

Établissement de l'inactivation transcriptionnelle du chromosome X pendant le développement embryonnaire

Elphège P. Nora et Edith Heard

Épigénèse et développement des mammifères, Institut Curie, CNRS UMR3215, INSERM 934, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

Auteur correspondant : Edith Heard, edith.heard@curie.fr

Reçu le 29 avril 2010

Résumé – L'inactivation du chromosome X est un modèle de choix pour étudier les mécanismes épigénétiques de contrôle de l'expression génique. Il est particulièrement remarquable que ce processus implique la mise en place et la maintenance d'un traitement différent entre les deux chromosomes X, pourtant présents au sein du même noyau cellulaire. L'acquisition du destin inactif du X repose sur l'expression du gène *Xist*, qui une fois activé produit un ARN non-codant capable de recouvrir le chromosome à partir duquel il est produit. L'activation monoallélique de *Xist* est finement contrôlée par une série de mécanismes régulateurs impliquant à la fois des facteurs protéiques et la réorganisation physique, dynamique, des séquences géniques entourant le locus *Xist* au sein du noyau. Une fois *Xist* exprimé sur l'un des deux X, celui-ci entraîne l'exclusion de la machinerie de transcription du territoire du chromosome qu'il recouvre et l'acquisition de marques hétérochromatiques. La répression transcriptionnelle progresse ensuite et s'accompagne de l'internalisation des séquences inactivées au sein du domaine nucléaire défini par l'accumulation de l'ARN *Xist*. Enfin, l'hétérogénéité dans la cinétique d'inactivation des différents gènes du chromosome X révèle l'existence de plusieurs voies amenant à la répression transcriptionnelle, et le rôle particulier des répétitions de type LINE-1 dans la propagation de l'inactivation le long du chromosome.

Mots clés : Inactivation du chromosome X / répression transcriptionnelle / organisation nucléaire

Abstract – Establishing transcriptional silencing of the X chromosome during early embryogenesis.

Early development of female mammals is accompanied by transcriptional inactivation of one of their two X chromosomes. This process, known as X-chromosome inactivation, relies on monoallelic activation of the *Xist* gene. *Xist* produces a non-coding RNA that can coat the chromosome from which it is transcribed *in cis* and trigger its silencing. How *Xist* expression is controlled and how it initiates transcriptional repression are central questions for our understanding of how this chromosome-wide monoallelic program is expressed. Several *trans*-acting factors have been identified as regulators of *Xist* expression. Interestingly, some *Xist* activators are encoded by the X chromosome itself, thereby efficiently promoting *Xist* expression in females (XX) but not in males (XY). Female cells also display transient physical pairing between their two X chromosomes at the level of their *Xics* (*X inactivation centers*) during the time window when X inactivation is initiated. It has been proposed that these pairing events may play a role in *Xist* activation and its monoallelic regulation. *Xist* RNA accumulates over the X chromosome from which it is expressed and rapidly triggers the exclusion of the transcription machinery. Genic sequences are initially located outside of this *Xist* RNA coated domain but as they become progressively silenced they are relocated into this silent nuclear compartment created by *Xist*. However genes are not all silenced with the same kinetics. Furthermore, some genes can escape X inactivation and remain located outside the *Xist*-coated compartment. Recent findings have

revealed that young, active LINE-1 retrotransposons are expressed from the inactive X chromosome and may facilitate X inactivation, particularly in regions of the X that would otherwise be prone to escape.

Key words: X chromosome inactivation / transcriptional silencing / nuclear organization

Introduction

Le développement embryonnaire précoce des mammifères femelles (XX) s'accompagne de l'inactivation transcriptionnelle de l'un de leurs deux chromosomes X, processus qui achève la compensation de dose vis-à-vis des mâles (XY).

Chez la souris, l'inactivation du chromosome X est mise en place à deux moments clés du développement précoce. Au stade préimplantatoire, lorsque l'embryon ne comporte encore que quatre cellules, l'inactivation est initiée de façon dite sous empreinte parentale car elle touche systématiquement le chromosome X paternel (Okamoto *et al.*, 2004). La répression transcriptionnelle du chromosome X paternel est ensuite maintenue jusqu'au stade blastocyste, où elle est spécifiquement levée dans les cellules de la masse cellulaire interne – qui formeront les tissus embryonnaires (Mak *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2004). Le chromosome X paternel reste inactif dans les cellules à l'origine des annexes extra-embryonnaires. Les cellules de la masse interne initient ensuite à nouveau l'inactivation du chromosome X, qui touche cette fois-ci aléatoirement le chromosome X d'origine maternelle ou paternelle (Mak *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2004). Une fois que l'état inactif de l'un ou l'autre des deux chromosomes X est spécifié dans les cellules des tissus embryonnaires, celui-ci est maintenu au cours des divisions cellulaires, si bien que les femelles adultes sont des mosaïques de populations cellulaires exprimant soit l'un soit l'autre de leurs deux chromosomes X (Lyon, 1961). Ce n'est que dans les précurseurs de cellules germinales, lors de la reprogrammation du génome, que la répression transcriptionnelle du chromosome X est à nouveau levée (Sugimoto & Abe, 2007). La dérivation de cellules souches embryonnaires (cellules ES) à partir de blastocystes permet la culture *ex vivo* de populations cellulaires ayant passé le stade de la réversion de l'inactivation sous empreinte mais n'ayant pas encore initié l'inactivation aléatoire. Les cellules ES femelles possèdent donc deux chromosomes X actifs. L'induction de leur différenciation s'accompagne de l'inactivation aléatoire de l'un de leurs chromosomes X, mimant la situation observée *in vivo* dans l'embryon.

Un locus complexe du chromosome X appelé *centre d'inactivation* (ou *Xic*) contient les séquences génétiques nécessaires et suffisantes pour orchestrer la

mise en place de l'inactivation (Rastan, 1983; Rastan & Robertson, 1985). Celle-ci repose sur le contrôle du gène *Xist* qui, une fois activé, produit un ARN non-codant capable de recouvrir le chromosome à partir duquel il est produit et de déclencher son inactivation (Brockdorff *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1991). Comprendre comment l'expression de *Xist* est contrôlée et comment la répression transcriptionnelle est établie sont donc deux questions centrales et sont le sujet du présent article.

Contrôle de l'initiation de l'inactivation

Plusieurs acteurs ont été impliqués dans la régulation de *Xist*. D'une part les facteurs de pluripotence Nanog et Oct4, exprimés seulement dans les cellules souches embryonnaires indifférenciées, répriment *Xist* et restreignent ainsi son expression au contexte de la cellule embryonnaire en cours de différenciation (Navarro *et al.*, 2008; Donohoe *et al.*, 2009). Si le mécanisme précis par lequel ces facteurs répriment *Xist* reste à préciser, il apparaît probable que celui-ci s'exerce à la fois directement sur *Xist* et sur ses régulateurs intermédiaires.

La simple observation que seules les cellules femelles (XX) déclenchent l'inactivation, à l'opposé des cellules mâles (XY) ou femelles (XO), suggère l'existence de facteurs activateurs de *Xist* produits par le chromosome X. Un de ces facteurs est la protéine Rnf12, encodée par un gène localisé dans le centre d'inactivation, et qui agit comme activateur dose-dépendant de *Xist* (Jonkers *et al.*, 2009). La délétion hétérozygote de ce gène retarde légèrement la mise en place de l'inactivation mais ne l'empêche cependant pas, suggérant l'existence d'autres facteurs activateurs de *Xist* liés au chromosome X (Jonkers *et al.*, 2009).

De manière intéressante, les deux allèles des centres d'inactivation sont capables d'entrer en contact physique au sein du noyau avant et pendant l'activation de *Xist* (Bacher *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006; Augui *et al.*, 2007; voir figure 1). Leur appariement n'est plus détecté dans les cellules différenciées, une fois l'inactivation établie. La rencontre des centres d'inactivation étant impossible en contexte mâle (XY), il a été proposé qu'elle soit impliquée dans le processus permettant à la cellule de détecter la présence de plusieurs chromosomes X

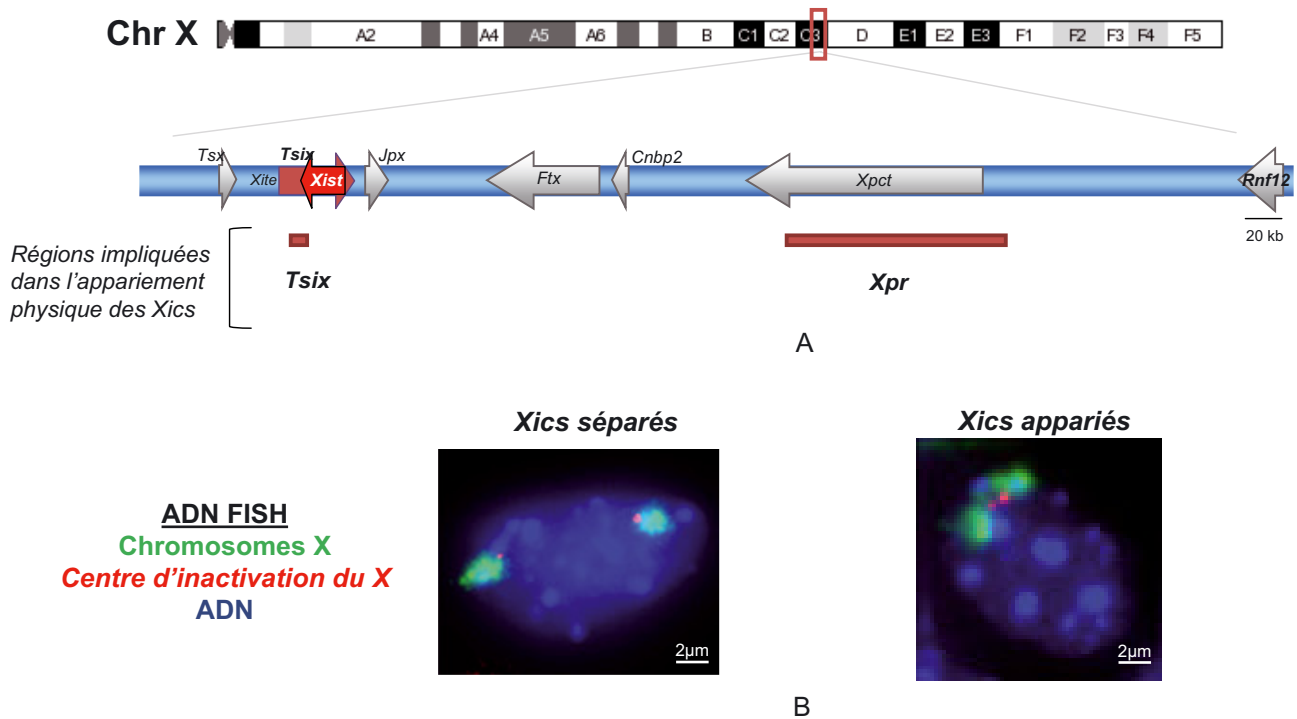


Fig. 1. Carte physique du centre d'inactivation (*Xic*). A. Le centre d'inactivation du chromosome X comporte le gène *Xist* (rouge) ainsi que plusieurs loci impliqués dans sa régulation. Le locus *Tsix* encode un transcrite anti-sens à *Xist* et le réprime. Situé à plus de 300 kb de *Xist*, le locus *Xpr* est capable d'engager des interactions physiques avec son allèle homologue sur l'autre chromosome X. Ces interactions précèdent dans le temps celles que *Tsix* est également capable d'établir, et ont toutes deux lieu lors de la phase d'activation de *Xist*. Enfin *Rnf12*, situé à 600 kb de *Xist*, encode une protéine capable de *trans*-activer *Xist*, mais dont le mécanisme d'action est encore inconnu. B. L'appariement des chromosomes X dans les cellules ES en cours de différenciation (détectés par hybridation *in situ* en fluorescence de l'ADN) se traduit par le rapprochement des territoires chromosomiques (vert) et l'interaction physique des centres d'inactivation (rouge).

(Marahrens, 1996). L'étude des différentes régions du centre d'inactivation a révélé seulement deux éléments capables de médier ces interactions : le locus *Xpr* et la région promotrice du gène *Tsix*, anti-sens à *Xist* (voir figure 1). Le locus *Xpr* possède la propriété de s'associer avec son homologue avant même la différenciation, tandis que le locus *Tsix* n'établit des associations *in trans* qu'une fois la différenciation déclenchée. L'observation de ces différences a mené à l'idée que la première étape de rencontre des centres d'inactivation *via Xpr* est associée à l'étape de reconnaissance de la diploïdie en chromosome X, tandis que la rencontre de la région *Tsix* gère l'activation monoallélique de *Xist* (Augui *et al.*, 2007). Ces hypothèses sont supportées par l'observation d'une expression asymétrique de *Xist* et *Tsix* entre les deux chromosomes après l'appariement *via* la région *Tsix* (Osamu Masui et Edith Heard, données non publiées).

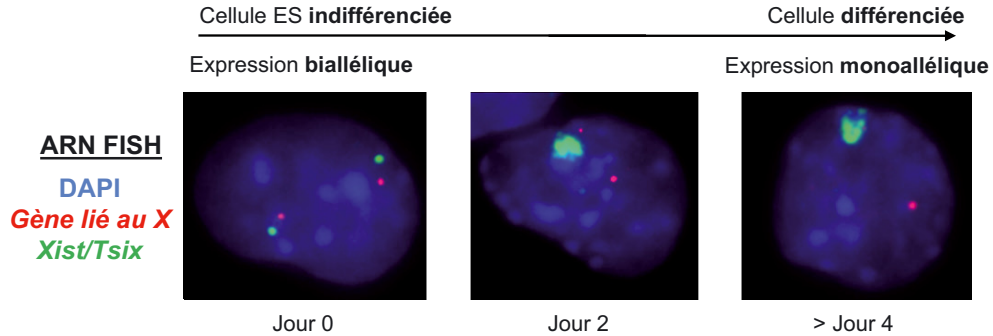
La mise en place de l'inactivation apparaît ainsi reposer sur de multiples voies de régulation, faisant intervenir à la fois des facteurs protéiques activateurs,

répresseurs, ainsi que des interactions physiques entre les centres d'inactivations au sein du noyau.

Mise en place de l'état inactif

Une fois *Xist* activé sur l'un des deux X, celui-ci produit un ARN non codant qui recouvre strictement *in cis* le chromosome à partir duquel il est transcrite. S'en suit la rapide exclusion de la machinerie de transcription du domaine nucléaire formé par *Xist*, ainsi que de nombreuses modifications de la chromatine (pour revue, Chow & Heard, 2009 ; voir figure 2). De manière surprenante, ce sont les séquences répétées (dites « fraction Cot-1 », comprenant la majorité des transposons et rétrotransposons) qui constituent initialement le compartiment silencieux recouvert par l'ARN *Xist*, au cœur du territoire du chromosome X (Chaumeil *et al.*, 2006 ; Clemson *et al.*, 2006). Juste après l'activation de *Xist*, les gènes portés par les séquences uniques sont encore actifs et localisés à la

A. Mise en place de l'expression monoallélique



B. Exclusion de la machinerie de transcription sur le X inactif

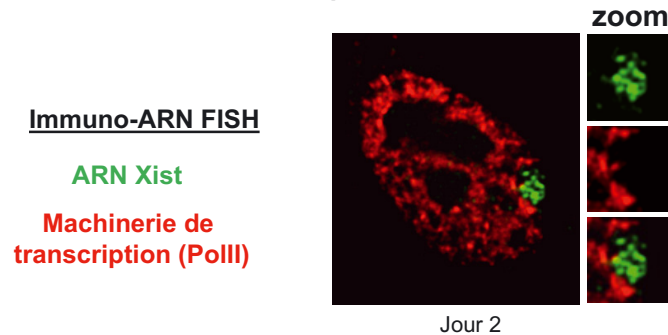


Fig. 2. Répression transcriptionnelle dans le domaine nucléaire formé par *Xist*. A. L'hybridation *in situ* en fluorescence de l'ARN permet de suivre l'expression de *Xist/Tsix* (vert) et d'un gène lié au X (rouge) avant, pendant et après la mise en place de l'inactivation dans les cellules ES. À l'état indifférencié, *Xist/Tsix* et les gènes du chromosome X sont exprimés à un niveau équivalent à partir de leurs deux allèles. La différenciation s'accompagne de l'activation monoallélique de *Xist*, dont l'ARN s'accumule alors *in cis*, et forme un domaine nucléaire distinct dont les gènes sont exclus. La répression transcriptionnelle de ces gènes est ensuite achevée, si bien que dans les cellules complètement différenciées un chromosome X exprime seulement *Xist*, alors que son homologue actif exprime, lui, les séquences géniques. B. Le compartiment nucléaire formé par *Xist* se distingue par l'exclusion totale de la machinerie transcriptionnelle, repérée ici par immunofluorescence contre la Polymérase II.

périphérie du territoire du chromosome X, encore au contact de la machinerie de transcription. La propagation de la répression transcriptionnelle aux séquences géniques est ensuite corrélée au recrutement de ces *loci* à l'intérieur du domaine recouvert par l'ARN *Xist*. De manière frappante, les quelques gènes connus pour échapper à l'inactivation ne sont pas relocalisés et restent ainsi à la périphérie ou à l'extérieur du compartiment formé par l'ARN *Xist* (voir modèle figure 3). Leur capacité à échapper à l'inactivation pourrait-elle ainsi être déterminée par la présence de séquences particulières permettant leur externalisation du compartiment nucléaire silencieux formé par *Xist*? Il est intéressant de noter que certaines mutations dans *Xist* peuvent abolir sa capacité à induire la répression génique (Wutz *et al.*, 2002). Certaines de ces mutations n'empêchent cependant pas la formation d'un compartiment nucléaire silencieux. Ce compartiment,

d'où est exclue la machinerie de transcription et où les marques hétérochromatiques sont enrichies, est cependant restreint à la fraction répétée du chromosome X (Wutz *et al.*, 2002). Dans cette situation, les gènes ne sont pas recrutés dans le domaine nucléaire formé par *Xist* et restent ainsi actifs (Chaumeil *et al.*, 2006). L'ARN *Xist* semble donc agir à plusieurs niveaux pour assurer la mise en place de l'inactivation, d'une part au niveau des séquences répétées et d'autre part au niveau des séquences géniques.

Propagation de l'état inactif

L'étude *in vivo* de la cinétique d'inactivation des gènes dans les embryons préimplantatoires a démontré une variabilité inattendue dans la rapidité avec laquelle les différents gènes du chromosome X sont réprimés

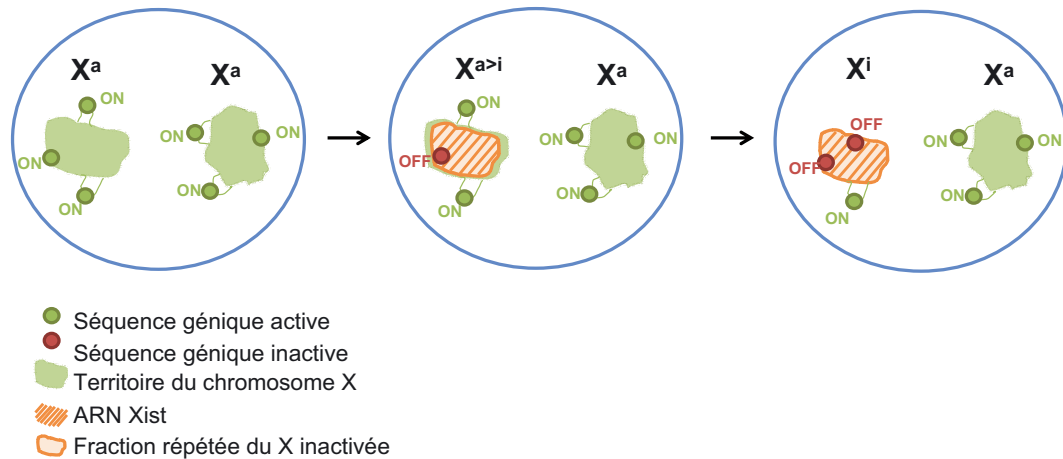


Fig. 3. Modèle de la réorganisation du chromosome X au cours de son inactivation. La mise en place de la répression transcriptionnelle du chromosome X n'est pas établie de façon synchrone le long du chromosome X. Les premiers loci à être inactivés sont les séquences répétées intergéniques, qui se coalescent au cœur du territoire chromosomique où l'ARN Xist s'accumule. À ce stade les séquences géniques, présentes à la périphérie du territoire au contact de la machinerie de transcription, sont toujours actives. Leur répression est ensuite corrélée à leur recrutement à l'intérieur du domaine nucléaire formé par l'ARN Xist.

(Patrat *et al.*, 2009). Si certains gènes sont rapidement inactivés, dès le stade huit cellules, d'autres ne sont pas réprimés avant le stade morula, voire même blastocyste tardif – alors que la réactivation a déjà eu lieu dans les cellules de la masse interne. Quels sont les facteurs déterminant la cinétique d'inactivation des différents *loci* du chromosome X ?

De manière intéressante, l'efficacité d'inactivation a été corrélée avec la présence d'un type d'élément répété particulier, les LINE-1. Ces rétrotransposons existent soit sous forme complète et active (ils ont alors appelés LINE-1 « jeunes », car ils ont peu divergé depuis leur dernière transposition), soit sous forme tronquée non mobilisable (les plus dérivés et donc généralement les plus anciens). Les éléments LINE-1 tronqués et entiers sont particulièrement enrichis sur le chromosome X, et en particulier dans les régions où les gènes sont inactivés le plus efficacement (Chow *et al.*, 2010).

Paradoxalement, l'analyse de l'environnement génomique des gènes capables d'échapper à l'inactivation révèle également un enrichissement en éléments LINE-1. Cependant cet enrichissement ne concerne que les LINE-1 entiers, et ceux-ci ne flanquent alors pas directement les gènes qui échappent à l'inactivation mais les séquences géniques voisines qui, elles, sont soumises à l'inactivation (Chow *et al.*, 2010). L'analyse de l'activité de ces LINE-1 entiers a révélé que ces éléments sont transitoirement sur-exprimés spécifiquement sur le chromosome X en cours d'inactivation, au stade où les derniers gènes à être inactivés commencent enfin à être réprimés (Chow *et al.*, 2010). Témoinnant ainsi des changements

chromatiniens particuliers ayant lieu sur le chromosome X en cours de répression, cette sur-activation des LINE-1 est également corrélée à l'apparition de petits ARN dans les régions géniques encore actives qui avoisinent ces LINE-1, suggérant de fait la mobilisation du mécanisme d'interférence-ARN (Chow *et al.*, 2010). Ces observations mettent là encore en évidence la diversité des mécanismes de répression transcriptionnelle des différents gènes portés par le X, et étayent l'idée selon laquelle les éléments LINE-1 seraient des facteurs favorisant la propagation de la répression transcriptionnelle le long du chromosome X (Lyon, 1998).

Conclusion

Il peut apparaître surprenant que l'acquisition du destin inactif de tout le chromosome X ne repose que sur l'activation d'un seul gène. Cependant la complexité du réseau de régulation qui converge sur *Xist* témoigne du contrôle raffiné de son expression. De manière surprenante, les influences régulatrices qui s'y exercent n'apparaissent pas seulement assurées par des facteurs de transcription, mais également par la capacité des chromosomes X à établir des interactions physiques entre eux *via* différentes régions génomiques encadrant le *locus Xist*. Une fois *Xist* activé, la mise en place de la répression transcriptionnelle fait à nouveau intervenir la plasticité de l'organisation topologique du chromosome X au sein du noyau : les séquences géniques sont progressivement internalisées dans le domaine nucléaire formé par l'ARN Xist au

fur et à mesure de leur inactivation. Les mécanismes contrôlant l'expression de *Xist* d'une part, et la propagation de la répression génique qu'il initie d'autre part, commencent ainsi à être déchiffrés. On ne comprend cependant pas bien comment ces deux phénomènes sont connectés, et la façon dont l'ARN *Xist* amorce la répression transcriptionnelle est totalement incomprise. Cet ARN étonnant est bien loin d'avoir livré tous ses mystères.

Références

- Augui S., Filion G.J., Huart S., Nora E., Guggiari M., Maresca M., Stuart A.F., Heard E., Sensing X chromosome pairs before X inactivation *via* a novel X-pairing region of the *Xic*. *Science*, 2007, 318, 1632.
- Bacher C.P., Guggiari M., Brors B., Augui S., Clerc P., Avner P., Eils R., Heard E., Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. *Nat Cell Biol*, 2006, 8, 293–299.
- Brockdorff N., Ashworth A., Kay G.F., Cooper P., Smith S., McCabe V.M., Norris D.P., Penny G.D., Patel D., Rastan S., Conservation of position and exclusive expression of mouse *Xist* from the inactive X chromosome. *Nature*, 1991, 351, 329–331.
- Brown C.J., Ballabio A., Rupert J.L., Lafreniere R.G., Grompe M., Tonlorenzi R., Willard H.F., A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*, 1991, 349, 38–44.
- Chaumeil J., Le Baccon P., Wutz A., Heard E., A novel role for *Xist* RNA in the formation of a repressive nuclear compartment into which genes are recruited when silenced. *Genes Dev*, 2006, 20, 2223–2237.
- Chow J., Heard E., X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 3, 359–366.
- Chow J.C., Ciaudo C., Fazzari M.J., Mise N., Servant N., Glass J.K., Attreed M., Avner P., Wutz A., Barillot E., Gready J.M., Voinnet O., Heard E., LINE1 activity in facultative heterochromatin formation during X-chromosome inactivation. *Cell*, 2010, 141, 956–969.
- Clemson C.M., Hall L.L., Byron M., McNeil J., Lawrence J.B., The X chromosome is organized into a gene-rich outer rim and an internal core containing silenced non-genic sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103, 7688–7693.
- Donohoe M.E., Silva S.S., Pinter S.F., Xu N., Lee J.T., The pluripotency factor Oct4 interacts with Ctf and also controls X-chromosome pairing and counting. *Nature*, 2009, 460, 128–132.
- Jonkers I., Barakat T.S., Achame E.M., Monkhorst K., Kenter A., Rentmeester E., Grosveld F., Grootegoed J.A., Gribnau J., RNF12 is an X-Encoded dose-dependent activator of X chromosome inactivation. *Cell*, 2009, 139, 999–1011.
- Lyon M.F., Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, 1961, 190, 372–373.
- Lyon M.F., X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Cell Genet*, 1998, 80, 133–137.
- Mak W., Nesterova T.B., de Napoles M., Appanah R., Yamanaka S., Otte A.P., Brockdorff N., Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science*, 2004, 303, 666–669.
- Marahrens Y., X-inactivation by chromosomal pairing events. *Genes Dev*, 1999, 13, 2624–2632.
- Navarro P., Chambers I., Karwacki-Neisius V., Chureau C., Morey C., Rougeulle C., Avner P., Molecular coupling of *Xist* regulation and pluripotency. *Science*, 2008, 321, 1693–1695.
- Okamoto I., Otte A.P., Allis C.D., Reinberg D., Heard E., Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*, 2004, 303, 644–649.
- Patrat C., Okamoto I., Diabangouaya P., Vialon V., Le Baccon P., Chow J., Heard E., Dynamic changes in paternal X-chromosome activity during imprinted X-chromosome inactivation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106, 5198–5203.
- Rastan S., Non-random X-chromosome inactivation in mouse X-autosome translocation embryos – location of the inactivation centre. *J Embryol Exp Morphol*, 1983, 78, 1–22.
- Rastan S., Robertson E.J., X-chromosome deletions in embryo-deleted (EK) cell lines associated with lack of X chromosome inactivation. *J Embryol Exp Morphol*, 1985, 90, 379–388.
- Sugimoto M., Abe K., X chromosome reactivation initiates in nascent primordial germ cells in mice. *PLoS Genet*, 2007, 3, e116.
- Wutz A., Rasmussen T.P., Jaenisch R., Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of *Xist* RNA. *Nat Genet*, 2002, 30, 167–174.
- Xu N., Tsai C.L., Lee J.T., Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. *Science*, 2006, 311, 1149–1155.