

Hérédité et épigénétique : un rôle inattendu pour l'ARN

Valérie GRANDJEAN, Minoo RASSOULZADEGAN

Université de Nice, INSERM U636 Parc Valrose, Nice

RESUME

L'hérédité mendélienne est la forme la plus classique de transmission génétique dont les lois furent découvertes par Gregor Mendel au XIX^e siècle. Bien qu'expliquant la transmission de la plupart des caractères, on observe que certains caractères ne suivent pas ce mode de transmission et qu'ils se transmettent à la descendance sans que la séquence nucléotidique du chromosome soit altérée. Par opposition à l'hérédité mendélienne, celle-ci est appelée hérédité non-mendélienne.

Elle met en jeu le plus souvent la transmission de modifications épigénétiques. L'exemple d'hérédité non-mendélienne ou hérédité épigénétique trans-générationnel le plus étudié est celui de la paramutation. Initialement mis en évidence chez les plantes et maintenant chez les mammifères comme la souris, la paramutation est une interaction entre deux allèles d'un locus. Dans la paramutation, un allèle d'une génération affecte d'une manière héréditaire l'expression de l'autre allèle dans la génération future, ceci même si l'allèle induisant ce changement n'est pas lui-même transmis.

Dans cette revue, nous décrivons un modèle de paramutation nouvellement décrit chez la souris où l'expression du gène *kit* est modulée par des variations épigénétiques. Contre toute attente, nous avons montré que l'information épigénétique transmise par le gamète mâle et le gamète femelle implique non pas les modifications épigénétiques classiques telles que la méthylation de l'ADN, la structure de la chromatine, mais les molécules d'ARN. Ainsi l'ADN ne serait pas le seul support de l'information héréditaire : l'ARN serait lui-aussi un vecteur important dans la transmission d'informations « épigénétiques ».

Mots clés : épigénétique, ARN, spermatozoïdes, souris

I. INTRODUCTION

1. Le code épigénétique

Les régulations épigénétiques jouent un rôle fondamental dans le contrôle de l'expression transcriptionnelle des gènes chez les organismes eucaryotes. Notamment ces dernières années, plusieurs analyses génétiques et moléculaires montrent que l'expression anormale de gènes impliqués soit dans le développement de cancers soit dans des maladies génétiques pouvait être le résultat d'altérations épigénétiques. Ainsi, l'inactivation de gènes ne s'avère pas être toujours associée à des mutations dans la séquence nucléotidique du gène mais peut survenir, dans certains cas, après des changements héréditaires de la molécule d'ADN (comme la méthylation) ou après des changements héréditaires de la structure de la chromatine [1, 20].

Si l'on considère l'ensemble du génome, les profils de méthylation de l'ADN ainsi que les profils de structure de la chromatine appelés par la suite code épigénétique, sont, en majorité, stables au cours du développement comme dans les tissus somatiques de l'adulte. Cependant, et ceci contrairement au code génétique, le code épigénétique n'est pas complètement figé. Ainsi dans de nombreux processus de différenciation, la chromatine et/ou l'état de méthylation de séquences promotrices de certains gènes sont complètement modifiés, changements qui permettent l'expression ou l'inactivation du gène en question. Il est donc primordial que ces marques soient complètement effacées dans les cellules totipotentes qui vont donner naissance à de nouveaux individus.

Deux périodes voient, ainsi, un remaniement draconien de ces structures : la période la plus précoce du développement embryonnaire (blastocyste avant implantation) et la

Correspondance :

Dr Valérie GRANDJEAN - Université de Nice, INSERM U636 Parc Valrose, 06100 Nice - Tel 04 92 07 64 09 - Fax 04 92 07 64 09 - Email grandjea@unice.fr

gamétogenèse. Ces périodes permettent une reprogrammation du génome des cellules germinales primordiales et des cellules les plus précoces du développement, leur assurant leur caractère totipotent, lequel est indispensable au développement d'un nouvel individu [19]. Néanmoins, et d'une manière tout à fait intéressante, de plus en plus de données tendent à montrer que toutes les marques épigénétiques ne sont pas complètement effacées entre les générations, de telles marques épigénétiques resteraient présentes aussi bien dans le gamète femelle que dans le gamète mâle.

2. Evidence de transmission de modifications épigénétiques chez l'Homme

En effet, il a été remarqué que des défauts dans la transmission d'informations épigénétiques pouvaient avoir des effets catastrophiques pour la descendance et même la survie de l'espèce. Si ce défaut n'est pas létal dans les étapes précoces du développement mais plus tard dans la vie adulte (formation de cancers entre autres), cette mutation ou plutôt épimutation est transmise aux descendants. Bien que les études chez l'Homme soient assez limitées, un nombre croissant d'entre elles tendent à montrer que certaines maladies humaines suivent ce mode d'hérédité où des épimutations induites au cours de la différenciation des cellules germinales sont transmises aux futures générations [8].

Notamment, plusieurs études indépendantes indiquent fortement que la nutrition pourrait induire de tels changements, à quelques loci. Point important à souligner, ces changements épigénétiques peuvent être transmis par l'intermédiaire des gamètes mâles.

D'autres analyses mettent en jeu des gènes régulés par l'empreinte génomique parentale où un défaut dans l'établissement de la marque épigénétique dans le gamète mâle ou femelle a des répercussions très graves chez les individus qui en héritent. L'équipe de Horsthemke a montré, ainsi, une association entre la présence d'épimutation, et non de mutation, dans le locus SNURF-SNRPN et une perte d'empreinte génomique chez les patients atteints du syndrome de Prader-Willi ou du syndrome d'Angelman. Sur les 19 patients informatifs, l'épimutation associée au syndrome de Prader-Willi était localisée sur le chromosome du père et du grand-père. Ceci signifie que le chromosome du père qui porte une marque épigénétique aberrante au locus SNURF-SNRPN est transmis par le grand-père. Une des explications donnée est un effacement incomplet de la marque maternelle dans les cellules germinales mâles [2].

L'ensemble de ces données convergent toutes vers la même idée (relativement nouvelle puisque pendant longtemps le génome des spermatozoïdes apparaissait comme une entité très compacte et « globalement » inerte) : le génome des spermatozoïdes est marqué par des modifications épigénétiques héréditaires indispensables au développement normal de l'embryon. La question qui se pose est de savoir quelles sont les modifications épigénétiques transmises par le gamète mâle. La méthylation de l'ADN et/ou la structure de la chromatine sont-elles les seules informations épigénétiques transmises par ce dernier ?

II. MODÈLE MURIN D'ANALYSE DE TRANSMISSION HÉRÉDITAIRE DE MARQUES ÉPIGÉNÉTIQUES : LA PARAMUTATION

Par définition, la paramutation est un mécanisme par lequel une modification épigénétique est induite sur un allèle quand l'autre est lui-même modifié. Une fois induite, cette modification épigénétique est transmise aux futures générations. Ce mécanisme fût décrit, il y a maintenant de nombreuses années, chez les plantes comme une interaction entre deux allèles [4]. Depuis, chez la souris, deux équipes ont décrit deux exemples d'interactions alléliques faisant intervenir la méthylation, qui se rapprochent de ce phénomène de paramutation [10, 17]. Néanmoins, des cas de paramutation où l'expression phénotypique d'un allèle est modifiée *via* son interaction avec un autre, n'avaient jamais été décrits chez les mammifères.

1. Paramutation dans le locus *kit*

Au cours de l'analyse du gène *c-kit* chez la souris, nous avons observé une claire dérive de la distribution mendélienne chez la descendance de croisements entre hétérozygotes de mutant insertionnel *c-kit-LacZ* où la cassette *LacZ* a été insérée par recombinaison homologue dans le premier exon du gène *c-kit* [18]. Ce gène code pour un récepteur à activité tyrosine kinase et joue un rôle critique dans plusieurs processus développementaux comme la différenciation des cellules germinales, la migration des mélanocytes et l'hématopoïèse. Les homozygotes portant cette mutation insertionnelle meurent juste après la naissance. Les hétérozygotes se caractérisent par des pattes blanches et des bouts de queues blancs (**Figure 1**).

Or, en croisant des hétérozygotes entre eux, nous avons pu observer que contrairement aux proportions attendues d'après les lois de Mendel, presque toute la descendance avait le phénotype «queue et pattes blanches» et ceci que leur génotype soit sauvage ou hétérozygote. Ainsi, le phénotype «queue et pattes blanches» est maintenu chez les descendants de génotype sauvage *Kit^{+/+}*. Les deux allèles sont pourtant structurellement normaux au niveau de la séquence nucléotidique, révélant ainsi un nouveau mode de mécanismes épigénétiques, appelés paramutation. Ce phénotype est transmissible aux futures générations. Point important à souligner, la transmission de la paramutation est aussi bien paternelle que maternelle.

La question posée fût alors de définir le mode de transmission de cette variation épigénétique. Deux types de modifications, susceptibles de modifier l'expression d'un gène, pouvaient intervenir : l'état de méthylation et la structure de la chromatine. Afin de déterminer si l'un ou l'autre de ces mécanismes était impliqué, l'état de méthylation du promoteur du gène *kit* ainsi que l'état de méthylation aux résidus de la lysine 4 et 9 des histones H3 ont été comparés entre les souris sauvages et paramutées. Ces analyses n'ont pas permis de déceler de différences notables entre l'allèle sauvage et modifié. Le problème principal avec ce type d'analyse (Southern blot, séquençage d'un ADN traité par le bisulfite et immuno-précipitation de la chromatine) est que seulement des régions limitées du gène *c-kit* peuvent être analysées. Or,

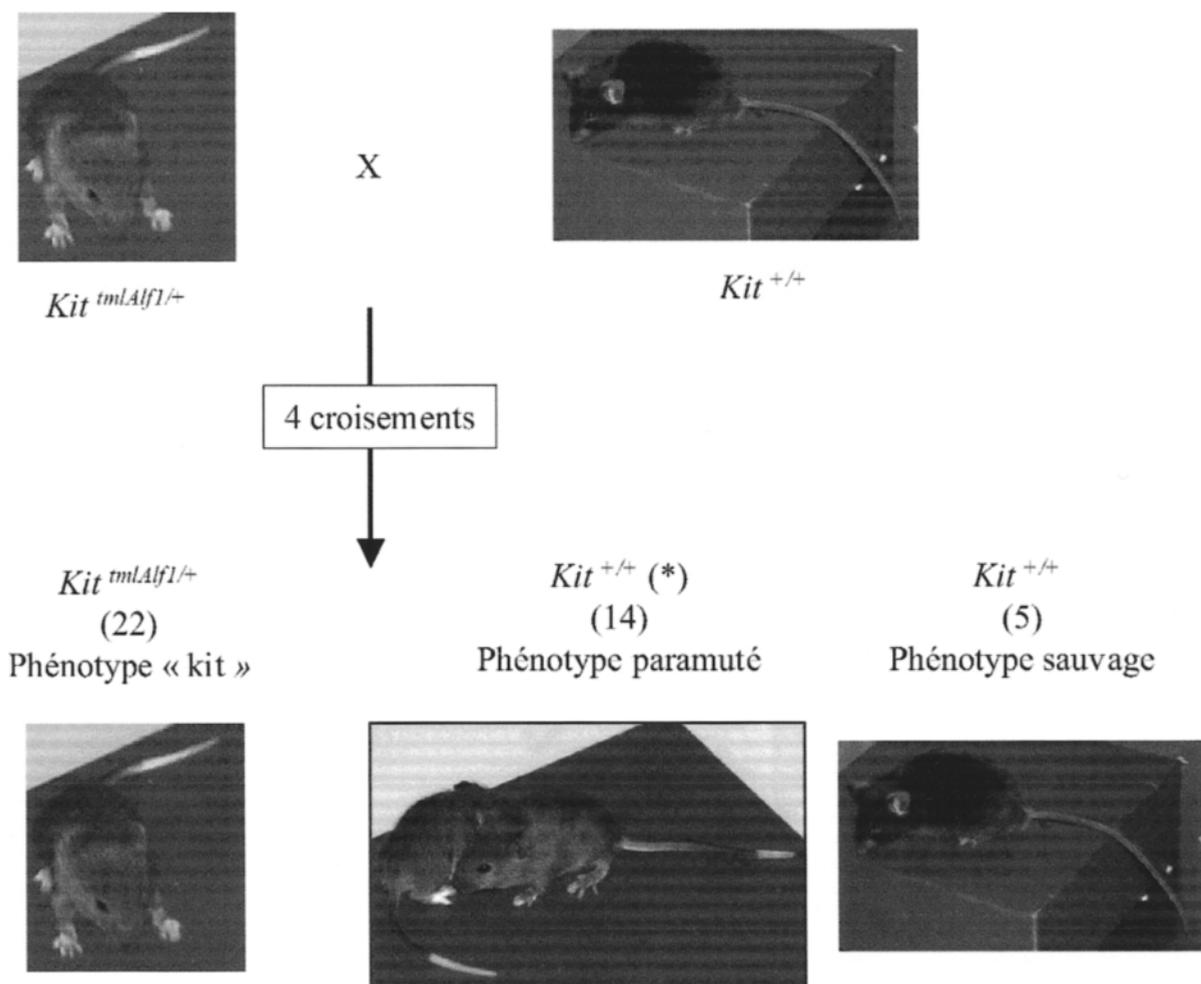


Figure 1 : Paramutation au locus *kit*.

Lorsque des souris hétérozygotes au locus *kit* (portant un allèle sauvage et un allèle mutant) sont croisées avec des souris homozygotes au locus *kit* (portant deux allèles sauvages), on s'attend à obtenir, d'après les lois de Mendel, 50% de souris avec un phénotype " *kit* " (bout de queue et pattes blanches) et 50% de souris avec un phénotype sauvage. Or on observe que près de 90% de la descendance ont un phénotype " *kit* ". Après génotypage des souris, il s'avère que la moitié de ces souris au phénotype " *kit* " possède un génotype sauvage. Ces souris sont alors appelées " souris paramutées " et sont notées *Kit^{+/+}* (*). Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'animaux analysés issus de 4 croisements indépendants

les analyses réalisées chez les plantes où cette même régulation a été observée montrent que l'élément régulateur peut se trouver à 100kb du promoteur du gène étudié [5].

2. ARN et micro-RNA : un vecteur d'informations épigénétiques

Plusieurs résultats indépendants indiquent fortement que l'information qui provoque une distorsion entre génotype et phénotype chez les descendants de croisements entre parents hétérozygotes serait, en fait, portée par l'ARN. Tout d'abord, l'expression du gène *Kit* est dérégulée dans les étapes tardives de la spermatogenèse puisqu'il existe une accumulation de transcrits anormaux dans les spermatides et les spermatozoïdes, transcrits qui proviennent soit de la dégradation d'ARN messager du gène *kit* soit de la maturation anormale de ces transcrits. Afin de déterminer si ces ARN

étaient potentiellement capables de transférer l'information épigénétique aux générations futures, des ARN extraits de tissus somatiques ou de spermatozoïdes d'animaux mutants ont été injectés dans des œufs fécondés. Fait remarquable, l'injection d'ARN qui avait montré induire des changements héréditaires chez *Caenorhabditis elegans* était également très efficace chez la souris. En effet, 40 à 50% des souris dérivant des embryons injectés montraient le phénotype « pattes et queues blanches » caractéristique d'un changement d'expression du gène *kit* (Figure 2) [18].

Ces dernières années, de nombreuses analyses montrent que la production d'une protéine peut être diminuée par des petits ARN non codant d'environ 22 nucléotides, appelés micro-RNA, ceci soit par inhibition de la traduction de la protéine soit par dégradation de l'ARN messager [9, 21]. Chez la souris, deux micro-RNA ont été identifiés *in silico* comme ciblant le

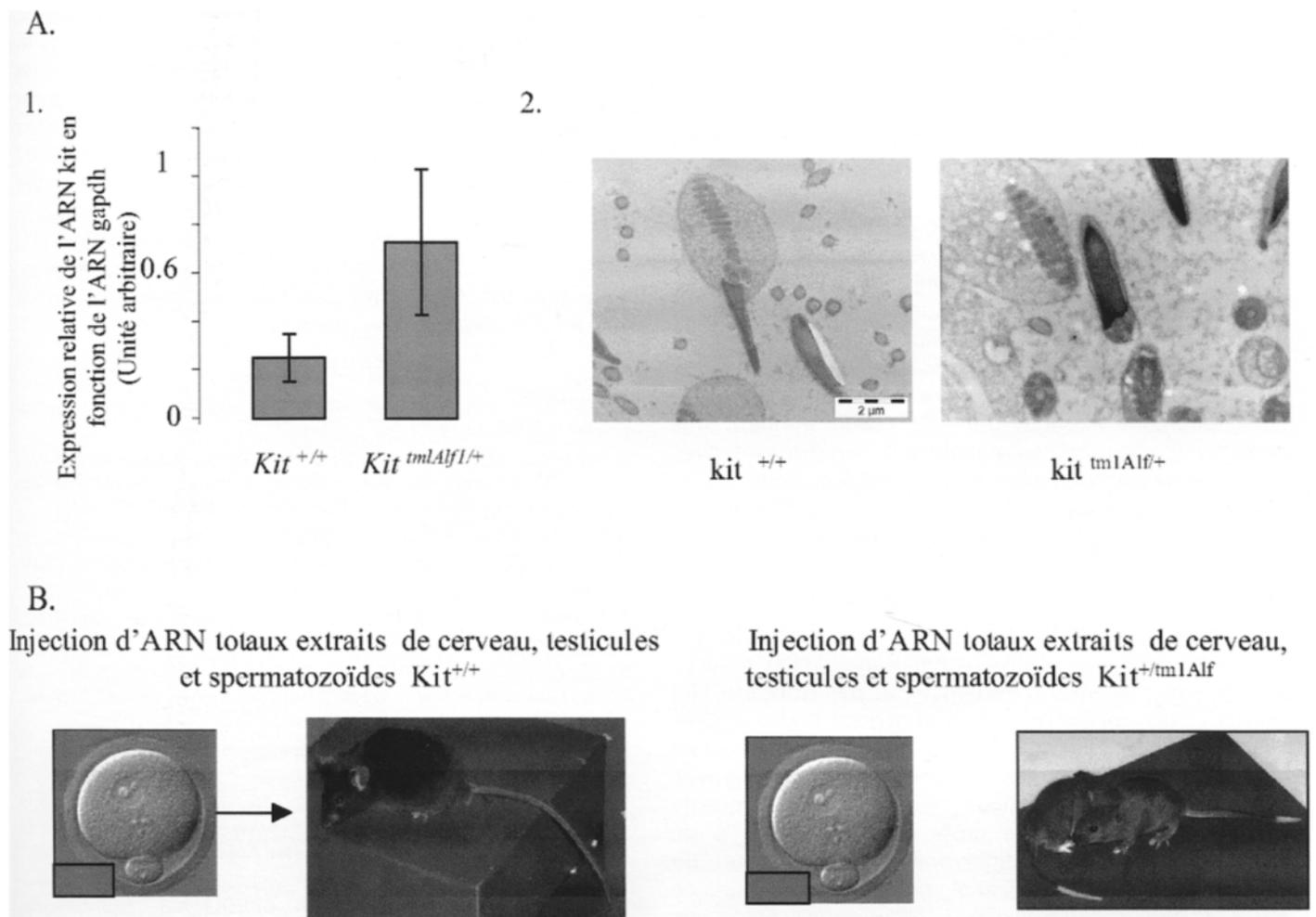


Figure 2 : L'ARN est impliqué dans la paramutation.

A. Présence de formes anormales d'ARN dans la tête du spermatozoïde. 1. Détermination quantitative par la technique de RT-PCR de l'ARN *kit* présent dans les spermatozoïdes de souris $Kit^{+/+}$ et $Kit^{+/tm1Alf}$ rapporté à l'ARN *Gapdh*. 2. Coloration par la technique régressive à l'EDTA. L'ARN apparaît plus contrasté que l'ADN sur les images de microscopie électronique. B. Induction du phénotype paramutant après injection d'ARN totaux extraits soit de cerveaux, de testicules ou de spermatozoïdes $Kit^{+/tm1Alf}$.

gène *kit*. Ce sont les micro-RNA 221 et 222, communément appelés miR-221 et miR-222 [7, 12]. Nous nous sommes demandés si l'injection de ces deux micro-RNA dans des œufs fécondés pouvait avoir le même effet que l'injection d'ARN totaux. L'expérience montre que c'est bien le cas. Les souris issues d'œufs fécondés injectés avec les micro-RNA miR-221 et miR-222 ont le phénotype « pattes et queues blanches ».

Ces résultats montrent que contre toute attente, l'ARN est un des acteurs de cette transmission. Néanmoins, de nombreuses questions restent en suspens. Notamment par quel mécanisme ces ARN modifient-ils l'expression génique ? Le gène *kit* est-il le seul gène dont l'expression puisse être modifiée par l'action des ARN ?

3. Quels sont les mécanismes moléculaires mis en jeu ?

Nos résultats montrent que l'injection de micro-RNA ou d'ARN extraits de souris hétérozygotes pour la mutation *kit* dans l'œuf fécondé induisent une modification épigénétique transmissible à la descendance. Sachant que les micro-RNA sont capables de diminuer la production de protéines soit en inhibant la traduction de la protéine soit en dégradant l'ARN messager, nous nous sommes demandés si la micro-injection de micro-ARN dans l'œuf modifiait l'expression du micro-ARN chez l'adulte. Nos analyses par les techniques de Northern blot et de transcription reverse de micro-ARN (RT-PCR), ont montré que ce n'était pas le cas, indiquant que les micro-ARN induisent une modification épigénétique sur les gènes cibles, modifications qui restent à identifier.

4. Le gène kit n'est pas le seul gène dont l'expression peut être modifiée par l'injection de micro RNA dans l'œuf fécondé

L'observation que l'injection des micro-ARN miR-221 et miR-222 induisait des changements épigénétiques transmissibles à la descendance, nous a conduit à nous poser la question de savoir si d'autres variations phénotypiques pouvaient être induites par l'injection d'autres micro-ARN. Pour cela, d'autres micro-RNA ont été injectés dans l'œuf fécondé et les souris descendantes de ces œufs micro-injectés ont été analysées phénotypiquement. Les descendants d'œufs injectés soit avec le miR-124, très largement exprimé dans le cerveau et qui possède de nombreuses cibles intervenant dans le contrôle de la prolifération cellulaire [13], soit avec le miR-1, spécifiquement exprimé dans le cœur, donnent des phénotypes tout à fait remarquables [7, 12]. En effet, avec beaucoup de surprises, nous nous sommes aperçus que les souris descendantes des embryons micro-injectés avec le miR-124 montraient une augmentation de la masse corporelle de 30 à 40%.

Nous avons, également, observé que les mâles atteignaient leur maturité sexuelle 10 jours avant les mâles témoins. Nos premières analyses réalisées par transcription reverse quantitative des ARN (Q-RT-PCR) et par Northern blot indiquent fortement que l'expression d'un gène, cible potentielle du micro-RNA 124, serait modifiée [Grandjean et al., en préparation]. Concernant les embryons micro-injectés avec le miR-1, ceux-ci montrent une hypertrophie concentrique de la paroi ventriculaire du cœur qui serait due à un agrandissement des cardiomyocytes initié au cours de l'embryogenèse [Wagner K et al., en préparation]. Dans ce cas, c'est l'expression d'un gène impliqué dans le processus d'élargissement cellulaire dans le cœur normal, qui est affectée. Très important et comme dans le cas du modèle «kit», ces phénotypes sont transmis à la descendance d'une manière plus ou moins atténuée.

III. PERSPECTIVES

Cette découverte, à savoir que l'ARN porté par le spermatozoïde régule l'expression d'un certain nombre de gènes par des voies épigénétiques et que cette régulation est transmissible aux générations *via* des modes non génomiques est, sans aucun doute, très importante tant sur le plan fondamental que sur le plan appliqué. Cela met en évidence un nouveau mode de transmission par le gamète mâle *via* l'ARN.

Du point de vue fondamental, cette découverte pose la question de savoir comment un ARN provenant du spermatozoïde injecté dans l'œuf fécondé agit sur le patrimoine épigénétique et/ou génétique présent dans l'oocyte. Bien que cette question soit loin d'être élucidée, une des hypothèses serait que ces petits ARN agiraient sur la mise en place des profils de modification épigénétique qui sont, comme nous l'avons vu précédemment, très dynamiques dans l'œuf. Cette hypothèse est confortée par de récentes et moins récentes données indiquant la capacité des petits ARN à diriger la méthylation et la compaction de la chromatine sur des régions données dans le génome de cellules humaines (pour revue voir [6]).

Sur le plan plus appliqué, on peut se poser la question de l'impact de l'ARN présent dans le spermatozoïde dans le développement chez l'Homme. Une chose est sûre, plusieurs analyses indépendantes le montrent, le spermatozoïde humain contient une quantité non négligeable d'ARN [14, 16]. Des analyses récentes ont montré que le profil d'expression d'ARN pouvait être différent entre l'homme fertile et l'homme infertile [3]. Quel est le rôle de cet ARN dans la fécondation, dans la transmission de maladies génétiques ou «épigénétique» [11, 15] ? Autant de questions qui demeurent encore sans réponse. Une chose est sûre, l'ARN présent dans le spermatozoïde n'a pas encore révélé tout ses secrets.

RÉFÉRENCES

1. BIRD A. : DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.*, 2002, 16 : 6-21.
2. BUITING K., GROSS S., LICH C. et al. : Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes : a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am. J. Hum. Genet.*, 2003, 72 : 571-577.
3. CARREAU S., LAMBARD S., SAID L. et al. : RNA dynamics of fertile and infertile spermatozoa. *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, 35 : 634-636.
4. CHANDLER V.L. : Paramutation : from maize to mice. *Cell*, 2007, 128 : 641-645.
5. CHANDLER V.L., STAM M., SIDORENKO L.V. : Long-distance cis and trans interactions mediate paramutation. *Adv. Genet.*, 2002, 46 : 215-234.
6. COSTA F.F. : Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. *Gene*, 2008, sous presse.
7. FELLI N., FONTANA L., PELOSI E. et al. : MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2005, 102 : 18081-18086.
8. GLUCKMAN P.D., HANSON M.A., BEEDLE A.S. : Non-genomic transgenerational inheritance of disease risk. *Bioessays*, 2007, 29 : 145-154.
9. GROSSHANS H., SLACK F.J. : Micro-RNAs : small is plentiful. *J. Cell. Biol.*, 2002, 156 : 17-21.
10. HERMAN H., LU M., ANGGRAIN M. et al. : Trans allele methylation and paramutation-like effects in mice. *Nat. Genet.*, 2003, 34, 199-202.
11. KRAWETZ S.A. : Paternal contribution : new insights and future challenges. *Nat. Rev. Genet.*, 2005, 6, 633-642.
12. LEWIS B.P., SHIH I.H., JONES-RHOADES M.W. et al. : Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 2003, 115 : 787-798.
13. MAKEYEV E.V., ZHANG J., CARRASCO M.A., MANIATIS T. et al. : The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol. Cell*, 2007, 27 : 435-448.
14. MARTINS R.P., KRAWETZ S.A. : RNA in human sperm. *Asian J. Androl.*, 2005, 7 : 115-120.
15. MILLER D., OSTERMEIER G.C., KRAWETZ S.A. : The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol. Med.*, 2005, 11 : 156-163.
16. OSTERMEIER G.C., DIX D.J., MILLER D. et al. : Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet*, 2002, 360 : 772-777.
17. RASSOULZADEGAN M., MAGLIANO M., CUZIN F. : Transvection effects involving DNA methylation during meiosis in the mouse. *EMBO J.*, 2002, 21 : 440-450.
18. RASSOULZADEGAN M., GRANDJEAN V., GOUNON P. et al. : RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature*, 2006, 441 : 469-474.
19. SANTOS F., DEAN W. : Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction*, 2004, 127 : 643-651.

20. WOLFFE A. : Chromatin-Structure and function. London, Academic Press, 1995.
21. ZENG Y. : Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene*, 2006, 25 : 6156-6162.
-

Manuscrit reçu : février 2008 ; accepté mars 2008.

Communication présentée lors du XXIVème Congrès de la SALF, Colmar décembre 2007.

ABSTRACT

Heredity and epigenetics: an unexpected role of RNA

Valérie GRANDJEAN, Mino RASSOULZADEGAN

Although Mendel's first laws explain the transmission of most characteristics, there has recently been a renewed interest in the notion that DNA is not the sole determinant of our inherited phenotype.

Human epidemiology studies and animal and plant genetic studies have provided evidence that epigenetic information ("epigenetic" describes an inherited effect on chromosome or gene function that is not accompanied by any alteration of the nucleotide sequence) can be inherited from parents to offspring.

Most of the mechanisms involved in epigenetic "memory" are paramutation events, which are heritable epigenetic changes in the phenotype of a "paramutable" allele. Initially demonstrated in plants, paramutation is defined as an interaction between two alleles of a single locus that results in heritable changes of one allele that is induced by the other.

The authors describe an unexpected example of paramutation in the mouse revealed by a recent analysis of an epigenetic variation modulating expression of the *Kit* locus. The progeny of heterozygote intercrosses (carrying one mutant and one wild-type allele) showed persistence of the white patches (characteristic of heterozygotes) in the homozygous *Kit*^{+/+} progeny. The DNA sequences of the two wild-type alleles were structurally normal, revealing an epigenetic modification. Further investigations showed that RNA and microRNA, released by sperm, mediate this epigenetic inheritance.

The molecular mechanisms involved in this unexpected mode of inheritance and the role of RNA molecules in the spermatozoon head as possible vectors for the hereditary transfer of such modifications - implying that paternal inheritance is not limited to just one haploid copy of the genome - are still a matter of debate. Paramutations may be considered to be one possibility of epigenetic modification in the case of familial disease predispositions not fully explained by Mendelian analysis.

Key words : *epigenetics, RNA, spermatozoa, mouse*