

Mécanisme d'instabilité des minisatellites

Les génomes eucaryotes contiennent de nombreuses séquences répétées en tandem que l'on peut classer en trois grandes catégories suivant la longueur des unités répétées. Dans l'ordre décroissant, sans que les frontières soient toujours bien définies, on distingue les séquences satellites, minisatellites et microsatellites. Les séquences « satellites », localisées le plus souvent dans les régions hétérochromatiques proches des centromères, peuvent recouvrir plusieurs mégabases. A l'autre extrême, les microsatellites sont répartis de façon régulière le long des chromosomes et correspondent aux répétitions de 1 à 4 nucléotides dont la longueur totale dépasse rarement quelques dizaines de nucléotides. Intermédiaires en taille, les séquences minisatellites sont constituées de répétitions de 10 à 100 paires de bases qui ne sont pas nécessairement identiques entre elles. La longueur totale des minisatellites varie suivant les locus entre 0,5 et 500 kb [1]. Les minisatellites les plus longs sont généralement localisés dans les régions sous-télomériques des chromosomes tandis que les minisatellites interstitiels ont une longueur qui excède rarement 1 kb. Sur le chromosome 22, dont la séquence vient d'être publiée [2], les trois catégories de séquences répétées en tandem sont présentes et distribuées suivant les caractéristiques décrites ci-dessus, suggérant ainsi que le chromosome 22 est représentatif de l'ensemble du génome. Au total, le chromosome 22 contient environ 2 361 séquences microsatellites (di-, tri-, tétra- et penta-nucléotides) couvrant environ 200 kb. Les minisatellites (classés sous la rubrique *other tandem*) sont moins nombreux (305) mais couvrent néanmoins 100 kb environ.

Une caractéristique remarquable de certains minisatellites est leur polymorphisme dans la population humaine. Cette propriété permet de

distinguer chaque individu (à l'exception des vrais jumeaux) et est à l'origine du développement des empreintes génétiques au cours des années 1980. Le polymorphisme résulte de mutations qui modifient le nombre de répétitions élémentaires. Pour certains minisatellites, ce taux de mutation est très élevé et peut atteindre plus de 95 % dans la population humaine. C'est le cas du minisatellite CEB1 qui mute à un taux de 13 % dans la lignée germinale paternelle [3]. Au niveau fonctionnel, la question du rôle biologique des minisatellites s'est longtemps posée. Bien que le nombre d'études sur ce sujet reste encore très restreint, il apparaît aujourd'hui que certains minisatellites peuvent régler ou modifier l'activité transcriptionnelle de gènes voisins et ainsi être, dans certains cas, impliqués dans des maladies. Les exemples les mieux documentés concernent les minisatellites situés à proximité des gènes de l'insuline, de la cystatine B et de l'oncogène *H-Ras1*, dont certains allèles sont associés, respectivement, à une susceptibilité accrue de développer un diabète insulino-dépendant, à l'épilepsie myoclonique progressive de type I et à un risque accru de développer certains cancers [4-6]. Également en relation avec leur instabilité, les minisatellites sont aussi des indicateurs potentiels d'exposition aux agents génotoxiques. Une étude récente sur l'effet mutagène de l'exposition chronique à de faibles doses de rayonnements a montré que le taux de mutation des minisatellites instables dans la lignée germinale était significativement augmenté chez les populations humaines vivant dans les régions contaminées après l'accident nucléaire de Tchernobyl ([7, 8] et *m/s* 1996, n° 6-7, p. 811).

Au niveau mécanistique, les analyses réalisées chez l'homme ont montré que l'instabilité des minisatellites était probablement méiotique, car les indi-

vidus mosaïques pour un allèle minisatellite sont très rares, ce qui indique que le taux d'instabilité dans les cellules somatiques est faible. De plus, l'analyse précise de la composition en motifs des allèles réarrangés (grâce à la méthode de MVR-PCR : *mapping - variant - repeats - polymerase - chain - reaction*) [3] a montré que les réarrangements des minisatellites ressemblaient à des événements de conversion génique sans échange des marqueurs flanquants. Ces deux observations ont conduit à l'hypothèse selon laquelle l'instabilité des minisatellites dans la lignée germinale pourrait résulter d'un mécanisme de recombinaison. Aussi, l'accumulation récente des connaissances sur les mécanismes et le contrôle de la recombinaison méiotique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* [9, 10], nous a-t-elle conduit à développer un système-modèle d'étude de l'instabilité du minisatellite humain CEB1 [11].

Dans un premier temps, pour développer ce modèle levure, nous avons choisi deux allèles de taille différente (de 0,6 et 1,8 kb avec un motif unitaire de 37 à 43 paires de bases) du minisatellite humain CEB1 que nous avons introduit, par recombinaison homologue, au niveau du gène *ARG4* à proximité des sites de cassures double-brin qui initient la recombinaison méiotique dans cette région du chromosome VIII. Puis, nous avons examiné les changements de taille des allèles minisatellites par *Southern blot* à partir de l'ADN extrait de cellules individuelles. Comme chez l'homme, nous avons observé une faible instabilité du minisatellite dans les cellules en croissance mitotique, et une augmentation d'un facteur cent environ dans la descendance des cellules méiotiques. Les réarrangements observés sont de tailles variées et correspondent à environ 13 % d'expansions et 87 % de contractions. Ces augmentations et ces diminutions de taille sont,

comme chez l'homme, des gains ou des pertes de motifs du minisatellite. Nous avons ensuite typé les réarrangements par la technique de MVR-PCR qui permet, grâce au polymorphisme des répétitions, de déterminer de manière précise la structure interne des allèles minisatellites, puis d'en déduire leur origine moléculaire en les comparant aux allèles parentaux. Nous avons constaté l'existence chez la levure, comme chez l'homme, d'événements intra-alléliques (75 % ; échange d'information génétique intramoléculaire ou entre chromatides sœurs) et inter-alléliques (25 % ; échange d'information entre les deux chromosomes homologues) à l'origine des nouveaux allèles (figure 1). Les résultats de cette analyse mettent en évidence une instabilité des allèles de CEB1 dans la levure suivant des modalités semblables à celles qui sont observées chez l'homme, et suggèrent que la levure *S. cerevisiae* est un bon modèle expérimental pour analyser les mécanismes moléculaires à l'origine de cette instabilité.

Dans un second temps, ce système modèle levure nous a permis de définir les modalités de l'instabilité méiotique de CEB1. Nous avons observé que CEB1 est instable en méiose seulement lorsqu'il est inséré dans une région où la recombinaison méiotique est naturellement élevée, mais qu'il reste stable lorsqu'il est inséré dans une autre région du génome où la recombinaison méiotique est très rare. De plus, CEB1 demeure stable en méiose également lorsque les gènes indispensables à la formation des cassures méiotiques initiateuses de la recombinaison, comme *SPO11* et *RAD50*, sont délétés. En conclusion, il apparaît donc que l'instabilité de CEB1 dans la levure dépend de la présence de cassures double-brin de l'ADN qui se situent à proximité du minisatellite. Cet effet de position indique que le minisatellite CEB1 ne contient pas les propriétés intrinsèques pour induire son instabilité mais que ce sont les cassures double-brin, initiateuses de la recombinaison méiotique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui stimulent l'instabilité.

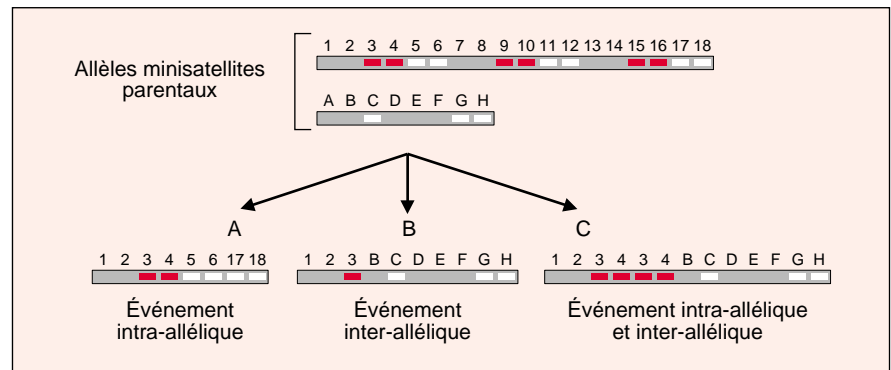


Figure 1. **Exemples de réarrangements survenus au niveau de la répétition minisatellite après les divisions méiotiques dans la levure.** Chaque motif minisatellite est représenté par un rectangle. Les polymorphismes entre les différents motifs composant le minisatellite sont schématisés par les différentes couleurs des rectangles (gris, blanc ou rouge). Les motifs du premier allèle minisatellite parental sont numérotés de 1 à 18 et ceux du second allèle parental sont notés de A à H. À l'issue de la méiose, plusieurs types d'événements sont obtenus. **A.** Événements intra-alléliques. L'exemple schématisé correspond à une déletion intra-allélique des motifs 7 à 16. **B.** Événements inter-alléliques. L'exemple schématisé correspond à une fusion des motifs 1 à 3 du premier allèle parental avec les motifs B à H du second allèle parental. **C.** Événements complexes. L'exemple schématisé correspond à un événement intra-allélique avec une duplication des motifs 3 et 4 du premier allèle parental et un événement inter-allélique où les motifs 1 à 4 du premier allèle parental sont joints aux motifs B à H du second allèle parental.

Pour tester si les gènes *MSH2* et *PMS1* impliqués dans la correction des mauvais appariements de bases et dans la stabilité des séquences répétées mono- et dinucléotidiques [12] intervenaient aussi dans le processus d'instabilité des minisatellites, nous avons examiné l'instabilité des allèles CEB1 dans des souches mutantes *msh2 pms1*. Nous avons constaté que le taux de réarrangement n'était pas affecté dans ces souches mais que, contrairement à la souche sauvage, environ 50 % des colonies issues d'un seul produit de méiose étaient hétérogènes et contenaient deux allèles réarrangés du minisatellite parental. Ce phénomène de « ségrégation postméiotique » traduit la formation, au cours de la méiose, de molécules d'ADN hétéroduplexe au niveau du minisatellite contenant des mésappariements de motifs qui ne sont pas corrigés. Ces intermédiaires sont appelés des « ADN hétéroduplexes réarrangés ».

En conclusion, l'ensemble des résultats que nous avons obtenus chez la levure suggère que l'instabilité des séquences minisatellites pendant la méiose résulte de la formation de cassures double-brin de l'ADN au niveau de sites d'initiation de la recombinaison homologue situés à proximité du minisatellite, suivie d'un événement de réarrangement proprement dit qui se produit lorsque les intermédiaires de réparation par recombinaison chevauchent le minisatellite [11]. La conservation de ce mécanisme chez l'homme signifierait que les minisatellites humains instables marquent la présence d'un site d'initiation de la recombinaison méiotique dans leur voisinage, et que l'instabilité des minisatellites doit dépendre des gènes intervenant dans l'initiation de la recombinaison, comme le gène *SPO11*, dont l'homologue humain vient d'être identifié [13]. Par ailleurs, il reste à déterminer les modalités de l'instabilité mitotique

des minisatellites. En effet, de nouveaux allèles minisatellites peuvent apparaître dans des lignées lymphoblastoïdes et dans certaines lignées tumorales. Ces événements somatiques sont caractérisés par de simples délétions ou duplications de motifs. Ils ne proviennent probablement pas du même processus que les événements ayant eu lieu dans la lignée germinale, qui donnent lieu à des réarrangements beaucoup plus complexes [14]. Le modèle de la levure devrait permettre de caractériser le (ou les) mécanisme(s) possibles d'instabilité des minisatellites dans les cellules en croissance végétative.

1. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable « minisatellite » regions in human DNA. *Nature* 1985 ; 314 : 67-73.
2. Dunham I, Shimizu N, Roe BA, Chissole S, et al. The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* 1999 ; 402 : 489-95.
3. Buard J, Vergnaud G. Complex recombination events at the hypermutable minisatellite CEB1 (D2S90). *EMBO J* 1994 ; 13 : 3203-10.
4. Bennett ST, Lucassen AM, Gough SCL, et al. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet* 1995 ; 9 : 284-92.

5. Krontiris TG, Devlin B, Karp DD, Robert NJ, Risch N. An association between the risk of cancer and mutations in the HRAS1 minisatellite locus. *N Engl J Med* 1993 ; 329 : 517-23.
6. Lalioti MD, Scott HS, Buresi C, et al. Dodecamer repeat expansion in cystatinB gene in progressive myoclonus epilepsy. *Nature* 1997 ; 386 : 847-51.
7. Dubrova YE, Nesterov VN, Krouchinsky NG, et al. Human minisatellite mutation rate after the Chernobyl accident. *Nature* 1996 ; 380 : 683-6.
8. Dubrova YE, Nesterov VN, Krouchinsky NG, et al. Further evidence for elevated human minisatellite mutation rate in Belarus eight years after the Chernobyl accident. *Mutat Res* 1997 ; 381 : 267-78.
9. Smith KN, Nicolas A. Recombination at work for meiosis. *Curr Opin Genet Devel* 1998 ; 8 : 200-11.
10. Mézard C, Baudat F, Debrauwère H, et al. Mechanisms and controls of meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Soc Biol* 1999 ; 193 : 23-7.
11. Debrauwère H, Buard J, Tessier J, Aubert D, Vergnaud G, Nicolas A. Meiotic instability of human minisatellite CEB1 in yeast requires DNA double-strand breaks. *Nat Genet* 1999 ; 23 : 367-71.
12. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Devel* 1999 ; 9 : 89-96.
13. Romanienko PJ, Camerini-Otero RD. Cloning, characterization, and localization of mouse and human SPO11. *Genomics* 1999 ; 61 : 156-69.
14. Jeffreys AJ, Neumann R. Somatic mutation processes at a human minisatellite. *Hum Mol Genet* 1997 ; 6 : 129-36.

Hélène Debrauwère
Alain Nicolas

Laboratoire de génétique moléculaire de la recombinaison, UMR144, Cnrs, Institut Curie, Section de recherche, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France.

Gilles Vergnaud

Institut de génétique et de microbiologie, Bâtiment 400, Centre Universitaire Paris Sud, 91000 Orsay, France.

Jérôme Buard

Séquences Répétées et Centromères Humains, Institut de Biologie, Cnrs UPR 1142, 4, boulevard Henri-IV, 34060 Montpellier, France.

Jacques Tessier
Dominique Aubert

CHU Hôtel-Dieu, 30, boulevard Jean-Monnet, BP 1005, 44035 Nantes Cedex 1, France.