

## Sans *Tsix*, les mâles aussi inactif leur chromosome X

Sébastien Vigneau, Philippe Clerc

Unité Génétique Moléculaire Murine, CNRS URA 2578,  
Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux,  
75724 Paris Cedex 15, France.

[pclerc@pasteur.fr](mailto:pclerc@pasteur.fr)

[svigneau@pasteur.fr](mailto:svigneau@pasteur.fr)

> Chez les femelles de mammifères, chaque cellule somatique de l'individu adulte exprime les gènes portés par un seul des deux chromosomes X. Le second chromosome X est maintenu transcriptionnellement inactif par un mécanisme épigénétique complexe appelé inactivation du chromosome X (→). Cette inactivation permet la compensation de dose des gènes liés au chromosome X entre les sexes, en assurant un niveau d'expression équivalent de ces gènes chez les femelles (XX) et les mâles (XY). Les tissus de l'adulte dérivent de l'épiblaste, formé dans l'embryon au moment de l'implantation, environ 5 jours et demi après la fécondation chez la souris. L'inacti-

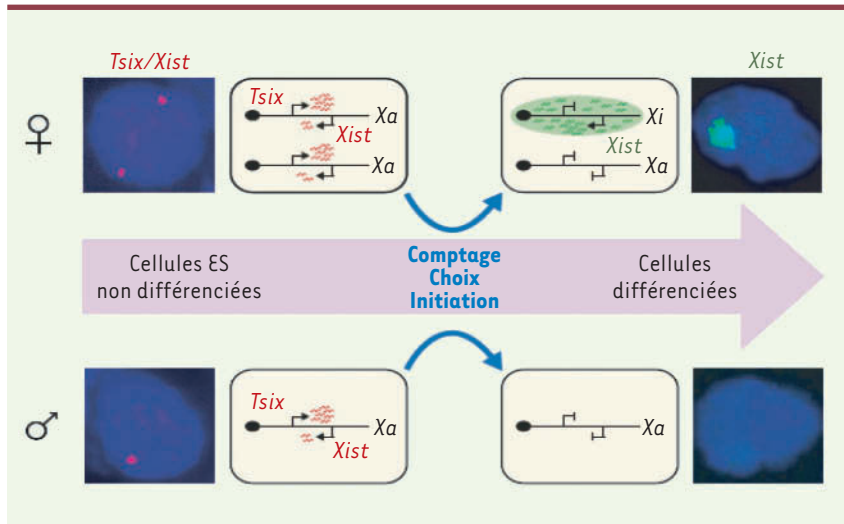
(→) m/s 2006,  
n° 11, p. 910

vation aléatoire de l'un ou l'autre des chromosomes X est initiée de manière indépendante dans chaque cellule de l'épiblaste de l'embryon femelle, au moment où elles s'engagent dans les voies de différenciation contemporaines à la gastrulation. Une fois établie, l'inactivation est transmise de manière stable lors des divisions mitotiques, ce qui aboutit à un individu adulte femelle mosaïque pour l'expression des gènes du chromosome X.

Les cellules souches embryonnaires (cellules ES) constituent un modèle de choix pour l'étude de l'inactivation du chromosome X (Figure 1). Elles dérivent de la masse cellulaire interne des blastocystes, tissu précurseur de l'épiblaste où n'a pas encore eu lieu l'inactivation

aléatoire du chromosome X. La même séquence d'événements aboutissant à l'inactivation de l'un des deux chromosomes X dans l'embryon femelle est observée dans des cellules ES femelles après différenciation *in vitro*. De plus, aussi bien dans l'embryon mâle que dans les cellules ES mâles, l'inactivation de l'unique chromosome X n'est jamais observée. En effet, un unique chromosome X par complément diploïde d'autosomes est toujours maintenu actif, du fait d'un mécanisme de comptage évaluant le rapport entre le nombre de chromosomes X et le nombre d'autosomes. Chez les femelles, un mécanisme additionnel de choix permet de décider aléatoirement quel chromosome X sera inactivé ou maintenu actif dans chaque cellule. À l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires du choix et du comptage restent encore à définir.

L'inactivation du chromosome X requiert son recouvrement par un ARN non codant, *Xist*, qui recrute des facteurs aboutissant à l'hétérochromatinisation du chromosome. Le gène *Xist* est localisé dans une région du chromosome X, le centre d'inactivation du chromosome X, nécessaire et suffisante pour diriger le processus d'inactivation. Chez la souris, l'expression de *Xist* est réprimée par un ARN non codant antisens, *Tsix*. Chez les femelles, l'absence d'expression de *Tsix* sur un allèle conduit à l'inactivation systématique du chromosome déficient, démontrant l'implication de ce gène dans le mécanisme de choix (pour revue, voir [1]). En revanche, la participation de *Tsix* dans le processus de comptage restait sujette à débat, sur la base d'observations suggérant que *Tsix* n'est pas néces-



**Figure 1. L'inactivation du chromosome X met en jeu les ARN non codants *Xist* et *Tsix*.** L'expression de *Xist* et de *Tsix* est ici visualisée par RNA-FISH dans des cellules souches ES murines. Dans les cellules indifférenciées aussi bien mâles que femelles, les chromosomes X sont actifs ( $X_a$ ), *Tsix* est fortement exprimé et *Xist* est très faiblement exprimé. En cours de différenciation, l'expression de *Tsix* est perdue et une forte expression de *Xist* est observée sur l'un des deux chromosomes X dans les cellules femelles (pour revue, voir [2]).

saire au maintien de l'état actif chez les mâles (pour revue, voir [2]). Il a toutefois été établi par des approches délétionnelles qu'un ou plusieurs éléments requis pour le comptage sont présents dans une région de 37 kb immédiatement en 3' de *Xist* [3]. Cette région inclut la partie 5' de *Tsix*, dans laquelle sont situés un homologue de l'activateur de transcription du récepteur pré-T, et deux minisatellites constitués de répétitions de 17 pb pour l'un et 34 pb pour l'autre.

### L'invalidation de *Tsix* conduit à l'inactivation de l'unique chromosome X de cellules ES mâles différenciées

Dans le but d'identifier les éléments de comptage contenus dans la région candidate située en 3' de *Xist*, une série de délétions ( $\Delta$ AJ,  $\Delta$ AS et  $\Delta$ AV) ciblant ces éléments a été réalisée dans des cellules ES murines mâles (Figure 2) [4]. Les délétions  $\Delta$ AJ et  $\Delta$ AS, ciblant le premier minisatellite et la région d'homologie, ne conduisent pas à une inactivation ectopique chez les mâles et permettent d'exclure ces deux éléments d'une fonction

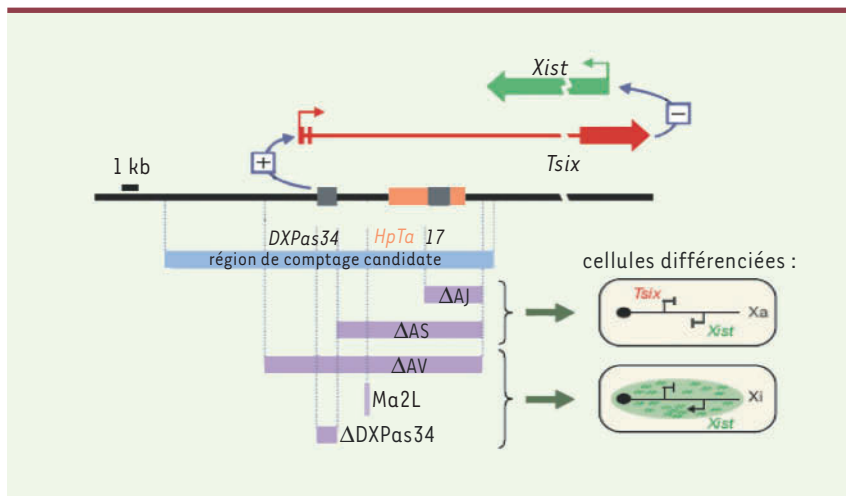
de comptage. Au contraire, la délétion  $\Delta$ AV, qui supprime le second minisatellite, appelé *DXPas34*, ainsi que le promoteur de *Tsix*, a pour effet de conduire de manière très efficace à l'inactivation inappropriée du chromosome X. Les cellules porteuses d'un chromosome X inactif sont détectables, par hybridation *in situ* en fluorescence (*RNA-FISH*) de l'ARN *Xist* ou par immunofluorescence pour l'histone 3 triméthylé sur la lysine 27, dans les phases précoces de la différenciation. Elles disparaissent ensuite du fait de la nullisomie pour les gènes du chromosome X. L'insertion d'un signal d'arrêt de transcription au début du gène *Tsix* (lignée Ma2L [5]) produit le même effet, suggérant que la transcription de *Tsix* est requise pour empêcher le déclenchement inapproprié de l'inactivation dans les cellules mâles et participe donc de manière essentielle au processus de comptage. L'absence de *Tsix* a ainsi des conséquences similaires en *cis* chez les mâles et les femelles, ce qui affaiblit les arguments en faveur de mécanismes de régulation de l'inactivation différents dans les deux sexes dont, notamment, l'existence d'un

facteur de compétence spécifique aux cellules femelles.

### Le minisatellite *DXPas34* est essentiel au contrôle transcriptionnel de *Tsix*

Compte tenu de l'importance et de la multiplicité des fonctions de *Tsix*, il est essentiel de comprendre comment ce gène est régulé au cours du développement. Le minisatellite *DXPas34* (pour revue, voir [2]), situé à proximité du promoteur de *Tsix*, est inclus dans un îlot riche en CpG méthylés différenciellement selon l'état actif ou inactif du chromosome X, et peut être associé aux facteurs CTCF et YY1 [6], de manière similaire aux centres régulateurs des gènes soumis à empreinte parentale. La délétion ciblée de *DXPas34* dans des cellules ES murines mâles [4] conduit à une diminution de 90 % de l'expression de *Tsix* dans les cellules non différenciées. De plus, une réduction importante de l'association de la machinerie de transcription au promoteur de *Tsix* est observée, ce qui démontre le rôle joué par *DXPas34* dans la régulation au niveau transcriptionnel de l'expression de *Tsix*. Enfin, la suppression partielle de *Tsix* résultant de la délétion de *DXPas34* est associée en cours de différenciation à l'inactivation inappropriée de l'unique chromosome X dans un nombre modéré de cellules. Ce résultat contraste cependant avec le phénotype plus marqué observé lorsque l'expression de *Tsix* est presque complètement abolie, dans les lignées  $\Delta$ AV et Ma2L.

Si l'on considère l'ensemble des lignées mutantes, il apparaît que l'expression du gène *Xist* est directement couplée au niveau d'expression résiduelle de *Tsix*, aussi bien avant qu'en cours de différenciation. Cela suggère qu'une régulation précise de *Tsix* au cours du développement contrôle le processus d'inactivation du chromosome X. L'implication de mécanismes reposant sur des interactions d'ARN sens et antisens n'a pour l'instant pas été démontrée. En revanche, le contrôle de *Xist* par *Tsix* semble mettre en jeu le remodelage de la chromatine à l'échelle du locus et au promoteur de *Xist*, et la répression de *Xist* aux niveaux transcriptionnels et post-transcriptionnels



**Figure 2. Caractérisation d'éléments participant au comptage par une approche délétionnelle en 3' de *Xist*.** La fonction des différents éléments contenus dans la région candidate de comptage a été étudiée dans des cellules souches embryonnaires murines mâles au moyen de délétions (lignées  $\Delta$ AJ,  $\Delta$ AS,  $\Delta$ AV et  $\Delta$ DXPas34) représentées par des barres pleines mauves, ainsi que par l'insertion d'un signal d'arrêt de transcription, figuré par une barre verticale. Les phénotypes des différentes lignées après différenciation *in vitro* sont représentés à droite. L'ensemble des observations supporte la conclusion que *Tsix* est impliqué dans la répression de l'inactivation dans les cellules mâles [4].

[7-9]. La fonction du bloc d'ADN répété *DXPas34* reste, quant à elle, pour l'essentiel, à définir. Outre la régulation directe du promoteur de *Tsix*, on peut envisager une fonction de barrière vis-à-vis d'un régulateur de *Tsix*, ou un rôle dans la conformation tridimensionnelle de la chromatine, notamment via la formation de boucles. L'association à des mécanismes de type ARNi spécifiques a été également montrée pour certains éléments répétés en tandem [10]. L'étude de *DXPas34* pourrait ainsi contribuer à mieux comprendre la fonction des éléments répétés dans les génomes des mammifères. ♦

## Without *Tsix*, male X chromosome is inactivated

### RÉFÉRENCES

1. Clerc P, Avner P. Random X-chromosome inactivation: skewing lessons for mice and men. *Curr Opin Genet Dev* 2006 ; 16 : 246-53.
2. Rougeulle C, Avner P. The role of antisense transcription in the regulation of X-inactivation. *Curr Top Dev Biol* 2004 ; 63 : 61-89.
3. Morey C, Navarro P, Debrand E, et al. The region 3' to *Xist* mediates X chromosome counting and H3 Lys-4 dimethylation within the *Xist* gene. *EMBO J* 2004 ; 23 : 594-604.
4. Vigneau S, Augui S, Navarro P, et al. An essential role for the *DXPas34* tandem repeat and *Tsix* transcription in the counting process of X chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 7390-5.
5. Luikenhuis S, Wutz A, Jaenisch R. Antisense transcription through the *Xist* locus mediates *Tsix* function in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2001 ; 21 : 8512-20.
6. Do Kim J, Hinz AK, Bergmann A, et al. Identification of clustered YY1 binding sites in imprinting control regions. *Genome Res* 2006 ; 16 : 901-11.
7. Navarro P, Pichard S, Ciaudo C, et al. *Tsix* transcription across the *Xist* gene alters chromatin conformation without affecting *Xist* transcription: implications for X-chromosome inactivation. *Genes Dev* 2005 ; 19 : 1474-84.
8. Sado T, Hoki Y, Sasaki H. *Tsix* silences *Xist* through modification of chromatin structure. *Dev Cell* 2005 ; 9 : 159-65.
9. Sun BK, Deaton AM, Lee JT. A transient heterochromatic state in *Xist* preempts X inactivation choice without RNA stabilization. *Mol Cell* 2006 ; 21 : 617-28.
10. Lippman Z, Gendrel AV, Black M, et al. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 2004 ; 430 : 471-6.

## NOUVELLE



**Le tissu adipeux  
Monsieur Hyde Obésité et Docteur Jekyll  
Médecine régénérative**

Christian Dani, Louis Casteilla

► Au cours de ces dernières années, le statut du tissu adipeux blanc a évolué, passant de celui d'un simple organe de stockage dont l'excès de développement est cause d'obésité et des maladies métaboliques qui lui sont associées, à celui d'un véritable tissu endocrine jouant un rôle essentiel dans de nombreuses réponses physiologiques de l'organisme. Beaucoup plus récemment, plusieurs laboratoires, dont les nôtres, ont révélé que le tissu adipeux est une source de cellules aux propriétés étonnantes parmi lesquelles des cellules souches. C'est ce dernier point que nous allons discuter. Nous avons montré, dans des travaux antérieurs à l'engouement du tissu adipeux comme source de cellules souches, que le préadipocyte, défini comme le précurseur capable de se différencier en adipocyte, possédait des activités de phagocytose, propriété que l'on pensait restreinte aux seuls macrophages, et que l'injection de la fraction stromale (SVF) du tissu adipeux permettait la reconstitution du système

hématopoïétique d'une souris irradiée [1]. Plus récemment a été démontrée la présence au sein du tissu adipeux de populations de cellules capables de se différencier *ex vivo* en divers types cellulaires, ostéoblastes, chondroblastes, cellules endothéliales et myocytes et, de manière encore plus inattendue, cardiomyocytes [2-4]. L'analyse phénotypique par cytométrie en flux de la SVF révèle la présence de multiples progéniteurs engagés dans différentes voies de différenciation [5]. Enfin, nous avons identifié de vraies cellules souches multipotentes dans des échantillons de SVF obtenus à partir de déchets opératoires de tissu adipeux de jeunes enfants. Ces cellules, nommées hMADS (*human multipotent adipose derived stem*), possèdent une forte capacité d'autorenouvellement et peuvent, à l'état clonal, se différencier en plusieurs types cellulaires [4]. L'ensemble des résultats démontre que la fraction stromale du tissu adipeux contient un gradient de cellules progénitrices ayant différentes

C. Dani : UMR 6543 CNRS-  
Université Nice Sophia-Antipolis,  
Institut Signalisation,  
Biologie du Développement et Cancer,  
Centre de Biochimie, 06108 Nice, France.  
L. Casteilla : UMR 5018 CNRS-UPS, IFR 31,  
Institut Louis Bugnard, BP 84225,  
31432 Toulouse Cedex 4, France.  
[dani@unice.fr](mailto:dani@unice.fr)  
[casteil@toulouse.inserm.fr](mailto:casteil@toulouse.inserm.fr)

potentialités de différenciation. Nous proposons de définir une hiérarchie de populations cellulaires du tissu adipeux selon une terminologie comparable à celle qui est utilisée pour classer les progéniteurs de la moelle osseuse : ADSC-AFU (*adipose derived stroma cell-adipocyte forming unit*), ADSC-OFU (*adipose derived stroma cell-osteoblast forming unit*) désignent des progéniteurs de potentialité restreinte, ADSC-AOFU (*adipose derived stroma cell-osteoblast-adipocyte forming unit*) des progéniteurs bipotents..., les cellules hMADS étant les cellules souches multipotentes immatures (Figure 1). Outre les questions fondamentales posées par la présence de cellules souches du (et dans le) tissu adipeux, ces observations ont un intérêt thérapeutique certain. En effet, contrairement aux autres organes à partir desquels des cellules souches sont isolées (comme la moelle osseuse,