

Epigénétique et implication en AMP

Y. Le Bouc^{1,2}, S. Rossignol^{1,2}, C. Gicquel³

¹ APHP, Hôpital d'Enfants Armand-Trousseau, Explorations Fonctionnelles Endocriniennes, 75012 Paris ; ² UPMC Paris 6-INSERM U938, France;

³ Baker Medical Research Institute, Australia

Les mécanismes épigénétiques jouent un rôle capital dans la régulation de l'expression des gènes. Une des marques de ces mécanismes épigénétiques est représentée par la méthylation de l'ADN des résidus dinucléotidiques CpG au niveau notamment des promoteurs, des régions DMR et centres d'empreinte (ICR : imprinting center region). L'empreinte parentale encore appelée empreinte génomique est une situation particulière d'épigénétique avec des méthylations spécifiques d'un des deux allèles parentaux qui résulte en une expression monoallélique d'un gène dépendant ainsi de l'origine parentale. Il existe deux périodes critiques pour la programmation épigénétique de cette empreinte : la gamétogénèse et le développement post-zygotique préimplantatoire.

Cette programmation prend place dans les cellules germinales dans laquelle l'empreinte venant de chaque parent est d'abord effacée et la totipotence restaurée (1). Les marques de l'empreinte sont ensuite établies de nouveau lors de la spermatogénèse et l'ovogénèse mais vont dépendre du sexe du fœtus (1-3). Lors de la fécondation, une vague de déméthylation générale du génome va avoir lieu qui sera suivie d'une vague de méthylation de novo, mais ces vagues vont épargner les loci soumis à l'empreinte qui auront été déterminés dans les cellules germinales male et femelle (4). Ces profils épigénétiques sont fidèlement maintenus durant le développement. Cependant cette apposition ou cette maintenance d'empreinte fait parfois défaut résultant en des profils anormaux induisant des pathologies humaines, notamment des anomalies de la croissance fœtale : croissance excessive telle que dans le syndrome de Beckwith Wiedemann (BWS) ou retard de croissance intra utérin tel que le syndrome de Silver Russell (SRS). Il s'agit dans ces cas de perturbations de l'empreinte au niveau de la région chromosomique 11p15 (5-7). Pour le BWS, ont été mises en évidence des pertes de méthylation de l'allèle d'origine maternelle au niveau du centre d'empreinte ICR2 (60%) ou un gain de méthylation de l'allèle maternel au niveau d'ICR1, soit isolé (10%) soit due à une isodisomie paternelle de la région dans 25% des cas (schéma). Pour le SRS il s'agit d'une perte de méthylation de l'ICR1 paternel.

L'embryogénèse précoce est une période critique pour la régulation épigénétique et peut donc être sensible à des facteurs environnementaux.

Des études relativement récentes suggèrent que l'Aide Médicale à la Procréation (AMP) pourrait être responsable d'anomalies de la croissance et du développement fœtal (8-11). Ces pathologies impliquant des anomalies épigénétiques (et plus particulièrement de l'empreinte parentale) ont été rapportées chez les animaux ou les humains concernés par ces techniques d'AMP. Ceci inclus les syndromes de croissance excessive chez les ovins et les bovins : large offspring syndrome (LOS) et chez les humains les syndromes BWS et d'Angelman (AS) mais aussi comme montrés dernièrement les patients présentant un syndrome SRS. La fréquence d'enfants conçus à l'aide de l'AMP dans les populations de BWS ou de SRS était en effet augmentée (12-13). Dans les premières études l'épimutation (pour désigner l'anomalie épigénétique) impliquait toujours une perte de méthylation de l'allèle d'origine maternelle : perte de méthylation d'ICR2 de la région 11p15 dans les BWS, de l'ICR de *SNRPN* dans les AS et du *DMR2* du gène de l'*IGF-2R* dans les LOS. Il a été montré par contre qu'il s'agissait

d'une perte de méthylation de l'allèle ICR1 d'origine paternelle, dans le cas du SRS. (7,12-15).

Ces données suggèrent que les procédures d'AMP pourraient interférer avec les mécanismes de mise en place ou de maintien des marques épigénétiques, en particulier dans les régions du génome soumises à empreinte parentale, lors de gamétogénèse et de la période post-fécondation préimplantatoire.

La (les) cause(s) de ces anomalies épigénétiques d'empreinte qui suivent l'AMP, le type d'infertilité, l'hyperstimulation hormonale, la fertilisation in vitro, l'exposition au milieu de culture, la maturation ovocytaire in vitro, l'injection intra cytoplasmique de spermatozoïdes, les micromanipulations des gamètes, la congélation, le temps de transfert, restent peu claires et les études n'impliquent pas une procédure plus qu'une autre.

Des analyses récentes ont montré que chez les patients BWS ou SRS incluant ceux issus de l'AMP, sont impliquées en plus des anomalies de la région 11p15 d'autres loci soumis à l'empreinte : sites de liaison du facteur CTCF à ICR1, DMR de H19 et d'IGF 2, KCNQ1OT1 (ICR2), SNRPN(15q11-13), Peg/Mest1 (7q31), récepteur IGF type 2 (6q26) ZAC1 (6q24) DLK1/GTL2-IG-DMR (14q32) et le locus GNAS (20q13.3) (14-15).

Ceci suggère que le manque de fidélité dans la maintenance des marques de méthylation de l'ADN suivant la fertilisation implique une dysrégulation d'un facteur régulateur agissant en *trans* dont l'expression ou l'action seraient altérées par l'AMP.

Des études prospectives et à long terme de larges cohortes d'enfants nés après AMP sont donc nécessaires pour évaluer clairement ces risques.

Références

1. Reik, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* (2007) 447, 425-32.
2. Lucifero, D., Mann, M.R., Bartolomei, M.S. Trasler, J.M. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* (2004) 13, 839-49.
3. Delaval, K. Feil, R. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* (2004) 14, 188-95.
4. Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W. Reik, W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* (2005) 14 Spec No 1, R47-58.
5. Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, Houang M, Steunou V, Barbu V, Danton F, Thibaud N, Le Merrer M, Burglen L, Bertrand AM, Netchine I, Le Bouc Y. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet* (2005) 37, 1003-7.
6. Gaston V, Le Bouc Y, Soupre V, Burglen L, Donadieu J, Oro H, Audry G, Vazquez MP, Gicquel C. Analysis of the methylation status of the KCNQ1OT and H19 genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* (2001) 9, 409-18.

7- Netchine I, Rossignol S, Dufourg MN, Azzi S, Rousseau A, Perin L, Houang M, Steunou V, Esteva B, Thibaud N, Raux Demay MC, Danton F, Petriczko E, Bertrand AM, Heinrichs C, Carel JC, Loeuille GA, Pinto G, Jacquemont ML, Gicquel C, Cabrol S, Le Bouc Y. 1p15 ICR1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver Syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. *J Clin Endocrinol Metab.* (2007) 92(8):3148-54. Epub 2007 May 15.

8. Doherty, A.S., Mann, M.R., Tremblay, K.D., Bartolomei, M.S. Schultz, R.M. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* (2000) 62, 1526-35.

9. Khosla, S., Dean, W., Brown, D., Reik, W. Feil, R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod* (2001) 64, 918-26.

10. Mann MR, Lee SS, Doherty AS, Verona RI, Nolen LD, Schultz RM, Bartolomei MS. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development* (2004) 131, 3727-35.

11. Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut I, Sinclair KD. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* (2001) 27, 153-4.

12. Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN1OT gene. *Am J Hum Genet* (2003) 72, 1338-41.

13. Arnaud, P. Feil, R. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in human disorders and following assisted reproduction. *Birth Defects Res C Embryo Today* (2005) 75, 81-97.

14. Rossignol S, Steunou V, Chalas C, Kerjean A, Rigolet M, Viegas-Pequignot E, Jouannet P, Le Bouc Y, Gicquel C. The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region. *J Med Genet* (2006) 43, 902-7.

15- Azzi S, Rossignol S, Steunou V, Sas T, Thibaud N, Danton F, Le Jule M, Heinrichs C, Cabrol S, Gicquel C, Le Bouc Y, Netchine I. (2009). Multilocus methylation analysis in a large cohort of 11p15-related foetal growth disorders (Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes) reveals simultaneous loss of methylation at paternal and maternal imprinted loci. *Hum Mol Genet.* (2009) Dec 15;18(24):4724-33. Epub 2009 Sep 14.

Schéma de la région chromosomique 11p15

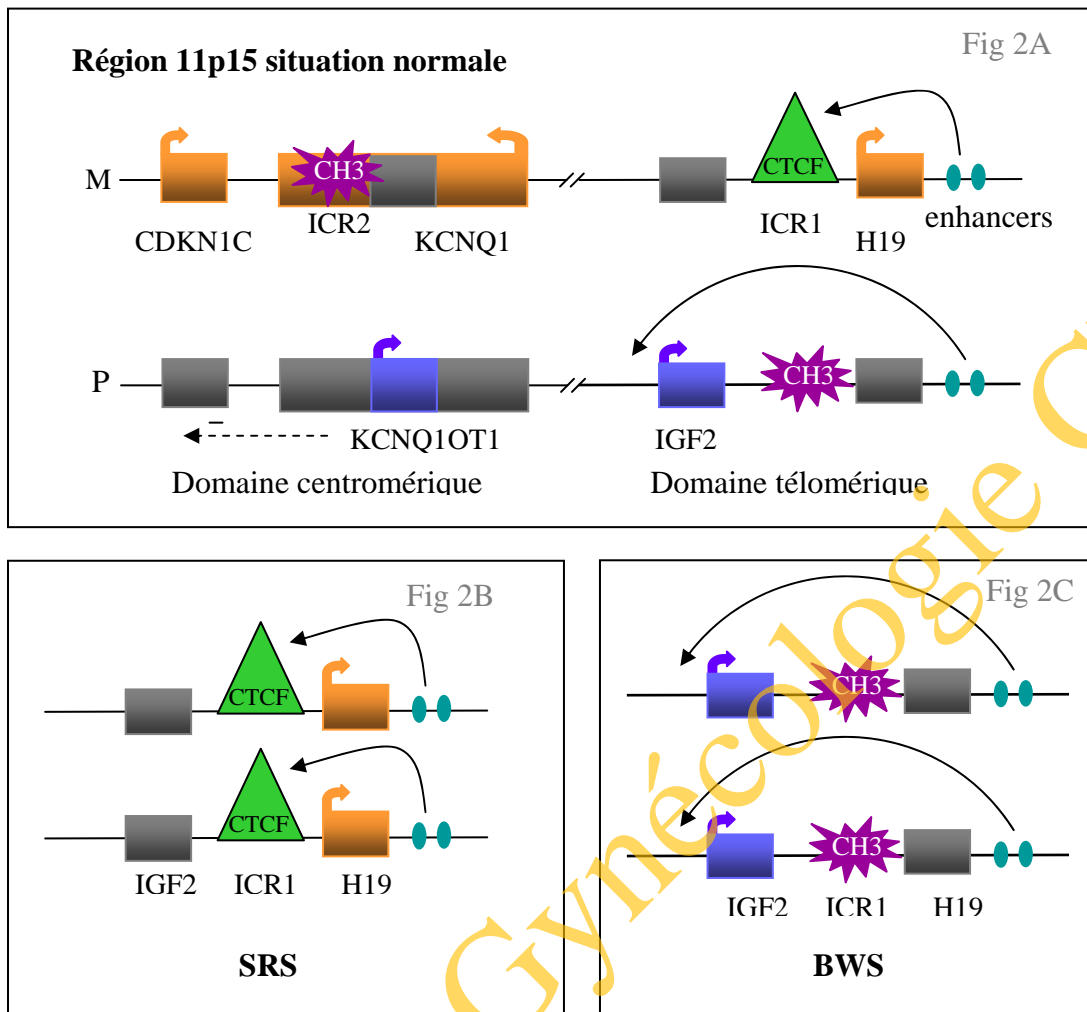


Fig 2A: La région 11p15 est soumise à l’empreinte parentale et est divisée en deux domaines, centromérique et télomérique avec deux centres d’empreinte ICR. L’empreinte réciproque du gène *H19* (ARN non codant) exprimé par l’allèle maternel (M) et du gène *IGF-II* exprimé par l’allèle paternel (P) dépend de l’*ICR1* méthylé (CH3) différenciellement en amont du gène *H19*. Le facteur CTCF lie l’*ICR1* maternel non méthylé et empêche le promoteur du gène d’*IGF-II* d’interagir avec les « enhancers » se trouvant en aval du gène *H19*. Sur l’allèle paternel *ICR1* est méthylé prévenant la liaison de CTCF et conduit à la transcription d’*IGF-II* paternel.

Le domaine centromérique *ICR2* non méthylé fonctionne comme un « silencier » en produisant un ARN non codant (*KCNQ1OT1*). Ceci induit en cis le silence des gènes paternels du domaine dont *CDKN1C* (inhibiteur des cyclines cdk de la phase G1 et donc du cycle cellulaire).

Fig 2B : Dans le cas du syndrome de Silver-Russell (SRS) la déméthylation anormale d’*ICR1* au niveau de l’allèle paternel entraîne l’expression biallélique d’*H19* et inhibe l’expression d’*IGF-2*, responsable du retard de croissance intra-utérin.

Fig 2C : Dans le cas du syndrome de Beckwith Wiedemann (BWS), un seul des mécanismes pathologiques est représenté ici : la méthylation anormale d’*ICR1* au niveau de l’allèle maternel entraînant l’expression biallélique d’*IGF-2*, responsable de la macrosomie, et l’inhibition d’expression de *H19*.

Dans l’AMP les anomalies rencontrées dans le BWS sont la perte de méthylation d’*ICR2* de l’allèle d’origine maternelle (inhibition du régulateur négatif du cycle cellulaire *CDKN1C*), et dans le SRS l’anomalie est celle de la fig 2B