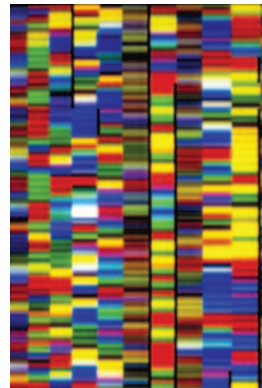


## Éléments mobiles SINE en phylogénie

Dorothee Huchon, Masato Nikaido,  
Norihiro Okada

> Les SINE (*short interspersed repetitive elements*) sont des éléments mobiles de l'ADN dérivés principalement des ARN de transfert ou de l'ARN cytoplasmique 7SL. Ils forment une composante majeure du génome des eucaryotes, puisque leur nombre peut atteindre plus de 104 copies par génome. Aucune fonction évidente n'est encore aujourd'hui attribuée à ces éléments. Récemment, ces « ADN égoïstes » se sont révélés être des outils très efficaces en systématique moléculaire: en effet, l'insertion d'un SINE à un site donné est un événement unique et non réversible à l'échelle des génomes. Les SINE se révèlent ainsi des outils phylogénétiques « parfaits ». L'étude de la présence ou de l'absence de sites d'insertion de ces éléments transposables a récemment conduit à des résultats phylogénétiques inattendus. Les qualités et les limites de ce nouvel outil phylogénétique sont présentées dans cet article. <



Tokyo Institute of Technology,  
Faculty of Bioscience  
and Biotechnology,  
4259 Nagatsuta-cho,  
Midori-ku,  
Yokohama 226-8501, Japon

de nouvelles hypothèses et de faire progresser les phylogénies précédentes (→ dans le cas des eucaryotes).

Cependant, après une phase euphorique au cours de laquelle les études moléculaires semblaient être la solution à toutes les questions phylogénétiques en suspens, certaines contradictions sont apparues. Les phylogénies moléculaires se sont en effet révélées être sensibles à l'échantillonnage taxonomique choisi, ainsi qu'au gène utilisé (→). Si de nombreux progrès ont été réalisés pour comprendre et détecter les artéfacts, des approches phylogénétiques complémentaires apparaissent nécessaires. Récemment, l'étude des sites d'insertion d'éléments transposables tels que les SINE (*short interspersed repetitive elements*) est apparue comme une méthode phylogénétique puissante, ayant permis d'améliorer considérablement la phylogénie de nombreux groupes taxonomiques tels que les poissons salmonidés, les mammifères cétacés et artiodactyles (revue dans [2, 3]), les primates [4] ou bien encore les plantes crucifères du genre *Brassica* [5]. Les SINE ont également été utilisés en phylogéographie pour étudier l'origine des populations humaines [6-8].

(→) m/s  
1995, n° 8,  
p. 1

(→) m/s  
1995, n° 8,  
p. 1 et  
1996, n° 2,  
p. 1

(→) m/s  
1995, n° 8,  
p. 1

Depuis Darwin, les classifications biologiques ont pour but de refléter la phylogénie, c'est-à-dire les relations évolutives entre les espèces. Les premières classifications étaient fondées sur des caractères morpho-anatomiques, paléontologiques ou embryologiques. Cependant, ces caractères semblent limités lorsque les espèces présentent des morphologies très différentes, donc difficilement comparables, comme dans le cas des eucaryotes unicellulaires (→), ou lorsqu'elles ont développé des adaptations similaires de façon indépendante (convergence), comme dans le cas des rongeurs [1]. Depuis le début des années 1960, l'analyse des caractères moléculaires, et en particulier des séquences d'ADN, est apparue comme une approche complémentaire des travaux morphologiques. Presque révolutionnaires, ces études moléculaires ont permis de suggérer

## Dynamique des éléments transposables et intérêt phylogénétique

Les éléments transposables représentent une composante importante du génome des eucaryotes, puisqu'ils constituent environ 45 % du génome humain, par exemple [9]. Aucun rôle précis n'a pu leur être attribué jusqu'à présent, et ils sont souvent considérés comme des parasites du génome (ADN « égoïste ») ou comme de l'ADN « poubelle ». Toutefois, ces éléments participent activement à l'évolution des génomes en facilitant, par exemple, les remaniements chromosomiques (revue dans [10]).

Les éléments transposables sont divisés en deux groupes: les rétrotransposons, ou éléments de classe I, ont un mode de transposition nécessitant le passage par un intermédiaire ARN, qui est ensuite rétrotranscrit en ADN avant d'être inséré dans le génome. Les transposons, ou éléments de classe II, utilisent en revanche un intermédiaire ADN. Les SINE sont des rétrotransposons dérivés principalement des ARN de transfert ou de l'ARN cytoplasmique 7SL (Figure 1). Des familles de SINE ont été identifiées dans de nombreux organismes, invertébrés, vertébrés ou plantes (Tableau I).

Le mécanisme de transposition des SINE n'est pas encore élucidé: dans la mesure où ils ne codent pas pour les fonctions nécessaires à leur rétrotransposition, les SINE pourraient utiliser la rétrotranscriptase des éléments LINE (*long interspersed repetitive elements*) (revue dans (→) et [14]). Bien que les mécanismes de multiplication des SINE soient, eux aussi, relativement mal connus, leur distribution dans les génomes révèle deux caractéristiques essentielles pour leur utilisation en phylogénie. Premièrement, les SINE présentent une spécificité d'insertion très faible, puisqu'elle dépend de combinaisons nucléotidiques variées et fréquentes [9, 13, 15, 16]: ils peuvent donc s'insérer à peu près partout dans le génome. Par ailleurs, étant donné la taille importante des génomes, la probabilité qu'un SINE s'insère exacte-

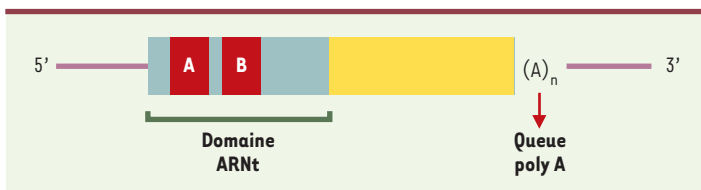
ment au même endroit dans le génome de deux espèces différentes peut être considérée comme négligeable [3]. Deuxièmement, il n'existe aucun processus d'élimination des rétrotransposons [2, 4]: les SINE se maintiennent de façon irréversible dans leur site d'insertion, où ils subissent les forces de mutation et de sélection propres à cette région du génome. Pour l'ensemble de ces raisons, la présence d'un SINE à un site donné est un événement qui n'est intervenu qu'une fois au cours de l'évolution.

Un SINE, à un locus donné, est fixé dans une population (ou une espèce) quand il est présent chez tous les individus de cette population. Sa fixation dépend principalement du hasard qui intervient dans la transmission d'un allèle d'une génération à une autre: selon les conditions, l'allèle peut totalement disparaître de la population (élimination d'un allèle) ou être présent chez tous les individus (fixation d'un allèle). D'après la théorie neutraliste de l'évolution, le temps de fixation dépend de la taille de la population, les fixations étant concentrées aux moments où l'espèce compte peu d'individus, comme à son commencement.

L'étude des sites d'insertion des SINE permet d'apporter une information phylogénétique lorsque la fixation d'un SINE à un site donné se situe entre deux événements de spéciation (Figure 2A): dans ce cas, les individus partageant le même SINE à un locus précis ont tous une origine commune. Ainsi dans la Figure 2A, les taxons B, C et D, possédant un SINE commun, sont phylogénétiquement plus proches entre eux qu'ils ne le sont du taxon A. La présence d'un SINE à un locus est un caractère binaire qui ne connaît ni convergence, ni réversion. Elle apparaît donc comme un caractère phylogénétique « parfait » dont la polarité est connue: l'absence de SINE dans un site est le caractère ancestral, et sa présence le caractère dérivé.

### Les principales étapes de la méthode SINE

La première étape de toute étude phylogénétique fondée sur l'utilisation des SINE consiste à identifier les éléments pertinents pour répondre à la question phylogénétique posée. Il faut, en effet, trouver une famille ou une sous-famille de SINE dont la multiplication par transposition dans le génome est contemporaine de la diversification des espèces étudiées (Figure 2A). Par exemple, il a été estimé que les éléments MIR (*mammalian-wide interspersed repeats*), présents dans le génome des mammifères, avaient cessé de se transposer il y a environ 80-100 millions d'années [9]: les MIR ne sont donc pas adaptés pour résoudre les relations de parenté au sein des rongeurs qui se sont diversifiés il y a



**Figure 1. Structure simplifiée d'un SINE.** A et B: promoteurs de l'ARN polymérase III qui peuvent être utilisés pour identifier les SINE présents dans un génome, soit en transcrivant *in vitro* l'ADN génomique par l'ARN polymérase III, soit en effectuant des PCR avec des amorces spécifiques du promoteur de l'ARN polymérase III (voir texte).

(→) m/s  
2001, n° 1,  
p. 103

(→) m/s  
2002, n° 11,  
p. 1146

environ 58 millions d'années. Les données bibliographiques peuvent guider le choix de la famille de SINE à considérer. Ainsi, les SINE associés à un taxon particulier (Tableau 1) doivent pouvoir aider à clarifier la phylogénie de ce taxon.

En l'absence d'information bibliographique, plusieurs méthodes ont été proposées, comme la transcription *in vitro* de l'ADN génomique par l'ARN polymérase III: cette approche se fonde sur le fait que les SINE sont dérivés des ARN de transferts et possèdent donc les promoteurs spécifiques de l'ARN polymérase III (Figure 1). L'ARN obtenu par transcription est ensuite utilisé comme sonde pour cribler une banque génomique de l'espèce concernée [17]. Une seconde méthode consiste à effectuer des PCR en utilisant des amorces spécifiques du promoteur de l'ARN polymérase III (A box et B box) présent dans la séquence des SINE (Figure 1); les produits de PCR obtenus sont utilisés par la suite pour cribler une

banque génomique [12].

Une fois la famille de SINE pertinente caractérisée, la mise en évidence de leurs sites d'insertion se déroule en cinq étapes (Figure 3). Pour contenir le maximum d'information phylogénétique, les espèces choisies doivent être les moins divergentes au sein du groupe étudié: ainsi, la recherche de SINE dans le génome de l'espèce A (Figure 2) ne permettra pas de résoudre les relations entre B, C, et D, et il vaut mieux choisir l'espèce C ou D. Une connaissance *a priori* de la phylogénie est donc préférable.

Pour élucider complètement les relations de parenté entre plusieurs espèces, il est nécessaire d'identifier au moins un SINE caractéristique pour chaque nœud de l'arbre phylogénétique.

### Avantages et limites de la méthode SINE

L'intérêt de cette approche est qu'elle ne connaît pas d'artefacts lors de la reconstruction des relations phylogénétiques. En revanche, le recours à l'analyse de séquences conduit les méthodes de reconstruc-

tion à être sensibles aux hétérogénéités de taux de substitution ou de composition en bases entre espèces. Dans le premier cas, les espèces ayant des taux de mutations élevés seront placées de façon artificielle à la base des arbres phylogénétiques: c'est le phénomène d'attraction des longues branches (→) [19]. Dans le second cas, les taxons ayant des compositions en bases similaires auront tendance à être regroupés artificiellement [20]. Un autre avantage de la méthode SINE est qu'elle ne nécessite pas l'utilisation de groupe externe pour polariser l'arbre phylogénétique obtenu; or les groupes externes sont parfois sources de problèmes dans l'enracinement des arbres [21]. Le fait que l'absence de SINE soit le caractère ancestral permet à lui seul d'orienter l'ordre de branchement des espèces.

La méthode SINE possède cependant ses limites. Tout d'abord, quand les séquences deviennent trop divergentes (à partir de 20-30 % de divergence), il devient difficile de définir des amorces de PCR communes à l'ensemble des espèces étudiées: cela se traduit par une absence de bande dans le produit de réaction obtenu. C'est le cas du mouton (espèce 5) dans la Figure 3B. Il est remarquable que l'absence de données n'affecte pas les conclusions obtenues: ainsi, dans la Figure 3B, le

Taxons		SINE
<b>Mammifères</b>	Monotrèmes, marsupiaux et placentaires	MIR
	Primates	Alu, Galago type 2
	Rongeurs (souris, cochons d'Inde, écureuils)	B1, B2, ID, B1dID, DIP, MEN
	Lagomorphes (lapins, pika)	C elements
	Carnivores (chats, ours, phoques)	Can Sine
	Périsso-dactyles (chevaux, rhinocéros)	ERE-1
	Chiroptères (chauves-souris)	VES
	Cétartiodactyles (baleines, chameaux, vaches, cochons)	Bovt-A, CHR-1, CHR-2, PRE1
<b>Reptiles</b>	Chéloniens (tortues)	Tortoise Pol III
<b>Poissons actinoptérygiens</b>	Salmonidés	Sma I, HpaI, Fok I, Ava III
	Cyprinidés ( <i>Danio</i> )	DANA elements
	Cichlidés	AFC
<b>Échinodermes</b>	Échinidés (oursins)	SURF-1
<b>Molusques</b>	Céphalopodes (poulpes, seiches, nautilus)	SK, OK, OR1, OR2
<b>Insectes</b>	Lépidoptères, bombycidés (vers à soie)	Bm1
	Diptères (moustiques)	Feilai SINE
<b>Plathelminthes</b>	Trématodes (schistosomes)	SM $\alpha$
<b>Angiospermes</b>	Solanacées (tabac)	TS
	Crucifères (choux, moutarde)	SINE S1, RathE1, RathE2
	Poacées (riz)	P-SINE1

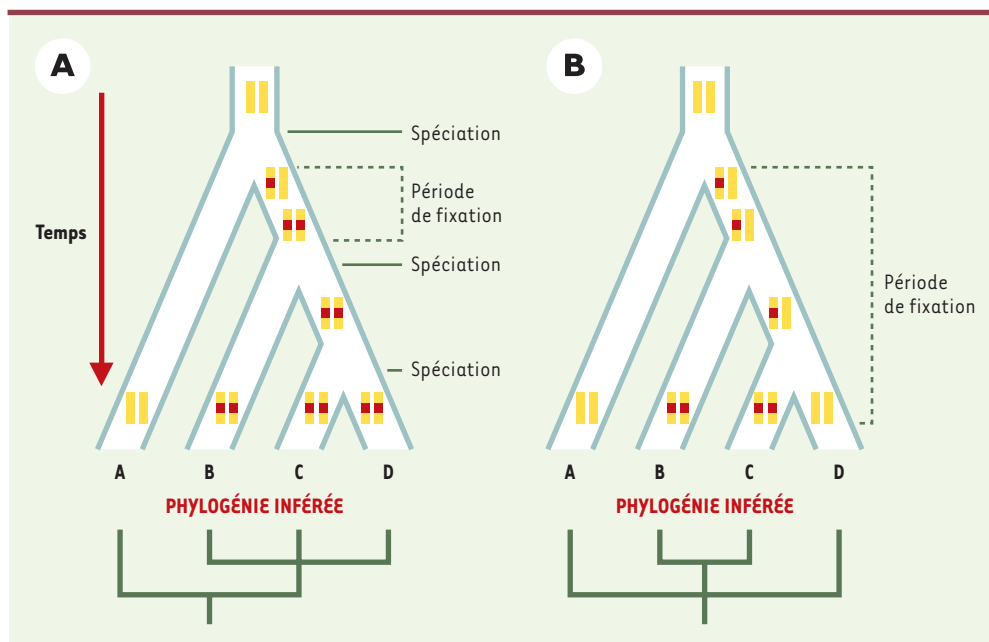
Tableau 1. Exemples de taxons pour lesquels une ou plusieurs familles de SINE ont été identifiées (d'après [2, 11-13]).

regroupement de l'hippopotame (espèce 7) avec les cétacés (espèces 8, 9 et 10) n'est pas remis en cause. Seule la position du mouton reste ambiguë, et il est impossible de savoir, à travers l'étude de ce locus, si le mouton appartient ou non au groupe cétacés + hippopotame. Toutefois, l'utilisation d'autres SINE a montré que le mouton se regroupait avec les ruminants (cerf et vache), et non avec l'hippopotame ou les cétacés [18]. Les problèmes de divergence entre séquences limitent la méthode SINE à des questions phylogénétiques concernant des spéciations ayant eu lieu après 75-100 millions d'années (ce qui correspond au crétacé supérieur), ou plus récemment [3] si les taxons considérés présentent de forts taux de substitution, comme dans le cas des divergences entre familles de rongeurs. La seconde limite de la méthode SINE trouve sa source dans la possibilité d'un polymorphisme ancestral au locus considéré. En effet, lorsque la divergence des taxons étudiés se produit avant la fixation du SINE à ce locus, la reconstruction peut conduire à une phylogénie erronée. Ainsi, dans la *Figure 2B*, les populations à l'origine des espèces B, C et D étaient polymorphes. L'allèle contenant le SINE s'est fixé dans les espèces B et C, mais pas dans l'espèce D chez laquelle il a été éliminé. La phylogénie reconstruite par la méthode SINE isole donc l'es-

pèce D de B et C, alors qu'en réalité C est plus proche de D que de B. De tels problèmes peuvent se produire lorsque les espèces se sont diversifiées dans un laps de temps très court, pendant la période de fixation de l'élément SINE. Le moyen de détecter cet artefact est d'identifier plusieurs SINE caractéristiques de chaque branchement de l'arbre phylogénétique. En cas de polymorphisme ancestral, il est attendu que les locus obtenus soient incongruents entre eux, c'est-à-dire qu'ils conduisent à des images phylogénétiques différentes. L'ordre de branchement des espèces se traduit alors par une multifurcation.

### Exemples d'applications phylogénétiques chez les cétartiodactyles

Les premiers résultats obtenus avec les SINE ont permis de confirmer des résultats moléculaires inattendus, comme le placement des cétacés au sein des artiodactyles [22] ou le surprenant groupement de l'hippopotame avec les baleines [18]. Les études morphologiques considéraient quant à elles que les cétacés et les artiodactyles formaient deux ordres distincts de mammifères [23], et regroupaient les hippopotames avec les cochons [24]. Récemment, la méthode SINE a au contraire permis de conforter les résultats morphologiques divisant les cétacés en odontocètes (cétacés à dents) et mysticètes (cétacés à fanons), alors que les analyses de séquences ne vérifiaient pas l'origine unique des odontocètes [25]. Il y a donc fort à attendre de l'application future de cette méthode à d'autres groupes taxonomiques dont la phylogénie reste énigmatique. ♦



**Figure 2. Impact sur la phylogénie inférée du temps de fixation d'un SINE dans un locus par rapport aux événements de spéciation.** L'évolution des allèles à un locus est représentée le long d'un arbre phylogénétique. Le locus considéré est indiqué par une barre verticale jaune, la présence d'un SINE est caractérisée par un rectangle rouge sur le locus. Les événements de spéciation sont indiqués par des flèches et le temps de fixation des allèles par une accolade. **A.** Le SINE se fixe entre deux événements de spéciation, et sa distribution reflète la phylogénie vraie. **B.** Le SINE n'est pas fixé lors de la séparation des espèces, et l'étude de sa distribution conduit à une phylogénie erronée.

### REMERCIEMENTS

D.H. remercie l'association Sciencescope pour lui avoir suggéré l'écriture de cet article, Frédéric Delsuc pour ses commentaires pendant la rédaction et l'expert de médecine/sciences pour ses remarques. Le travail de D.H. était financé par une bourse Lavoisier attribuée par le ministère des Affaires étrangères.

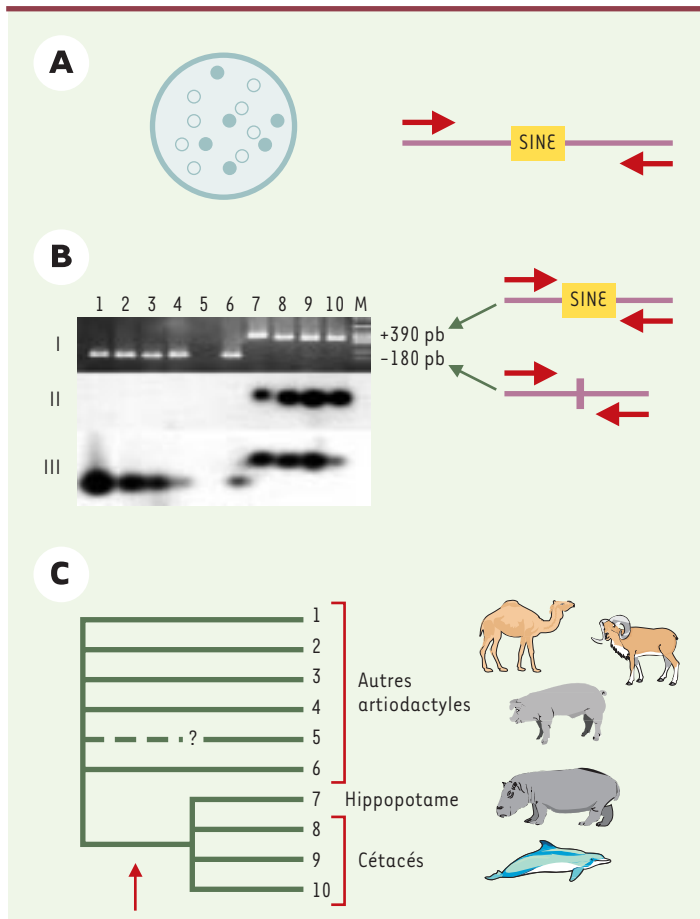
## SUMMARY

### Use of SINE retroposon in phylogeny

SINE (short interspersed repetitive elements) are retroposons derived from tRNA or 7SL RNA. These repetitive sequences represent a large part of the eukaryotic genome. Their copy number can reach more than  $10^4$  per genome. However, no evident function is recognized to these elements. Recently, these « selfish DNAs » appear as a powerful tool in molecular systematic. SINE retroposons have the ability to duplicate and to be reincorporated many times into the genome. Their insertions have two major characteristics: first, a SINE has a negligible probability to be inserted twice at a specific genomic location, second, the chance that a deletion at one insertion site matches exactly the boundaries of the SINE is also insignificant. For these reasons, the analysis of SINE insertions is a source of phylogenetic information, free of convergence and reversal. SINEs thus appear as « perfect » phylogenetic characters and the study of their insertion site has recently led to unexpected phylogenetic results. The advantages and limits of this new phylogenetic method are presented here. ♦

## RÉFÉRENCES

1. Jaeger JJ. Rodent phylogeny: new data and old problems. In: Benton MJ, ed. *The phylogeny and classification of the Tetrapods*. Oxford: Clarendon Press, 1988 : 177-99.
2. Shedlock AM, Okada N. SINE insertions: powerful tools for molecular systematics. *BioEssays* 2000; 22: 148-60.
3. Shedlock AM, Milinkovitch MC, Okada N. SINE evolution, missing data, and the origine of whales. *Syst Biol* 2000; 49: 808-17.
4. Hamdi H, Nishio H, Zielinski R, Dugaiczak A. Origin and phylogenetic distribution of *Alu* DNA repeats: irreversible events in the evolution of primates. *J Mol Biol* 1999; 289: 861-71.
5. Tatout C, Warwick S, Lenoir A, Deragon JM. SINE insertions as clade markers for wild crucifer species. *Mol Biol Evol* 1999; 16: 1614-21.
6. Batzer MA, Stoneking M, Alegria-Hartman M, et al. African origin of human-specific polymorphic Alu insertions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12288-92.
7. Novick GE, Novick CC, Yunis J, et al. Polymorphic alu insertions and the Asian origin of native American populations. *Hum Biol* 1998; 70: 23-39.
8. De Pancorbo MM, Lopez-Martinez M, Martinez-Bouzas C, et al. The Basques according to polymorphic Alu insertions. *Hum Genet* 2001; 109: 224-33.



**Figure 3. Différentes étapes de la méthode SINE.** **A.** Construction d'une banque de gènes, criblage de la banque grâce à une sonde caractéristique de la famille de SINE étudiée, séquençage des clones positifs et définition d'amorces (représentées par des flèches) dans les régions flanquant les SINE identifiés. **B.** Données confirmant le regroupement de l'hippopotame avec les cétacés (locus HIP4, [18]). I. Réaction de PCR avec les amorces créées, afin de déterminer la distribution du SINE dans le groupe étudié. Les bandes de grande taille (taxons 7-10) correspondent à des fragments contenant un SINE; celles de petite taille (taxons 1-4 et 6) à des fragments sans SINE. II. Validation du résultat de la PCR par *Southern blot* utilisant la séquence du SINE comme sonde. III. *Southern blot* utilisant la séquence des régions flanquant le SINE comme sonde. Ces deux dernières étapes permettent de vérifier que les produits de PCR obtenus sont bien homologues et ne correspondent pas à des artefacts. **C.** Arbre phylogénétique inféré à partir du locus HIP4. Les taxons 7 à 10 sont regroupés car ils partagent un SINE, la position du taxon 5 ne peut être inférée, l'absence de produit de PCR ne permettant pas de déterminer l'absence ou la présence de SINE à ce locus. Taxons considérés: 1: *Camelus bactrianus* (chameau); 2: *Sus scrofa* (cochon); 3: *Axis axis* (cerf axis); 4: *Giraffa camelopardalis* (girafe); 5: *Ovis aries* (mouton); 6: *Bos taurus* (vache); 7: *Hippopotamus amphibius* (hippopotame); 8: *Megaptera novaeangliae* (baleine à bosses); 9: *Berardius bairdii* (baleine à bec); 10: *Globicephala macrorhynchus* (glocicéphale); M: Marqueur de taille.



9. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
10. Makalowski W. SINEs as a genomic scrap yard: an essay on genomic evolution. In: Marais RJ, ed. *The impact of short interspersed elements (SINEs) on the host genome*. Austin: R.G. Landes Company, 1995: 81-104.
11. Okada N. SINEs: short interspersed repeated elements of the eukaryotic genome. *Trends Ecol Evol* 1991; 6: 358-61.
12. Borodulina OR, Kramerov DA. Wide distribution of short interspersed elements among eukaryotic genomes. *FEBS Lett* 1999; 457: 409-13.
13. Lenoir A, Lavie L, Prieto JL, et al. The evolutionary origin and genomic organization of SINEs in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Evol* 2001; 18: 2315-22
14. Okada N, Hamada M, Ogiwara I, Ohshima K. SINEs and LINEs share common 3' sequences: a review. *Gene* 1997; 205: 229-43.
15. Jurka J. Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retroposons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1872-7.
16. Tatout C, Lavie L, Deragon JM. Similar target site selection occurs in integration of plant and mammalian retroposons. *J Mol Evol* 1998; 47: 463-70.
17. Endoh H, Okada N. Total DNA transcription *in vitro*: a procedure to detect highly repetitive and transcribable sequences with tRNA-like structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 251-5.
18. Nikaido M, Rooney AP, Okada N. Phylogenetic relationships among cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: hippopotamuses are the closest extant relatives of whales. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10261-6.
19. Philippe H, Laurent J. How good are deep phylogenetic trees? *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 616-23.
20. Mooers AØ, Holmes EC. The evolution of base composition and phylogenetic inference. *Trends Ecol Evol* 2000; 15: 365-9.
21. Sullivan J, Swofford DL. Are guinea pigs rodents? The importance of adequate models in molecular phylogenetics. *J Mammal Evol* 1997; 4: 77-86.
22. Shimamura M, Yasue H, Ohshima K, et al. Molecular evidence from retroposon that whales form a clade within even-toed Ungulata. *Nature* 1997; 388: 666-70.
23. McKenna MC, Bell SK. *Classification of mammals above the species level*. New York: Columbia University Press, 1997: 632 p.
24. Montgelard C, Ducroq S, Douzery E. What is a suiforme (*Artiodactyla*)? *Mol Phylogenet Evol* 1998; 9: 528-32.
25. Nikaido M, Matsuno F, Hamilton H, et al. Retroposon analysis of major cetacean lineages: the monophyly of toothed whales and the paraphyly of river dolphins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7384-9.

---

**TIRÉS À PART**  
D. Huchon