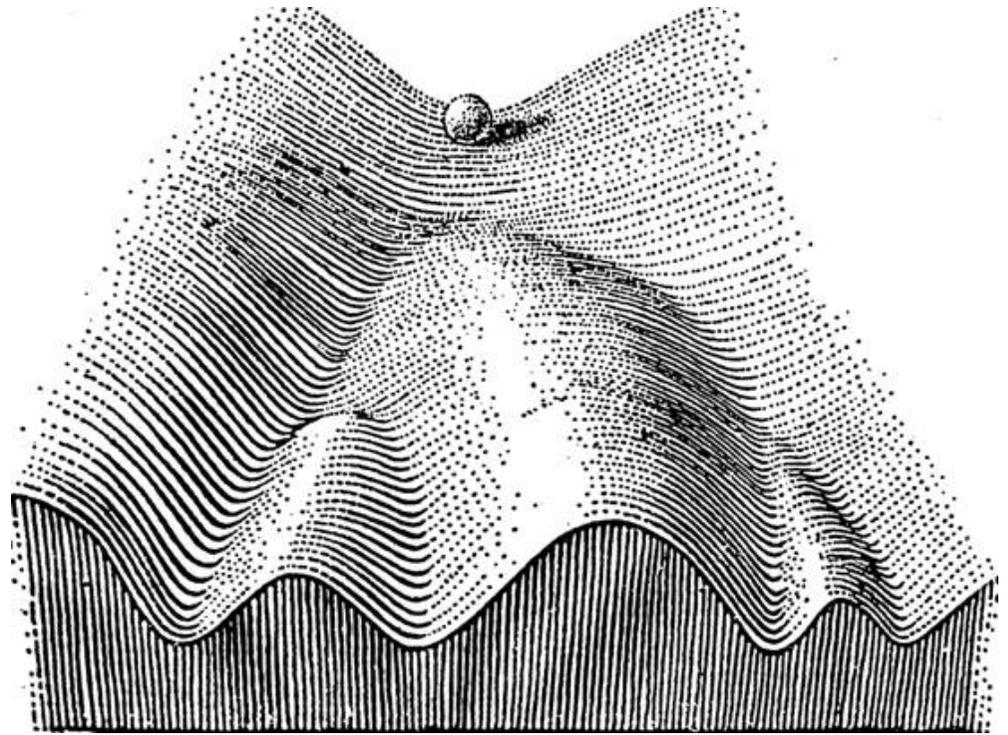


Université Populaire de Marseille, printemps 2019  
Cycle *Hérédité génétique et épigénétique*  
Jacques van Helden

***Rappel des notions  
vues au cours des séances précédentes***

# Le paysage épigénétique de Waddington

- Définition originelle de l'épigénétique (Waddington, 1942).
  - Les cellules des différents tissus adoptent des phénotypes différents (formes, fonctions), alors qu'elles ont toutes le même génotype.
  - Epigénétique : science qui étudie les mécanismes causaux par lesquels les gènes entraînent les effets phénotypiques au cours du développement.
  - Epigénotype : complexe complet de processus développementaux entre le génotype et le phénotype.
- Le **paysage épigénétique** (Waddington, 1957)
  - La bille représente une cellule non-différenciée.
  - Cette cellule peut s'engager dans différentes voies de différenciation (vallées), qui donneront lieu à différents types cellulaires (foie, muscle, neurone, ...).



Waddington, C.H. (1957). *The strategy of the genes*, p31.

- Waddington, C.H. (1942). *The epigenotype*. 1942. *Int J Epidemiol* 41, 10–13.
- Waddington, C.H. (1957). *The strategy of the genes*.

# Déterminants de la différenciation : les facteurs de transcription

- L'engagement initial d'une cellule dans une voie de différenciation est déterminée par les **facteurs transcriptionnels**.
  - Protéines qui se lient à l'ADN
  - Reconnaissance de séquences spécifiques (motifs).
  - Actifs dans différents tissus au cours du développement (établissement du pattern).
  - Activent ou répriment l'expression d'autres gènes (les « effecteurs » de la différenciation).
- Phénotypes
  - Dans l'**embryon normal**, les cellules qui expriment un facteur suivent une voie développementale particulière.
  - Chez certains **mutants** de ces facteurs, les organes manquent, ou se développent à des positions incorrectes.
- Au **début de l'embryogenèse**, les facteurs transcriptionnels établissent la topologie générale de l'embryon
  - Axe antéro-postérieur
  - Axe dorso-central
  - Position des membres
- Chez la drosophile, on a étudié en grand détail les **réseaux de régulation** qui permettent d'établir progressivement ce « **plan de l'organisme** ».
- Ces réseaux résultent de
  - cascades d'activations et répressions entre facteurs transcriptionnels;
  - interactions entre cellules par des voies de signalisation.

Adapté de Waddington, C.H. (1957). The strategy of the genes, p31.

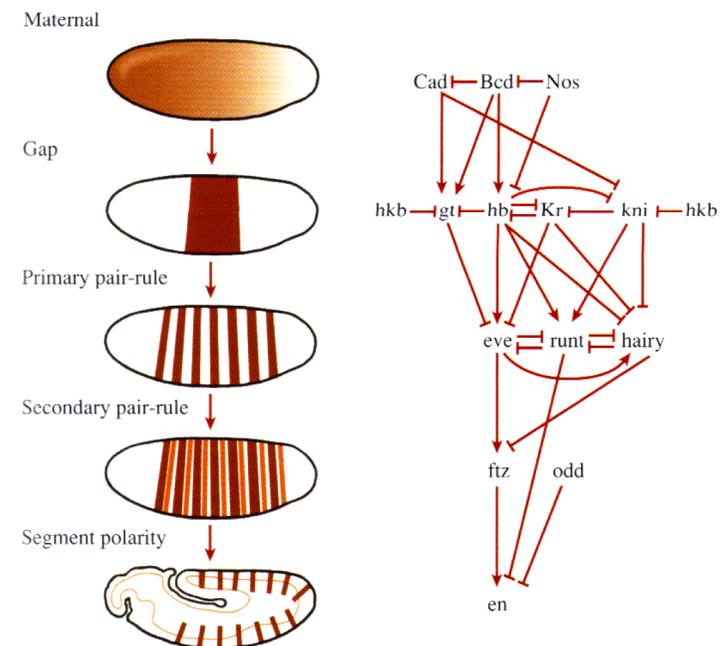
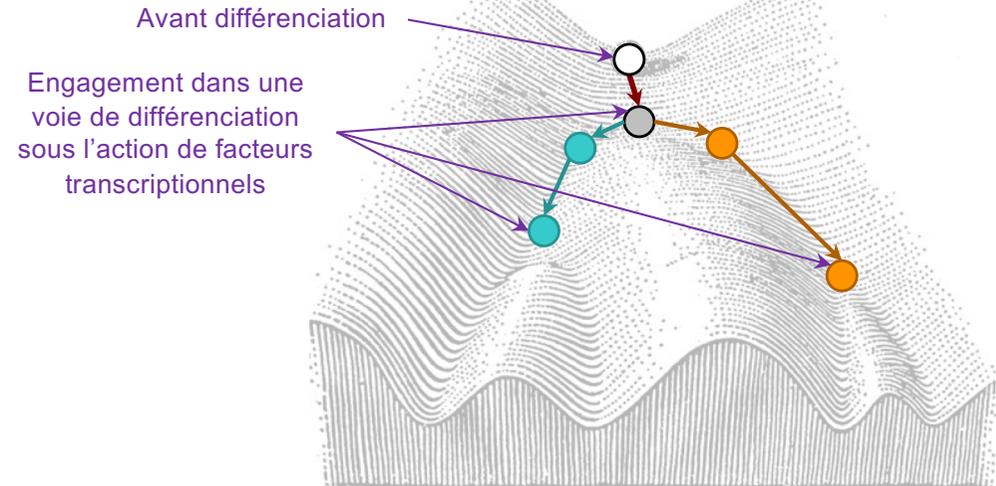


Figure 3.5  
The segmentation genetic regulatory hierarchy

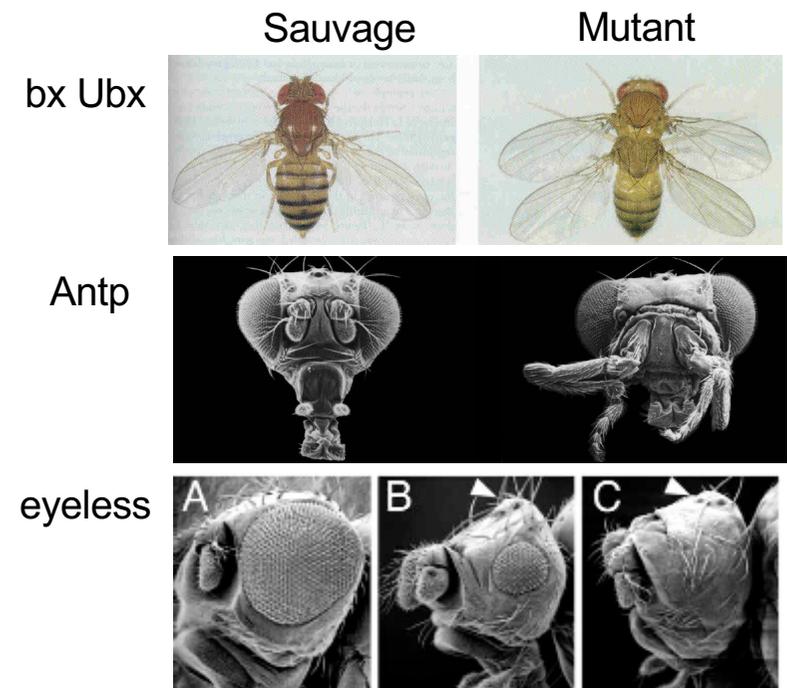
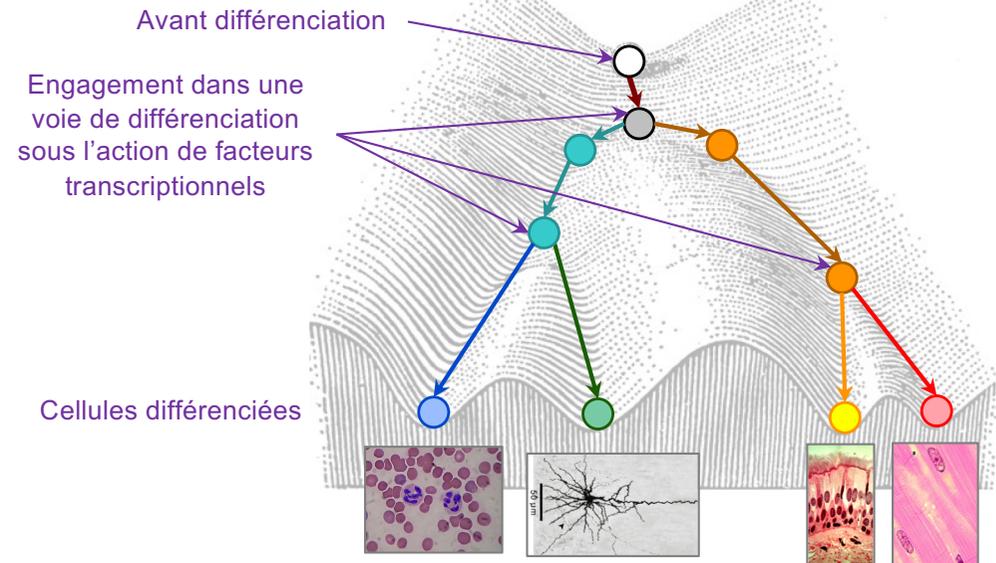
**left** The expression patterns of five classes of anteroposterior axis patterning genes are depicted in embryos at different stages. **right** Selected members of these classes are shown and the regulatory interactions between these genes are indicated. An arrow indicates a positive regulatory interaction; a line crossed at its end indicates a negative repressive regulatory relationship.

Source: Carroll, 2005. From DNA to diversity (2nd edition). Blackwell Publishing.

# Déterminants de la différenciation : les facteurs de transcription

- Au cours du développement, les facteurs transcriptionnels spécifient
  - l'organisation générale de l'embryon (diapo précédente);
  - l'identité segmentaire (exemples ci-dessous);
  - la formation des organes et des tissus;
  - la différenciation des cellules;
- Exemples
  - *bithorax+Ultrabithorax*:
    - différenciation 3<sup>ème</sup> segment thoracique (mutant : 2<sup>ème</sup> segment thoracique)
  - *Antennapedia* :
    - expression -> antenne (mutant -> patte)
  - *eyeless*:
    - formation de l'œil (mutant : absence d'œil)
  - ... des centaines d'autres mutations connues.
- Tout au long de la vie de l'organisme, les facteurs transcriptionnels interviennent également dans l'adaptation des cellules à des modifications de leur environnement (exemple: régulation métabolique).

Adapté de Waddington, C.H. (1957). The strategy of the genes, p31.



# Modifications chromatinienne : la « mémoire cellulaire »

Adapté de Waddington, C.H. (1957). The strategy of the genes, p31.

## ■ Méthylation de l'ADN

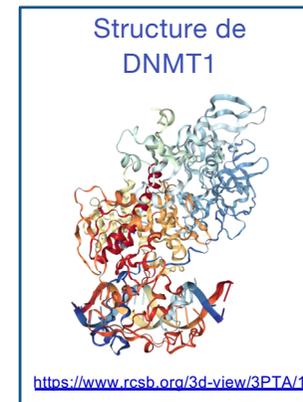
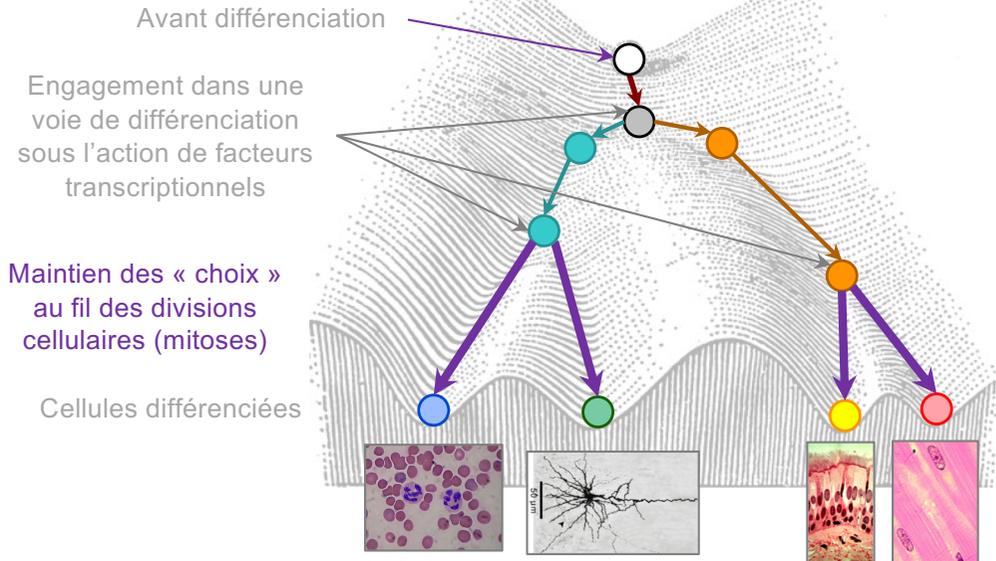
- Par des enzymes spécialisées (DNA méthyltransférases, DNMT)
- Chez les mammifères: méthylation spécifique des cytosines suivies d'un G (dinucléotide CpG).
- Chez les insectes: pas de méthylation de l'ADN
- Chez les plantes: méthylation moins spécifique, mécanismes différents.

## ■ Rôle supposé

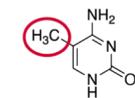
- Inactivation d'une copie du X chez les femelles de mammifère
  - compensation de dose
- Inactivation des éléments transposables (rétroviraux)
  - réduction des risques de mutation par transposition d'un élément

## ■ Enzymes chez les mammifères

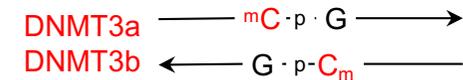
- **DNMT3a, DNMT3** : méthylation *de novo*, sur les deux brins
- **DNMT1**: « **de maintien** », méthylation des CpG sur le nouveau brin suite à la réplication, à partir des CpG hémi-méthylés.



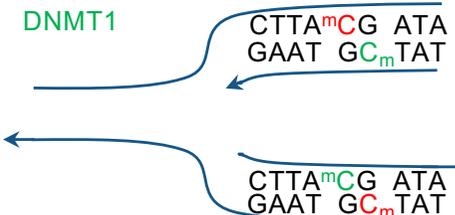
Méthylation de la cytosine



Méthylation « de novo » de l'ADN



Méthylation « de maintien »



# Redéfinition de l'épigénétique ?

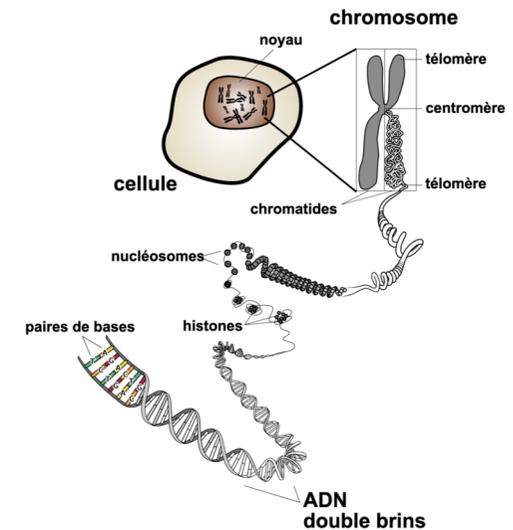
- Dans les années 1970 – 1990, Holliday et Briggs mettent en évidence la méthylation de l'ADN et son rôle dans l'inactivation de la chromatine.
- On leur attribue la définition moderne de la régulation épigénétique : **variations phénotypiques héritables** (au cours des mitoses ou entre générations) **et réversibles qui ne résultent pas d'une modification de la séquence primaire de l'ADN.**
- Note: en 1990, Holliday propose d'utiliser des cultures cellulaires comme système empirique – approximatif – pour étudier la répression des gènes au cours du développement. A cette époque, il se réfère à Waddington pour définir l'épigénétique.
  - *La génétique classique a révélé les mécanismes de transmission des gènes de génération en génération, mais la stratégie par laquelle les gènes déploient le programme de développement demeurent obscurs. L'épigénétique est l'étude des mécanismes qui régissent le contrôle spatial et temporel des activités de tous les gènes requis pour le développement d'un organisme complexe, depuis le zygote jusqu'à l'adulte. Les modifications épigénétiques dans l'activité d'un gène peuvent être étudiées en les mettant en relation avec la méthylation de l'ADN dans des cultures de cellules de mammifères. Il est également possible d'isoler et de caractériser des mutations qui altèrent l'activité de méthylase de l'ADN. Quoique ce système expérimental soit plutôt éloigné des contrôles épigénétiques qui agissent durant le développement, il fournit le moyen de clarifier les règles qui gouvernent la répression des gènes par la méthylation spécifique d'ADN, et leur réactivation par la déméthylation. Ceci facilitera à son tour les études du contrôle de l'expression des gènes dans les cellules des organismes en développement ou chez l'adulte.*
- L'origine de la définition moderne semble dater de 1994. Elle est discutée en détail dans une correspondance publiée par la revue Science (Wu & Morris, 2001).
  - <https://science.sciencemag.org/content/sci/suppl/2001/08/08/293.5532.1103.DC1/WuWeb.pdf>

- Holliday, R. (1990). DNA methylation and epigenetic inheritance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 326, 329–338.
- Wu Ct and Morris, J.R. (2001). Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* 293, 1103–1105.

# Structure de la chromatine

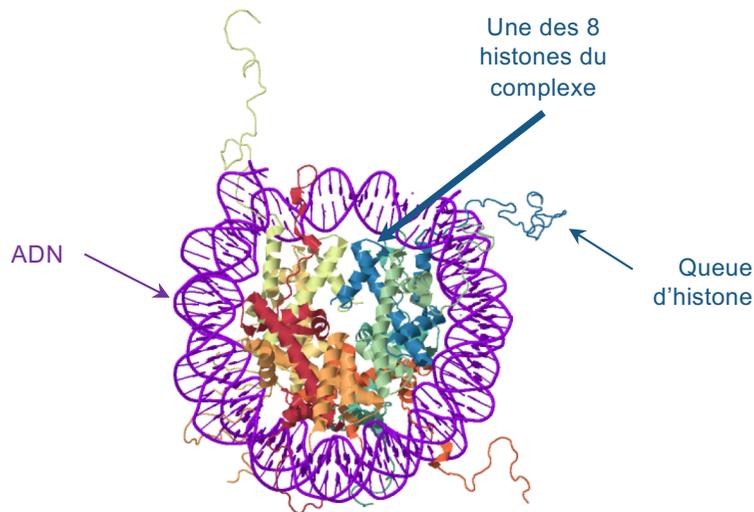
- Nucléosome
  - complexe formé de 8 histones (protéines) entourées de 2 enroulements d'ADN
- Une extrémité de chaque histone sort du complexe.
- Des enzymes spécialisées peuvent modifier chimiquement certains acides aminés des queues d'histones
  - méthylation (histone méthyltransférases)
  - acétylation (histone acetyl transférase, HAT)
  - déacétylation (histone désacétylase, HDAC)

## Structure de la chromatine



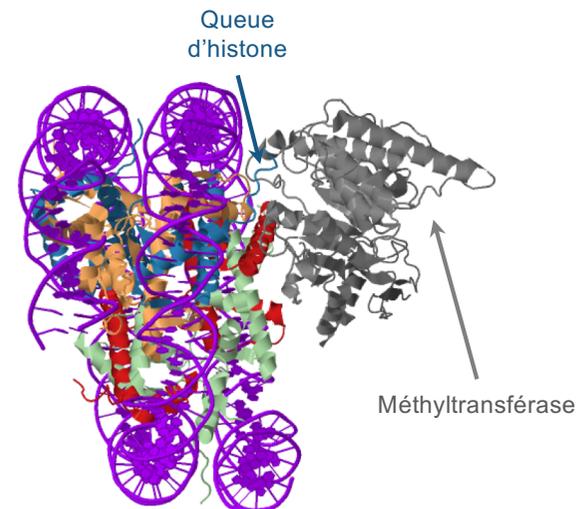
[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2a/Chromosome\\_fr.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2a/Chromosome_fr.svg)

## Nucléosome



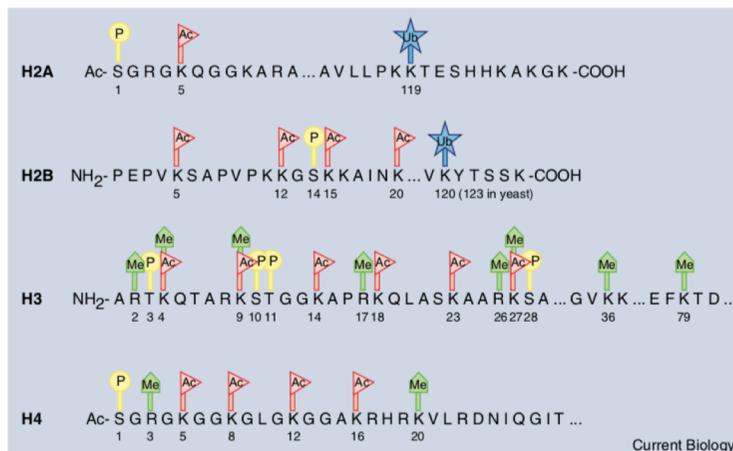
<https://www.rcsb.org/pdb/explore/mol.do?structureId=1kx5&biomolecule=1&molMode=HTML5>

## Méthyltransférase DOT1L complexée avec un nucléosome



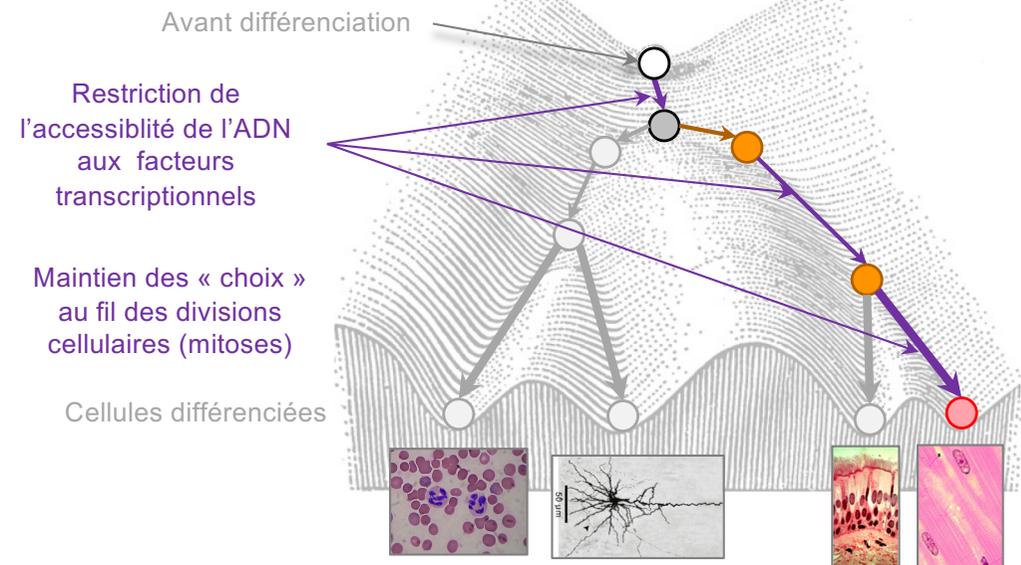
# Le « code » des histones

- Au début des années 2000, plusieurs chercheurs ont suggéré que les différentes modifications des queues d'histones constituaient un « code des histones ». Cette notion est cependant contestée.
  - Les modifications associées aux régions actives sont transitoires, elles pourraient être la conséquence de l'activité transcriptionnelle plutôt que leur cause
  - En particulier, l'acétylation/désacétylation semble dynamique.
  - D'autres modifications semblent plus stables (marques répressives).
- Mémoire cellulaire ? Les mécanismes de transmission au fil des mitoses restent mal compris.
- Qui contrôle qui ?
  - Nucléosomes → inaccessibilité de l'ADN aux facteurs tr. ?
  - Facteurs transcriptionnels → modifications d'histones ?
  - L'un des deux selon le stade et les facteurs ?



Peterson, C.L., and Laniel, M.-A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* 14, R546-551.

Adapté de Waddington, C.H. (1957). *The strategy of the genes*, p31.



Histone	Résidu	Modif	Effet	Localisations
H2B	K5	me1	activation	
H2B	K5	me3	répression	
H3	K122	ac	activation	promoteurs prêts à démarrer la transcription
H3	K14	ac	activation	promoteurs des gènes activement transcrits
H3	K27	ac	activation	promoteurs actifs et enhanceurs
H3	K27	me3	répression	
H3	K27	me3	répression	régions génomiques facultativement réprimées par formation d'hétérochromatine
H3	K36	me3	activation	corps des gènes activement transcrits
H3	K4	me1	activation	promoteurs actifs et enhanceurs
H3	K4	me2	activation	
H3	K4	me3	activation	
H3	K9	ac	activation	promoteurs des gènes activement transcrits
H3	K9	me3	répression	gènes constitutionnellement réprimés
H4	K20	me1	activation	

Université Populaire de Marseille, printemps 2019  
Cycle *Hérédité génétique et épigénétique*  
Jacques van Helden

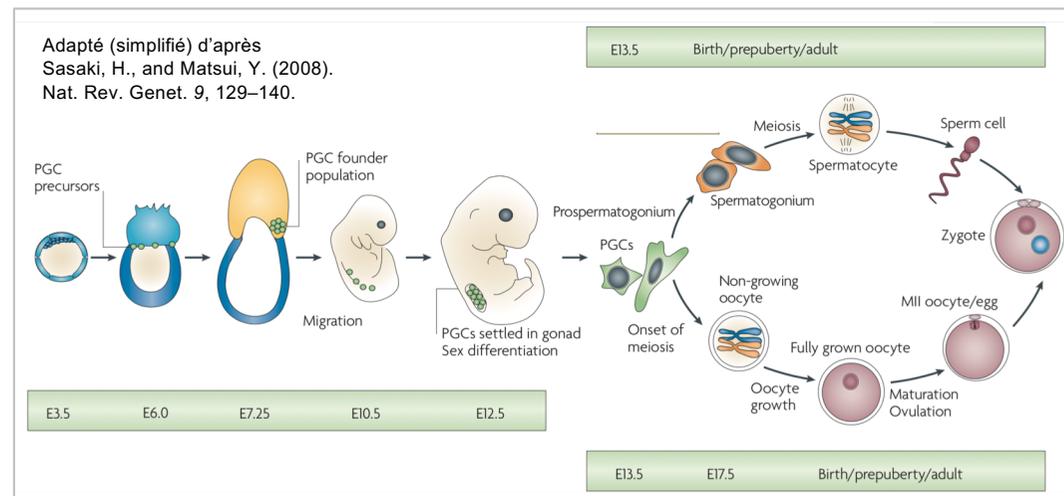
*Chapitre 5*

***Reprogrammation cellulaire et épigénétique***

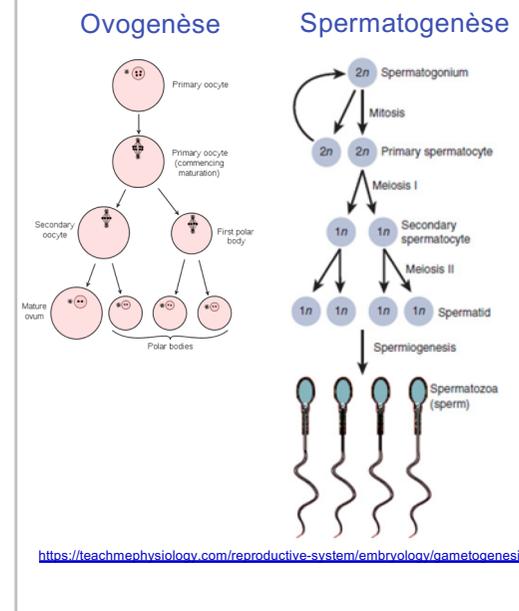
# La séparation germe - soma

- Pendant le développement embryonnaire des mammifères, on observe une séparation très précoce des lignées germinale et somatique.
  - **Lignée germinale** : gamètes (ovules et spermatozoïdes) et cellules qui les produisent.
  - **Lignée somatique** : toutes les autres cellules de l'embryon.
- A la fin des années 1890, August Weismann établit la **théorie du plasma germinatif**.
  - Les lignées germinales et somatique sont séparées dès le début de l'embryogenèse (« **barrière de Weismann** »).
  - Cette séparation initiale des lignées germinales et somatiques constitue un obstacle à la théorie de Lamarck.
    - Les **caractères acquis** au sens de Lamarck (développement par l'usage) affectent les **cellules somatiques**.
    - Seule la lignée germinale contribue à l'hérédité.
    - Ils ne peuvent donc pas se transmettre à la génération suivante.

## Lignée germinale

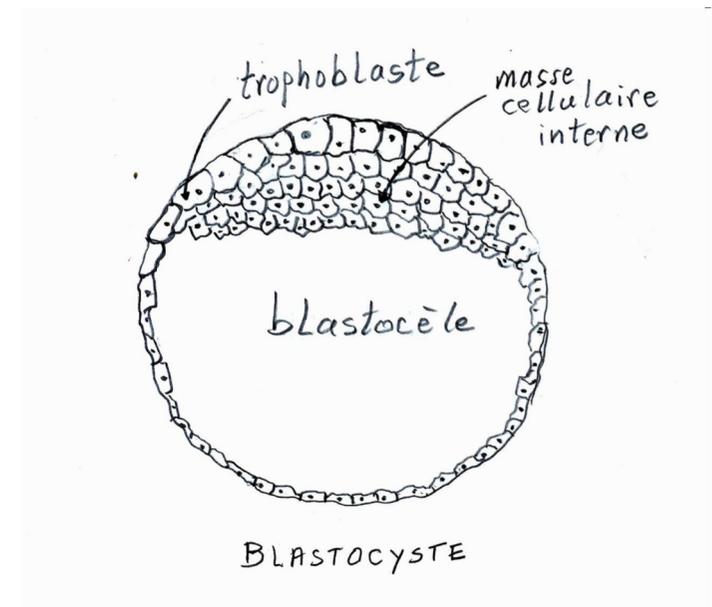


## Gamétogenèse



# Cellules souches embryonnaires

- Le zygote (ovule fécondé par un spermatozoïde) est qualifié de **totipotent**, car il a la capacité de générer toutes les cellules d'un organisme (y compris les tissus extra-embryonnaires).
- Les **cellules souches embryonnaires (CSE)** sont des cellules prélevées sur un embryon au stade blastocyste.
- Les CSE sont
  - **Autoproliférantes**: elles se reproduisent sans limite dans des milieux de culture.
  - **Pluripotentes**: elles peuvent se différencier pour donner tous les types cellulaires d'un organisme (y compris la lignée germinale), sauf les tissus extraembryonnaires.
- Elles offrent donc des perspectives intéressantes pour la régénération tissulaire, mais donnent lieu à des débats éthiques.

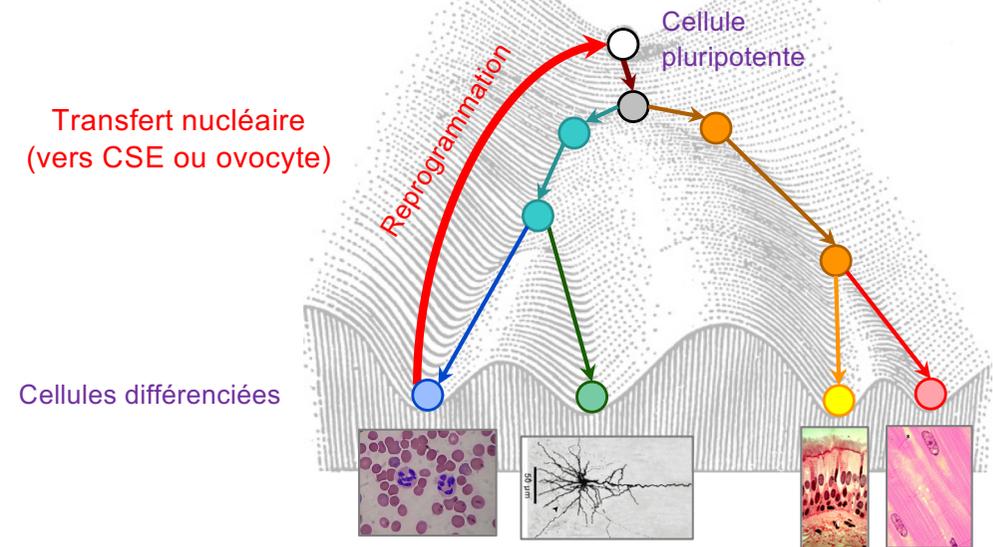


Description: Coupe d'un blastocyste montrant le trophoblaste, le blastocèle et la masse cellulaire interne. Dessin original de Michel Hamels.

# Reprogrammation cellulaire par transfert nucléaire

- Dans les années 1960, John Gurdon met au point des méthodes permettant de générer un individu entier en clonant une cellule somatique.
- Ses premiers travaux portent sur l'embryon de xénope.
- Il transfère les noyaux de cellules somatiques dans des cellules souches embryonnaires.
- Au début il arrive à obtenir des clones à partir de cellules peu différenciées (blastula).
- En 1962, il parvient à cloner des cellules intestinales.
- Des travaux ultérieurs montrent qu'on peut ainsi obtenir des clones à partir de quasiment tous les types cellulaires d'un adulte.
- Ceci démontre que les cellules somatiques peuvent être « reprogrammées » pour donner une cellule totipotente.
  - La **différenciation** est donc **réversible**
  - Les **cellules somatiques conservent toutes les potentialités génétiques** (et épigénétiques).
- Une trentaine d'année plus tard, on arrive à cloner également des mammifères (notamment la brebis Dolly), par transfert nucléaire vers des **ovocytes**.

Adapté de Waddington, C.H. (1957). The strategy of the genes, p31.  
Et d'Edith Heard (cours du 13 mars 2014 au collège de France)



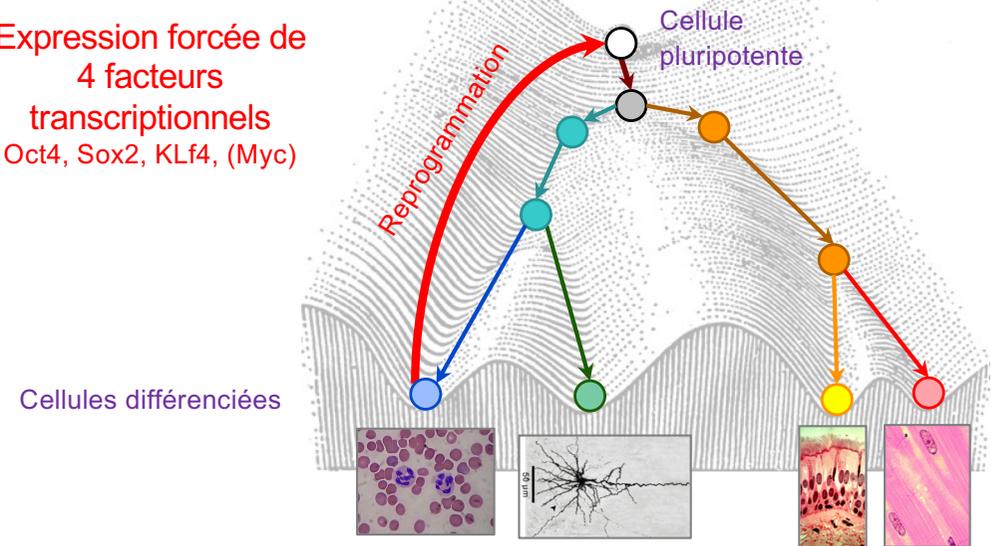
■ Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. J Embryol Exp Morphol 10, 622–640.

# Cellules souches pluripotentes induites

- Au début des années 2000, Shinya Yamanaka tente de reprogrammer des cellules somatiques sans transfert nucléaire à des cellules souches embryonnaires (CSE).
- A l'époque on avait identifié 24 facteurs transcriptionnels exprimés dans les CSE.
- Il teste différents « cocktails » de ces facteurs pour identifier la combinaison minimale permettant de reconstituer des cellules pluripotentes.
- En 2007 il démontre qu'on peut reprogrammer des cellules somatiques en y injectant 4 facteurs transcriptionnels: Oct3/4, Sox2, Klf4 et Myc.
  - Myc suscite des problèmes (tumeurs), et on montre ultérieurement qu'on peut le remplacer par un autre facteur.

Adapté de Waddington, C.H. (1957). The strategy of the genes, p31.  
Et d'Edith Heard (cours du 13 mars 2014 au collège de France)

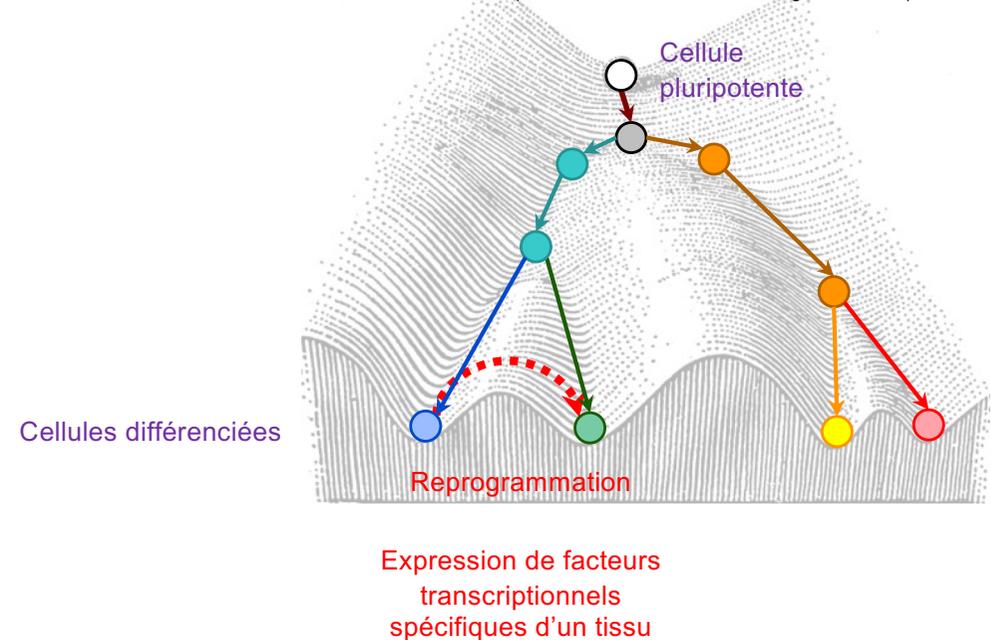
Expression forcée de  
4 facteurs  
transcriptionnels  
Oct4, Sox2, Klf4, (Myc)



# Cellules souches pluripotentes induites

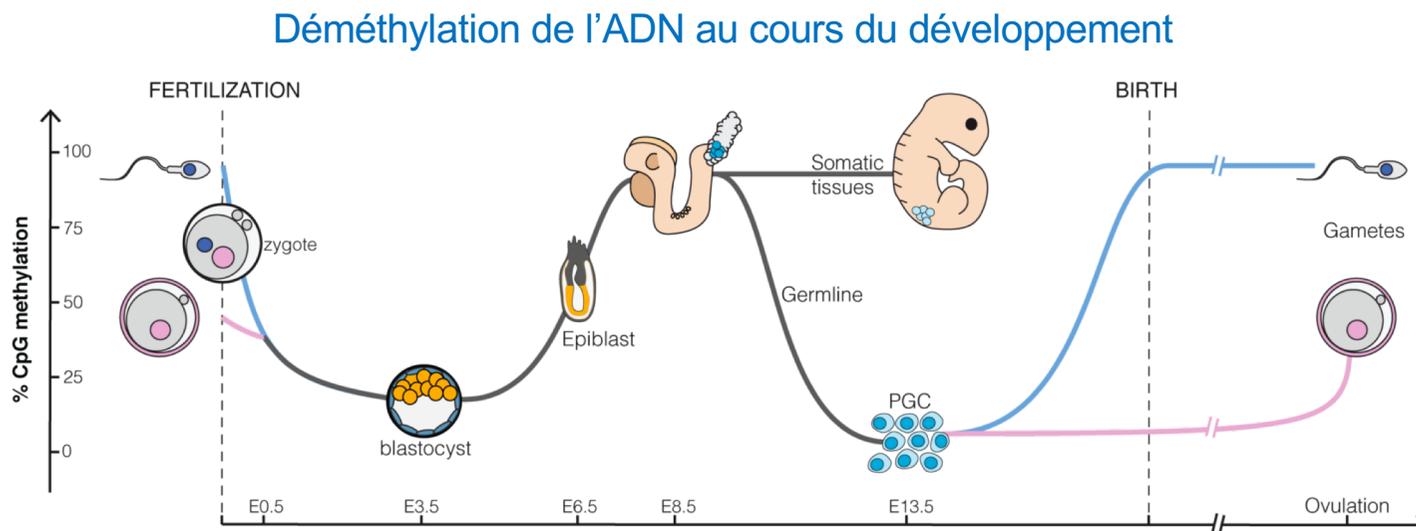
- Des expériences ultérieures démontrent qu'on peut également, dans certains cas, reprogrammer des cellules différenciées d'un type à une autre sans passer par le stade pluripotent, en forçant l'expression d'un facteur transcriptionnel particulier.
- La reprogrammation n'est cependant pas parfaite, les cellules conservent des traces de leur ancienne identité.

Adapté de Waddington, C.H. (1957). The strategy of the genes, p31.  
Et d'Edith Heard (cours du 13 mars 2014 au collège de France)

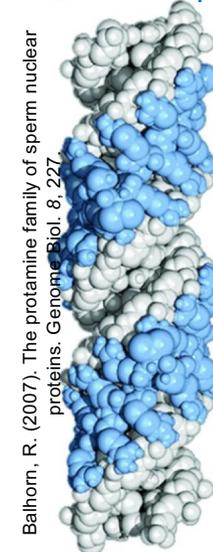


# La reprogrammation épigénétique au cours du développement

- Lors du développement des mammifères, les marques épigénétiques sont effacées à deux reprises.
  - Gamétogenèse
  - Zygote
- L'ADN est déméthylé
  - Cependant certaines régions échappent à la déméthylation
  - Ces régions coïncident généralement avec des éléments répétés de type rétrotransposons
  - Protection du génome
- Lors de la spermatogenèse, les histones sont remplacées par des **protamines**
  - Ceci permet d'empaqueter les chromosomes de façon extrêmement compacte.
  - Cependant, 10-15% des gènes restent protégés par des histones.
- Les facteurs cytoplasmiques (notamment facteurs transcriptionnels) sont transmis à la descendance par la voie maternelle, mais pas par le spermatozoïde.
- Transmission de petits ARN ?

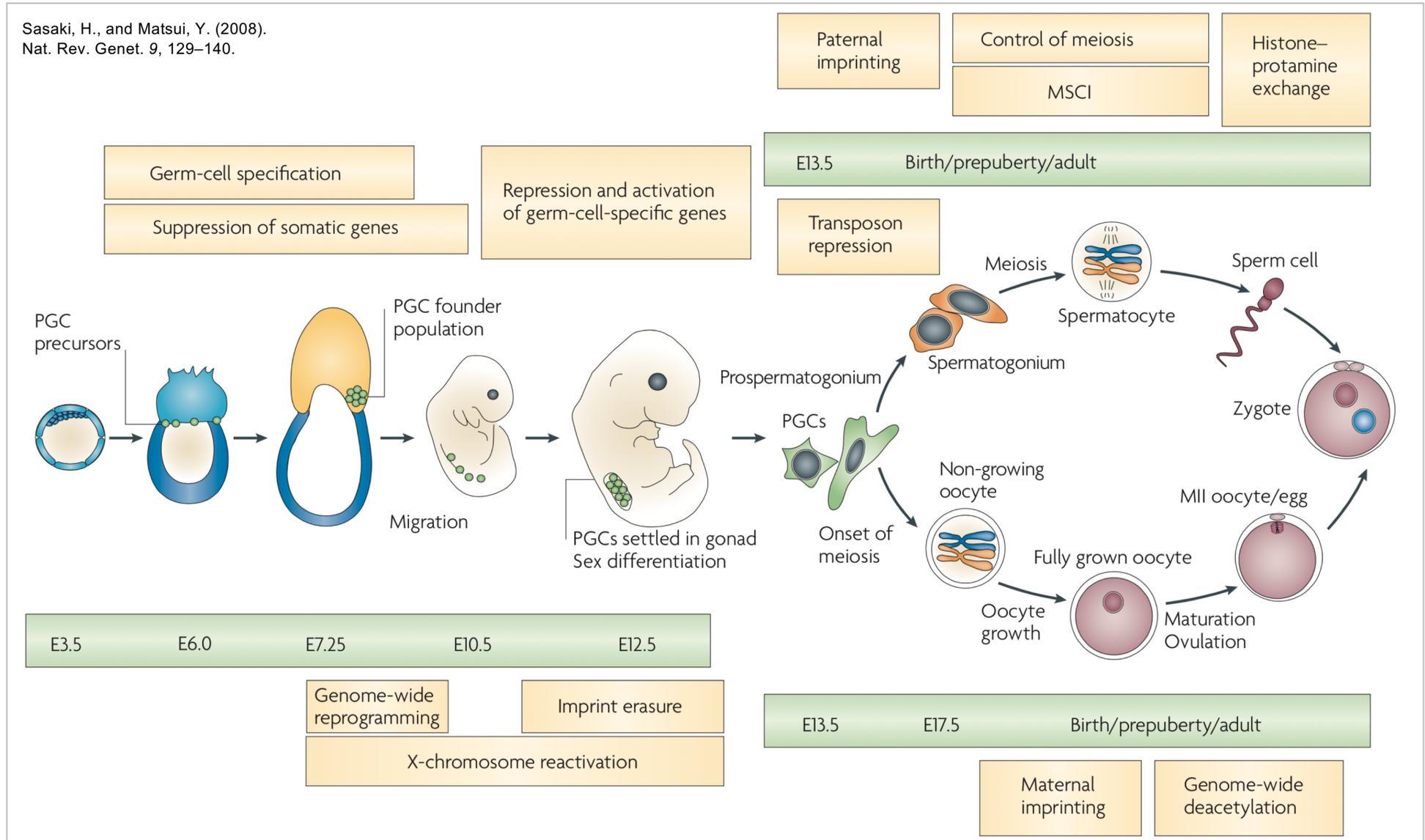


## Chromatine-protamine



# Evénements épigénétiques dans la lignée germinale

Sasaki, H., and Matsui, Y. (2008).  
Nat. Rev. Genet. 9, 129–140.



*Chapitre 6*

***Existe-t-il une transmission transgénérationnelle  
des modifications épigénétiques ?***

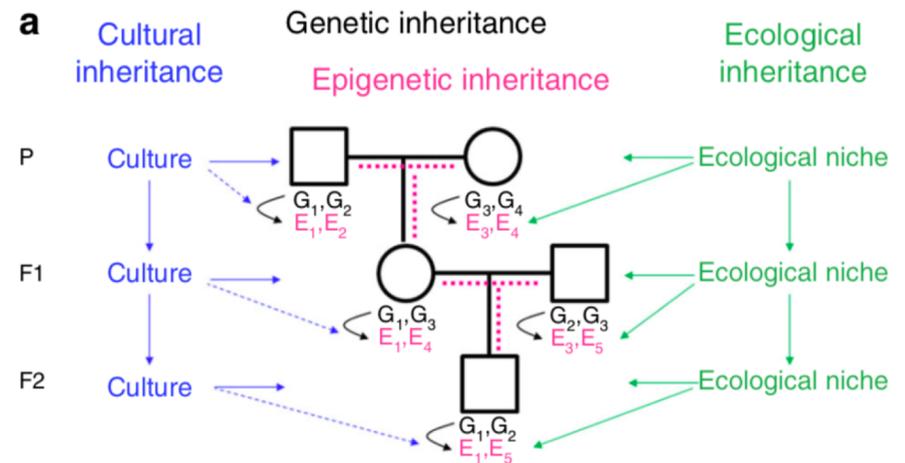
# Existe-il une transmission héréditaire des modifications épigénétiques ?

- Différentes études ont rapporté une transmission héréditaire de différents types de stress
  - Stress métabolique
    - Carences alimentaires
    - Obésité
  - Perturbateurs endocriniens
  - Tabac
  - Alcool
  - Drogues
  - Traumatisme psychologique
  - ...
- On interprète ces observations comme des indications d'une transmission héréditaire de caractères acquis.
- On invoque des mécanismes épigénétiques.
- La question n'est cependant pas évidente
  - Transmission transgénérationnelle ou effet *in utero* sur la descendance ?
  - Comment distinguer les effets biologiques et culturels ?
  - Les mécanismes épigénétiques connus ne permettent pas d'expliquer une transmission héréditaire chez les mammifères.
  - Certaines études récentes contredisent les résultats des premières publications.
- **Avertissement**
  - Sujet controversé
  - Recherches très récentes / actuelles
    - Une partie des choses qu'on considère aujourd'hui vraisemblables pourraient être informées
    - De nouveaux mécanismes pourraient être découverts dans un futur plus ou moins proche.

- Radford, E.J. (2018). Exploring the extent and scope of epigenetic inheritance. *Nat Rev Endocrinol* 14, 345–355.
- Henikoff, S., and Greally, J.M. (2016). Epigenetics, cellular memory and gene regulation. *Curr. Biol.* 26, R644-648.
- Horsthemke, B. (2018). A critical view on transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Nat Commun* 9, 2973.

# Qu'entend-on ici par « environnement » ?

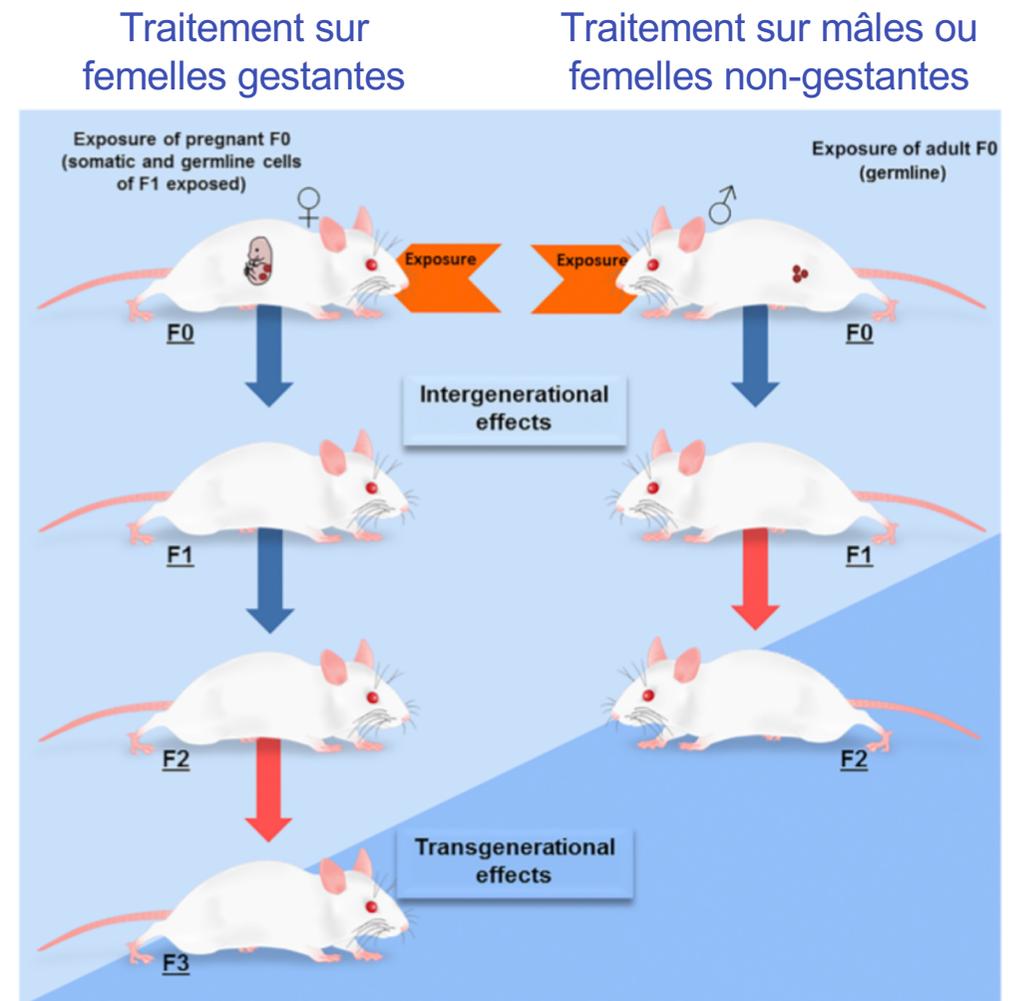
- Dans la littérature concernant l'épigénétique, le terme « environnement » recouvre des facteurs assez distincts.
  - Facteurs physico-chimiques
    - Exposition à des substances chimiques
    - Climat
    - Irradiations
  - Facteurs biologiques
    - Alimentation
  - Facteurs sociaux et culturels
    - Stress
    - Mode de vie
  - Combinaisons
    - Exemple: impact culturel sur l'alimentation
- Ces facteurs peuvent agir de différentes manières sur le génome (mutations) et l'épigénomes (notamment par modifications des marques chromatinienne).
- Il est donc important de les distinguer.



Horsthemke, B. (2018). A critical view on transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Nat Commun* 9, 2973.

# Hérédité intergénérationnelle versus transgénérationnelle

- Dans le domaine de l'épigénétique, on a établi une distinction entre deux niveaux d'hérédité
  - **intergénérationnelle**: impact du sur la descendance pouvant s'expliquer par l'exposition de ces descendants au traitement (**foetus, gamètes du foetus**).
  - **transgénérationnelle**: impact sur les générations n'ayant pas été exposées au traitement.
- Traitement sur femelles gestantes (gauche)
  - les foetus (qui donneront la F1) contiennent déjà les ovules qui formeront le la petite fille (F2);
  - les effets transgénérationnels ne peuvent donc se mesurer qu'à partir de la troisième génération (F3).
- Traitements sur mâles ou femelles non-gestantes (droite)
  - mâles : les spermatozoïdes se forment à partir de la puberté;
  - femelles non-gestantes: les gamètes de F0 sont exposés, ils donnent les individus de F1;
  - les individus F2 sont donc constitués par des cellules qui n'ont pas été exposées.



*Agouti*

- Chez la souris, certaines souches présentent une expression variable du gène agouti selon les individus.
- Ce gène est normalement exprimé dans les poils et confère à leur pigmentation.
- Chez cette souche, l'expression ectopique (en des lieux anormaux) a des effets multiples
  - coloration jaune du pelage,
  - obésité,
  - susceptibilité aux tumeurs.

Home » November » **DNA Is Not Destiny: The New Science of Epigenetics**

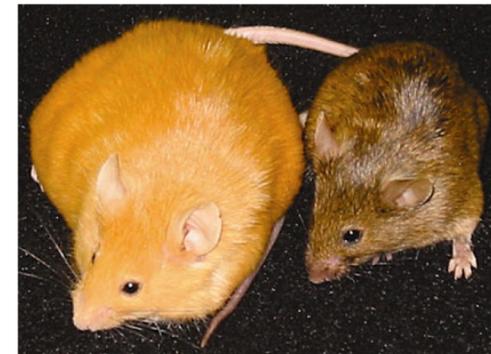
FROM THE NOVEMBER 2006 ISSUE

## DNA Is Not Destiny: The New Science of Epigenetics

Discoveries in epigenetics are rewriting the rules of disease, heredity, and identity.

By Ethan Watters | Wednesday, November 22, 2006

RELATED TAGS: **GENETICS**, **EPIGENETICS**

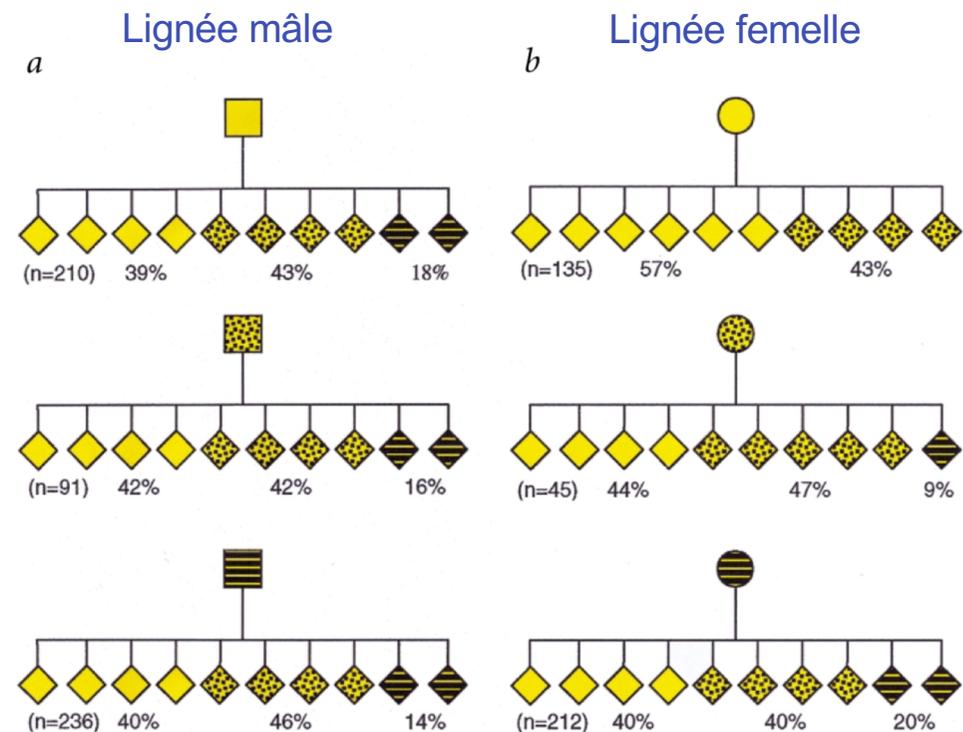


With no more than a change in diet, laboratory agouti mice (left) were prompted to give birth to young (right) that differed markedly in appearance and disease susceptibility.

<http://discovermagazine.com/2006/nov/cover>

# Héritabilité du phénotype agouti

- Phénotype
  - variable entre individus d'une même portée,
  - quantitatif (échelle continue) plutôt que qualitatif (tout ou rien),
  - héritable via la mère mais pas le père,
  - réversible entre générations,
  - influençable par la nutrition maternelle,
  - ne provient pas d'une différence de séquence de l'ADN.
- Figure du haut: variabilité du phénotype.
- Figure du bas: hérabilité du phénotype
  - **Pas d'héritabilité par la lignée paternelle:** les proportions de souris jaunes, foncées ou intermédiaires ne dépendent pas du phénotype paternel.
  - **Héritabilité par la lignée maternelle:** les souris jaunes donnent une proportion plus importante de souris jaunes, et réciproquement.



# Contrôle épigénétique des éléments transposables

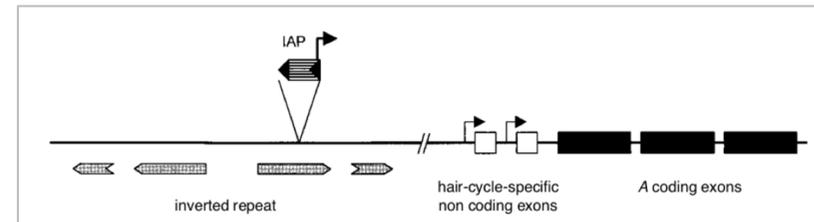
- La variabilité du phénotype s'explique par la présence, à 100 kilobases de distances (100.000 nucléotides) d'un élément transposable.
- Cet élément est normalement inactivé par méthylation de l'ADN
- Chez les souris de la lignée « *viable yellow agouti* » ( $A^{vy}$ ) l'inactivation est moins efficace, ce qui provoque une expression ubiquitaire du gène, dont l'intensité varie selon les individus.

letter

© 1999 Nature America Inc. • <http://genetics.nature.com>

## Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse

Hugh D. Morgan<sup>1</sup>, Heidi G.E. Sutherland<sup>2</sup>, David I.K. Martin<sup>3</sup> & Emma Whitelaw<sup>1</sup>



- Morgan, H.D., Sutherland, H.G., Martin, D.I., and Whitelaw, E. (1999). Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat. Genet.* 23, 314–318.

# Impact de la nutrition sur le phénotype Agouti

- Une nourriture enrichie en molécule donneuse de méthyl (S-Adenosyl-méthionine) diminue les phénotypes
  - agouti (surexpression d'un pigment due à un rétrotransposon)
  - axin (déformation de la queue due à un rétrotransposon dans un intron).
- Ceci suggère que le niveau de déméthylation, variable entre individus, peut être compensé par une diète appropriée (« traitement épigénétique »).
- Cet effet n'est cependant pas transmis aux générations suivantes.

- Waterland, R.A., Dolinoy, D.C., Lin, J.-R., Smith, C.A., Shi, X., and Tahiliani, K.G. (2006). Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin Fused. *Genesis* 44, 401–406.
- Waterland, R.A., Travisano, M., and Tahiliani, K.G. (2007). Diet-induced hypermethylation at agouti viable yellow is not inherited transgenerationally through the female. *FASEB J.* 21, 3380–3385.

# *Perturbateurs endocriniens*