

ÉPIGÉNÉTIQUE : UNE LECTURE DU GÉNOME VIA DES MODIFICATIONS STABLES / TRANSITOIRES ET TRANSMISSIBLES

EPIGENETICS: A READING OF THE GENOME THROUGH STABLE / TEMPORARY / INHERITABLE MODIFICATIONS

Hélène JAMMES⁽¹⁾

(Communication présentée le 28 Novembre 2013)

RÉSUMÉ

L'épigénétique se réfère à un ensemble de processus moléculaires contrôlant le fonctionnement du génome. Ces processus, mettant en jeu la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, de petits et grands ARN non codants, constituent la machinerie épigénétique et participent à l'architecture nucléaire. Stable mais aussi flexible, et variant rapidement, le statut épigénétique du noyau cellulaire est dynamique. Dès la fécondation, les patrimoines génétiques parentaux subissent une reprogrammation épigénétique orchestrant l'expression génique indispensable au développement embryonnaire. Au cours du développement, les vagues de différenciation cellulaire, nécessaires à l'organogénèse, s'accompagnent de la mise en place d'épigénomes cellulaires spécifiques dont la stabilité est assurée par l'héritabilité des marques épigénétiques à travers la mitose (voire la méiose). Ceci garantit le maintien de la fonction cellulaire de par la stabilité du profil de gènes exprimés. Flexibilité et/ou réversibilité de ces marques peuvent intervenir en réponse à divers changements environnementaux. Cette caractéristique prend toute sa dimension dans les processus de programmation foetale, soulignant l'empreinte de la vie *in utero* sur le devenir de la descendance. Afin d'illustrer l'ensemble de ces notions, nous prendrons divers exemples de biologie du développement avec une attention particulière concernant la place de la programmation épigénétique au cours de la spermatogénèse. L'épigénétique peut être considérée comme mémoire cellulaire et source de diversité entre les individus.

Mots-Clés : épigénétique, développement, différenciation cellulaire, spermatogénèse.

SUMMARY

Epigenetics refers to molecular processes checking the reading of the genome. These processes, including DNA methylation, the histone post translational modifications, as well as small and long non coding RNA, constitute the epigenetic machinery and participate to nuclear architecture. Stable, flexible, and quickly variable, the epigenetic status of cell nucleus is dynamic. After the fertilization, the parental genomes undergo epigenetic reprogramming, orchestrating the gene expression essential to the embryonic development. During the embryo development, the waves of cellular differentiation involved in organogenesis, come along with the implementation of cell-specific epigenome. Its stability is insured by the heritability of the epigenetic marks through the mitosis (and meiosis). It provides the maintenance of cell function associated with the stability of gene expression profile. Flexibility and/or reversibility of these marks take place in answer to diverse environmental changes. The importance of these processes is suggested by fetal programming, underlined the impact of in utero life on adult health and diseases. In order to exemplify these concepts, we will analyze the role played by the epigenetic programming during the spermatogenesis. Thus, epigenetics acts such as cell memory and origin of diversity between the individuals.

Key Words: epigenetics, development, cell differentiation, spermatogenesis.

(1) DR INRA, Biologie du Développement et Reproduction, Jouy en Josas
Courriel : helene.jammes@jouy.inra.fr

L'ÉPIGÉNÉTIQUE, ENSEMBLE DE SIGNATURES MOLÉCULAIRES ORCHESTRANT LA SÉLECTION DE L'INFORMATION GÉNÉTIQUE

La notion d'épigénétique, dans son sens moderne, est basée sur les travaux du biologiste Conrad H. Waddington (1942). Ce dernier définit l'épigénétique comme la branche de la biologie étudiant les interactions entre les systèmes « gènes » et « environnement » donnant naissance au phénotype de l'individu (Holliday, 2006). L'épigénétique se réfère aux marques apposées sur le génome, orchestrant une organisation du patrimoine génétique en domaines actifs et non actifs, permettant ainsi une sélection et une lecture dirigée de l'information génétique. Les marques épigénétiques induisent des changements durables de l'expression des gènes sans modification de l'ADN (pas de mutation). Apposées en réponse à un stimulus externe, elles sont maintenues malgré la disparition du stimulus. Et ce, contrairement aux facteurs de transcription dont la liaison à l'ADN est transitoire et régule l'expression des gènes (activation / inhibition) en réponse immédiate à un stimulus externe à la cellule. Les marques épigénétiques sont stables et héréditaires au cours des divisions cellulaires (mitose). Elles fonctionnent comme une mémoire de la cellule et sont responsables à longs termes du profil d'expression des gènes. Les marques épigénétiques sont toutefois modifiables et/ou réversibles en fonction de l'environnement.

L'identité cellulaire

L'identité cellulaire est sous le contrôle de marques épigénétiques, (i) s'apposant sur la molécule d'ADN sans en modifier la séquence, (ii) transmissibles et héréditaires à travers la mitose, (iii) réversibles. Les marques évoluent au cours du développement.

Prenons deux exemples pour éclairer cette notion :

Considérons le cycle de développement du papillon. De l'œuf, éclot la larve qui se transforme en chenille puis vient le splendide papillon dont la vie est généralement éphémère et consacrée à la reproduction. À chacune de ces étapes, des cellules se différencient en exprimant un profil de gènes bien défini afin d'obtenir le phénotype adéquat. Or toutes les cellules de cet individu, de l'œuf au splendide papillon, possèdent le même patrimoine nucléaire. Il est donc évident qu'une sélection de l'information génétique est indispensable à chaque phase de développement. Cette nécessité de sélectionner l'information génétique, c'est-à-dire les gènes à exprimer, est assurée par les processus épigénétiques. Cette nouvelle strate d'informations se superpose au génome, orchestre le transcriptome (ensemble de gènes exprimés à un stade donné) et contribue au devenir cellulaire, c'est-à-dire au phénotype. L'apposition des marques épigénétiques, activatrices ou inhibitrices, spécifiques, constitue la mémoire de la différenciation cellulaire, ou **épigénome** cellulaire. Les modifications dans l'expression des gènes qui en résultent, sont transmissibles au cours des divisions cellulaires.

Le développement embryonnaire chez les mammifères est aussi un bon exemple de programmation épigénétique (Reik *et al.*, 2007). Spermatozoïdes et ovocytes ont respectivement un patrimoine nucléaire haploïde de cellule hautement différenciée. Les ovocytes expriment un large catalogue de gènes et les ARNm maternels ont un rôle majeur dans les premières étapes du développement de l'œuf après fécondation (Rivera *et al.*, 2013). Au contraire, les spermatozoïdes n'expriment que peu d'ARNm du fait de la compaction de leur ADN nucléaire (cf ci-dessous). Chaque type de gamète est donc porteur de marques épigénétiques très spécifiques. À la fécondation, les deux patrimoines perdent une partie importante de leurs marques épigénétiques propres. De nouvelles marques s'apposent. Cette reprogrammation épigénétique fondamentale permet la mise en place du programme de gènes nécessaire au développement harmonieux de l'embryon (*figure 1*).

Les grandes familles de marques épigénétiques

Les histones et leurs modifications post-traductionnelles (figure 2)

- Les histones sont les protéines constituant les nucléosomes, structure autour de laquelle s'enroule la molécule d'ADN permettant une forte compaction du patrimoine génétique, indispensable au regard de la taille du noyau cellulaire.
- Les modifications biochimiques post-traductionnelles touchent des acides aminés particuliers des histones (lysine, arginine...) et changent les interactions de type protéine-protéine (interactions histone-histone et histone-autres protéines nucléaires) et les interactions protéine-ADN créant ainsi des domaines ouverts à la transcription ou fermés (silence transcriptionnel). À l'heure actuelle, plus de 100 modifications post-traductionnelles ont été répertoriées. La combinaison de ces différentes modifications est appelée « Code des histones » et contrôle l'état transcriptionnel d'une région (Kouzarides 2007 ; Dawson *et al.*, 2012). De nombreux acteurs, dits modificateurs et lecteurs (« Modifiers and Readers », Yun *et al.*, 2011) contribuent au déchiffrement de ce code extrêmement complexe.

La méthylation de l'ADN (Figure 3)

- Cette modification covalente permet la liaison d'un groupe méthyl (CH₃) sur le carbone 5 de la cytosine (5meC) d'un dinucléotide CG chez les mammifères (Holliday et Pugh, 1975). Chez les plantes, les sites de méthylation sont aussi de type CHG et CHH où H peut être A, G ou T. Le groupe CH₃ est apporté par le S-Adenosyl Méthionine (SAM) fourni dans l'alimentation.
- Elle est pilotée par une famille d'enzymes les DNA méthyltransférases, (DNMT ; Bestor 2000). Certaines DNMT ont pour fonction l'apposition de nouvelles marques (méthylation *de novo*). D'autres maintiennent les marques à travers la mitose et participent donc à la conservation de la mémoire épigénétique (maintien de la méthylation).

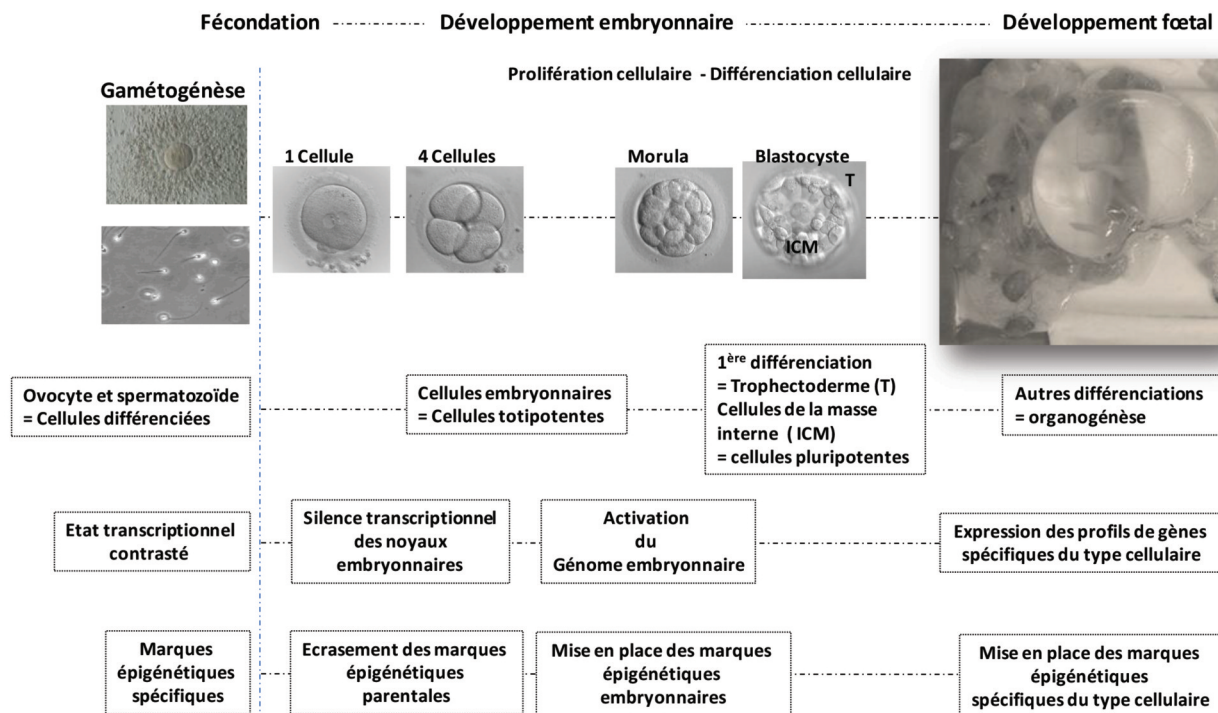


Figure 1 : Développement embryonnaire chez les mammifères. Les états de totipotence, de pluripotence puis de différenciation cellulaire afin d'obtenir l'organogénèse propre à l'individu nécessitent l'expression de gènes sélectionnés au sein de l'information génétique. Cette sélection est pilotée par l'apposition de marques épigénétiques.

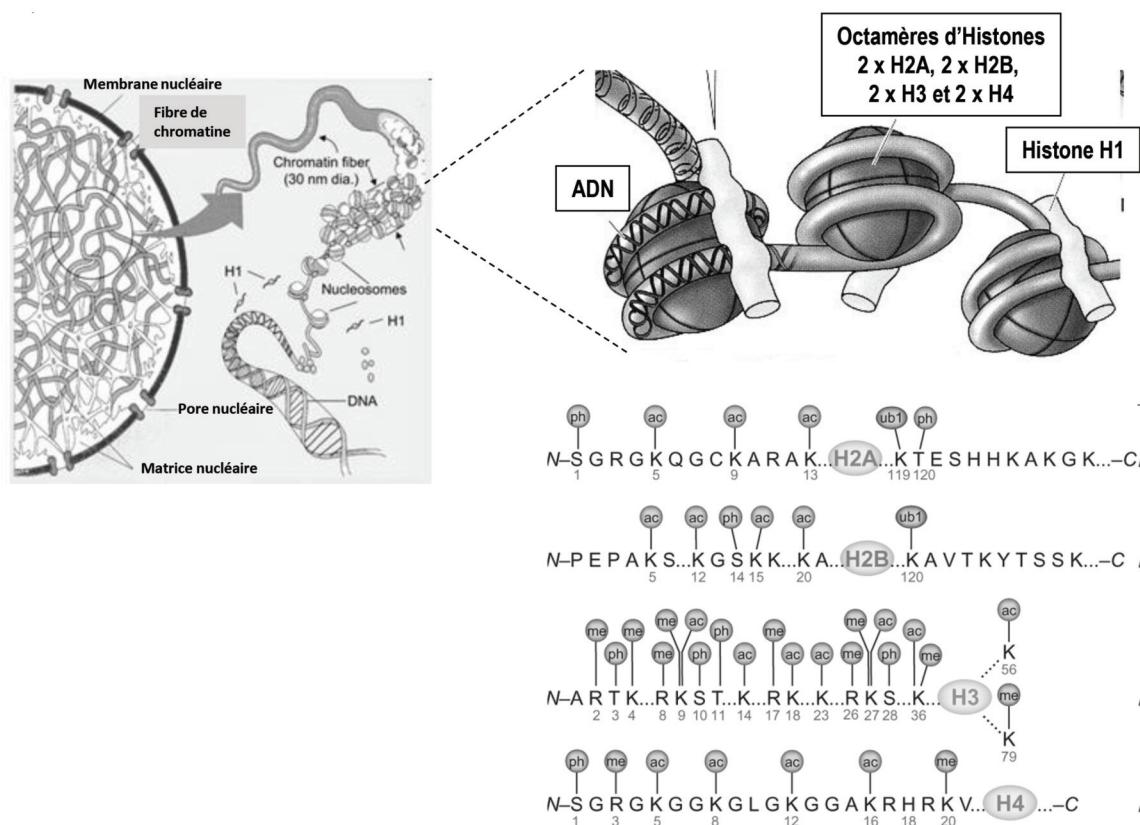


Figure 2 : (A) Représentation des nucléosomes, composés d'Histones (H1, H2, H3 et H4) sur lesquels la molécule d'ADN s'enroule. (B) Liste non exhaustive des modifications post-traductionnelles apposées sur les acides aminés de chaque type d'histones. Ph - phosphorylation, ac - acétylation, me - méthylation, ub1 - ubiquitinylation.

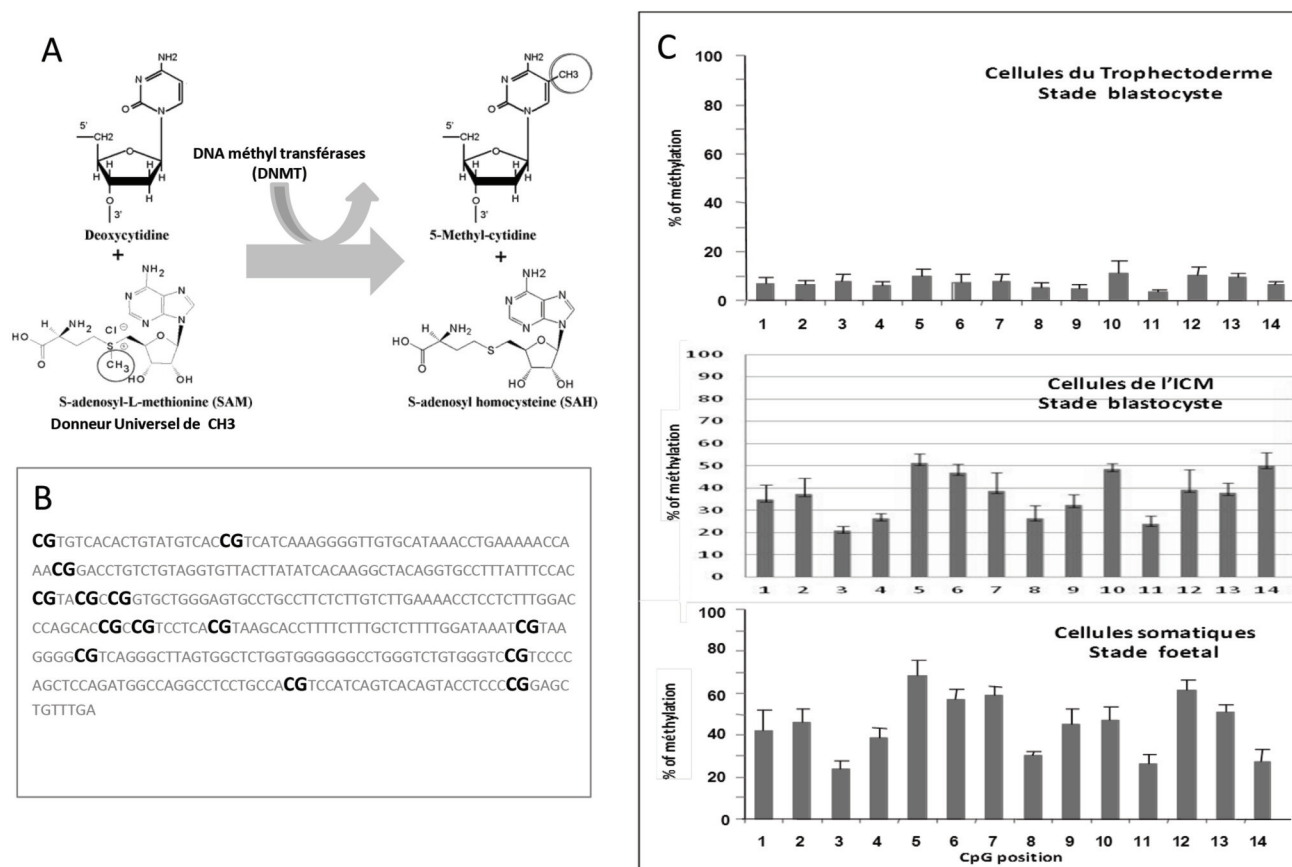


Figure 3 : (A) Fixation d'un groupe méthyl (CH₃) donné par le S-adenosyl-L-méthionine (SAM) sur le carbone 5 d'une cytidine sous l'action d'enzymes, appelées DNA méthyltransférases (DNMT). (B) Exemple de séquence génomique de mammifère, comportant 14 dinucléotides CG pouvant être la cible d'une méthylation (en gras). (C) Détermination du pourcentage de méthylation porté par chacun des 14 CG, par conversion au bisulfite de sodium de la séquence génomique et analyse quantitative par pyroséquençage dans 3 types cellulaires différents (résultats obtenus au laboratoire).

- La méthylation de l'ADN est réversible selon soit une déméthylation passive (la DNMT de maintien ne fonctionne pas : à chaque mitose, il y a une perte progressive de l'information épigénétique), soit par déméthylation active. Dans les cellules germinales primordiales (dans la gonade embryonnaire) et juste après la fécondation, une vague de déméthylation très rapide est observée. Plusieurs mécanismes sont évoqués dont la transformation de la 5meC en 5hmeC par oxydation catalysée par la famille des « Ten Eleven Translocation (TET) enzymes » (Kinney *et al.*, 2013).
- Chez les eucaryotes, la méthylation n'est pas universelle. Aucune méthylation de l'ADN génomique n'est détectée chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*), les nématodes (*Caenorhabditis elegans*) et certains insectes comme la drosophile. Chez les abeilles, un faible taux de méthylation globale est observé, de l'ordre de 0,5%. Bien qu'étant faible, cette marque joue un rôle important au cours du développement de l'abeille comme nous le verrons ultérieurement. La méthylation n'affecte que 3 à 8% des cytosines chez les mammifères contre 50% chez les plantes. À ce titre, la méthylation de l'ADN *de novo* est considérée aujourd'hui comme une réelle

réponse adaptative de la plante à son environnement avec la possibilité de changements dans l'expression des gènes, à la fois rapides et stables en fonction des modifications environnementales (Zhang *et al.*, 2013 ; Weigel *et al.*, 2012).

- La méthylation de l'ADN est une des marques épigénétiques la plus analysée qui suscite le développement d'un très large éventail de technologies (Laird, 2010).

Les longs et petits ARN non codants

- De longs ARN non codant, une fois transcrits, jouent aussi un rôle majeur dans le contrôle de la transcription de certaines régions chromosomiques. Ils s'accrochent sur des domaines chromosomiques particuliers et bloquent ainsi la transcription. L'exemple le plus connu est celui de XIST, un long ARN non codant impliqué dans l'inactivation du chromosome X chez la femelle des mammifères (Schlutz *et al.*, 2013 ; Schaukowitch *et al.*, 2013). Les petits ARN non codants sont sous divisés en plusieurs classes selon leur taille et leur mécanismes d'action. Ils participent à la régulation de l'expression génique (Sethupathy *et al.*, 2013).

ARCHITECTURE NUCLÉAIRE

Euchromatine et hétérochromatine

Lorsqu'on regarde le noyau d'une cellule sous un microscope, on observe des régions foncées et des régions claires. Les régions foncées (opaques à la lumière) correspondent en fait à de l'hétérochromatine, c'est-à-dire à des domaines condensés et fermés à la transcription. A contrario, les parties claires correspondent à l'euchromatine, région ouverte et transcriptionnellement active. La proportion hétérochromatine/euchromatine n'est pas figée ; elle est modulable et dynamique et dépend du type cellulaire observé (*figure 4*).

L'importance de cette architecture nucléaire est bien illustrée par la mise en évidence des variations au sein des noyaux des cellules photoréceptrices de mammifères. Selon les études menées par Solovei *et al.*, (2009), il existe une corrélation étroite entre la distribution de l'hétérochromatine au sein du noyau des cellules photoréceptrices et la vision diurne versus nocturne des animaux. La compaction de la chromatine serait une des com-

posantes physiques des capacités visuelles des animaux développées en fonction de leur mode de vie lié à la lumière.

Les compartiments nucléaires

Les connaissances actuelles dans le domaine de l'organisation du génome au sein des noyaux de cellules somatiques suggèrent aussi que l'organisation tridimensionnelle de la chromatine est un niveau supplémentaire de régulation transcriptionnelle des gènes (Schneider and Grosschedl, 2007). L'espace nucléaire est en effet composé de compartiments de structures et de fonctionnalités bien distinctes et à proximité desquels les gènes se localisent en fonction de leur état transcriptionnel. Quand des gènes sont co-exprimés, ils peuvent s'associer à la même machinerie de transcription. Ceci implique une localisation particulière au sein du noyau. Il est ainsi démontré que des gènes co-exprimés, éloignés les uns des autres sur le même chromosome ou situés sur des chromosomes différents, peuvent se relocaliser au sein d'un compartiment du noyau (Francastel *et al.*, 1999 ; Kress *et al.*, 2010).

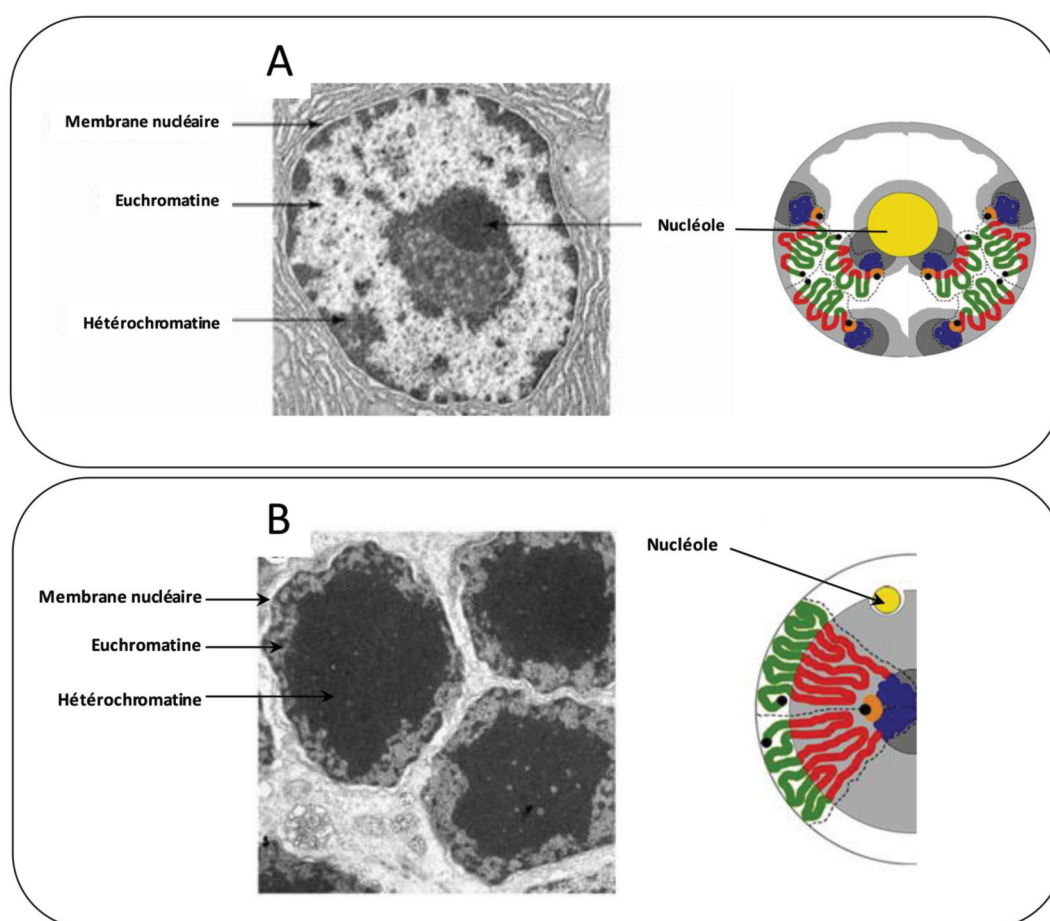


Figure 4 : Implication fonctionnelle des domaines d'euchromatine et d'hétérochromatine. Photos en microscopie électronique de cellules hépatiques (A) et de cellules photoréceptrices (B) de souris et représentations schématiques des domaines d'euchromatine et d'hétérochromatine et des marques épigénétiques associées (d'après Helmlinger *et al.*, 2006).

En bleu, hétérochromatine centromérique associée à la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 9, marque répressive (H3K9me3).

En vert, euchromatine associée à la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 4, marque permissive (H3K4me3)

En rouge, hétérochromatine non centromérique associée à la triméthylation de l'histone H4 (H4K20me3).

IMPACT DE LA NUTRITION SUR LA MÉTHYLATION DE L'ADN ET DÉTERMINISME PHÉNOTYPIQUE

Reine ou ouvrière, gelée royale et méthylation de l'ADN

Un très bel exemple de l'influence de la nutrition comme paramètre environnemental intégré par les marques épigénétiques, est donné par la distinction entre ouvrières et reine induite dès le stade larvaire chez les abeilles. Au cours du développement larvaire, seul l'apport de gelée royale dicte le devenir d'une reine. Kucharski et coll démontrent parfaitement que l'absence de méthylation *de novo* globale a le même effet que l'apport de la gelée royale. Pour cela, les auteurs ont injecté au stade L1, un siRNA : cette molécule dégrade spécifiquement les ARNm de DNMT3. L'absence d'ARNm bloque la production de la protéine du même nom qui est responsable de la méthylation *de novo*. Dans ce cas, une diminution importante de la méthylation de l'ADN est observée. Cependant, le développement larvaire se poursuit jusqu'au stade adulte. Pour 75% des larves injectées, les auteurs obtiennent une reine. Les auteurs concluent que l'apport de la gelée royale et l'hypométhylation induite ont les mêmes effets phénotypiques. Ils démontrent aussi que les larves nourries à la gelée royale (les futures reines) présentent une hypométhylation globale du génome comparée à la méthylation de celui des larves des futures ouvrières. Cette démonstration de l'impact de la méthylation en réponse à la nutrition chez l'abeille est d'autant plus remarquable que le taux de méthylation du génome chez cet insecte est assez faible.

Multiexemples de l'impact de la nutrition: études épidémiologiques chez l'homme et modèles animaux

Au cours de la dernière décennie, une abondante littérature scientifique a souligné la contribution possible de modifications épigénétiques dans l'explication de certaines réponses de type adaptative. En première intention, les analyses épidémiologiques de Barker (2007) ont abouti au concept de « syndrome métabolique » et à l'hypothèse du DOHaD (*Developmental Origin of Health and Disease*) selon laquelle les conditions nutritionnelles durant la gestation influencent le développement foetal et peuvent avoir des conséquences post natales à plus ou moins longs termes. Ainsi des conditions nutritionnelles particulières (restriction ou régime « Cafétéria » riche en lipide) appliquées chez les mères pourraient induire des perturbations importantes du développement foetal avec un retard de croissance et un petit poids de naissance et être associées à une prédisposition aux pathologies cardiovasculaires et métaboliques chez le jeune adulte. Chez l'homme, les études épidémiologiques d'Heijmans *et al.* (2009) et de Tobi *et al.* (2009) mettent en évidence l'impact de la famine subie par les grands parents sur le développement

de pathologies cardiovasculaires chez les petits enfants. Ils observent des altérations des marques épigénétiques associées aux syndromes et les considèrent comme « une mémoire » de l'environnement nutritionnel. Depuis la publication de ces résultats, de très nombreux modèles animaux ont été mis en place afin de mieux comprendre les processus biologiques impliqués. Ces modèles animaux (souris, rat, porc, brebis, vache.....) fournissent la possibilité i) d'identifier avec plus de précision les fenêtres d'action chez les mères (au cours de la puberté, en période péri-conceptionnelle, en début de gestation, au cours de la gestation.....), ii) d'analyser les paramètres métaboliques de la descendance et de mieux caractériser le phénotype (au cours de la gestation, en postnatal, au cours de la vie adulte...) et iii) de déterminer les mécanismes épigénétiques sous-jacents (Harris, 2012).

Il est maintenant établi que les perturbations nutritionnelles maternelles (F0 ; quelque soit la fenêtre d'application) induisent des modifications métaboliques observables chez la descendance avec des différences de réponse entre descendance mâle et descendance femelle (F1 ; notion de dimorphisme sexuel dans la programmation foetale). Dans certains cas, des altérations épigénétiques ont aussi été identifiées au niveau des organes cibles de ces modifications phénotypiques (foie, reins....), preuves d'une mémoire cellulaire acquise au cours du développement foetal et altérant la fonction de l'organe. Dans certains cas, le métabolisme de la génération suivante peut être aussi affecté (F2). Il est admis de parler d'effets multi-générationnels.

L'ÉPIGÉNÉTIQUE DE LA SPERMATOGÉNÈSE ET LA FERTILITÉ

Spermatozoïdes, cellules hautement différenciées et épigénétiquement marquées (Figure 5)

Le spermatozoïde présente une structure unique de la chromatine: sa compaction y est extrême au regard de tous les autres types de cellules eucaryotes connus. Cette compaction, mise en place progressivement tout le long de la gamétogenèse, induit un blocage de l'activité transcriptionnelle (pas ou très peu d'expression des gènes) et assure une protection du patrimoine génétique à transmettre à l'embryon. Cette compaction nécessite différents processus moléculaires épigénétiques se déclinant selon cinq classes : i) la méthylation de l'ADN, ii) les modifications des histones et la présence de variants spécifiques du spermatozoïde, iii) le remplacement des histones par les protamines, iv) la présence de petits ARN non codants et v) l'organisation en domaines de l'ADN (Govin *et al.*, 2004 ; Miller *et al.*, 2010).

Vagues successives de modifications épigénétiques liées à la spermatogénèse

Au cours du développement embryonnaire, la migration des cellules germinales primordiales au niveau des crêtes génitales

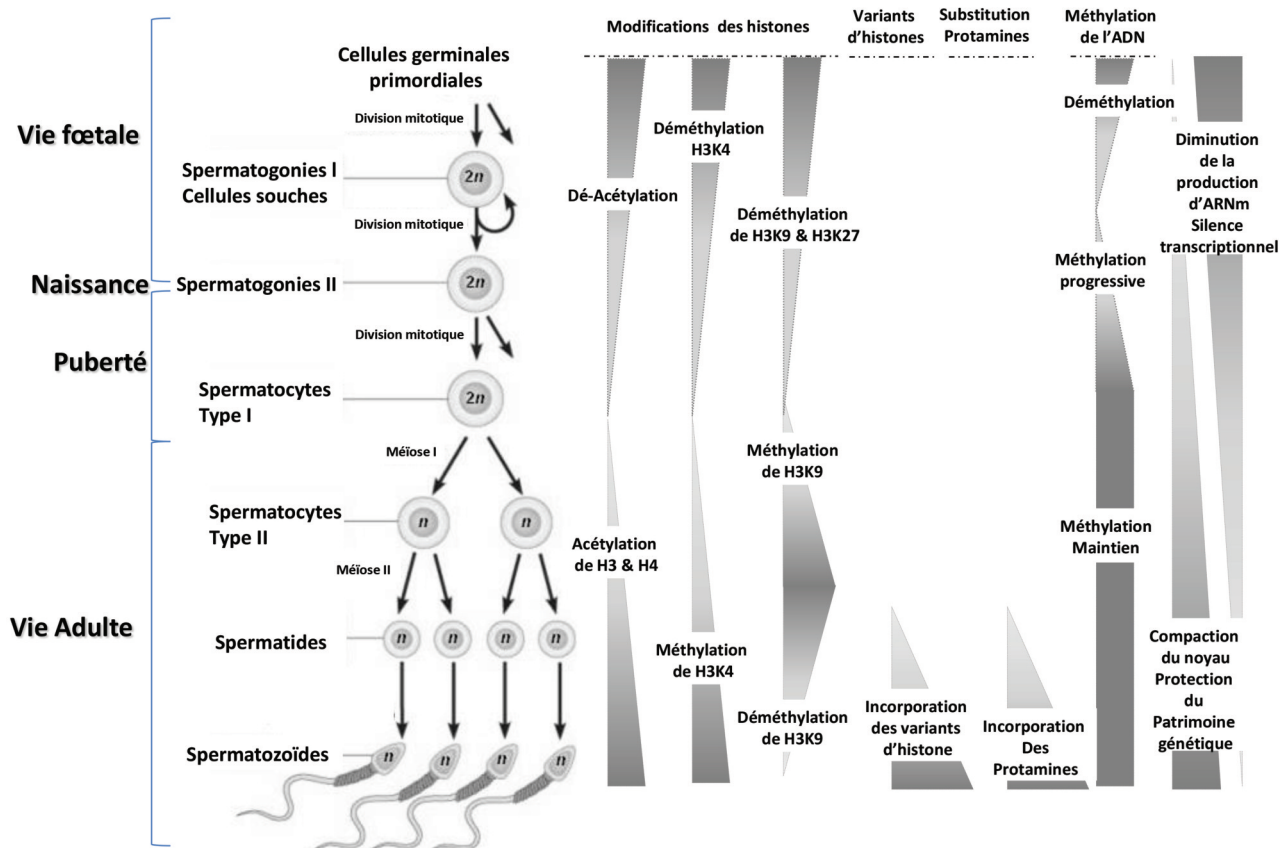


Figure 5 : Représentation des différentes étapes de la spermatogenèse et des différentes vagues de modifications épigénétiques associées au cours de la vie fœtale, post-natale et adulte. L'ensemble des marques épigénétiques héritées au stade spermatozoïde concourt à une exceptionnelle compaction de l'ADN, cruciale pour une protection maximale du patrimoine génétique paternel.

signe l'initiation de la gamétogenèse. Ces cellules perdent alors toutes leurs marques épigénétiques et leur ADN nucléaire est complètement déméthylé. Chez le mâle, la spermatogenèse démarre pendant la vie fœtale. Les cellules germinales occupent les tubes séminifères et fournissent un stock de cellules non différenciées diploïdes (2n) appelées « **spermatogonies** ». À la naissance chez la souris et à la puberté chez l'homme, les spermatogonies se différencient en **spermatocytes de type I** (2n) ; ces cellules subissent une méiose permettant d'obtenir des **spermatocytes de type II** (n) puis des **spermatides** (n). Les spermatides sont alors transformées en **spermatozoïdes** de par l'acquisition d'un flagelle et la compaction du noyau. Ces différentes étapes de mitoses/méiose et de différenciation cellulaire s'accompagnent de vagues successives d'apposition de marques épigénétiques. La méthylation est mise en place progressivement : elle commence au stade « spermatogonie » et atteint un maximum au stade « spermatocyte de type I ». La méthylation est ensuite transmise en l'état et conservée jusqu'au stade « spermatozoïde ». Concernant les histones, le profil de modifications est beaucoup plus complexe. Après une dé-acétylation et une démé-

thylation des histones H3 et H4 sur différentes lysines, qui s'achèvent au stade spermatocyte, une ré-acétylation et une re-méthylation de ces mêmes histones se mettent en place. Des variants d'histones vont aussi se substituer aux histones classiques. Enfin, une grande proportion d'histones va être remplacée par des protamines. L'ensemble de ces processus sera achevé au stade spermatozoïde, conférera au noyau sa compaction maximale et conduira à un silence transcriptionnel. Il est à noter que certaines modifications épigénétiques s'effectuent au cours de la vie *in utero* de l'individu mâle. Ce point est d'autant plus remarquable i) qu'il est caractéristique de la spermatogenèse, soulignant un dimorphisme dans la cinétique d'acquisition de la maturité épigénétique des gamètes entre mâles et femelles et ii) qu'il joue un rôle primordial dans la compréhension des effets de l'environnement maternel sur le devenir et la fertilité des petits mâles (Zamudio *et al.*, 2008).

Épigénétique et fertilité

Que le profil de méthylation de l'ADN, acquis progressivement et conservé jusqu'au stade spermatozoïde, soit clairement

impliqué dans la fertilité ne fait aujourd'hui aucun doute (Carrell *et al.*, 2010 ; Boissonnas *et al.*, 2013). Chez l'homme, de nombreuses études démontrent que des perturbations de la méthylation mesurées de façon globale (Houshdaran *et al.*, 2007 ; Aston *et al.*, 2012) ou plus spécifiquement au niveau de certains gènes peuvent être associées à des sub- ou infertilités (Boissonnas *et al.*, 2010). Le taux global de méthylation et les régions génomiques concernées influencent donc la fertilité de l'individu.

De nombreuses publications soulignent l'importance des modifications post-traductionnelles des histones dans la fertilité mâle (Zamudio *et al.*, 2008). De la même façon, le rôle des protamines a été démontré. En particulier, une corrélation significative a été établie entre la diminution de l'expression des gènes des protamines et l'infertilité chez l'homme (Steger *et al.*, 2008).

Les études transcriptomiques révèlent que le spermatozoïde mature contient différents types d'ARN (ARN codants mais aussi petits et longs ARN non codants ; Lalancette *et al.*, 2008). Les ARN non codants jouent un rôle important dans la régulation épigénétique et sont potentiellement transmissibles à la descendance au moment de la fécondation.

Ces observations ouvrent de nouvelles perspectives concernant la contribution paternelle dans le développement de l'embryon et les possibilités de transmission d'information à la descendance (Yamauchi *et al.*, 2010). Rappelons qu'après la fécondation, une reprogrammation épigénétique prend place afin de contribuer à l'expression du génome embryonnaire et au développement. Toute altération de la mise en place des marques épigénétiques au cours de la spermatogénèse peut impacter cette reprogrammation et affecter ainsi le développement de l'embryon. Il est possible aussi que certaines marques ne soient pas totalement écrasées. C'est le cas de la déméthylation du génome paternel qui est complète chez la souris, mais partielle chez l'embryon de lapin, d'ovine et de bovin, suggérant qu'une mémoire paternelle épigénétique peut être conservée (Young *et al.*, 2004 ; Reis Silva *et al.*, 2011).

Impact environnemental sur l'épigénétique et la fertilité de la descendance mâle

Dans les modèles animaux, toute modification du taux de méthylation induite par un traitement chimique (ingestion d'inhibiteur de la méthylation comme la 5 azacytidine) ou par l'exposition à différents xénobiotiques (pesticides, fongicides...) perturbe de manière notable la fertilité des mâles. Le diéthylstilbestrol (DES), un agoniste du récepteur œstrogénique, souvent prescrit chez la femme enceinte jusque dans les années 70, a été associé au développement de cancers vaginaux et à de fréquentes anomalies de développement du tractus génital. Des études chez la souris indiquent clairement qu'un traitement prénatal ou néonatal par le DES induit une susceptibilité trans-générationnelle au développement de tumeurs du tractus génital chez

la descendance (femelles et mâles) associée à une altération de la méthylation loci-spécifique (Li *et al.*, 2003 ; Sato *et al.*, 2009). Le cyclophosphamide utilisé comme agent anti cancéreux et immunosuppresseur, ou la vinclozolin, un composé anti androgénique et fongicide ou encore le méthoxychlore, un composé œstrogénique et utilisé comme pesticide, présentent tous des effets sur la fonction de reproduction et sur les partenaires moléculaires épigénétiques que sont la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones altérant ainsi l'organisation chromatinienne et les profils d'expression de gènes (Manikkam *et al.*, 2012).

Modifications environnementales et transmission d'altérations épigénétiques à la descendance mâle

Une question posée aujourd'hui est la transmission de génération en génération des altérations épigénétiques et de leurs conséquences phénotypiques. Si ce processus est clairement établi chez les plantes, les exemples de la littérature permettant de l'évoquer chez les mammifères sont plus rares. Les travaux de Zeybel et coll. (2012) démontrent l'existence d'une adaptation épigénétique à un challenge à travers deux générations. Le protocole expérimental induit une fibrose hépatique par utilisation d'un hépatotoxique, le tétrachlorométhane ou tétrachlorure de carbone, chez des rats mâles (*figure 6*). Après exposition, les rats sont mis à la reproduction comme les rats témoins (2 groupes ; F0). Les descendants de chaque groupe (F1) sont à leur tour séparés en deux groupes, l'un exposé à l'induction de fibrose hépatique, l'autre non exposé (4 groupes), puis mis à la reproduction. Enfin les descendants de ces quatre groupes de rats (F2) sont exposés à ce challenge et leur réponse mesurée en termes de dépôt de collagène signant la fibrose et d'expression de gènes et de méthylation de l'ADN. Zeybel et coll. notent une adaptation au challenge avec une diminution significative de la réponse plus marquée chez les rats dont le grand père avait été exposé à ce challenge, que chez ceux pour lesquels seul le père avait subi ce challenge. Notamment, dans le foie, l'expression du gène *COL1* et le dépôt de collagène sont fortement diminués. Le gène *TGF-β1*, codant pour un facteur profibrinogène, est diminué, alors que le gène *PPAR-γ*, codant pour un facteur anti-fibrinogène est augmenté. La méthylation du promoteur du gène *PPAR-γ* est significativement hypométhylée sur certaines positions CpG, pouvant contribuer à l'augmentation de l'expression. Par contre, l'analyse de la méthylation du sperme des différentes générations ne met pas en évidence de modification notable. Des investigations complémentaires doivent être menées afin d'évaluer si d'autres modifications épigénétiques de la semence telles que des modifications des histones pourraient être impliquées. Ceci reste toutefois un bel exemple d'adaptation trans-générationnelle.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'épigénétique offre la possibilité de progresser dans la compréhension et la maîtrise de l'expression du patrimoine génétique. C'est un vaste domaine d'investigations puisque de nombreux processus moléculaires sont impliqués, interagissant entre eux et nécessitant d'innombrables acteurs pour mener à bien toutes les étapes d'écrasement, d'apposition des marques, de modifications et de lecture. Malgré, l'avalanche de publications et de données à hauts et moyens débits (voir pour exemple : *Perspectives of International Human Epigenome Consortium*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3630389/>), les questions résolues sont bien moins nombreuses que celles posées. L'apposition de marques épigénétiques sur le génome, tel des post-it signalant les domaines actifs ou silencieux transcriptionnellement,

est indiscutable mais la lecture de ce code reste souvent incomplète. La transmission de ces marques au travers la mitose et leur pérennité comme garant de la différenciation cellulaire sont largement démontrées que ce soit au cours du développement embryonnaire précoce, de la gamétogenèse ou plus généralement de l'organogénèse. Il est aussi bien démontré que l'altération de ces processus peut être enregistrée, mémorisée et avoir des conséquences à longs termes sur la fonctionnalité des organes. Il reste cependant à étudier plus avant les possibilités de transmission multi-générationnelles voire trans-générationnelle. Il reste aussi à identifier des leviers d'action capables de modifier avec précision les marques épigénétiques d'un gène, que ce soit des molécules ou certaines conditions environnementales.

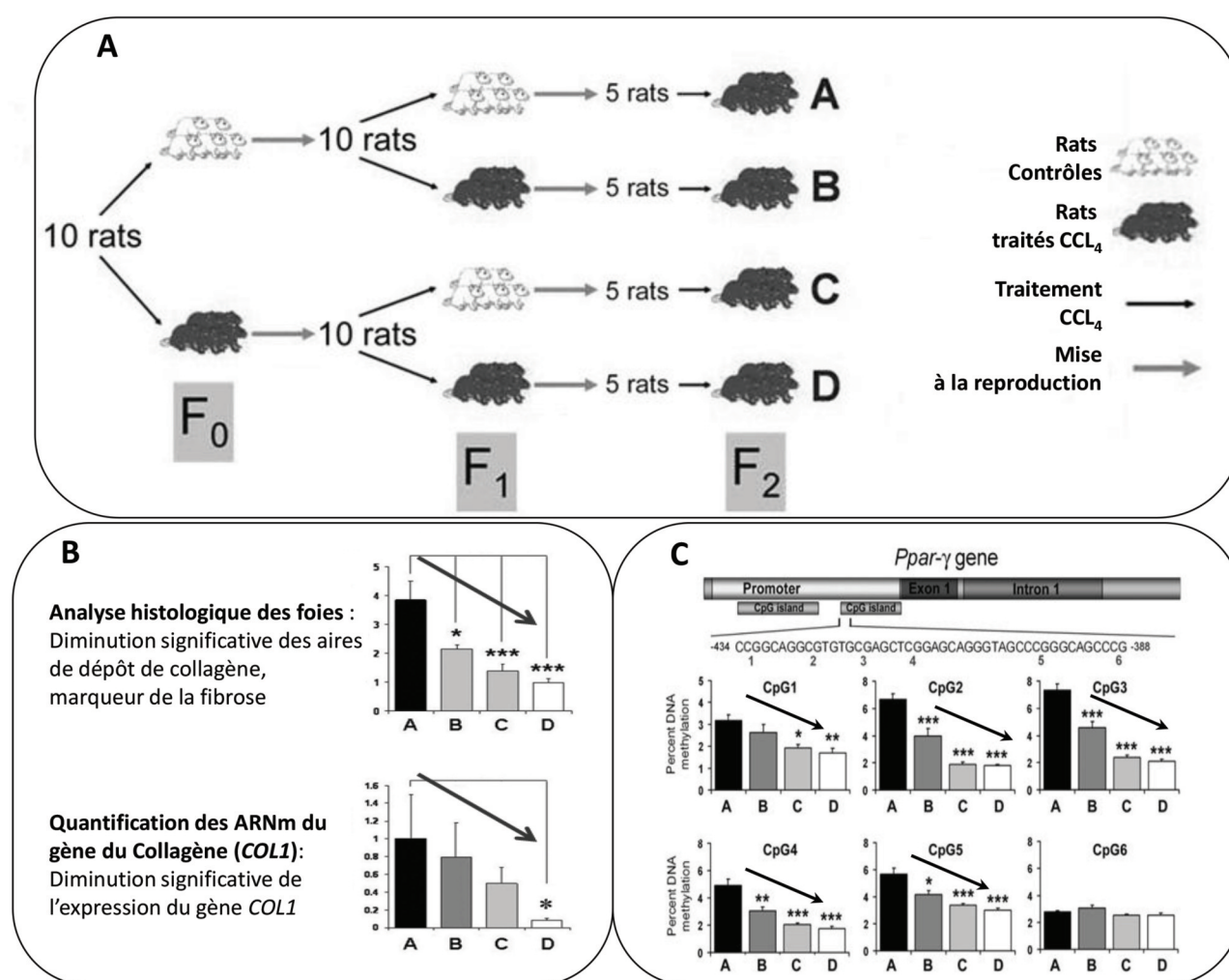


Figure 6 : (A) Protocole d'induction d'une fibrose hépatique chez les rats mâles sur trois générations (de F₀ à F₂). (B) Résultats en termes d'analyse histologique (dépôt de collagène utilisé comme marqueur de la fibrose) et de quantification de l'expression du gène COL1, codant un collagène ; les petits fils des grands pères ayant subi une induction de fibrose sont plus résistants au traitement. (C) Analyse de la méthylation de la séquence promotrice du gène PPAR-gamma ; l'expression du gène PPAR-gamma, codant pour un facteur anti-fibrinogène, est augmentée et associée à une diminution significative de la méthylation de CG de la région promotrice chez les petits fils en réponse à l'induction de la fibrose. (d'après Zeybel et al., 2012).

BIBLIOGRAPHIE

- Aston, K.I., Punj, V., Liu, L., Carrell, D.T. 2012. Genome-wide sperm deoxyribonucleic acid methylation is altered in some men with abnormal chromatin packaging or poor in vitro fertilization embryogenesis. *Fertil Steril.* 97(2):285–292.
- Barker, D.J. 2007. The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 261(5):412–417. Review.
- Bestor, T.H. 2000. *Human Molecular Genetics* 9 (16): 2395–2402.
- Boissonnas, C.C., Abdalaoui, H.E., Haelwlyn, V., Fauque, P., Dupont, J.M., Gut, I., Vaiman, D., Jouannet, P., Tost, J., Jammes, H. 2010. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet.* 18(1):73–80.
- Boissonnas, C.C., Jouannet, P., Jammes, H. 2013. Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertil Steril.* 99(3):624–631.
- Carrell, D.T., Hammoud, S.S. 2010. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Mol Hum Reprod.* 16(1):37–47.
- Dawson, M.A., Kouzarides, T., Huntly, B.J. 2012. Targeting epigenetic readers in cancer. *N Engl J Med.* 367(7):647–657.
- Francastel, C., Walters, M.C., Groudine, M., Martin, D.I. 1999. A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centrometric heterochromatin. *Cell* 99(3):259–269.
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., Khochbin, S. 2004. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem.* 271(17): 3459–3469.
- Harris, C. 2012. Animal models in epigenetic research: institutional animal care and use committee considerations across the lifespan. *ILAR J.*, 53(3-4):370–376.
- Heijmans, B.T., Tobi, E.W., Lumey, L.H., Slagboom, P.E. 2009. The epigenome: archive of the prenatal environment. *Epigenetics* 4: 526–531.
- Holliday, R. 2006. Epigenetics: a historical overview *Epigenetics*, 1(2):76–80.
- Holliday, R., Pugh, J. E., 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187:226–232.
- Houshdaran, S., Cortessis, V.K., Siegmund, K., Yang, A., Laird, P.W., Sokol, R.Z. 2007. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS One.* 2(12):e1289.
- Kinney, S.R., Pradhan; S. 2013. Ten eleven translocation enzymes and 5-hydroxymethylation in mammalian development and cancer. *Adv Exp Med Biol.* 754:57–79.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693–705.
- Kress, C., Kieu, K., Droineau, S., Galio, L., Devinoy, E. 2011. Specific positioning of the casein gene cluster in active nuclear domains in luminal mammary epithelial cells *Chromosome Res.* 19: 979–997.
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R., 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 319:1827-1830.
- Laird, P.W. 2010. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet.* 11(3):191–203. Review.
- Lalancette, C., Miller, D., Li Y., Krawetz, S.A. 2008. Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. *J Cell Biochem* 104(5):1570–1579.
- Li, S., Hursting, S.D., Davis, B.J., Mclachlan, J.A., Barret, J.C. 2003. Environmental exposure, DNA methylation, and gene regulation: lessons from diethylstilbesterol-induced cancers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 983:161–169.
- Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., Skinner, M.K. 2012. Pesticide and insect repellent mixture (permethrin and DEET) induces epigenetic transgenerational inheritance of disease and sperm epimutations. *Reprod Toxicol.* 34(4):708–719.
- Miller, D., Brinkworth, M., Iles, D. 2010. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139(2):287–301.
- Reik W. 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447: 425–432.
- Reis Silva, A.R., Adenot, P., Daniel, N., Archilla, C., Peynot, N., Lucci, C.M., Beaujean, N., Duranthon, V. 2011. Dynamics of DNA methylation levels in maternal and paternal rabbit genomes after fertilization. *Epigenetics* 6(8):987–993.
- Rivera, R.M., Ross, J.W. 2013. Epigenetics in fertilization and preimplantation embryo development. *Prog Biophys Mol Biol.* 113(3): 423–32.
- Sato, K., Fukata, H., Kogo, Y., Ohgane, J., Shiota, K., Mori, C. 2009. Neonatal exposure to diethylstilbestrol alters expression of DNA methyltransferases and methylation of genomic DNA in the mouse uterus. *Endocr J.* 56(1): 131–139.
- Schaukowitch, K., Kim, T.K. 2013. Emerging epigenetic mechanisms of long non-coding RNAs. *Neuroscience* S0306-4522(13)01018X.
- Schneider, R., Grosschedl, R. 2007. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev.* 21(23):3027–3043.
- Schulz, E.G., Heard, E. 2013. Role and control of X chromosome dosage in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev.* 23(2): 109–115.
- Sethupathy, P. 2013. Illuminating microRNA Transcription from the Epigenome. *Curr Genomic* 14(1):68–77.
- Steger, K., Wilhelm, J., Konrad, L., Stalf, T., Greb, R., Diemer, T., Kliesch, S., Bergmann, M., Weidner, W. 2008. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum Reprod.*, 23(1):11–16.
- Solovei, I., Kreysing, M., Lanctôt, C., Kösem, S., Peichl, L., Cremer, T., Guck, J., Joffe, B. 2009. Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell.* 137(2):356–368
- Tobi, E.W., Lumey, L.H., Talens, R.P., Kremer, D., Putter, H. et al. 2009. DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum. Mol. Genet.* 18:4046–4053.
- Weigel, D., Colot, V. 2012. Epialleles in plant evolution. *Genome Biol.* 13(10):249-255.
- Yamauchi, A., Telschow, A., Kobayashi, Y., 2010. Evolution of cytoplasmic sex ratio distorters: Effect of paternal transmission. *J Theor Biol.* 266(1):79–87.
- Young, L.E., Beaujean, N. 2004. DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep. *Anim Reprod Sci.* 82-83:61-78. Review.
- Yun, M., Wu, J., Workman, J.L., and Li, B. 2011. *Cell Research* 21:564–578.
- Zhang, Y.Y., Fischer, M., Colot, V., Bossdorf, O. 2013. Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity. *New Phytol.* 197(1):314–322.
- Zamudio, N.M., Chong, S., O'Bryan, M.K. 2008. Epigenetic regulation in male germ cells *Reproduction*, 136(2):131–146.
- Zeybel, M., Hardy, T., Wong, Y.K., Mathers, J.C., Fox, C.R., Gackowska, A., Oakley, F., Burt, A.D., Wilson, C.L., Anstee, Q.M., Barter, M.J., Masson, S., Elsharkawy, A.M., Mann, D.A., Mann, J. 2012. Multigenerational epigenetic adaptation of the hepatic wound-healing response. *Nat Med.* 18(9):1369–1377.