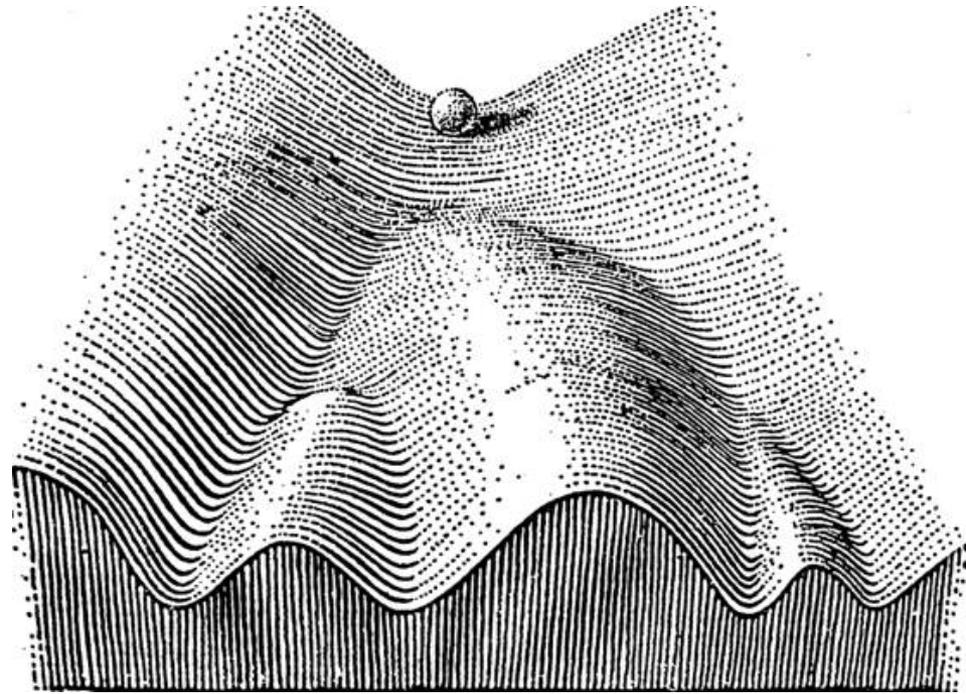


Université Populaire de Marseille, printemps 2019  
Cycle *Hérédité génétique et épigénétique*  
Jacques van Helden

***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

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)

- 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.

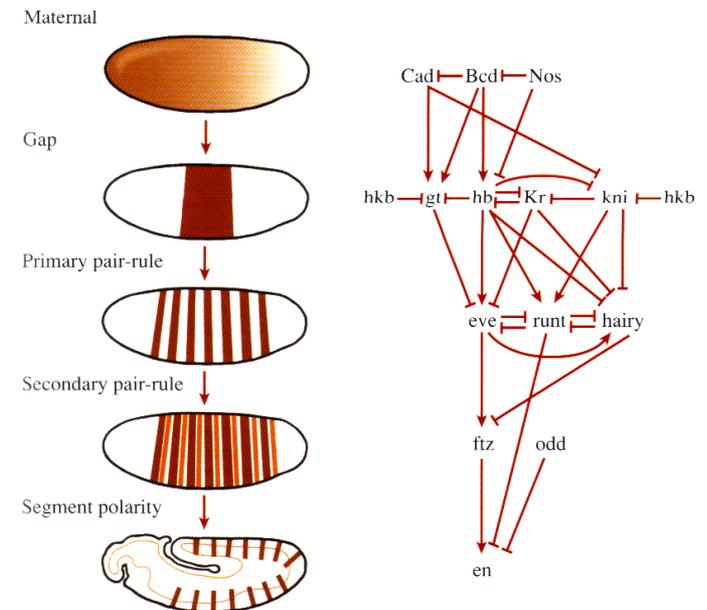
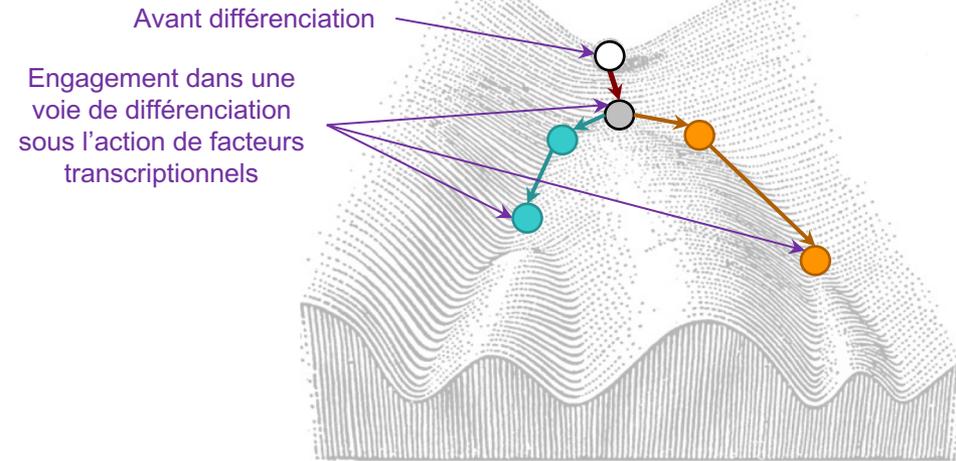


Figure 3.5  
The segmentation genetic regulatory hierarchy

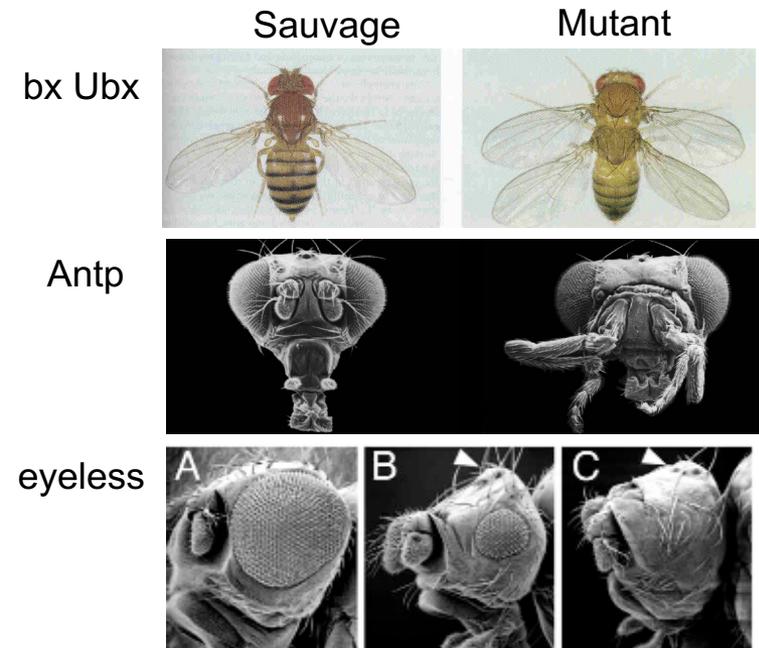
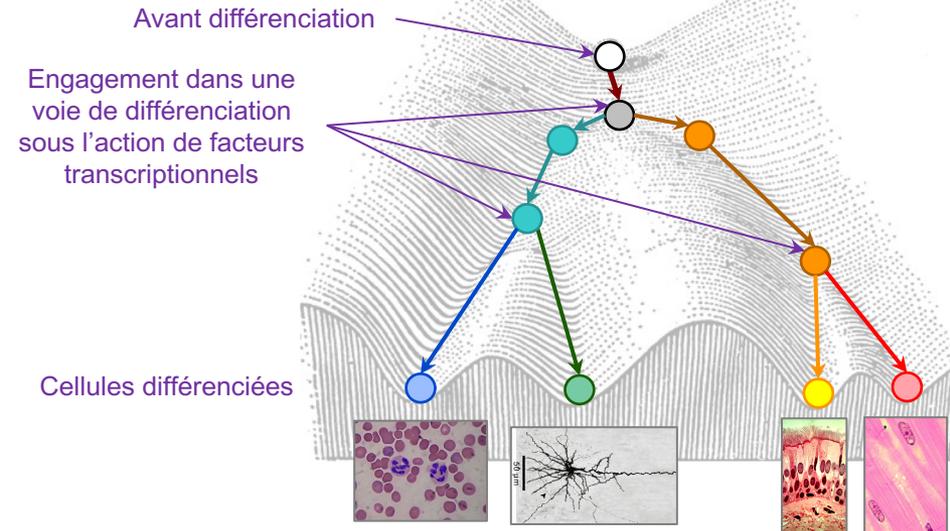
(left) The expression patterns of five classes of anteroposterior axis patterning genes are depicted in embryos at different stages. (right) Selected members of these classes are shown and the regulatory interactions between these genes are indicated. An arrow indicates a positive regulatory interaction; 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

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)

- 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 copies du 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).



# Modifications chromatinienne : la « mémoire cellulaire »

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)

## ■ Méthylation de l'ADN

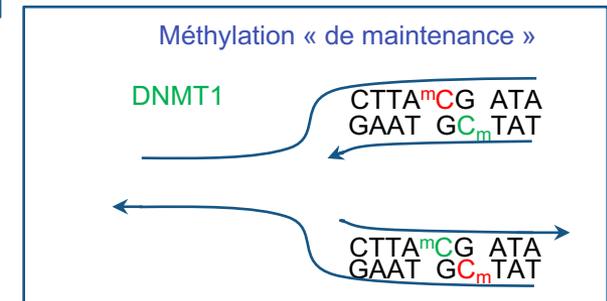
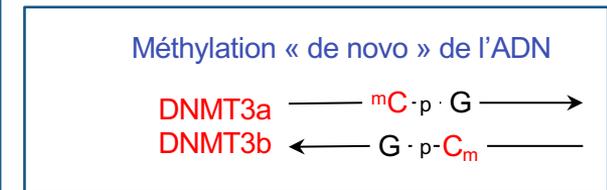
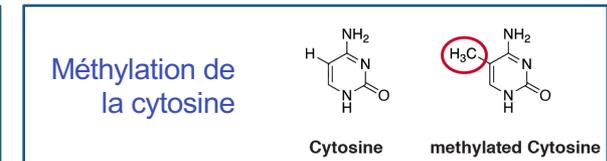
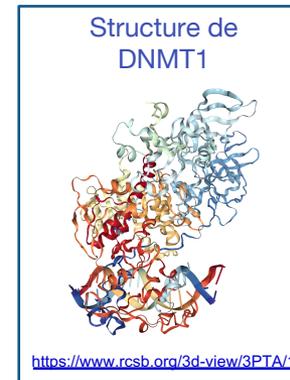
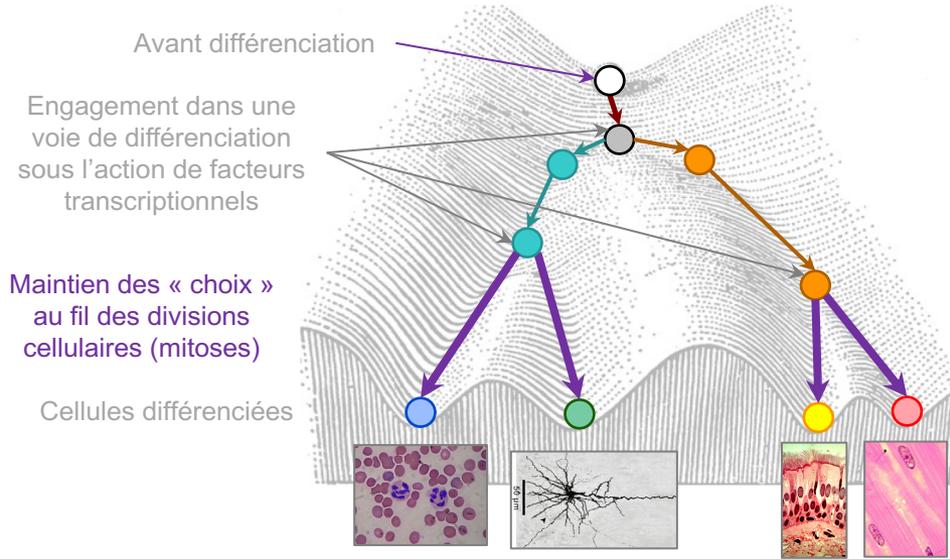
- Par des enzymes spécialisées (DNA méthyltransférases, DNMT)
- Chez les mammifères: méthylation spécifique des cytosines suivies d'un G (dinucléotide CpG).
- Chez les insectes: pas de méthylation de l'ADN
- Chez les plantes: méthylation moins spécifique, mécanismes différents.

## ■ 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.



# 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>

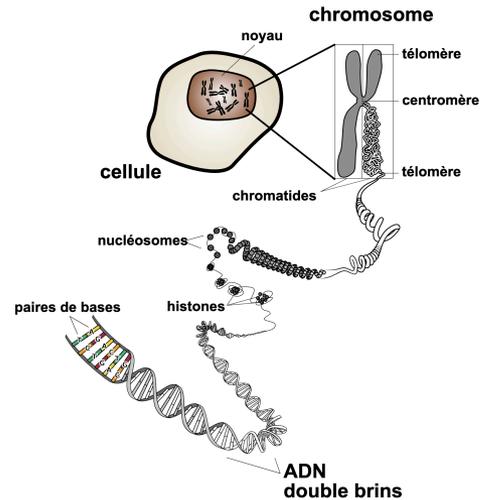
■ Holliday, R. (1990). DNA methylation and epigenetic inheritance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 326, 329–338.

■ Wu Ct and Morris, J.R. (2001). Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* 293, 1103–1105.

# Structure de la chromatine

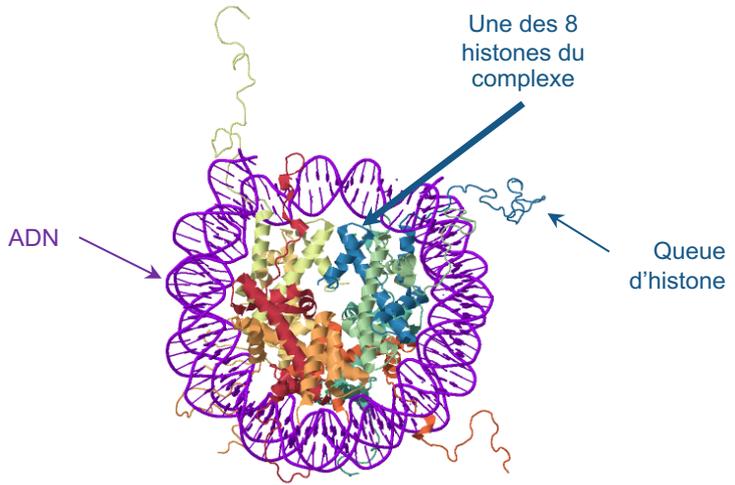
- Nucléosome
  - complexe formé de 8 histones (protéines) entourées de 2 enroulements d'ADN
- Une extrémité de chaque histone sort du complexe.
- Des enzymes spécialisées peuvent modifier chimiquement certains acides aminés des queues d'histones
  - méthylation (histone méthyltransférases)
  - acétylation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

## Structure de la chromatine



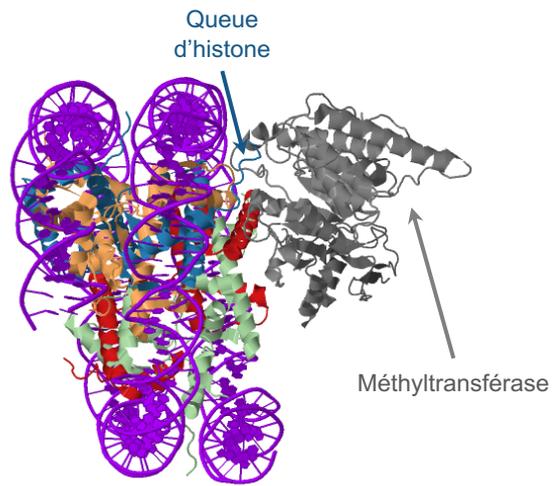
[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2a/Chromosome\\_fr.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2a/Chromosome_fr.svg)

## Nucléosome



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

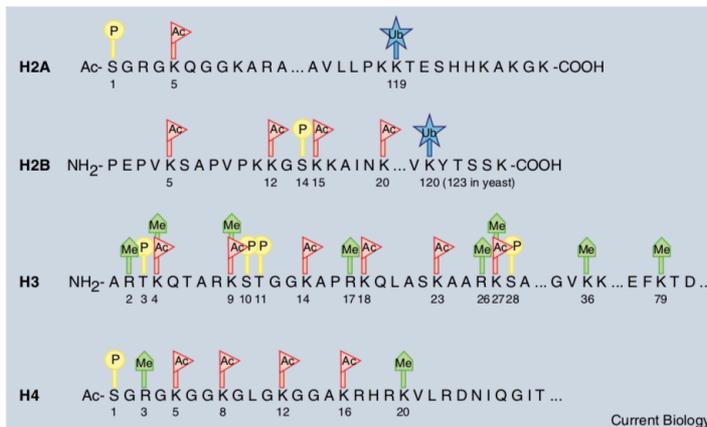
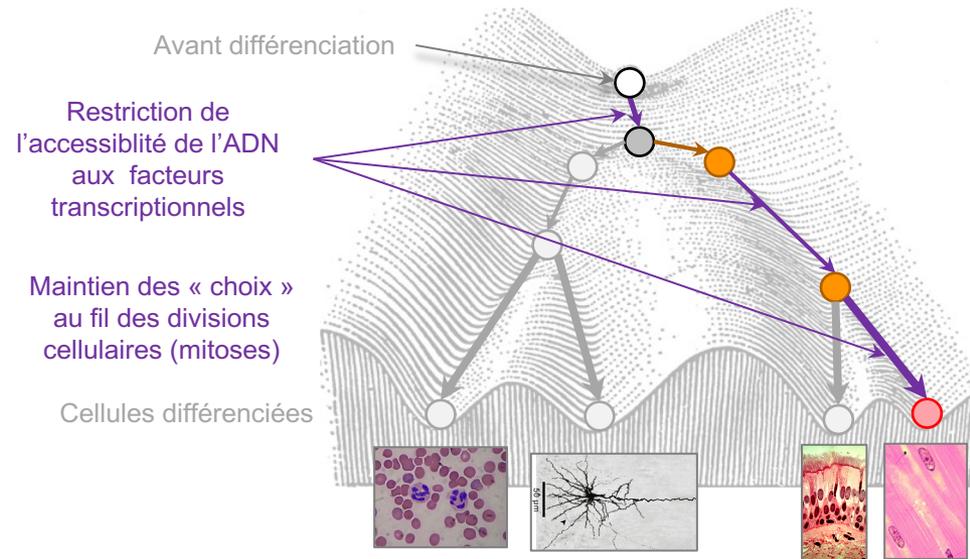
## Méthyltransférase DOT1L complexée avec un nucléosome



# 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 ?

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)



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

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 Hérité génétique et épigénétique*  
*Jacques van Helden*

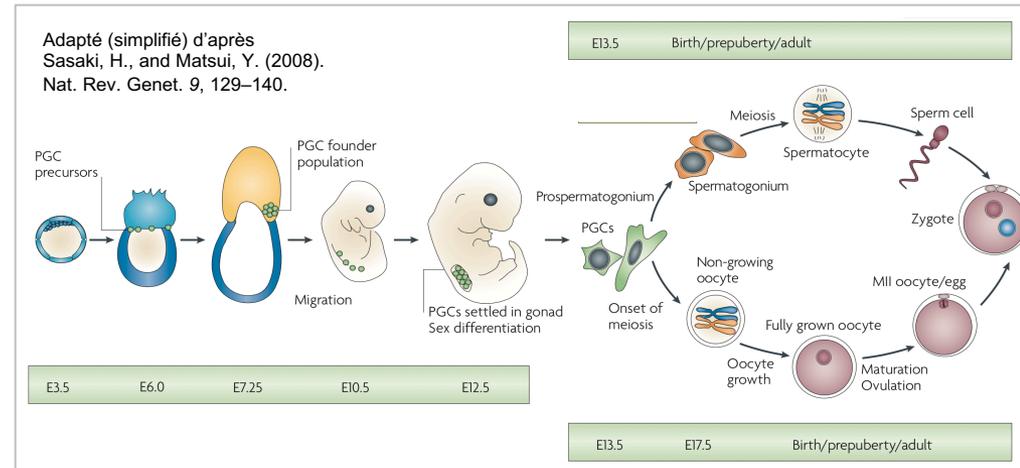
*Chapitre 5*

***Reprogrammation cellulaire et épigénétique***

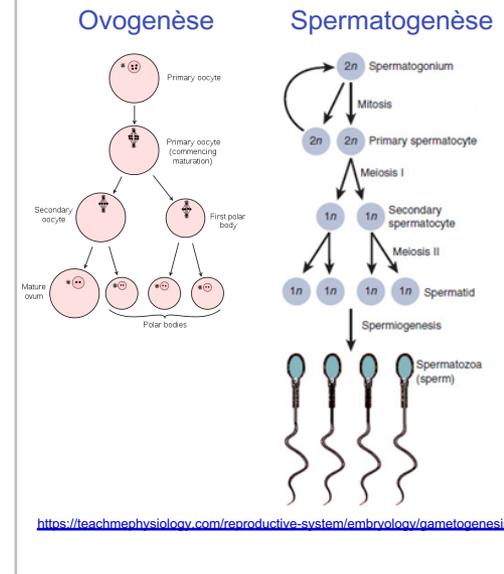
# La séparation germe - soma

- 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

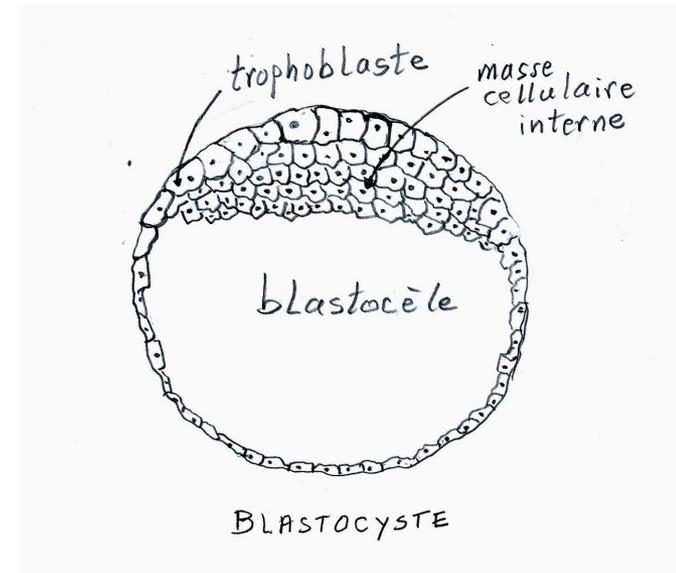


## Gamétogenèse



# 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.

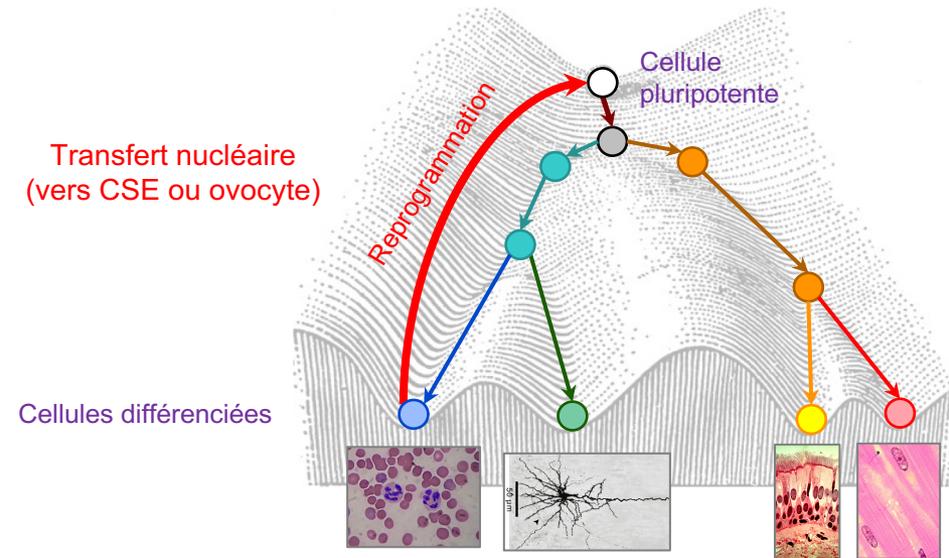


Description: Coupe d'un blastocyste montrant le trophoblaste, le blastocèle et la masse cellulaire interne. Dessin original de Michel Hamels.

# Reprogrammation cellulaire par transfert nucléaire

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)

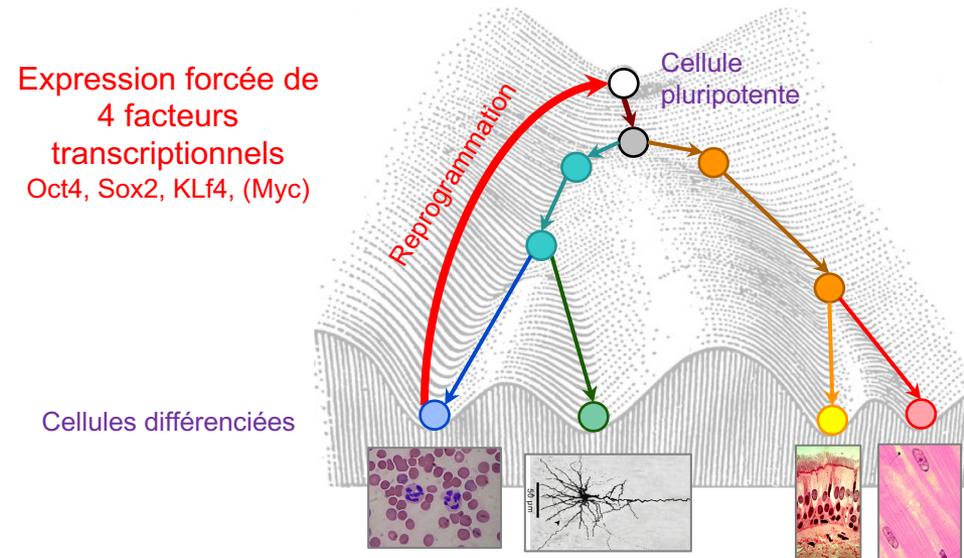
- Dans les années 1960, John Gurdon met au point des méthodes permettant de générer un individu entier en clonant une cellule somatique.
- Ses premiers travaux portent sur l'embryon de xénope.
- Il transfère les noyaux de cellules somatiques dans des cellules souches embryonnaires.
- Au début il arrive 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**.



# 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.

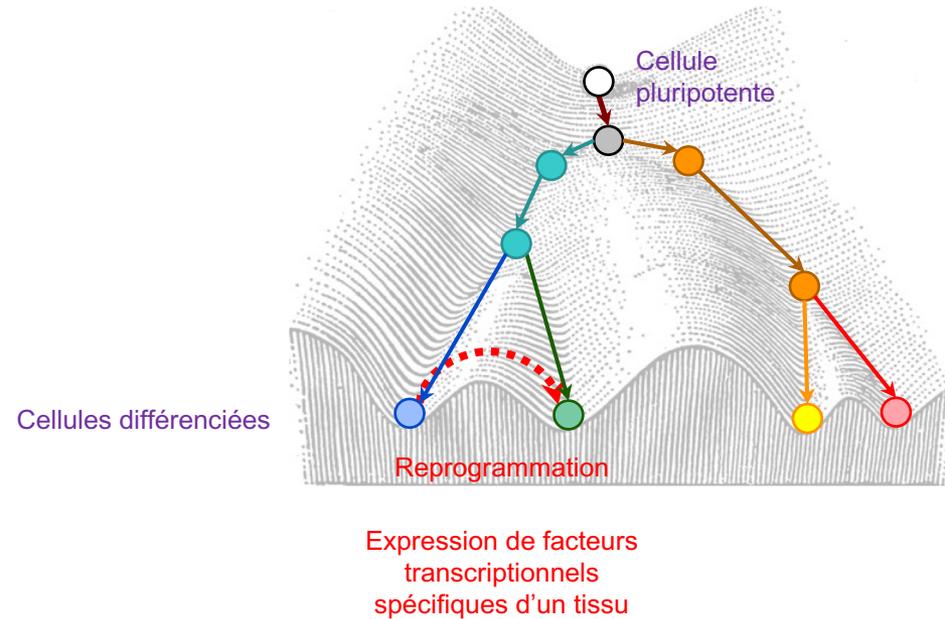
Adapté de Waddington, C.H. (1957). The strategy of the genes, p31.  
et d'Edith Heard (cours du 13 mars 2014 au collège de France)



# 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.

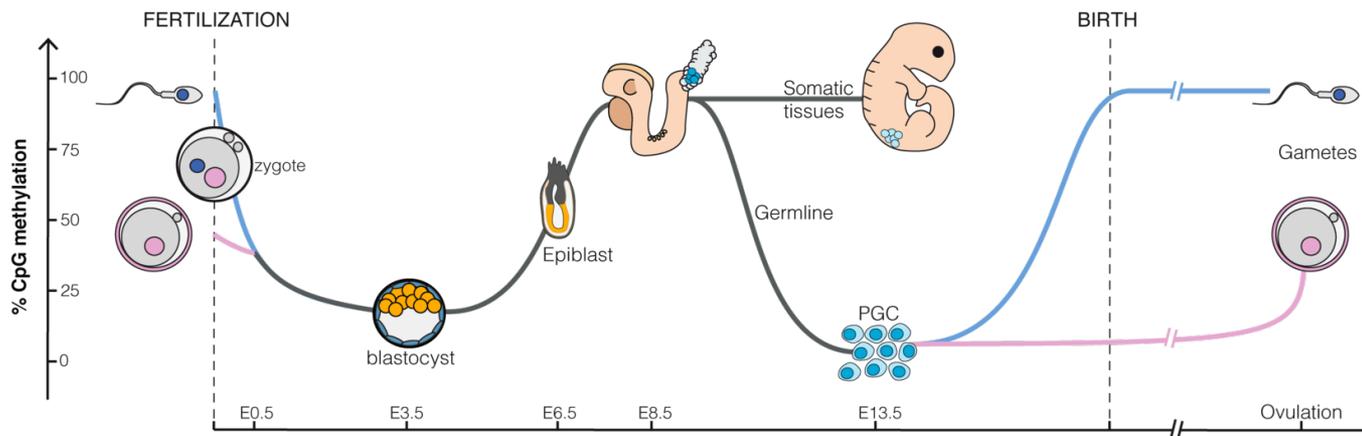
Adapté de Waddington, C.H. (1957). The strategy of the genes, p31.  
et d'Edith Heard (cours du 13 mars 2014 au collège de France)



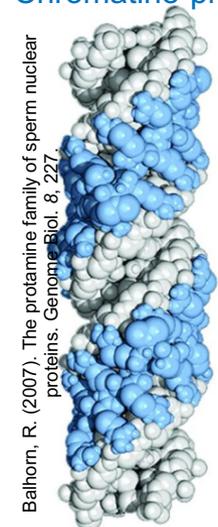
# La reprogrammation épigénétique au cours du développement

- 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 ?

## Déméthylation de l'ADN au cours du développement



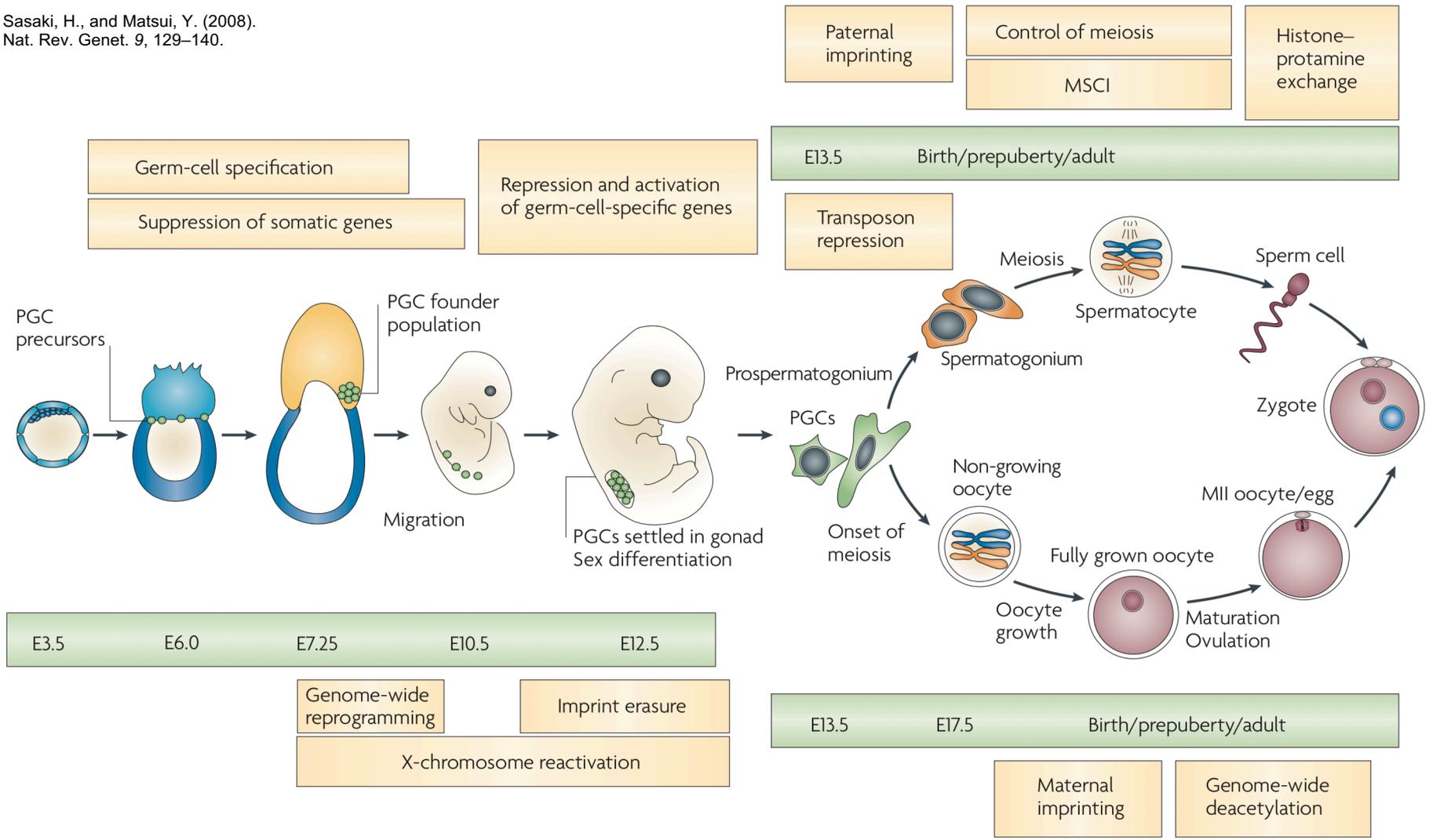
## Chromatine-protamine



Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 8, 227.

# Événements 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 ?***

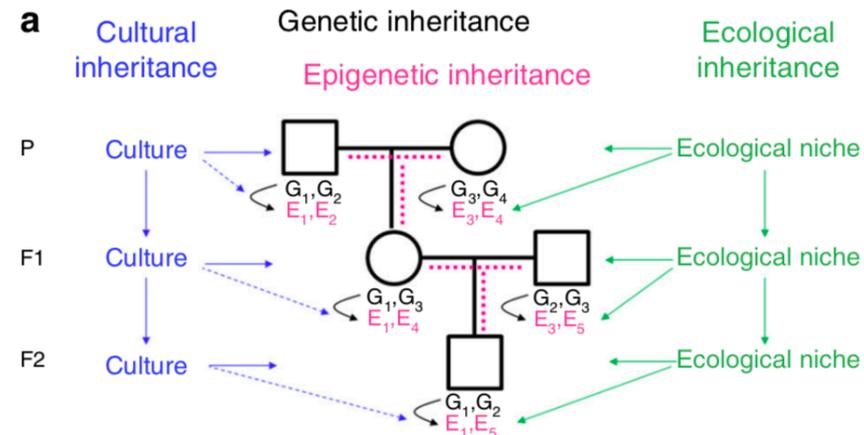
# Existe-il une transmission héréditaire des modifications épigénétiques ?

- 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 Grealley, 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 » ?

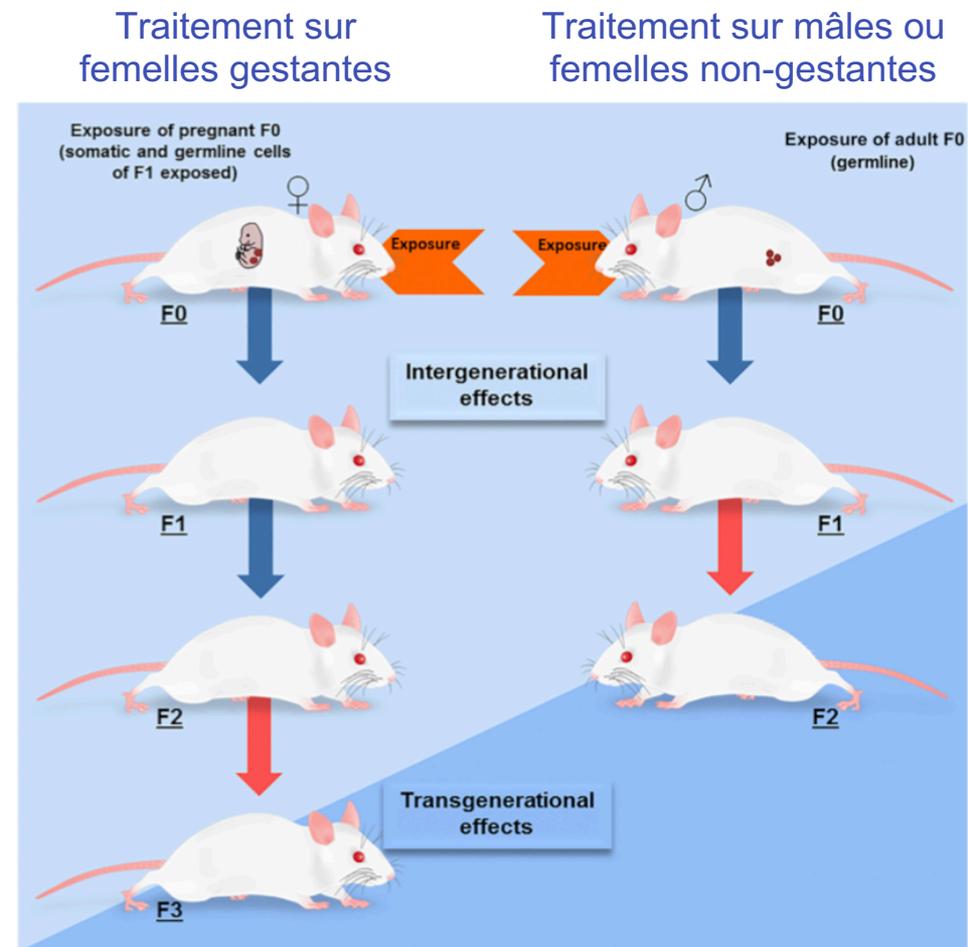
- Dans la littérature concernant l'épigénétique, le terme « environnement » recouvre des facteurs assez distincts.
  - Facteurs physico-chimiques
    - Exposition à des substances chimiques
    - Climat
    - Irradiations
  - Facteurs biologiques
    - Alimentation
  - Facteurs sociaux et culturels
    - 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>

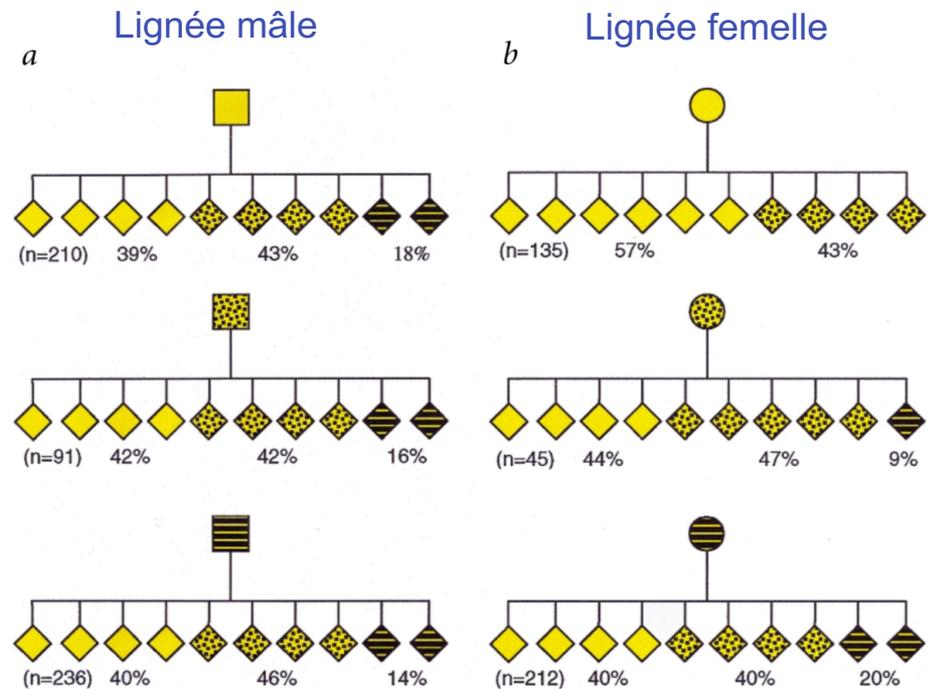
# Héritabilité du phénotype agouti

- 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: héritabilité 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.



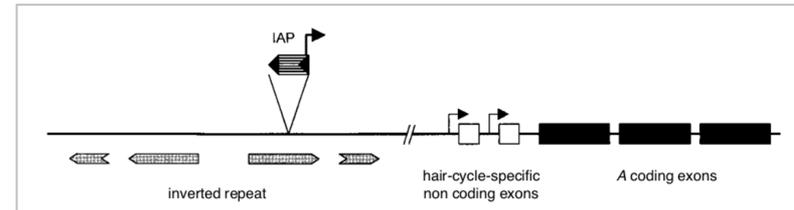
- La variabilité du phénotype s'explique par la présence, à 100 kilobases de distances (100.000 nucléotides) d'un élément transposable.
- Cet élément est normalement inactivé par méthylation de l'ADN
- Chez les souris de la lignée « *viable yellow agouti* » ( $A^{vy}$ ) l'inactivation est moins efficace,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



- 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.

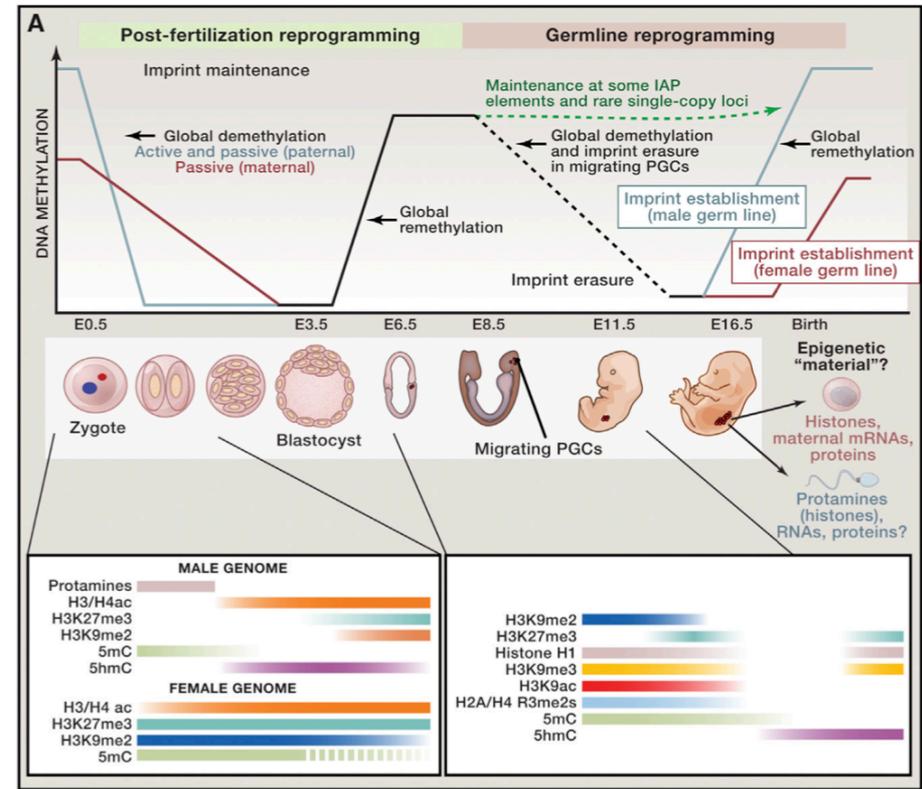
- Waterland, R.A., Dolinoy, D.C., Lin, J.-R., Smith, C.A., Shi, X., and Tahiliani, K.G. (2006). Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin Fused. *Genesis* 44, 401–406.
- Waterland, R.A., Travisano, M., and Tahiliani, K.G. (2007). Diet-induced hypermethylation at agouti viable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

*Université Populaire de Marseille*  
*Hérédité génétique et épigénétique*  
*Sixième séance, le 6 mai 2019*

## ***Transition entre séances 5 et 6***

# Reprogrammation des marques chromatinienne

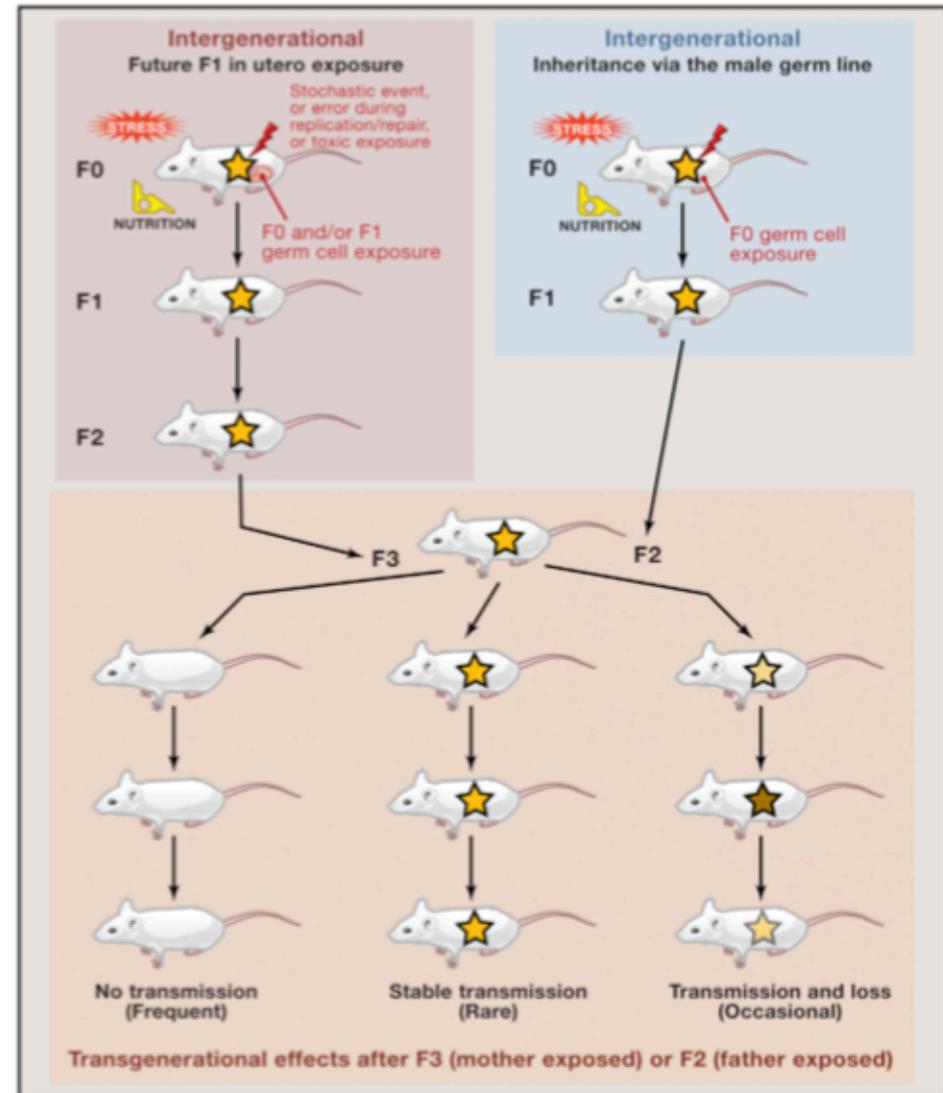
- Marques chromatinienne
  - Méthylation de l'ADN
  - Modification des queues d'histones (protéines) par acétylation ou méthylation
- Effacement de ces marques à 2 reprises
  - Gamétogenèse
  - Début de l'embryogenèse



Heard, E., and Martienssen, R.A. (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* 157, 95–109.

# Modalités de transmission des effets épigénétiques

- « Inter-générationnelle »
  - Traitement de femelles gravides -> exposition in utero
    - F1 (première génération): Embryons en développement
    - F2 : via les gamètes des embryons F1
    - F3 : première génération non-exposée
  - Traitement de femelles non-gravides ou de mâles
    - Exposition F1 via les gamètes des individus traités
- Transgénérationnelle: à partir de la première génération non-exposée
  - Traitement de femelles gravides -> F3
  - Traitement de femelles non-gravides ou de mâles -> F2



Heard, E., and Martienssen, R.A. (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* 157, 95–109.

# 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.

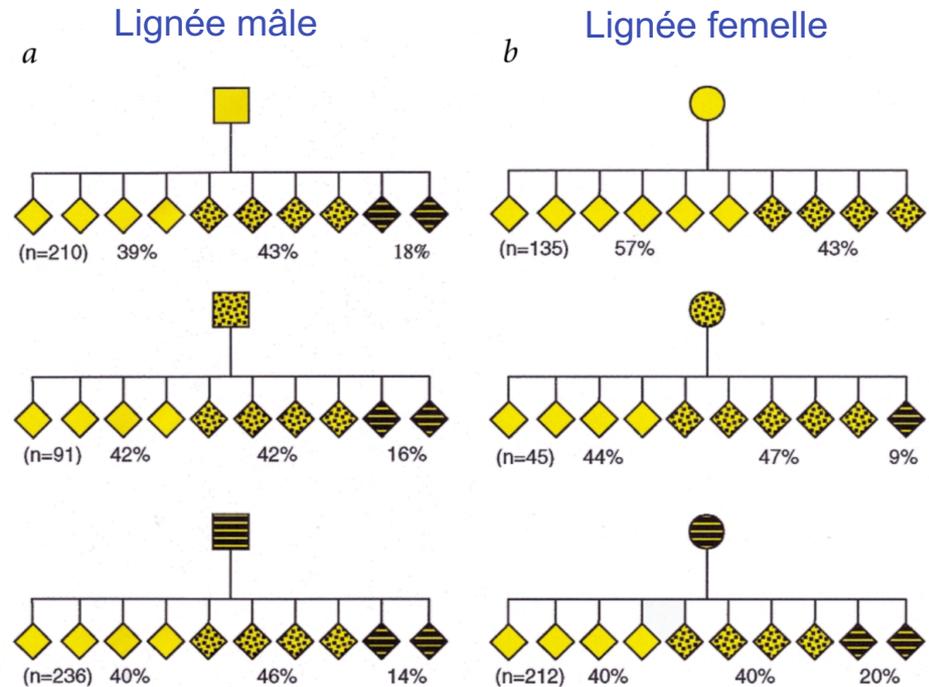
## ■ Figure du haut: variabilité du phénotype.

## ■ Figure du bas: héritabilité 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.

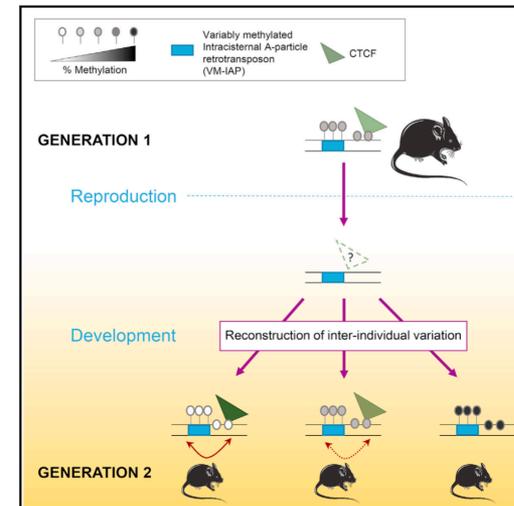


- Recherche systématique d'éléments transposables de type IAP avec répression « méta-stable »
  - Constante entre tissus d'un individu
  - Variable entre individus
- Etude de l'impact de ces éléments sur l'expression des gènes avoisinants
- La plupart n'ont pas d'impact, contrairement aux effets bien connus sur agouti et l'axine.
- Raison: ces éléments sont isolés par des éléments « insulateurs » (CTCF).

Cell

## Identification, Characterization, and Heritability of Murine Metastable Epialleles: Implications for Non-genetic Inheritance

Graphical Abstract



Authors

Anastasiya Kazachenka,  
Tessa M. Bertozzi,  
Marcela K. Sjoberg-Herrera, ...,  
Sarah Adams, David Adams,  
Anne C. Ferguson-Smith

Correspondence

afsmith@gen.cam.ac.uk

In Brief

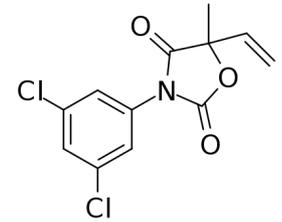
A genome-wide interrogation of variably methylated endogenous retroviruses shows common reprogramming of methylation states after fertilization, challenging the paradigm of transgenerational non-genetic inheritance at such loci.

# ***Perturbateurs endocriniens***

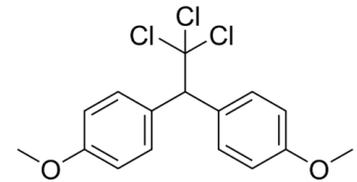
# Effets des perturbateurs endocriniens

- Perturbateurs endocriniens
  - Molécules qui interagissent avec les systèmes endocrines (métabolisme des hormones), et, par là, affectent un grand nombre de fonctions biologiques.
  - Ces molécules peuvent affecter le développement embryonnaire (exposition *in utero*).
  - Mode d'action : liaison aux récepteurs hormonaux.
  - Action à faible concentration
- Vinclozoline (VZ)
  - fongicide utilisé pour la vigne; effet antiandrogène
  - Impact de l'exposition *in utero* : diminution de la spermatogenèse, mort des spermatozoïdes, baisse de leur concentration et motilité.
  - En usage limité aux Etats-Unis; interdiction dans certains pays (notamment scandinaves)
- Méthoxychlore
  - Pesticide utilisé en remplacement du DDT; obsolète
  - Action sur les récepteurs d'œstrogènes
- Bisphénol A
  - Utilisé dans la fabrication des biberons, boîtes de conserves, canettes, ...
  - Inhibition de la vasopressine et de l'ocytocine
  - Interdit dans certains pays pour les contenants alimentaires destinés aux bébés
  - En France : bras de fer entre Sénat et compagnie PlasticsEurope concernant l'interdiction dans tous les contenants alimentaires
- Entre 2005 et mai 2019, des dizaines de publications démontrent que les perturbateurs endocriniens suscitent de modifications épigénétiques.
- Plusieurs articles rapportent en outre une transmission transgénérationnelle
  - de l'effet toxique des perturbateurs
  - des modifications épigénétiques associées

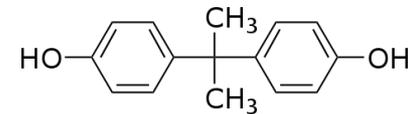
Vinclozoline (VZ)



Méthoxychlore



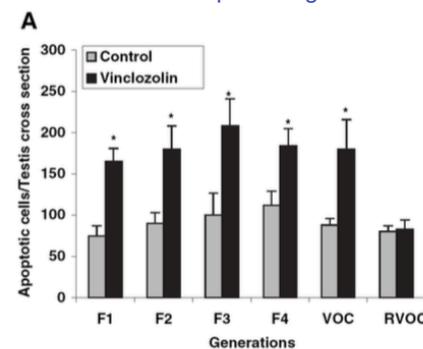
Bisphénol A



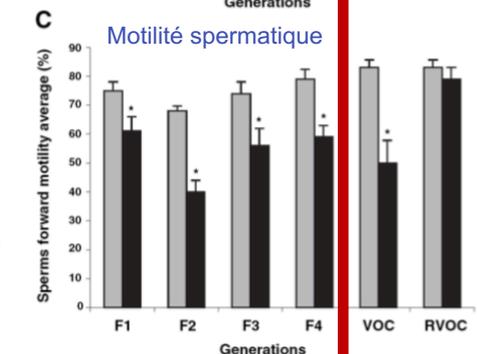
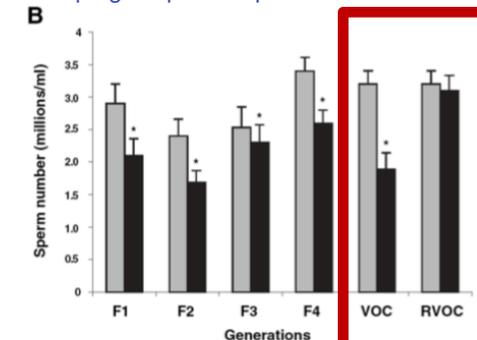
# Transmission épigénétique des effets de perturbateurs endocriniens

- Anway et col/ (2005) testent l'effet de 2 perturbateurs endocriniens
  - Vinclozoline
  - Methoxychlore
- Effets observés sur 4 générations
  - Mort de cellules spermatiques
  - Réduction de la densité spermatique
  - Réduction de la motilité des spermatozoïde
- **Rétro-croisements** suggèrent que l'effet est transmis par la ligné mâle
  - Effet sur progéniture de ♂F2 traités x ♀ non-traitées (VOC)
  - Pas d'effet sur progéniture de ♀F2 traitées x ♂ non-traités (RVOC)
- Effets de la vinclozoline sur certaines marques épigénétiques (figure du bas)
  - sur les individus exposés
  - sur les générations suivantes (F2, F3)

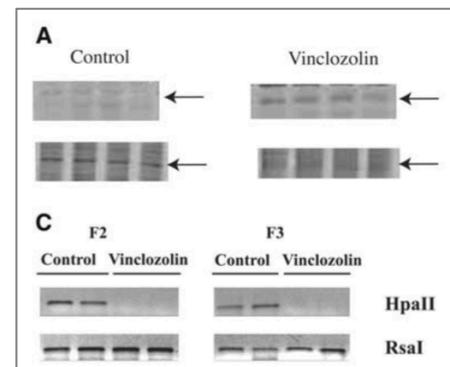
## Mort des cellules spermatogènes



## Comptages spermatiques

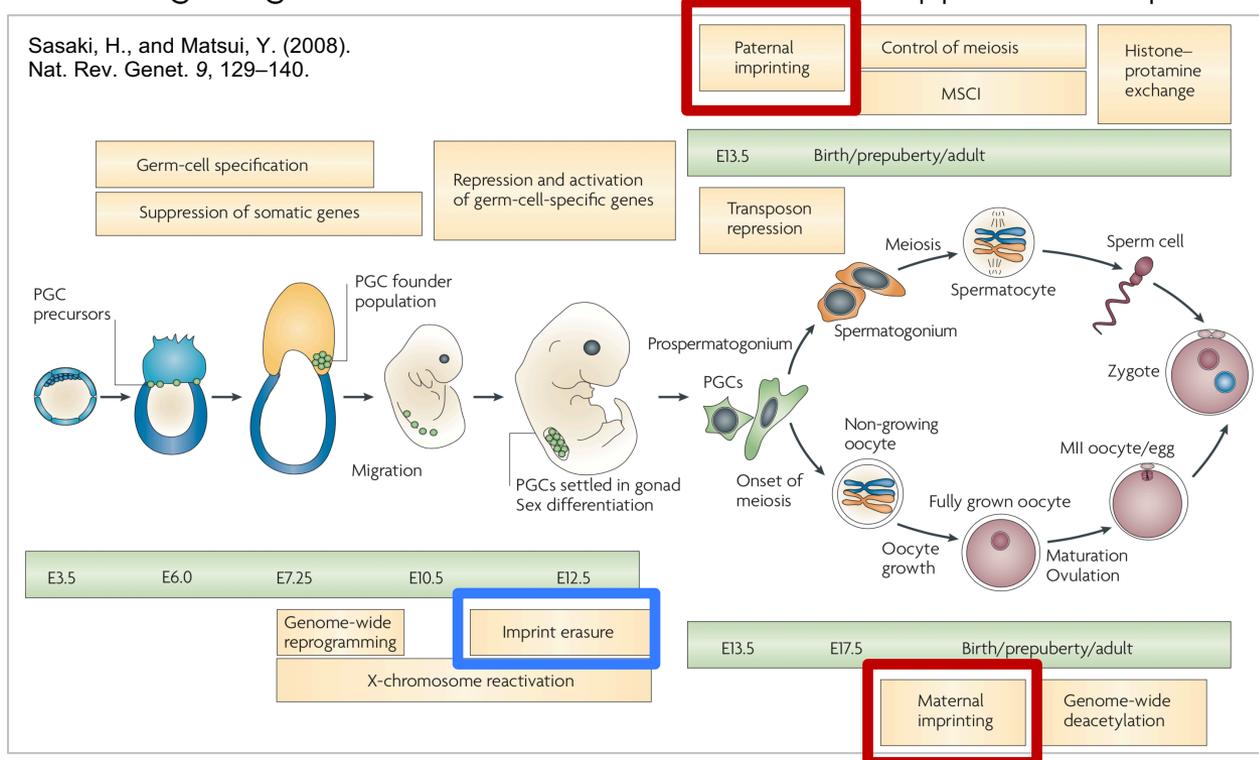


**Figure 1.** Transgenerational phenotype after vinclozolin treatment of F<sub>0</sub> gestating mothers. (A) Spermatogenic cell apoptosis, (B) epididymal sperm counts, and (C) epididymal sperm motility in PND60 to 180 control and vinclozolin off-spring Sprague-Dawley rats in the F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, and F<sub>4</sub> generations, and vinclozolin F<sub>2</sub> generation male outcross (VOC) to wild-type control females, and vinclozolin F<sub>2</sub> generation female reverse outcross (RVOC) to wild-type control males. Statistically significant differences between control and vinclozolin treatment generations are indicated by (\*) for  $P < 0.001$  with a two-way analysis of variance test. The  $n$  value for each bar ranged between 10 and 30 animals. Detailed methods are provided in Supporting Materials (below).



# Empreinte parentale

- Certains gènes sont spécifiquement réprimés sur le chromosome soit paternel soit maternel. On parle d'**empreinte parentale** (paternelle ou maternelle selon le gène).
- Cette répression spécifique est nécessaire au bon déroulement du développement embryonnaire.
- L'empreinte est modulée par une **méthylation spécifique** de ces gènes durant la gamétogenèse.
- Les empreintes se retrouvent dans les cellules somatiques.
- Elles sont **effacées dans la lignée germinale**, lors de la différenciation sexuelle des gonades.
- Les résultats d'Anway suggèrent que la transmission des effets de perturbateurs endocriniens repose sur des gènes soumis à l'empreinte paternelle. Ceci semble cependant contradictoire avec l'effacement de l'empreinte dans la lignée germinale. Des études ultérieures ont approfondi la question.



# Perturbateurs endocriniens et marques chromatiniennes

- Une étude sur les effets « transgénérationnels », du perturbateur endocrinien vinclozoline (VZ).
- Le résumé mentionne ceci:
  - « Les effets sont transgénérationnels mais ils disparaissent progressivement de F1 [première génération] à F3 [troisième génération]. La concentration moyenne du sperme de la descendance des femelles auxquelles on a administré de la VCZ vaut 56% de celle des contrôles en F1, et revient à la normale en F2 et F3 ». Stouder & Paoloni-Giacobino, 2010.
- L'effet sur la concentration de sperme (figure de gauche) est limitée aux embryons exposés au perturbateur endocrinien (F1).
- Dans le sperme des descendants, on détecte des effets sur la méthylation de 5 gènes soumis à empreinte parentale (figure de droite)
  - en F1 (embryons exposés)
  - dans une moindre mesure en F2 (gamètes exposés).
  - Ces effets ne sont pas détectés dans les autres tissus des descendants (queue, foie, muscles).
- L'étude ne permet donc pas de conclure à un effet transgénérationnel (au sens actuel de la définition).

## Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the methylation pattern of imprinted genes in the mouse sperm

Christelle Stouder<sup>1</sup> and Ariane Paoloni-Giacobino<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetic Medicine and Development and <sup>2</sup>Swiss Center for Applied Human Toxicology, University of Geneva Medical School, CMU, 1 Michel-Servet, 1211 Geneva 4, Switzerland

Correspondence should be addressed to A Paoloni-Giacobino at Department of Genetic Medicine and Development, University of Geneva Medical School, CMU; Email: ariane.giacobino@unige.ch

### Abstract

Endocrine-disrupting chemicals (EDCs), among which is the antiandrogen vinclozolin (VCZ), have been reported to affect the male reproductive system. In this study, VCZ was administered to pregnant mice at the time of embryo sex determination, and its possible effects on the differentially methylated domains (DMDs) of two paternally (*H19* and *Gil2*) and three maternally (*Peg1*, *Snrpn*, and *Peg3*) imprinted genes were tested in the male offspring. The CpGs methylation status within the five gene DMDs was analyzed in the sperm, tail, liver, and skeletal muscle DNAs by pyrosequencing. In the sperm of controls, the percentages of methylated CpGs were close to the theoretical values of 100 and 0% in paternally or maternally imprinted genes respectively. VCZ decreased the percentages of methylated CpGs of *H19* and *Gil2* (respective values 83.1 and 91.5%) and increased those of *Peg1*, *Snrpn*, and *Peg3* (respective values 11.3, 18.3, and 11.2%). The effects of VCZ were transgenerational, but they disappeared gradually from F1 to F3. The mean sperm concentration of the VCZ-administered female offspring was only 56% of that of the controls in the F1 offspring, and it was back to normal values in the F2 and F3 offspring. In the somatic cells of controls, the percentages of methylated CpGs were close to the theoretical value of 50% and, surprisingly, VCZ altered the methylation of *Peg3*. We propose that the deleterious effects of VCZ on the male reproductive system are mediated by imprinting defects in the sperm. The reported effects of EDCs on human male spermatogenesis might be mediated by analogous imprinting alterations.

Reproduction (2010) 139 373–379

### Concentration spermatique

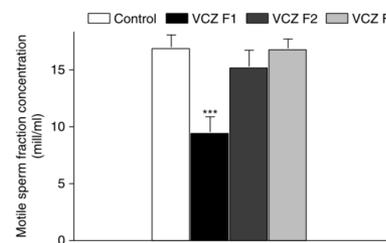


Figure 5 Motile sperm concentration, in millions of spermatozoa per milliliter of sperm, in the F1, F2, and F3 offspring of control and vinclozolin-administered female mice. The results are the means  $\pm$  s.e.m. of 5–8 mice. \*\*\* $P < 0.005$ .

### Méthylation de 5 gènes soumis à l'empreinte parentale

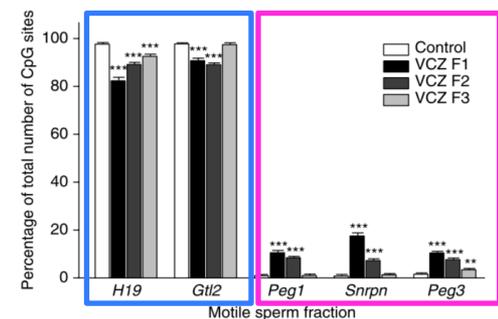


Figure 1 Methylation status of the paternally methylated *H19* and *Gil2* genes and of the maternally methylated *Peg1*, *Snrpn*, and *Peg3* genes in the motile sperm fraction of the F1–F3 offspring of control and of vinclozolin-administered female mice. Control: vehicle only. VCZ: vinclozolin. The results are the means  $\pm$  s.e.m. of 8–15 mice. They represent the number of methylated CpG sites and are expressed as the percentage of the total number of CpG sites. \*\*\* $P < 0.001$  and \*\* $P < 0.01$  versus respective controls.

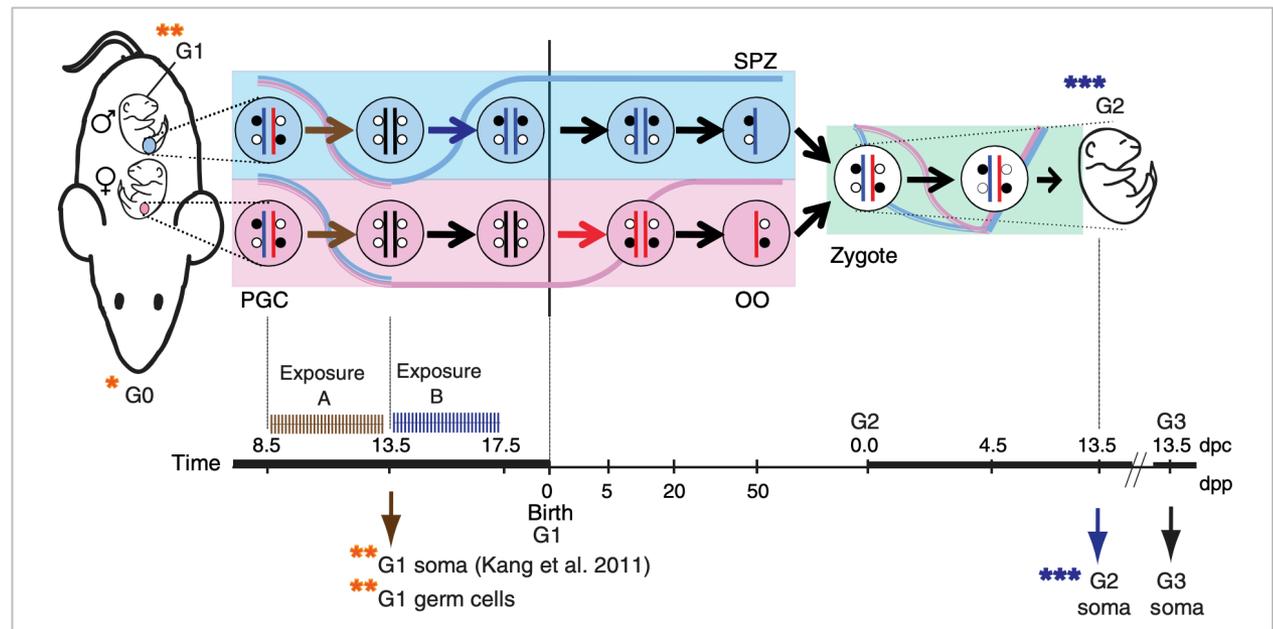
- Stouder, C., and Paoloni-Giacobino, A. (2010). Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the methylation pattern of imprinted genes in the mouse sperm. *Reproduction* 139, 373–379.

# Les effets des perturbateurs endocriniens sont corrigés par la reprogrammation épigénomique

- En 2015, Iqbal et collègues réévaluent la transmission épigénétique de l'effet des perturbateurs endocriniens, au moyen d'un protocole extrêmement détaillé.
- Des rates sont exposées aux perturbateurs pendant la grossesse, et on mesure les perturbations au fil des générations.
- Le but des expérience est de pouvoir faire la différence entre deux causes possibles pour les effets des perturbateurs sur la descendance :
  - exposition des fœtus (G1) pendant la grossesse de la mère (G0)
  - transmission épigénétique de la mère au fœtus

**Bleu / rose:** cellules germinales des mâles / femelles exposés au traitement au stade fœtal.

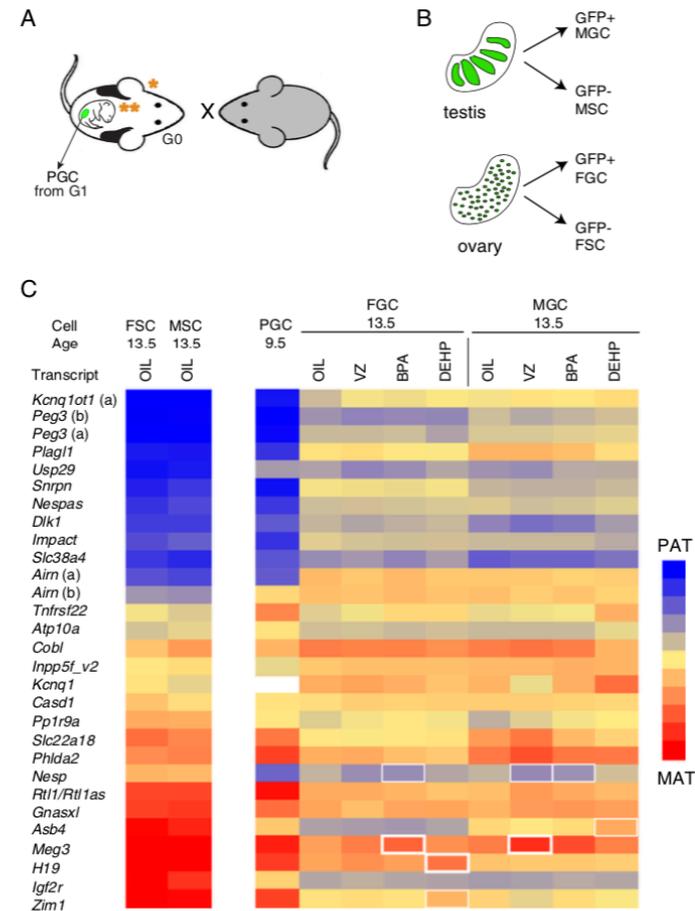
**Vert:** embryons de seconde génération.



- Iqbal, K., Tran, D.A., Li, A.X., Warden, C., Bai, A.Y., Singh, P., Wu, X., Pfeifer, G.P., and Szabó, P.E. (2015). Deleterious effects of endocrine disruptors are corrected in the mammalian germline by epigenome reprogramming. *Genome Biol.* 16, 59.

# Les effets des perturbateurs endocriniens sont corrigés par la reprogrammation épigénomique

- Iqbal et collègues (2015) testent l'effet de 3 perturbateurs endocriniens sur l'expression des gènes dans 7 tissus (embryon, tête, cœur, foie, poumon, placenta, vésicule vitelline).
  - ▢ OIL contrôle (huile sans perturbateurs)
  - ▢ VZ vinclozoline
  - ▢ BPA bisphénol alpha
  - ▢ DEHP di-(2-ethylhexyl) phthalate
- Chez les individus de génération F1 (foetus exposés lors de la grossesse) on observe un effet des perturbateurs
  - ▢ dans la lignée somatique
  - ▢ dans la lignée germinale
- Ces perturbations sont toutefois absentes dès la seconde génération (F2), soit la première génération n'ayant pas été exposée au traitement.
- Ceci s'explique par la reprogrammation épigénomique, bien décrite par ailleurs: les marques épigénétiques sont effacées à deux reprises au cours du cycle de la vie
  - ▢ gamétogenèse
  - ▢ début de l'embryogenèse



**Figure 2** Testing the effect of endocrine-disrupting chemicals (EDs) on imprint erasure. (A) Experimental design. JF1 females (tail up) were mated with OG2 males (tail down). Pregnant dams (G0) were treated with EDs or oil control from 8.5 dpc to 12.5 dpc. Imprint erasure occurs during this time in PGCs of the exposed G1 embryos. One orange star = exposed G0 generation; two orange stars = exposed G1 embryo. (B) GFP positive male and female germ cells and somatic cells were collected from the gonads by FACS sorting. (C) Results of RNA Sequenom allelotyping experiments of imprinted transcripts are displayed for cells treated with an ED or control vehicle (oil); letters in parentheses indicate separate SNPs. Average (n = 3) allele-specific transcription is shown in color, 100% paternal (blue) to 100% maternal (red), with 50% biallelic in yellow. Many imprinted genes have parental allele-specific transcription in PGCs at 9.5 dpc but biallelic transcription in FGCs and MGCs (but not in FSCs and MSCs) at 13.5 dpc. Statistically significant ( $P < 0.05$ ) aberrations in erased allele-specific transcription, greater than 5% or 10%, are marked by thin or bold white rectangles, respectively.

- Iqbal, K., Tran, D.A., Li, A.X., Warden, C., Bai, A.Y., Singh, P., Wu, X., Pfeifer, G.P., and Szabó, P.E. (2015). Deleterious effects of endocrine disruptors are corrected in the mammalian germline by epigenome reprogramming. *Genome Biol.* 16, 59.

- Résumé des résultats
  - L'effet perturbateur in utero est clairement établi.
  - Les perturbations hormonales affectent les marques épigénétiques.
  - Ces modifications épigénétiques semblent être effacées lors de la reprogrammation.
  - La transmission transgénérationnelle des effets physiologique est difficile à évaluer, étant donné l'abondance de la littérature et les résultats divergents.
- Que conclure ?
  - Qu'il existe ou non une transmission transgénérationnelle, l'impact sur les individus exposés (adultes et embryons) est une raison suffisante pour proscrire les perturbateurs endocriniens.

# *Stress métabolique*

# L'hypothèse du phénotype parcimonieux

- Sur base des phénotypes associés à l'exposition à la famine des Pays-Bas, Hales et Barker remettent à jour l'hypothèse du **phénotype économe** (« *thrifty phenotype* »).
- Cette hypothèse vise à expliquer les corrélations entre problèmes métaboliques chez la mère enceinte et troubles métaboliques observés chez l'enfant (intolérance au glucose, diabète de type 2).
- Formulation originale (1992)
  - La carence nutritionnelle de l'embryon perturbe le développement des cellules beta du pancréas, responsables de la production d'insuline.
  - Si l'enfant ou l'adulte sont ultérieurement confrontés à une alimentation riche, cette insuffisance pancréatique provoque des troubles métaboliques.
- Interprétation « adaptationniste » récente dans la littérature épigénétique : le métabolisme fœtal s'adapte aux signaux de l'environnement, ce qui augmente les chances pour l'individu de survivre dans le monde où il va naître.
  - Des embryons souffrant d'une limitation d'apports en nutriments pendant la grossesse développent un métabolisme extrêmement efficace pour fixer les métabolites.
  - Si les individus disposent ensuite d'une alimentation normale ou riche, ils développeront des maladies métaboliques liées à cette sur-activation des voies métaboliques.

Schéma original (1992)

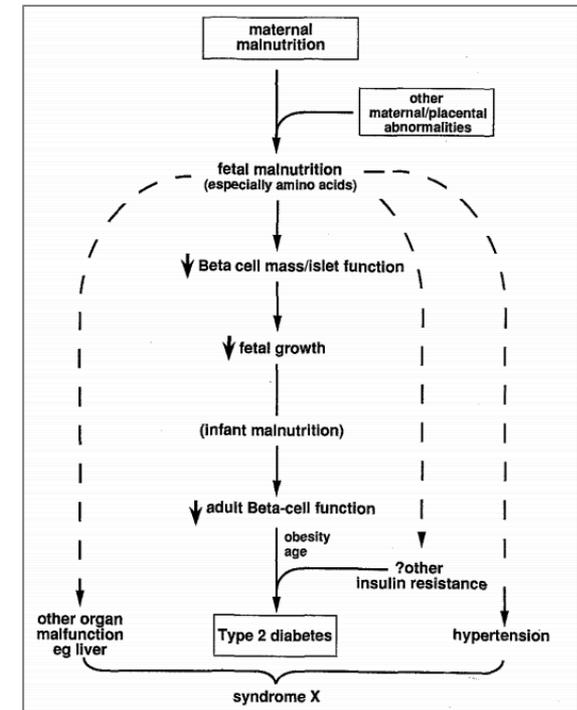
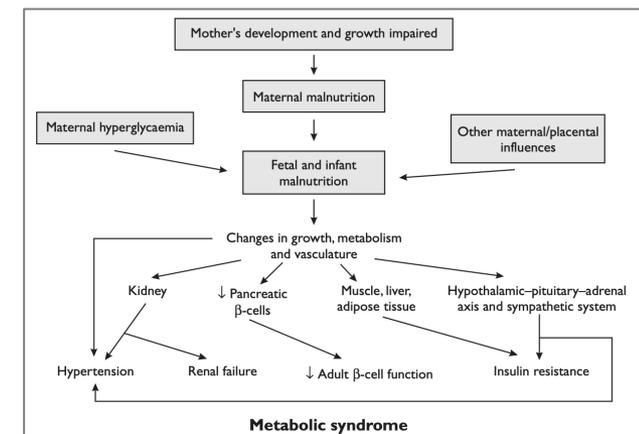


Schéma mis à jour (2001)



- Hales, C.N., and Barker, D.J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35, 595–601.
- Hales, C.N., and Barker, D.J. (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *Br. Med. Bull.* 60, 5–20.

# L'hiver de la faim aux Pays-Bas

- Pendant l'hiver 1944-1945, une région des Pays-Bas a été privée d'approvisionnement pendant plusieurs mois, et la population a enduré de sévères carences alimentaires.
- D'innombrables études scientifiques se sont penchées sur les conséquences de cette famine sur la descendance des femmes ayant souffert de cette famine pendant la grossesse.
- On observe des perturbations métaboliques chez les enfants de femmes enceintes exposées à cette famine
  - taille réduite à la naissance
  - tendance au diabète
  - tendance à l'obésité
  - un léger effet (<10%) sur la méthylation de l'ADN chez l'adulte
- Plusieurs publications rapportent des perturbations chez les petits-enfants des femmes exposées.
- On ne tarde pas à invoquer une transmission transgénérationnelle du stress métabolique.

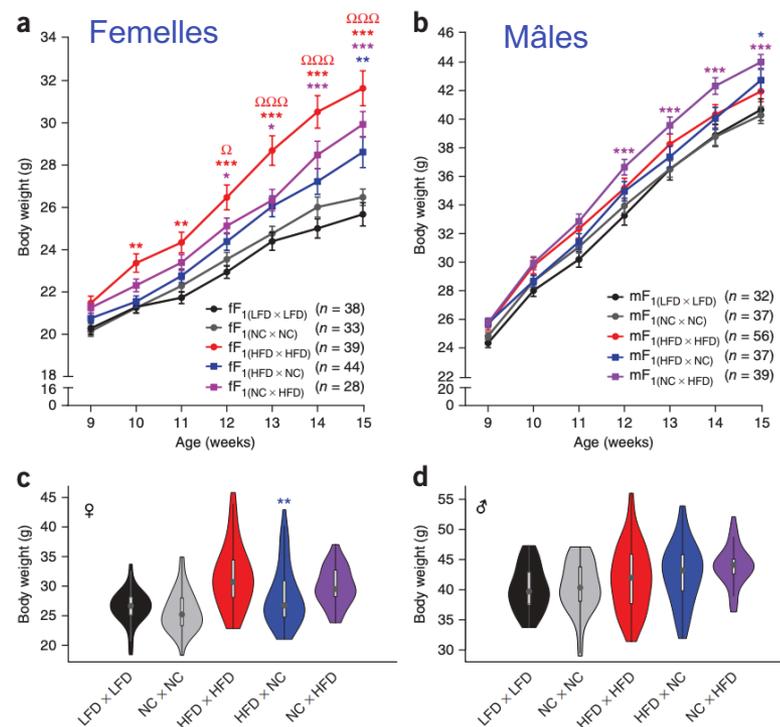
# *La famine aux Pays-Bas indique-t-elle une transmission transgénérationnelle de caractères épigénétiques ?*

- Comment distinguer un effet biologique (épigénétique) d'un effet de comportement
  - il est raisonnable de penser que les mères ayant souffert de famine pendant la grossesse adoptent un comportement alimentaire particulier avec l'enfant;
  - cet enfant peut à son tour transmettre ce comportement à ses propres enfants.
- Les différences de méthylation de l'ADN pourraient être la conséquence plutôt que la cause de l'alimentation et/ou des maladies métaboliques.
- A ce jour on ne dispose d'aucune expérience convaincante pour affirmer qu'il y ait une transmission épigénétique des conséquences de cette carence alimentaire.
- Au contraire, une étude d'association à échelle épigénomique (EWAS) a montré que les différences de méthylation sont la conséquence, mais non la cause, de perturbations métaboliques.

# Approches expérimentales sur des animaux

- Huypens et coll. (2016)
  - Analyse des troubles métaboliques (obésité, intolérance au glucose, taux d'insuline) chez des souris en fonction de la diète donnée aux parents.
    - LFD Pauvre en graisse
    - NC normale
    - HFD Riche en graisses
  - Fécondation in vitro pour séparer effets in utero des effets épigénétiques.
  - Réponse aux graisses dépend de la diète des parents génétiques et non de la mère porteuse.
  - Parents (génétiques) avec un diète riche en graisse → prise de poids plus rapide à la première génération.
  - Les auteurs concluent que c'est bien la lignée germinale qui est responsable de la différence observée.
- Remarques
  - Effet observé dans la progéniture femelle, quasiment pas d'effet chez le mâle.
  - Effet intergénérationnel, mais pas forcément transgénérationnel (on n'a pas étudié l'effet sur les générations suivantes).
  - On n'a pas identifié les mécanismes moléculaires de cet effet phénotypique.

Huypens et al. (2016). Epigenetic germline inheritance of diet-induced obesity and insulin resistance. *Nat. Genet.* 48, 497–499.



**a, b:** Prise de poids pendant croissance sur diète riche en graisse. **c, d:** poids à 15 semaines.

## Alimentation des parents

- Pauvre en graisse (LFD)
- Normale (NC)
- Riche en graisse (HFD)
- Riche (père) x normale (mère)
- Riche (mère) x normale (père)

- Huypens, P., Sass, S., Wu, M., Dyckhoff, D., Tschöp, M., Theis, F., Marschall, S., Hrabě de Angelis, M., and Beckers, J. (2016). Epigenetic germline inheritance of diet-induced obesity and insulin resistance. *Nat. Genet.* 48, 497–499.

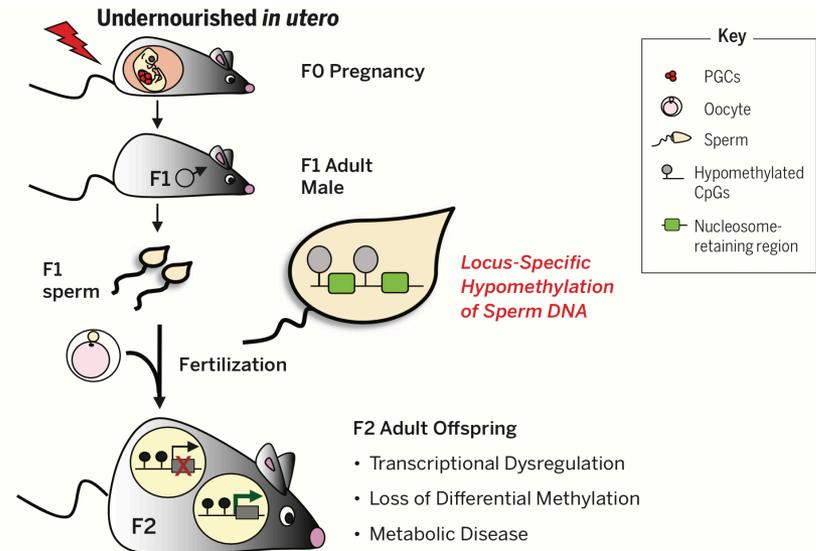
- Sous-nutrition de mères gravides
- Effet première génération (F1, exposée *in utero*)
  - Hypo-méthylation de l'ADN dans le spermatozoïde de la progéniture mâle
- Effet seconde génération (F2)
  - Dérégulation métabolique
  - Troubles métaboliques
- Pas d'effets sur les générations suivantes
- Il s'agit donc d'un effet
  - intergénérationnel
  - transmis par la lignée germinale
- Il ne s'agit pas d'une transmission transgénérationnelle

## RESEARCH ARTICLE SUMMARY

### IN UTERO EFFECTS

## In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism

Elizabeth J. Radford, Mitsuteru Ito, Hui Shi, Jennifer A. Corish, Kazuki Yamazawa, Elvira Isganaitis, Stefanie Seisenberger, Timothy A. Hore, Wolf Reik, Serap Erkek, Antoine H. F. M. Peters, Mary-Elizabeth Patti,\* Anne C. Ferguson-Smith\*

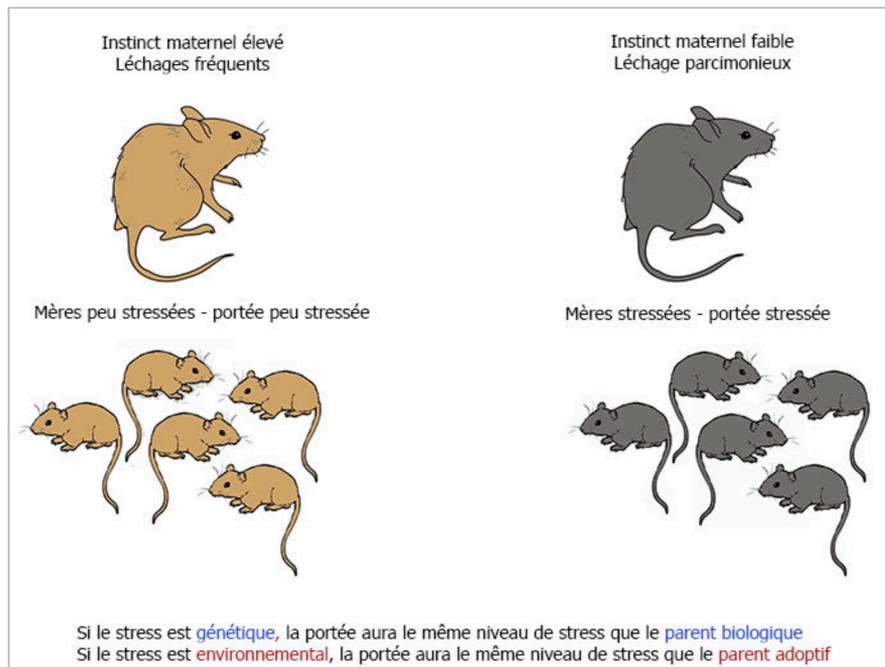


**In utero undernourishment alters the adult germ cell methylome.** Undernourishment during PGC reprogramming results in hypomethylation of discrete loci in adult sperm. These regions are enriched in nucleosomes and are low-methylated regions. Although partially resistant to blastocyst reprogramming, differential methylation does not persist in the next generation. However, dysregulated expression of genes neighboring DMRs is observed in F<sub>2</sub> offspring.

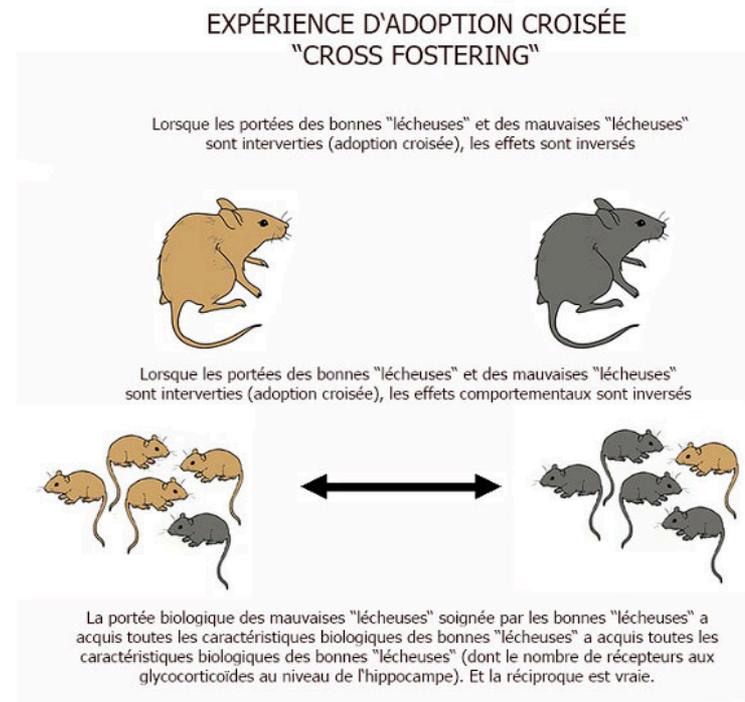
# *Stress psychologique*

# Le soin maternel chez le rat

- Chez le rat, le léchage maternel prémunit les jeunes du stress.
- Les enfants de mères plus attentives sont moins stressés, et manifestent un comportement semblable vis-à-vis de leur descendance.
- Si l'on échange des individus au sein des portées, ils manifestent le comportement de la mère d'adoption plutôt que de la mère biologique.



- Le léchage maternel réduit la méthylation expression du gène NRC31 dans le cerveau de la progéniture, qui code pour un récepteur aux glucocorticoïdes.
- En absence de léchage, on constate une augmentation du cortisol dans le sang.



- Source des figures : E. Drouet (07/02/2019). Encyclopédie de l'environnement.  
<https://www.encyclopedie-environnement.org/sante/epigenome-facteurs-environnementaux/>,  
avec une petite correction pour l'image de droite (on n'échange qu'un ou deux individus de la portée)

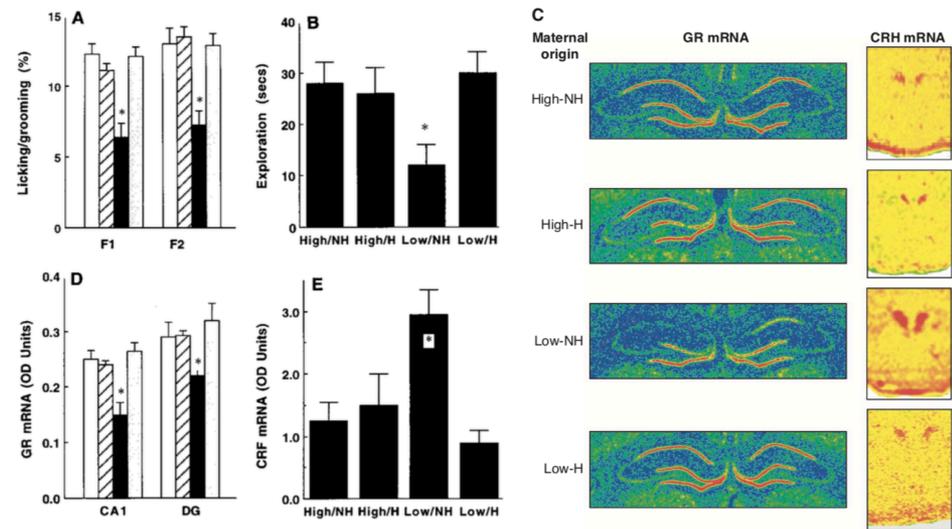
# Transmission « non-génomique » du comportement

- Publication fondatrice pour les études d'impact de transmission du comportement de soin maternel chez les rats.
- Approche : échange de nouveaux-nés entre mères à niveau élevé / bas de soin aux petits (léchage/toilettage du nouveau-né).
- L'article montre que le degré de soin maternel affecte le comportement de la descendance :
  - réactivité au stress;
  - exploration de territoires ouverts;
  - reproduction du comportement maternel d'une génération à l'autre (les rates élevées par des mères attentionnées deviennent des mères attentionnées).
- Les auteurs observent des différences entre taux de récepteurs aux glucocorticoïdes dans le cerveau.
- L'échange de nouveaux-nés montre que l'effet dépend de la mère éleveuse plutôt que de la mère biologique (effets non-génétiques).
- Les expériences n'indiquent pas si la transmission repose de mécanismes biologiques (épigénétiques) ou psychologiques.

## Nongenomic Transmission Across Generations of Maternal Behavior and Stress Responses in the Rat

Darlene Francis, Josie Diorio, Dong Liu, Michael J. Meaney\*

In the rat, variations in maternal care appear to influence the development of behavioral and endocrine responses to stress in the offspring. The results of cross-fostering studies reported here provide evidence for (i) a causal relationship between maternal behavior and stress reactivity in the offspring and (ii) the transmission of such individual differences in maternal behavior from one generation of females to the next. Moreover, an environmental manipulation imposed during early development that alters maternal behavior can then affect the pattern of transmission in subsequent generations. Taken together, these findings indicate that variations in maternal care can serve as the basis for a nongenomic behavioral transmission of individual differences in stress reactivity across generations.



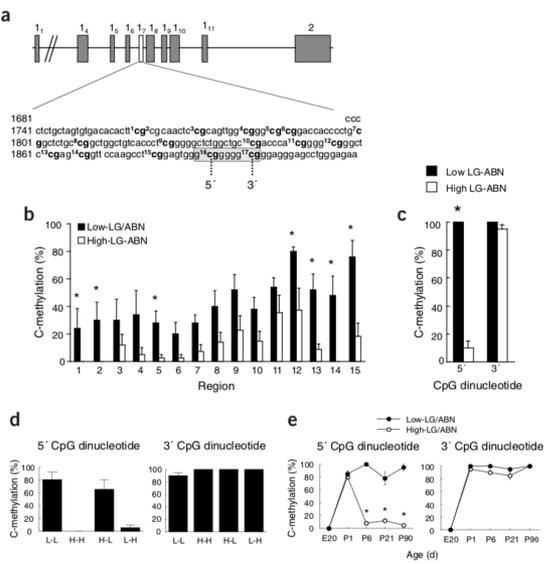
# Impact du soin maternel sur la méthylation de l'ADN

- Le gène Nr3c1 du rat code pour un récepteur de glucocorticoïdes.
- Dans la région non-codante du gène, on trouve des dinucléotides CpG.
- Le niveau de méthylation de l'ADN diminue significativement en réponse au soin maternel (figures b,c). Le site le plus affecté (figure d) est un site de liaison du facteur transcriptionnel NCF1-A. La méthylation empêche donc la liaison de ce facteur.
- Quand on échange les nouveaux-nés (figure d), le niveau de méthylation correspond à la mère adoptive plutôt qu'à la mère biologique.
- Le niveau de méthylation est donc bien déterminé par l'environnement du nouveau-né plutôt que par la lignée germinale.

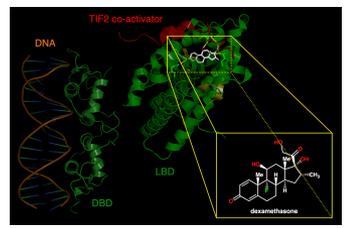
## Epigenetic programming by maternal behavior

Ian C G Weaver<sup>1,2</sup>, Nadia Cervoni<sup>3</sup>, Frances A Champagne<sup>1,2</sup>, Ana C D'Alessio<sup>3</sup>, Shakti Sharma<sup>1</sup>, Jonathan R Seckl<sup>4</sup>, Sergiy Dymov<sup>3</sup>, Moshe Szyf<sup>2,3</sup> & Michael J Meaney<sup>1,2</sup>

Here we report that increased pup licking and grooming (LG) and arched-back nursing (ABN) by rat mothers altered the offspring epigenome at a glucocorticoid receptor (GR) gene promoter in the hippocampus. Offspring of mothers that showed high levels of LG and ABN were found to have differences in DNA methylation, as compared to offspring of 'low-LG-ABN' mothers. These differences emerged over the first week of life, were reversed with cross-fostering, persisted into adulthood and were associated with altered histone acetylation and transcription factor (NGFI-A) binding to the GR promoter. Central infusion of a histone deacetylase inhibitor removed the group differences in histone acetylation, DNA methylation, NGFI-A binding, GR expression and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) responses to stress, suggesting a causal relation among epigenomic state, GR expression and the maternal effect on stress responses in the offspring. Thus we show that an epigenomic state of a gene can be established through behavioral programming, and it is potentially reversible.

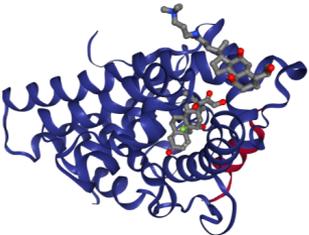


### Structure du récepteur de glucocorticoïdes (GR)



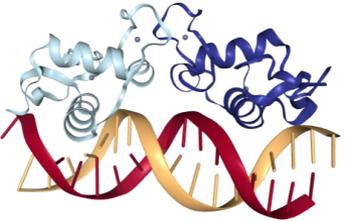
[https://en.wikipedia.org/wiki/Glucocorticoid\\_receptor#/media/File:Glucocorticoid\\_receptor.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Glucocorticoid_receptor#/media/File:Glucocorticoid_receptor.png)

### GR lié à l'hexaméthasone



<http://www.rcsb.org/3d-view/4UDC/1>

### GR lié à l'ADN

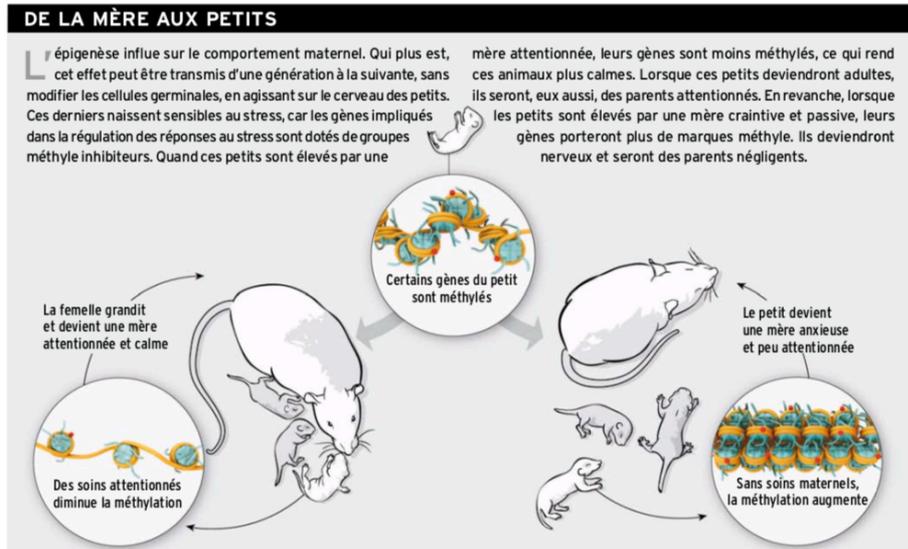


<https://www.rcsb.org/3d-view/5CBY/1>

■ Weaver, I.C.G., Cervoni, N., Champagne, F.A., D'Alessio, A.C., Sharma, S., Seckl, J.R., Dymov, S., Szyf, M., and Meaney, M.J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. Nat. Neurosci. 7, 847-854.

# Existe-t-il une transmission transgénérationnelle du stress maternel ?

- Dans une revue de 2013, Eric Nestler rapporte les expériences réalisées dans le laboratoire d'Isabelle Masui, qui suggèrent que le stress se transmet entre générations.
- Il souligne que ces expériences ne démontrent pas une transmission des marques épigénétiques par la lignée germinale.
- Il signale qu'il a tenté sans succès de reproduire l'une des expériences les plus souvent citées pour attester d'une transmission transgénérationnelle du stress chronique chez les rongeurs. Il n'a cependant pas publié ses propres résultats négatifs (communication personnelle).
- Conclusion:
  - Les effets peuvent s'expliquer en termes d'effet du comportement sur les marques épigénétiques. L'étude de Weaver (2004) montre clairement que le comportement affecte la méthylation.
  - A ce stade on n'a pas démontré la causalité inverse (épigénétique -> comportement)
  - On n'a pas non plus démontré que la transmission passait par la lignée germinale.



Eric Nestler (2013). Le cerveau modelé par l'environnement. Pour la Science n° 81, Octobre 2013. Dossier « L'hérédité sans gènes »

*« Les effets du comportement maternel sont transmis, au moins en partie, par des mécanismes épigénétiques. Par rapport aux petits choyés, les petits élevés par des mères passives présentent plus de méthylation de l'ADN dans les séquences de régulation d'un gène codant le récepteur des glucocorticoïdes, une protéine centrale dans les réactions d'un animal à l'hormone de stress, le cortisol. Une méthylation excessive, détectée dans l'hippocampe, diminue la quantité de ces récepteurs produits par les neurones. [...] Ainsi, les changements épigénétiques seraient transférés d'une génération à la suivante, sans être transmis par les ovules ou les spermatozoïdes. Quand le comportement d'une mère modifie la régulation épigénétique dans le cerveau d'un de ses petits, ce dernier présente le même comportement que sa mère, lequel modifie les marques épigénétiques, et, par conséquent, le comportement de ses petits, et ainsi de suite. » Eric Nestler (2013).*

# Impact du stress paternel sur la progéniture par accouplement

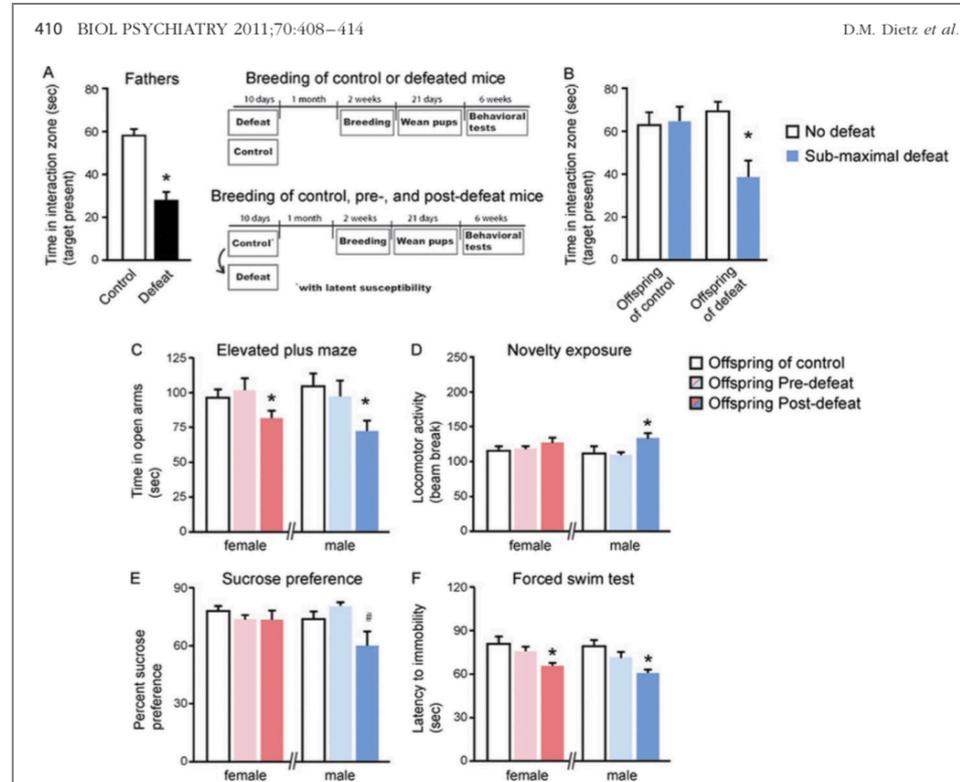
- Induction d'un stress de « défaite sociale »
  - Des rats mâles sont confrontés pendant 10 minutes / jour à un mâle agressif, puis séparés par une paroi de plexiglass (ils voient leur agresseur le reste du temps).
  - Des rats de contrôle ne sont pas confrontés au mâle agressif.
- Impact du stress sur le mâle soumis au traitement
  - comportement « de défaite »
  - symptômes qualifiés « de type dépressif » subsistent >30 jours
- Impact sur sa progéniture générée par accouplement avec la femelle (les mâles passent 10 jours avec la femelle)
  - Sensibilité accrue au stress de défaite sociale (se manifeste suite à une exposition réduite au stress)
  - Exploration différente d'un labyrinthe
  - Augmentation de mobilité face à un environnement inconnu
  - Perte d'appétit pour le sucrose
  - Endurance réduite pour des tests de nage forcée
- Impact sur la progéniture générée par fécondation *in vitro*
  - Voir diapo suivante

## PRIORITY COMMUNICATIONS

### Paternal Transmission of Stress-Induced Pathologies

David M. Dietz, Quincey LaPlant, Emily L. Watts, Georgia E. Hodes, Scott J. Russo, Jian Feng, Ronald S. Oosting, Vincent Vialou, and Eric J. Nestler

## Stress de la progéniture générée par d'un accouplement



- Dietz, D.M., LaPlant, Q., Watts, E.L., Hodes, G.E., Russo, S.J., Feng, J., Oosting, R.S., Vialou, V., and Nestler, E.J. (2011). Paternal transmission of stress-induced pathologies. *Biol. Psychiatry* 70, 408–414.

# Impact du stress paternel sur la progéniture par FIV

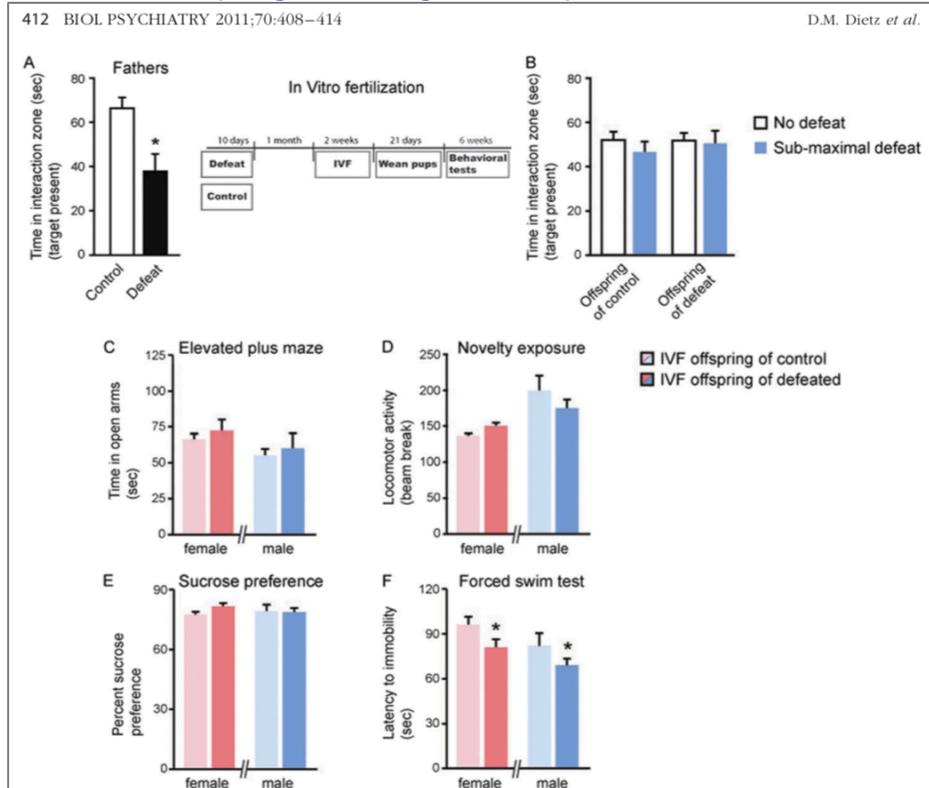
- Impact sur la progéniture après fécondation *in vitro*
  - Presque tous les effets disparaissent.
  - Il reste une différence légère mais qualifiée de significative pour l'endurance à la nage forcée.
- Conclusion
  - Remise en cause de la transmission du comportement via la lignée germinale.
  - Suggère que le stress est transmis par le mâle à la femelle lors de l'accouplement, puis par la femelle à sa progéniture.
  - Ceci met en cause toutes les études précédentes qui testent la transmission de comportements sur base d'accouplements.
  - La fécondation *in vitro* devient une exigence méthodologique pour pouvoir étudier la transmission épigénétique de comportements.

## PRIORITY COMMUNICATIONS

### Paternal Transmission of Stress-Induced Pathologies

David M. Dietz, Quincey LaPlant, Emily L. Watts, Georgia E. Hodes, Scott J. Russo, Jian Feng, Ronald S. Oosting, Vincent Vialou, and Eric J. Nestler

## Stress de la progéniture générée par fécondation *in vitro*



- Dietz, D.M., Laplant, Q., Watts, E.L., Hodes, G.E., Russo, S.J., Feng, J., Oosting, R.S., Vialou, V., and Nestler, E.J. (2011). Paternal transmission of stress-induced pathologies. *Biol. Psychiatry* 70, 408–414.

# Une transmission épigénétique du conditionnement olfactif ?

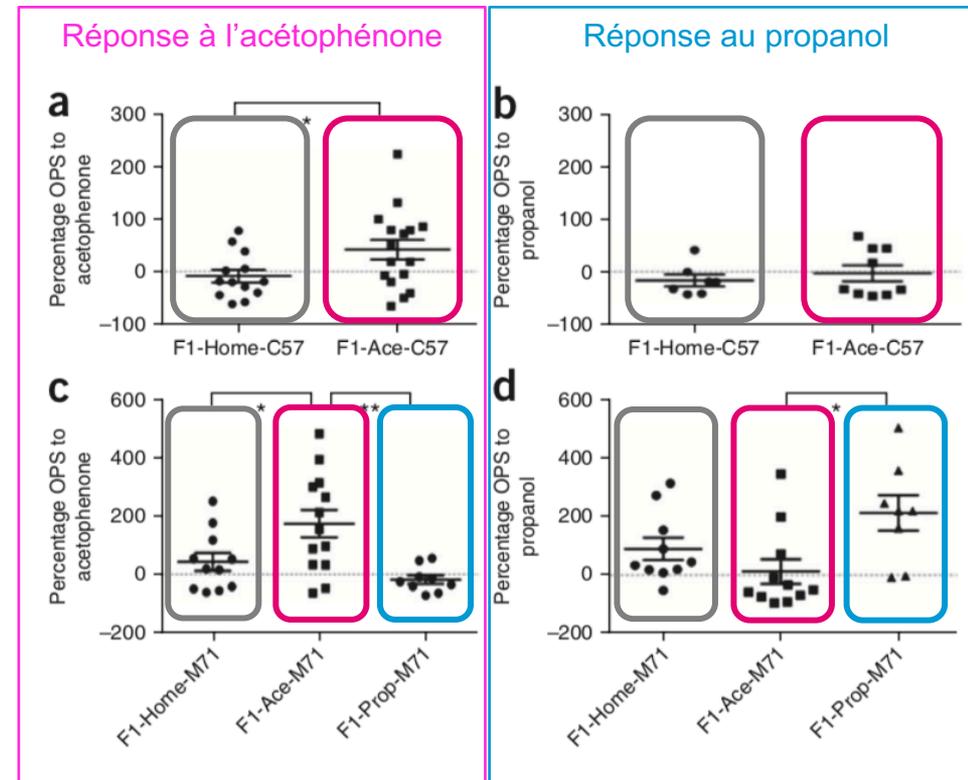
- **Etape 1: Conditionnement de rats mâles**
  - Des rats mâles sont soumis à un stress olfactif, en associant l'émission d'une odeur spécifique (molécule d'**acétophénone** ou de **propanol**) à un choc électrique.
  - Si on présente ultérieurement la même odeur (sans choc électrique), les rats conditionnés manifestent des signes de stress (ils anticipent le choc).
  - Il s'agit typiquement d'un **conditionnement pavlovien**
- **Etape 2: insémination artificielle de femelles** avec le sperme récolté chez ces rats conditionnés
  - Aucun contact entre le mâle stressé et la femelle
  - On évite donc un biais de transmission comportementale du stress
- **Etape 3: test de la transmission**
  - Quand on présente la même odeur aux descendants mâles de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> générations, ils manifestent des signes de stress correspondant au conditionnement de leur père / grand-père, alors qu'ils n'ont pas subi eux-mêmes le conditionnement.
- L'article comporte également un tas d'autres expériences, montrant notamment des modifications des connexions neuronales.

Les boîtes arrondies indiquent le Conditionnement

« Home »: Aucun

Ace: Acétophénone

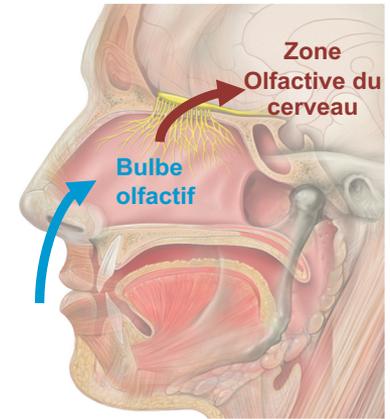
Prop: Propanol



- L'étude de Dias et Ressler suscite le scepticisme d'une bonne partie de la communauté scientifique, pour différentes raisons.
- **Protocole de conditionnement.**
  - L'association de type pavlovien entre un stimulus et un choc électrique peut provoquer de fausses réponses. Des tests basés sur une réponse active à un stimulus positif sont moins problématiques.

# Scepticisme concernant la transmission du conditionnement olfactif

- L'étude de Dias et Ressler suscite le scepticisme d'une bonne partie de la communauté scientifique, pour différentes raisons.
- **Protocole de conditionnement.**
  - L'association de type pavlovien entre un stimulus et un choc électrique peut provoquer de fausses réponses. Des tests basés sur une réponse active à un stimulus positif sont moins problématiques.
- **Mécanismes de conditionnement olfactif**
  - Le conditionnement olfactif repose sur le renforcement de connexions au niveau du cortex, plutôt que sur une régulation épigénétique de l'expression des récepteurs.



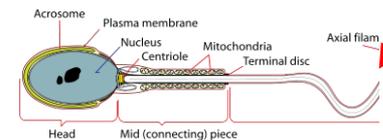
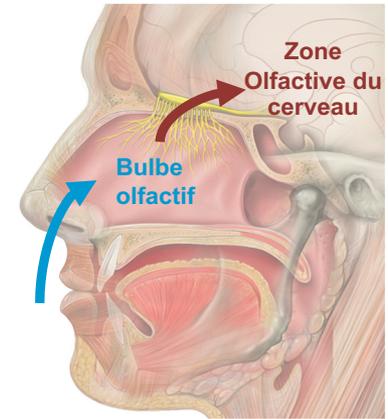
■ Dias, B.G., and Ressler, K.J. (2014). Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat. Neurosci.* 17, 89–96.

■ Images

- [https://fr.wikipedia.org/wiki/Olfaction\\_-\\_/media/Fichier:Head\\_olfactory\\_nerve.jpg](https://fr.wikipedia.org/wiki/Olfaction_-_/media/Fichier:Head_olfactory_nerve.jpg)

# Scepticisme concernant la transmission du conditionnement olfactif

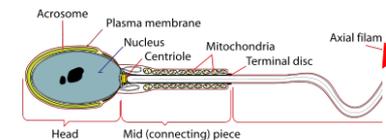
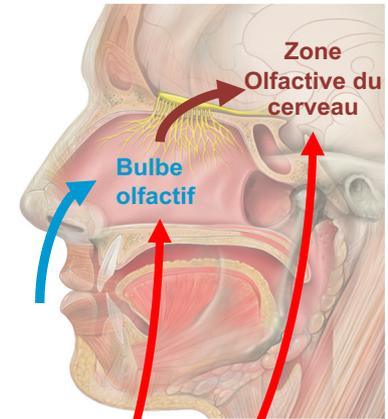
- L'étude de Dias et Ressler suscite le scepticisme d'une bonne partie de la communauté scientifique, pour différentes raisons.
- **Protocole de conditionnement.**
  - L'association de type pavlovien entre un stimulus et un choc électrique peut provoquer de fausses réponses. Des tests basés sur une réponse active à un stimulus positif sont moins problématiques.
- **Mécanismes de conditionnement olfactif**
  - Le conditionnement olfactif repose sur le renforcement de connexions au niveau du cortex, plutôt que sur une régulation épigénétique de l'expression des récepteurs.
- **Transfert d'information neurones → spermatozoïdes ?**
  - Chez les mammifères, on ne connaît aucun mécanisme qui permettrait de transférer des modifications épigénétiques depuis les tissus somatiques vers les cellules germinales.



- Dias, B.G., and Ressler, K.J. (2014). Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat. Neurosci.* 17, 89–96.

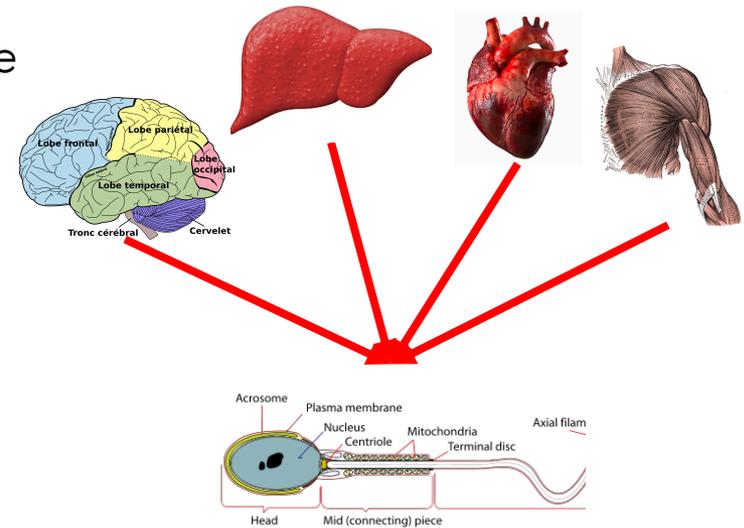
# Scepticisme concernant la transmission du conditionnement olfactif

- L'étude de Dias et Ressler suscite le scepticisme d'une bonne partie de la communauté scientifique, pour différentes raisons.
- **Protocole de conditionnement.**
  - L'association de type pavlovien entre un stimulus et un choc électrique peut provoquer de fausses réponses. Des tests basés sur une réponse active à un stimulus positif sont moins problématiques.
- **Mécanismes de conditionnement olfactif**
  - Le conditionnement olfactif repose sur le renforcement de connexions au niveau du cortex, plutôt que sur une régulation épigénétique de l'expression des récepteurs.
- **Transfert d'information neurones → spermatozoïdes ?**
  - Chez les mammifères, on ne connaît aucun mécanisme qui permettrait de transférer des modifications épigénétiques depuis les tissus somatiques vers les cellules germinales.
- **Retour d'information zygote → neurones ?**
  - Même en imaginant qu'un tel mécanisme existe, comment l'information du gamète pourrait-elle, via zygote puis au fil des divisions cellulaires de l'embryon, arriver à cibler spécifiquement le même neurone de la progéniture ?



# Scepticisme concernant la transmission du conditionnement olfactif

- L'étude de Dias et Ressler soulève une question plus fondamentale : si elle venait à être confirmée par des études indépendantes, elle remettrait fortement en cause le socle de l'épigénétique.
- Intégration d'informations contradictoires
  - Comment pourrait-on concevoir qu'une seule et même cellule, le gamète, intègre à la fois les informations épigénétiques résultant du vécu de différentes cellules somatiques ?
    - cellules nerveuses pour les stress psychologiques;
    - cellules du foie pour les effets métaboliques,
    - les autres types cellulaires pour les effets qui leur sont propres, ...
  - Les marques épigénétiques associées à ces différentes réponses adaptatives sont parfois opposées (la même région est méthylée dans un type cellulaire, déméthylée dans un autre). C'est l'essence même de la régulation épigénétique.
- Comment une seule cellule pourrait-elle porter simultanément ces informations ?



## Too Much Success for Recent Groundbreaking Epigenetic Experiments

**Gregory Francis**

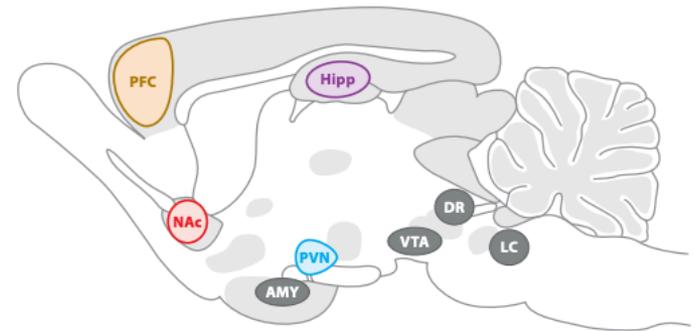
Department of Psychological Sciences, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47906, and Brain Mind Institute, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne 1015, Switzerland

ORCID ID: 0000-0002-8634-794X (G.F.)

- L'année même de sa publication, l'article de Dias et Ressler est contesté sur base d'arguments statistiques.
- Les résultats de toutes les expériences « collent trop bien », on n'y trouve pas la variabilité expérimentale à laquelle on s'attend généralement quand on mène une série d'expériences sur des êtres vivants.
- Note: ceci ne démontre pas formellement que l'étude de Rias & Ressler est faussée, mais suggère d'attendre des confirmations indépendantes et d'élucider les mécanismes avant de considérer qu'il existe effectivement une transmission transgénérationnelle d'un comportement acquis (dans ce cas, par conditionnement pavlovien).

# *Troubles psychiatriques*

# Modifications épigénétiques subséquentes au stress

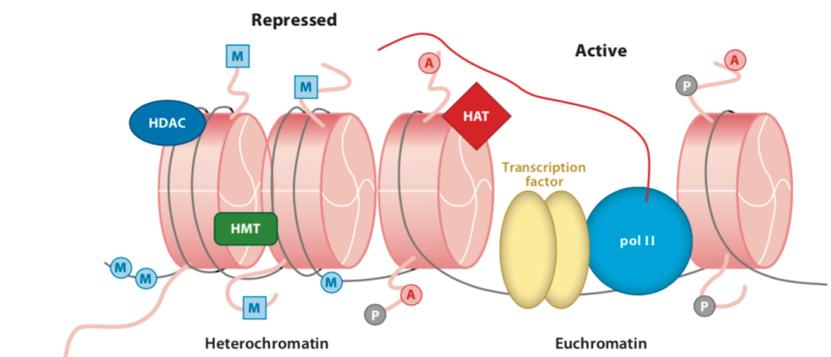


Gene	Region	MeDNA	Associated mechanisms	Behavioral paradigm
<i>BDNF</i> ↓	Hipp	↑		Predator stress <sup>105</sup>
<i>BDNF</i> ↓	PFC	↑		Early-life stress <sup>146</sup>
<i>CRF</i> ↓ ↑	PVN	↑ ↓		Chronic mild stress (females) <sup>103</sup> Social defeat (reversed by imipramine) <sup>31</sup>
<i>P11</i> ↓ ↑	PFC	↑ ↓		FSL depression model <sup>110</sup> FSL with escitalopram <sup>110</sup>
<i>GDNF</i> ↓ ↑	NAc	↑	↑ MeCP2/HDAC2 ↑ MeCP2/CREB	Social defeat – sus and res <sup>108</sup> Social defeat – sus only <sup>108</sup> Social defeat – res only <sup>108</sup>
<i>AVP</i> ↑	PVN		↓ MeCP2	Maternal separation <sup>144</sup>
<i>GR</i> ↑	Hipp	↓		High LG (maternal attention) <sup>151</sup>

Vialou, V., Feng, J., Robison, A.J., and Nestler, E.J. (2013). Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 59–87.

- Vialou, V., Feng, J., Robison, A.J., and Nestler, E.J. (2013). Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 59–87.

# Impact des traitements antidépressifs sur la chromatine



Residue	Mark/effect	Region	Experimental manipulation
General acetyl-H3	Acet ↓	NAc	Social stress in stress-sensitive mice, reversed by imipramine <sup>108</sup>
	Hipp ↑	Hipp	Social stress, reversed by imipramine <sup>116, 119, 120</sup>
	AMY ↓	AMY	Social stress <sup>116</sup>
	mPFC ↓	mPFC	Social stress <sup>117</sup>
H3 lysine 27	2Me ↑	NAc	Broad changes with social stress, reversed by imipramine <sup>127</sup>
	3Me ↓	Hipp	Restraint stress <sup>126</sup> and social stress <sup>120</sup>
	↓	NAc	Social stress in stress-resistant mice <sup>108</sup>
H3 lysine 14	Acet ↑	NAc	Temporally modulated by stress <sup>26</sup>
	Hipp ↓	Hipp	Regulation in LR/HR rats <sup>118</sup>
H3 lysine 9	1Me ↓	Hipp	Restraint stress <sup>126</sup>
	2Me ↓	NAc	Social stress <sup>125</sup>
	↓	Hipp	Broad changes with social stress, reversed by imipramine <sup>127</sup>
	3Me ↑	Hipp	Restraint stress, reversed by fluoxetine <sup>126</sup>
H3 lysine 4	Acet ↓	Hipp	Antidepressants and electroconvulsive seizures <sup>120,124</sup>
	2Me ↑	Hipp	Social stress and imipramine <sup>120</sup>
	3Me ↓	NAc, Hipp	Restraint and social stress <sup>108,126</sup>
General acetyl-H2B	Acet ↓	Hipp	Regulation in LR/HR rats <sup>118</sup>
General acetyl-H4	Acet ↓	Hipp	Regulation in LR/HR rats <sup>118</sup>
H3 lysine 12	Acet ↑	Forebrain	Maternal separation <sup>148</sup>

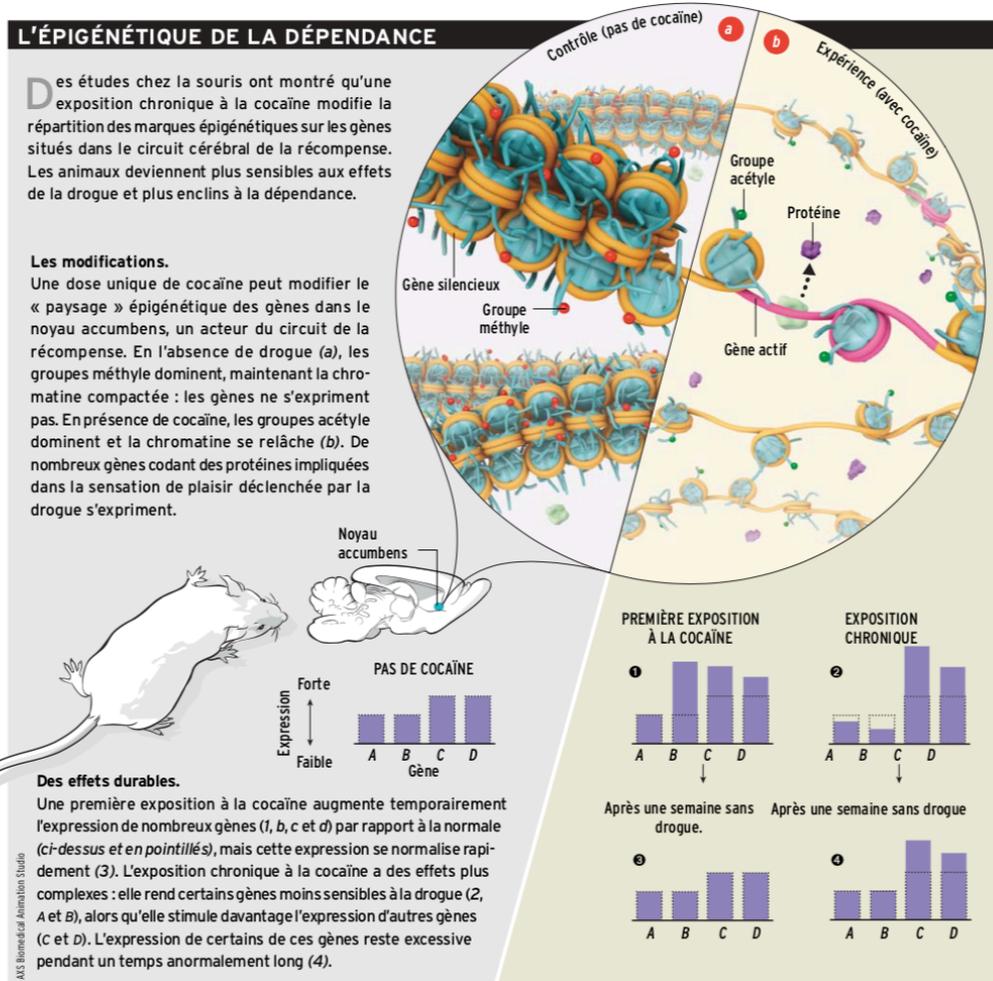
Vialou, V., Feng, J., Robison, A.J., and Nestler, E.J. (2013). Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 59–87.

■ Vialou, V., Feng, J., Robison, A.J., and Nestler, E.J. (2013). Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 59–87.

# *Impact des drogues*

# Impact de drogues sur l'épigénome

- Eric Nestler a mesuré l'expression des gènes et les marques épigénétiques sur de souris exposées à la cocaïne.
- L'exposition à la cocaïne modifie
  - les marques chromatiniennes des gènes situés dans le circuit cérébral de la récompense;
  - le niveau d'expression des gènes.
- Une première exposition ne laisse pas de traces durables.
- Une exposition prolongée laisse des traces irréversibles.
- Il existe donc un effet épigénétique des drogues sur les individus exposés (y compris embryons) mais Nestler ne mentionne pas de transmission transgénérationnelle de ces effets.



***Conclusion: transmission transgénérationnelle  
des effets de l'environnement***

# Quelques précautions

- Les exemples abordés durant les deux dernières séances sont limités aux mammifères. Les conclusions ne s'appliquent donc qu'aux mammifères
- Il est impossible de réviser les milliers de publications parues dans le domaine depuis des décennies. Je me suis basé sur
  - les articles les plus emblématiques
  - plusieurs revues de spécialistes
- Je n'ai abordé que les mécanismes les mieux établis, et pour lesquels on dispose de plusieurs (dizaines d')années de recul
  - régulation transcriptionnelle
  - méthylation des CpG
  - modifications d'histones
- Je n'ai pas abordé de recherches concernant le rôle potentiel de petits ARN (miRNA, piRNA, tRNA), qui font l'objet d'un intérêt croissant.

# Quelques précautions

- On a de bonnes raisons de penser que la situation est différentes dans d'autres groupes taxonomiques.
- Plantes
  - pas de séparation germe/soma
  - exemples bien documentés de transmission épigénétique sur plusieurs générations (phénotype perloc) quoique des travaux récents montrent une stabilité plus restreinte que ce qu'on pensait (vernalisation)
- Mouche drosophile
  - pas de méthylation de l'ADN
  - transmission transgénérationnelle démontrée pour certains phénotypes
- Ver nématode *Caenorhabditis elegans*
  - Pas de méthylation de l'ADN/
  - Processus de développement complètement différent des autres animaux pluricellulaires (nombre fixe de cellules, détermination des fonctions par lignage)
  - Transmission transgénérationnelle sur des dizaines de générations, via des piRNA.

- Rôle des facteurs transcriptionnels
  - durant le développement
  - durant la vie de l'organisme (réponse adaptative à l'environnement)
- Interactions (dans les deux sens) entre régulation transcriptionnelle et modifications chromatinienne
  - méthylation d'ADN
  - modifications d'histones
- Impact de l'environnement (métabolisme, psychisme, toxines, drogues, médicaments) sur la régulation
  - régulation transcriptionnelle (niveau d'expression des gènes)
  - marques chromatinienne
- Impact « intergénérationnel » (?) par exposition du fœtus à des facteurs de l'environnement
  - Il serait moins ambigu de parler d'un impact direct sur l'embryon, par la voie utérine
- Chez certaines espèces – mais pas chez les mammifères – un impact transgénérationnel de modifications épigénétiques
  - Bactéries: via facteurs transcriptionnels et boucles de rétroaction (Wiener & Novick, 1957)
  - Plantes (phénotype « peloric » )
  - Ver nématode (impact de petits ARN sur la longévité)
  - Drosophile

- Impact inter-générationnel par la voie germinale chez les mammifères
  - Pas si évident, si l'on ne retient que les expériences par la voie paternelle et avec fécondation in vitro
- Impact trans-générationnel chez les mammifères
  - Avec les précautions actuellement demandées, aucune publication ne démontre clairement un tel impact

# Ce qui reste pour moi complètement mystérieux

- Les interactions environnement – épigénome affectent des tissus spécifiques (connexions neuronales, glandes endocrines, foie, ...).
- Chez les mammifères, comment pourrait-on expliquer une hypothétique transmission « horizontale » des modifications épigénétiques entre cellules somatiques et cellules germinales ?
  - Transfert d'information soma → germe
    - Nous ne connaissons aucun mécanisme qui permettrait à l'information de passer des cellules somatiques aux cellules germinales.
  - Ciblage tissulaire de l'information portée par les gamètes
    - Même s'il subsiste des signaux (méthylation ADN, modifications d'histones, petits ARN), comment pourraient-ils cibler spécifiquement les tissus concernés ? Ces signaux sont-ils transmis par mitose à tous les tissus ? Ou au contraire transmis sélectivement à certains tissus ?
- Un fardeau pesant pour les frêles épaules d'un gamète
  - Même en supposant que de tels mécanismes existent, et qu'on puisse les découvrir, comment une seule cellule (le gamète) pourrait-elle être dépositaire de l'histoire des différents tissus, alors que ces tissus se distinguent précisément par les différences de leurs profils épigénomiques ?
- A ma connaissance, ces questions-ci ne sont même pas évoquées dans la littérature scientifique.

***Pour aller plus loin***

- Cours d'Edith Heard « **Epigénétique et mémoire cellulaire** » au collège de France
  - <https://www.college-de-france.fr/site/edith-heard/>
  - Une demi-douzaine de séances par an depuis 2013
  - Vidéos, bande son et diaporamas disponibles.
- Quelques revues récentes (en anglais)
  - Heard, E., and Martienssen, R.A. (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* 157, 95–109.
  - Henikoff, S., and Grealia, J.M. (2016). Epigenetics, cellular memory and gene regulation. *Curr. Biol.* 26, R644-648.
  - van Otterdijk, S.D., and Michels, K.B. (2016). Transgenerational epigenetic inheritance in mammals: how good is the evidence? *FASEB J.* 30, 2457–2465.
  - Horsthemke, B. (2018). A critical view on transgenerational epigenetic inheritance in humans. *Nat Commun* 9, 2973.
  - Radford, E.J. (2018). Exploring the extent and scope of epigenetic inheritance. *Nat Rev Endocrinol* 14, 345–355.
  - Bošković, A., and Rando, O.J. (2018). Transgenerational Epigenetic Inheritance. *Annu. Rev. Genet.* 52, 21–41.
  - Perez, M.F., and Lehner, B. (2019). Intergenerational and transgenerational epigenetic inheritance in animals. *Nat. Cell Biol.* 21, 143–151.