

## Épigénétique et mémoire cellulaire

M<sup>me</sup> Edith HEARD, professeur

ENSEIGNEMENT

### **Cours : Reprogrammations développementales, induites et pathologiques**

Ce rapport d'activité annuel de la chaire d'Épigénétique et mémoire cellulaire comprendra deux parties : un rapport sur l'enseignement, un rapport sur la recherche. Cette chaire a pour but d'offrir une vision d'un domaine nouveau et très riche de la biologie, qui touche aussi bien au développement des organismes et aux variations normales ou pathologiques de celui-ci, notamment en lien avec l'environnement, qu'à l'hérédité et à l'évolution. Le thème de mes cours en 2014 concernait la reprogrammation cellulaire. Depuis l'avènement de la génétique moléculaire, les biologistes essaient de comprendre comment l'ovule fécondé forme un organisme composé de centaines de types de cellules spécialisées, chacune exprimant un ensemble défini de gènes. Initialement, il s'agissait de déterminer si cette spécialisation résulte d'une perte progressive de l'information génétique contenue dans la séquence de l'ADN ou d'une expression différentielle des gènes au cours du développement. Les expériences pionnières de clonage par transfert nucléaire chez les amphibiens de Robert Briggs et Thomas King dans les années 1950, puis de John Gurdon en 1962, ont validé la seconde hypothèse, en démontrant que l'embryogénèse procède par restriction progressive du potentiel d'expression des gènes, plutôt que par perte de ces derniers. Ainsi, l'identité cellulaire résulte de l'expression d'une combinaison spécifique de gènes. Ces travaux ont été reproduits plusieurs décennies plus tard chez les mammifères : la brebis Dolly, la vache Marguerite sont les deux premiers exemples réussis de clonage par transfert nucléaire dans ce groupe d'espèces et ont été suivis de nombreux autres, y compris chez la souris, l'espèce modèle pour la plupart des études en biologie des mammifères. Plus récemment, Shinya Yamanaka démontre qu'il est possible d'induire des cellules souches pluripotentes (cellules iPS) par dédifférenciation de cellules souches adultes, par expression forcée de quatre gènes clés (*Oct3/Oct4*, *SOX2*, *KLF4* et *c-myc*). Ces travaux, ainsi que ceux de John Gurdon, en démontrant

que les cellules différenciées peuvent être reprogrammées en cellules pluripotentes, ont valu à ces deux chercheurs de recevoir le prix Nobel de physiologie et médecine en 2012.

### *1. Reprogrammation de l'identité cellulaire. Introduction historique*

Le premier cours a repris l'histoire du clonage et de la reprogrammation – en débutant par la théorie du plasma germinatif proposée à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle par les biologistes allemands August Weismann et Wilhelm Roux. En substance, ces chercheurs postulent que les cellules germinales qui assurent la transmission des caractères de l'espèce doivent posséder la totalité de l'information contenue dans le noyau de l'œuf fécondé. En revanche, cette information serait perdue pendant la différenciation des cellules somatiques. Cette théorie du développement embryonnaire impliquait donc une discontinuité entre soma et lignée germinale et s'opposait ainsi à la théorie de Jean-Baptiste Lamarck de la transmission des caractères acquis. Les expériences de clonage par transfert nucléaire dans les années 1950 et 1960 ont cependant démontré que la différenciation des cellules somatiques est un processus réversible, puisqu'un animal entier pouvait être obtenu à partir d'un noyau issu d'une cellule somatique. En d'autres termes, ces travaux ont établi que la différenciation résulte de l'expression différentielle des gènes plutôt que de leur élimination au cours des divisions cellulaires successives. Le cours a rappelé que, bien entendu, les exemples de clonage naturel abondent dans le règne végétal, notamment pour la vigne. Nous avons décrit ensuite les multiples tentatives de clonage chez différentes espèces de mammifères, ainsi que les applications potentielles et les limitations éthiques chez l'homme. L'accent a été mis sur la découverte et la manipulation des cellules souches embryonnaires chez la souris, qui ont ouvert la voie à l'obtention des premières cellules souches pluripotentes induites à partir des cellules somatiques.

### *2. Étapes de la reprogrammation au cours du développement chez les mammifères*

Le deuxième cours s'est focalisé sur les mécanismes en jeu lors de la reprogrammation naturelle au cours du développement précoce et dans la lignée germinale. Les études chez la souris ont montré une forte dynamique des marques épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN et la modification des histones. Ainsi, pour un même génome dans toutes les cellules ou presque, il existe une multitude d'épigénomes, chacun caractéristique d'un type cellulaire précis et composé de marques épigénétiques permettant le cas échéant la mémorisation des états transcriptionnels des gènes au travers des divisions des cellules. Pour ne prendre qu'un exemple, après fécondation de l'œuf, celui-ci se divise et très vite certaines cellules de l'embryon migrent jusqu'à la crête génitale où elles deviendront des cellules germinales. Nous savons maintenant que cette différenciation s'accompagne, tant dans les lignées germinales mâles que femelles, d'une reprogrammation intense de l'épigénome, qui se caractérise par l'effacement de marques épigénétiques à l'échelle du génome entier et l'acquisition de nouvelles marques associées à la totipotence/pluripotence des cellules. Nous avons retracé dans le détail la dynamique de ces changements épigénétiques, en discutant les mécanismes moléculaires impliqués dans chaque cas. Nous avons également

souligné que les percées récentes dans le domaine ont été obtenues grâce aux outils génétiques et à la possibilité d'explorer l'expression des gènes et les phénotypes associés à l'échelle de la cellule unique.

### *3. Reprogrammation expérimentale : les cellules pluripotentes induites*

Le troisième cours a porté sur les cellules pluripotentes induites (iPS). Les expériences de Shinya Yamanaka ayant conduit à l'obtention de cellules iPS ont été décrites en détail, ainsi que les implications expérimentales et éthiques de l'utilisation de ces cellules, avec un accent mis sur leur potentiel pour l'étude des processus de différenciation et/ou comme outil clinique/thérapeutique. Une grande partie du cours a été consacrée à la notion de « pluripotence » et aux moyens de définir cet état dans les cellules ES et iPS. Pour les cellules ES et iPS murines, la pluripotence est définie par leur capacité, lorsqu'elles sont injectées dans un blastocyste, à développer un embryon chimérique. Chez l'homme, pour des raisons éthiques, les mêmes démonstrations sont impossibles et le critère de pluripotence retenu est la capacité des ES et iPS à induire la formation de tératomes (dérivés des trois tissus embryonnaires) lorsqu'elles sont injectées sous la peau de souris immunodéficientes. Shinya Yamanaka et ses collègues ont montré que l'état de pluripotence dépend de l'expression de différents facteurs de transcription (OCT4, SOX2, NANOG, SALL4...), ainsi que d'une conformation particulière de la chromatine. Néanmoins, le processus de reprogrammation reste loin d'être compris et les bases génétiques et épigénétiques sont l'objet d'actives recherches, discutées lors du quatrième cours. La différenciation des cellules iPS vers différents lignages à l'aide de facteurs spécifiques est maintenant aussi possible, et ceci de manière de plus en plus contrôlée. Les perspectives thérapeutiques semblent donc relativement proches, même si plusieurs problèmes persistent, que nous avons décrits dans le cinquième cours.

### *4. Mécanismes moléculaires au cours de la reprogrammation*

Le quatrième cours s'est penché sur les différents processus de reprogrammation (y compris le transfert nucléaire, l'expression de facteurs de transcription OKSM, les fusions entre cellules somatiques et cellules ES) ainsi que sur les études récentes permettant la définition des étapes impliquées dans chacun de ces processus. Les données génétiques et biochimiques obtenues suggèrent que l'épigénétique agit comme une barrière à la reprogrammation. De fait, il semble que la chromatine agisse comme un frein aux changements forcés de l'expression génétique. Les mécanismes moléculaires, comme la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et d'autres facteurs épigénétiques ont été discutés dans le contexte de la reprogrammation développementale et induite. Des mécanismes différents émergent : il semble que les variants d'histones jouent un rôle important dans la reprogrammation par transfert nucléaire alors que la reprogrammation naturelle dans la lignée germinale requiert une perte de la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me2), marque épigénétique classiquement associée à l'hétérochromatine. La dynamique de la méthylation de l'ADN a été aussi discutée lors du séminaire du professeur Wolf Reik. À la fin de ce cours, le rôle des facteurs de transcription dans la reprogrammation a été réévalué à partir des données récentes indiquant que des cellules peuvent être « trans-différenciées » (i.e. passer d'un destin cellulaire à un autre, par simple expression forcée d'un ou de plusieurs facteurs de transcription appropriés).

### 5. Utilisations des cellules iPS comme outils thérapeutiques et comme modèles en pathologie

Le cinquième cours a porté sur l'application des cellules iPS comme outil thérapeutique et comme modèle en pathologie. Une première considération concerne les dangers éventuels de ces cellules en clinique. Même si les cellules iPS évitent les inconvénients techniques et éthiques du clonage, l'utilisation de vecteurs d'origine rétrovirale pour introduire les facteurs de transcription OKSM a été associée à des risques d'insertion aléatoire dans le génome. Différentes stratégies d'introduction, ou même d'induction chimique de l'expression des facteurs de transcription, ont été discutées. Par ailleurs, l'utilisation d'un oncogène potentiel – MYC – dans le cocktail original de Yamanaka a été remplacée par celle d'autres facteurs, réduisant ainsi considérablement les risques d'oncogenèse. Néanmoins, l'inefficacité de la procédure de production de cellules iPS ainsi que les difficultés persistantes dans la différenciation de ces cellules vers des voies spécifiques rendent les perspectives thérapeutiques chez l'homme incertaines. À l'inverse, l'utilisation des cellules iPS pour l'exploration des maladies cardiaques, hémato-poïétiques, neurodégénératives ou autres, est en pleine explosion, avec beaucoup d'espoir pour une meilleure compréhension des bases moléculaires de certains désordres et des perspectives de traitement. En effet, la dérivation des cellules iPS de patients ou d'individus en bonne santé permet le criblage de drogues de manière « personnalisée » et représente un domaine en plein essor. Ce dernier cours s'est conclu sur une discussion concernant l'utilisation des cellules souches adultes ou des cellules *trans*-différenciées pour des fins thérapeutiques, avec comme exemple les traitements en développement utilisant des cellules trans-différenciées créées *in situ*, suite à un infarctus.

### Séminaires : Reprogrammations développementales, induites et pathologiques

Le séminaire s'est tenu sous la forme de trois conférences en lien avec les cours, ainsi que d'un colloque avec 8 orateurs organisé le lundi, 26 mai 2014 sur la thématique « Reprogrammations développementales, induites et pathologiques » (*Reprogramming in development and disease*).

#### Trois conférences d'actualité en lien avec les cours

Sir John Gurdon (Gurdon Institute, Cambridge, Royaume-Uni), le vendredi 14 mars à 17h30 : « From somatic cell nuclear transfer to cell replacement prospects ».

Pr Wolf Reik (Babraham Institute, Royaume-Uni), le lundi 17 mars à 17h30 : « The Role of DNA Modifications in Epigenetic Reprogramming and Signaling ».

Dr Claire Rougeulle (Institut d'Épigénétique et Destin cellulaire, Paris VII), lundi 24 mars à 17h30 : « Inactivation du chromosome X, pluripotence et reprogrammation, de la souris à l'homme ».

#### Colloque: *Reprogramming in development and disease*

Pr Nicole Le Douarin, Collège de France, Paris : « From the emergence of the Stem Cell concept to reprogramming of adult differentiated cells ».

Pr Helen Blau, Stanford University, California, États-Unis : « Reprogramming cell fate ».

Dr Jacob Hanna, Weizmann Institute of Science, Israel : « The epigenetic 'in'stability of the pluripotent and somatic cell states ».

Pr Azim Surani, Gurdon Institute, University of Cambridge, Royaume Uni : « Germline – Specification and epigenetic programming for totipotency and development ».

Dr Nathalie Beaujean, INRA, Jouy-en-Josas, France : « Epigenetic reprogramming and pericentric heterochromatin remodeling after nuclear transfer as a marker of developmental potential? ».

Pr Rob Martienssen, CSHL, New York, États-Unis : « Germline reprogramming in plants through histone variants and small RNA ».

Pr Rick Livesey, Gurdon Institute, University of Cambridge, Royaume Uni : « Human stem cell models of brain development, evolution and disease ».

Pr John Harris, Institute for Science, Ethics and Innovation, School of Law, University of Manchester, Royaume-Uni : « Multiplex Parenting: IVG and the generations to come ».

## Enseignement à l'étranger

Université de Bonn (chaire Ernst Robert Curtius), dans le cadre du cycle de cours « L'art reflété par la maladie – la maladie reflétée par l'art » : deux conférences en forme de « dialogue » avec le professeur Carlo Ossola, sur « La reprogrammation : biologique et sociale », le 28 mai 2014, à la faculté de médecine de l'université de Bonn.

## PUBLICATIONS 2013-2014

### Articles originaux

GIORGETTI L., GALUPA R., NORA E.P., PILOT T., LAM F., DEKKER J., TIANA G. et HEARD E., « Predictive polymer modeling reveals coupled fluctuations in chromosome conformation and transcription », *Cell*, 157(4), 2014, 950-963, DOI : 10.1016/j.cell.2014.03.025.

GENDREL A.-V., ATTIA M., CHEN C.-J., DIABANGOUAYA P., SERVANT N., BARILLOT E. et HEARD E., « The developmental dynamics and disease potential of random monoallelic gene expression », *Developmental Cell*, 28(4), 2014, 366-380, DOI : 10.1016/j.devcel.2014.01.016.

DA ROCHA S.T., BOEVA V., ESCAMILLA-DEL-ARENAL M., ANCELIN K., GRANIER C., MATIAS N.R., SANULLI S., CHOW J., SCHULZ E., PICARD C., KANEKO S., HELIN K., REINBERG D., STEWART A.F., WUTZ A., MARGUERON R. et HEARD E., « Jarid2 Is Implicated in the Initial Xist-Induced Targeting of PRC2 to the Inactive X Chromosome », *Molecular Cell*, 53(2), 2014, 301-316, DOI : 10.1016/j.molcel.2014.01.002.

SCHULZ E.G., MEISIG J., NAKAMURA T., OKAMOTO I., SIEBER A., PICARD C., BORENSZTEIN M., SAITOU M., BLÜTHGEN N. et HEARD E., « The two active X chromosomes in female ESCs block exit from the pluripotent state by modulating the ESC signaling network », *Cell Stem Cell*, 14(2), 2014, 203-216, DOI : 10.1016/j.stem.2013.11.022.

## Revue, commentaires

CHALIGNÉ R. et HEARD E., « X-chromosome inactivation in development and cancer », *FEBS letters*, 588(15), 2014, 2514-2522, DOI : 10.1016/j.febslet.2014.06.023.

GENDREL A.-V. et HEARD E., « Noncoding RNAs and epigenetic mechanisms during X-chromosome inactivation », *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 2014, 561-580, DOI : 10.1146/annurev-cellbio-101512-122415.

HEARD E. et MARTIENSSEN R.A., « Trans-generational epigenetic inheritance: myths and mechanisms », *Cell*, 157(1), 2014, 95-109, DOI : 10.1016/j.cell.2014.02.045.

## AUTRES ACTIVITÉS

### Principales conférences sur invitation

#### Séminaires

BIOGEN Idec, Boston, États-Unis, 8/9/2014.

Oxford University, Royaume-Uni, 4/2/2014, invitée par le Pr Doug Higgs.

Max Planck Institute, Freiberg, Allemagne, 27/2/2014, – invitée par le Pr Asifa Akhtar

Max Planck Institute, Munich, Allemagne, 28/2/2014, invitée par le Pr Jurg Mueller.

« TOTAL », Pau, France, 14/1/2014.

Harvey Lecture, Rockefeller University, New York, États-Unis., 21/11/2013.

#### Colloques / symposia

FEBS-EMBO Meeting, septembre 2014, Paris, France.

Cold Spring Harbor « Chromatin and Epigenetics » meeting, CSH, New York, États-Unis, (présentation plénière).

Keystone meeting « Chromatin and Epigenetics », mars 2014, Oberstdorf, Allemagne.

Keystone meeting « Long Non coding RNAs », février 2014, Santa Fe, New Mexico (États-Unis.) (organisatrice et oratrice).

Wellcome Trust Meeting « Chromatin: From nucleosomes to chromosomes », mai 2014, Hinxton, Royaume-Uni.

« Epigenesis » Annual Meeting, décembre, 2013, Babraham, Royaume-Uni.

EMBO Conference « Nuclear Structure and Dynamics », octobre, 2013, Isle-sur-la-Sorgue.

Institut A. Bonniot colloque organisé par des étudiants : « Decoding ncRNA function », octobre, 2013, Grenoble.

## PARTICIPATION AUX PROGRAMMES NATIONAUX ET INTERNATIONAUX

Coordination d'un Laboratoire d'excellence « DEEP » (Développement, épigénèse, épigénétique et potentiel), conçu dans le cadre des « Investissements d'avenir » au sein de PSL (depuis 2012).

Membre du réseau européen « Epigenesis » (2010- 2015).

Partenaire du projet européen intégré FP7 « Syboss » (2010-2015).

- Partenaire du projet européen intégré FP7 « MODHEP » (2010-2015).
- Partenaire du projet international « Epigenetics » BIOGEN Idec (2014-2017).
- Membre du Conseil stratégique de la recherche (CSR), depuis décembre 2013.
- Membre de la Comité de la recherche de la FRM (Fondation pour la recherche médicale) (2012- ).
- Conseil scientifique de l'Institut de génétique humaine (Montpellier, France) (2011- ).
- Membre du « EMBO Membership Committee » (2013- ).
- Membre du Conseil scientifique de la Fondation Bettencourt-Schueller (2014- ).
- Membre du « Section Committee 7 of the Royal Society » (2013- ).

## ACTIVITÉS DE RECHERCHE

### **1. Direction de l'unité de Génétique et biologie du développement à l'Institut Curie (INSERM U 934, CNRS UMR 3215)**

Depuis 2010, je dirige l'unité de Génétique et biologie du développement à l'Institut Curie, composé de neuf équipes, dont la mienne. L'ambition de cette unité repose sur un concept simple, mais fondamental : mieux connaître les processus qui régissent le développement normal pour identifier l'origine des désordres pathologiques. Au cours du développement, les cellules doivent en permanence tenir compte de repères moléculaires et physiques, qui leur permettent de percevoir leur environnement, d'interagir ou de se synchroniser avec d'autres cellules, de proliférer, de prendre la décision de maintenir un état de pluripotence ou de s'engager vers la différenciation et d'acquérir une spécialisation à l'origine de fonctions tissulaires complexes. La transformation cancéreuse peut résulter de perturbations à chacun de ces niveaux, et induire un programme spatio-temporel aberrant de différenciation, de prolifération, et de maintenance de l'identité cellulaire. Les interactions au sein de l'Institut Curie assurent la continuité entre une recherche fondamentale et une recherche appliquée visant à l'amélioration du diagnostic des pathologies tumorales et au développement de traitements anti-cancéreux innovants.

L'unité de Génétique et Biologie du développement fournit une trame multithématique et multidisciplinaire unique pour l'étude des événements qui affectent l'identité cellulaire dans un contexte développemental. À partir d'organismes modèles tels que la drosophile, la souris et le poisson zèbre, les chercheurs de notre unité étudient les mécanismes fondamentaux du développement, depuis la formation des cellules souches germinales, à la différenciation et la morphogenèse de l'embryon, jusqu'à l'acquisition de fonctions complexes. L'année 2013-2014 a été marquée par plusieurs découvertes et publications dans les domaines de l'épigénétique et de la biologie du développement, ainsi que l'attribution de deux ERC (équipes de D. Bourchis et Y. Bellaïche). Parmi les neuf équipes, six sont actuellement porteuses d'un ERC (<http://ugbdd.curie.fr/fr/article/00186-les-travaux-des-%C3%A9quipes-de-recherche-pr%C3%A9sentation>).

Depuis 2012, notre unité, ainsi que l'UMR 3664 de l'Institut Curie, bénéficie d'une labélisation « LABEX ». Financé pour 8 ans dans le cadre des « Investissements d'avenir », ce Labex relève de nouveaux défis scientifiques dont l'impact est important tant sur le plan cognitif que pour les applications potentielles en santé humaine. Le projet DEEP (Développement, épigénèse, épigénétique et potentiel) est

réalisé dans le contexte de l'Idex PSL (Initiative d'excellence, « Paris Sciences et Lettres »), permettant des liens forts avec d'autres instituts, en particulier le Collège de France. Les activités fédératrices, scientifiques, et d'enseignement de ce LABEX en 2013-2014 sont décrites sur le site web : (<http://www.labex-deep.fr/>).

## **2. Direction de l'équipe « Épigenèse et développement chez les mammifères »**

J'anime une équipe de recherche au sein de l'unité de Génétique et biologie du développement à l'Institut Curie. Notre but est de comprendre comment, au cours du développement et de la différenciation cellulaire, l'acquisition de caractéristiques cellulaires spécialisées est assurée non pas par un changement de la nature et de la séquence des gènes, mais par la manière dont ces gènes sont exprimés. Le développement embryonnaire précoce des mammifères femelles s'accompagne de l'inactivation transcriptionnelle de l'un de leurs deux chromosomes X, achevant ainsi la compensation de dose vis-à-vis des mâles XY. Ce processus, connu sous le nom d'« inactivation du chromosome X », représente un paradigme de l'épigenèse développementale. En étudiant le contrôle de l'inactivation du chromosome X, nous développons des méthodes et des techniques permettant la compréhension de mécanismes fondamentaux qui sous-tendent la régulation de l'expression des gènes, au cours du développement et de la différenciation cellulaire, mais aussi lors de la tumorigenèse.

L'inactivation du chromosome X est un modèle de choix pour décrypter les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la prise de décisions développementales, ainsi que pour assurer leur maintien. Notre recherche est organisée autour de quatre axes principaux de recherche :

1. Quels sont les mécanismes contrôlant l'initiation de l'inactivation du chromosome X ?
2. Comment la répression transcriptionnelle du chromosome X est-elle établie ?
3. Comment l'état inactif est-il fidèlement transmis au cours des générations cellulaires ?
4. Comment le développement tumoral affecte-t-il le maintien de l'état inactif du chromosome X ?

### *Résumé des découvertes récentes de l'équipe*

(Pour plus d'informations, consulter le site web de l'équipe [http://ugbdd.curie.fr/fr/equipe\\_heard](http://ugbdd.curie.fr/fr/equipe_heard).)

1. Développement d'un modèle physique permettant une meilleure compréhension des fluctuations structurelles de la chromatine, qui pourraient expliquer la dynamique transcriptionnelle des gènes impliqués dans la mise en place de l'inactivation du chromosome X. Giorgetti *et al.*, *Cell*, 2014.

2. Découverte de plusieurs gènes exprimés de manière monoallélique au cours du développement chez la souris et impliqués dans des maladies autosomiques dominantes chez l'homme. Gendrel *et al.*, *Developmental Cell*, 2014.

3. Identification de la protéine Jarid2 comme facteur principal dans le recrutement du complexe polycomb PRC2 à la chromatine via l'ARN Xist. Rocha *et al.*, *Mol. Cell*, 2014.

4. Découverte que la présence de deux chromosomes X actifs empêche la différenciation des cellules souches embryonnaire, *via* la modulation des voies de la signalisation. Schulz *et al.*, *Cell Stem Cell*, 14.

*Faits illustrant le rayonnement ou l'attractivité académiques de l'équipe*

1. Porteuse d'un ERC « Advanced Investigator Award » (2010-2015).
2. Labellisation « La Ligue contre le cancer » (2012).
3. Participation à trois projets européens (SYBOSS, MODHEP, Epigenesys) et un projet NIH actuellement (2010-2015).
4. Fellow of the Royal Society (2013) et membre de l'EMBO (depuis 2005).
5. Prix de la Fondation Allianz Institut de France (2013).

*Principales contributions de l'équipe à des actions de formation*

1. Comité scientifique de plusieurs cours internationaux (Masters/PhD) à l'Institut Curie (cours Épигénétique, génome non-codant, biologie du développement et autres).
2. Enseignement à différents cours M2/PhD à l'Institut Curie, l'Institut Pasteur, ENS et autres (environ 9 cours/an).
3. Accueil de stagiaires (collégiens, lycéens, etc.), par exemple « Opération apprentis chercheurs » au sein de l'équipe.

