



La linaria commune peut développer des épi-allèles spontanés. Elle participe ainsi à la démonstration d'une épigénétique transgénérationnelle.

La génétique au-delà de la séquence de l'ADN

L'épigénétique transgénérationnelle s'intéresse aux variations héritables de caractères qui ne sont associées à aucun changement de la séquence d'ADN. Cette autre forme d'hérédité commence à être bien documentée chez les plantes. Si le phénomène est désormais démontré, son importance reste méconnue. Jusqu'à quel point les différences génétiques entre individus sont à chercher ailleurs que dans la séquence du génome ?

© BOL/TH FOTO/BSIP

Les auteurs

Victoire Baillet
et Vincent Colot

École normale supérieure,
Institut de biologie (IBENS),
CNRS UMR8197, INSERM U1024,
Paris

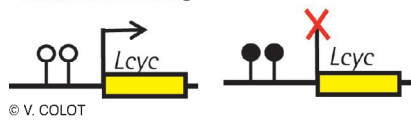
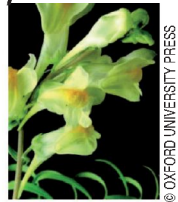
Le terme « épigénétique » a été proposé dans les années 1940 par l'embryologiste et généticien Conrad Waddington pour décrire l'étude des mécanismes par lesquels les gènes gouvernent le développement des organismes (1). Or, nous savons aujourd'hui que chez les eucaryotes, la chromatine, en modulant l'accessibilité de l'ADN – *via* notamment la modification de certains acides aminés des histones, l'incorporation de formes variantes de ces protéines, la méthylation des cytosines de l'ADN ou encore la production d'ARN non codants – joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes. Aussi l'épigénétique tend-elle à désigner de plus en plus souvent tout ce qui touche à la chromatine (1). Cependant, il existe une autre définition de l'épigénétique, proposée par Robin Holliday dans les années 1980 et qui nous concerne ici. Elle caractérise les changements d'expression des gènes

transmissibles au travers des divisions cellulaires, mitotiques voire méiotiques, en l'absence de tout changement de la séquence de l'ADN (1). Cette transmission épigénétique repose, dans la plupart des cas documentés chez les eucaryotes, sur la chromatine, d'où de fréquentes confusions. Elle joue un rôle essentiel dans le développement des organismes, notamment en permettant de perpétuer l'état réprimé des gènes le long de tel ou tel lignage cellulaire en l'absence du répresseur initial. À l'inverse de cette épigénétique intragénérationnelle – rétablie à chaque génération –, l'épigénétique transgénérationnelle et sa possible contribution aux variations héritables de caractères, restent très largement inexplorées. Néanmoins, plusieurs travaux récents, principalement chez les plantes, commencent à percer les mystères, notamment moléculaires, de cette génétique au delà de la séquence de l'ADN.

ÉPIMUTATIONS NATURELLES

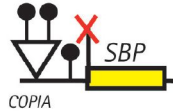
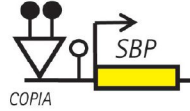
À ce jour, les exemples d'altérations phénotypiques causés par des changements chromatinien héritables sont rares. Ces « épimutations » ont été nommées ainsi par opposition aux mutations de la séquence de l'ADN. Les premières à avoir été caractérisées sont responsables des variants spontanés dits *peloric* chez la linaria commune (*Linaria vulgaris*) (photo ci-dessus) – une herbacée vivace – et *cnr* chez la tomate (figure p. 36) (2,3). Dans le cas du variant *peloric*, la morphologie des fleurs est fortement altérée tandis que c'est le mûrissement du fruit qui est bloqué chez la tomate *cnr*. La génétique mendélienne nous indique qu'un seul locus est en cause à chaque fois. Cependant, aucune mutation de la séquence de l'ADN n'est associée au phénotype mutant. Ces variants résultent plutôt d'une extinction de l'expression du gène présent au locus en lien avec une

peloric



© V. COLOT

cnr



© G. SEMOUR



Peloric et *cnr*, deux exemples d'épimutations naturelles.

Le locus affecté est représenté dans son état sauvage (gauche) et épimutant (droite), sous la photo correspondante, d'après (23).

La méthylation de l'ADN est figurée par des cercles pleins. Un exemple d'instabilité somatique est donné pour *cnr* (droite).

altération stable de la chromatine, sous la forme d'une méthylation de plusieurs cytosines situées au sein ou à proximité du gène affecté. Dès lors, par analogie avec les allèles sauvage et mutant d'un gène, on parle d'épi-allèles, dont la version mutante à l'origine de l'altération phénotypique correspond ici à cette forme méthylée.

Alors que pour *peloric*, l'origine de cette méthylation est inconnue, elle est pour *cnr* probablement à chercher dans l'élément transposable situé en amont du gène *SBP*, qui code un facteur de transcription (4). Cet élément est en effet déjà présent à l'état méthylé dans la forme épi-allélique sauvage, ce qui suggère que l'épi-allèle

mutant résulte d'une propagation accidentelle de la méthylation jusqu'au promoteur du gène (figure ci-dessus) (4). Ce détail a son importance si l'on considère que les génomes de très nombreux eucaryotes – comme ceux de l'homme ou du blé – sont composés pour plus de 50 % de leur séquence d'éléments transposables et de leurs reliques, qui sont le plus souvent méthylés.

Les épimutations *peloric* et *cnr* présentent d'autres caractéristiques notables qui les distinguent des mutations classiques de la séquence de l'ADN, comme une instabilité somatique importante et une expressivité variable. Les fruits de la tomate *cnr* peuvent

ainsi présenter des secteurs clonaux rouges, témoins d'une réversion vers l'épi-allèle sauvage dans une cellule au tout début de la croissance du fruit (figure ci-contre). Ces secteurs s'étendent ensuite au travers des divisions à mesure que la forme « déméthylée » est transmise dans le lignage cellulaire. Quant au variant *peloric* de la linaire, il produit fréquemment sur un même pied toute une gamme de fleurs, dont certaines sont quasiment de type sauvage. Cet assortiment de phénotypes est lié à une méthylation variable au niveau du locus *peloric*, qui module l'expression du gène *Lcyc*, homologue au gène *CYCLOIDEA*, lequel contrôle la symétrie florale chez de nombreuses plantes à fleur. Si ces deux exemples, comme la dizaine d'autres actuellement recensés chez les plantes, donnent un premier aperçu des propriétés des épimutations, ils ne nous renseignent pas sur la contribution de ce type d'altérations à la variation génétique naturelle.

L'APPORT DES POPULATIONS DE LIGNÉES « epiRIL »

Dans la nature, différences nucléotidiques et épigénétiques coexistent, et il devient donc très vite impossible d'établir ce que la variation phénotypique héritable^{*2} doit aux unes et aux autres dès lors que l'on s'écarte du cadre simple d'un déterminisme monogénique (5). Pour tenter de contourner cette difficulté, deux populations expérimentales ont été établies chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, en partant de parents présentant un même génome mais des différences de méthylation de l'ADN aussi nombreuses que possible. L'objectif était double : tester la stabilité transgénérationnelle de ces différences de méthylation et quantifier leur impact en termes de variation phénotypique héritable.

Les deux populations dérivent du croisement entre deux individus identiques en tout point du

Et les mammifères ?

Si l'épigénétique transgénérationnelle associée à la méthylation de l'ADN ne fait plus de doute chez les plantes, son existence chez les mammifères reste controversée, notamment en raison de l'intense reprogrammation du « méthylome^{*1} » dans les lignées germinales mâle et femelle ainsi que dans l'embryon précoce. Néanmoins, à l'exemple des souris porteuses de l'allèle *A^{vy}* (*agouti viable yellow*, ci-contre), quelques exemples d'épimutations ont été décrits (20) et des études effectuées chez cet organisme et le rat suggèrent que l'environnement peut induire des variants de méthylation de l'ADN

transmissibles au travers des générations. La transmission en absence du signal inducteur est cependant rarement analysée et lorsque c'est le cas, les résultats diffèrent d'une étude à l'autre (21, 22). Notons que la mise en évidence d'effets transgénérationnels chez les mammifères est complexifiée par la détermination précoce de la lignée germinale, déjà mise en place chez le fœtus. Dès lors, il est difficile de s'assurer que l'apparente transmission d'un phénotype n'est pas la conséquence d'une exposition directe *in utero*, ou encore influencée par le soin maternel. Si l'emploi de stratégies sophistiquées (transfert de sperme, adoptions croisées) dans les



© S. HARTEN, E. WHITELAW

L'allèle *A^{vy}* correspond à la présence d'une séquence répétée en amont du gène *agouti*. En fonction de l'état de méthylation de cette séquence, la couleur du pelage des souris varie sur un spectre allant du brun (méthylé) au jaune (non méthylé).

modèles murins permet de s'affranchir de tels effets, il n'est pas possible chez l'homme d'aller plus loin que le suivi épidémiologique de cohortes. Aussi, même si la possible existence d'effets épigénétiques transgénérationnels dans des populations humaines est fréquemment évoquée, les multiples facteurs confondants empêchent de le déterminer avec certitude.

*1 Profil de méthylation tout au long du génome.

*2 Variation héritable observée entre individus pour un trait quantitatif et qui dépend donc de différences génétiques. Le poids de cette influence génétique – distincte de l'influence de l'environnement, qui dicte également la variation observée – est mesuré par l'héritabilité.

génomique sauf à un *locus*, où l'un des deux individus porte un allèle mutant pour un gène codant un acteur de la méthylation de l'ADN. Dans un cas, il s'agit du gène *MET1* (6), qui code la principale méthyltransférase de maintenance d'*A. thaliana* et dans l'autre cas, du gène *DDM1*, qui code un facteur de remodelage de la chromatine ciblant préférentiellement les séquences répétées (7) (figure ci-dessous). Les deux croisements ont donc produit des individus F1 hétérozygotes pour la mutation et également hétérozygotes pour les différences de méthylation de l'ADN induites dans le parent mutant – si bien sûr ces différences sont transmissibles. Dans la descendance (F2), obtenue soit par autofécondation*3 dans une expérience (6), soit par croisement d'un individu F1 avec son parent sauvage dans l'autre (7), seules les plantes ayant perdu l'allèle mutant ont été sélectionnées. Ces individus de génotype sauvage ont été propagés par autofécondation sur six générations pour obtenir *in fine* une population de lignées appelées « *epigenetic recombinant inbred lines* » (epiRIL) (figure ci-dessous).

Ces lignées permettent donc d'analyser la transmission des différences de méthylation de l'ADN induites dans le parent mutant de départ en l'absence de la mutation inductrice. Il a ainsi pu être établi qu'en dépit de l'existence d'un mécanisme de restauration de la méthylation de l'ADN par un processus d'interférence ARN (8), plusieurs centaines d'épi-allèles induits par les mutations *met1* ou *ddm1* sont hérités de manière stable sur au moins huit générations. En d'autres termes, ces deux populations expérimentales d'epiRIL démontrent l'existence d'un fort potentiel d'épimutation à l'échelle du génome (6,7). Par ailleurs, des analyses phénotypiques poussées, réalisées sur la population dérivée du croisement avec le mutant *ddm1*, ont mis en évidence une variation phénotypique héritable pour de nombreux traits complexes, comme la longueur de la racine ou le temps de floraison (7,9). Bien

que les conséquences sur le phénotype soient ténues – pas plus de deux à trois jours de différence pour le temps de floraison entre les phénotypes sauvage et *ddm1* –, les valeurs d'héritabilité sont suffisamment fortes pour être compatibles avec une sélection variétale. Dans un dernier temps, grâce à une approche classique de génétique quantitative, plusieurs QTL*4 « épigénétiques » gouvernant ces deux traits ont pu être identifiés, ce qui constitue la première démonstration d'une héritabilité de caractères complexes fondée sur des différences autres que portées par la séquence de l'ADN (10). De façon remarquable, certaines des différences de méthylation présentes dans les intervalles génomiques définissant les QTL – donc potentiellement causatives – sont également retrouvées dans la nature (10). Ceci suggère donc une contribution de l'épigénétique transgénérationnelle à l'architecture génétique des traits complexes en conditions naturelles.

VARIATION ÉPIGÉNÉTIQUE ET ENVIRONNEMENT

Les modalités d'apparition des épimutations dans la nature sont

encore peu connues, mais il est clair que les différents allèles présents à un *locus* donné ne sont pas tous épimutables, c'est-à-dire susceptibles d'héberger ce type de variations. Cette propriété apparaît, en effet, réservée aux allèles associés à des réarrangements entre des régions du génome ou à des séquences répétées (11).

De fait, si des variations spontanées de méthylation affectant une seule cytosine sont fréquemment observées chez *A. thaliana* au niveau de séquences uniques dans le génome, elles sont très instables et n'ont sans doute que peu d'impact sur l'expression des gènes. Les variations affectant un groupe de cytosines sont, quant à elles, majoritairement rencontrées au niveau de séquences répétées. Si ces épimutations apparaissent de façon spontanée beaucoup plus rarement que celles touchant une cytosine isolée, elles sont bien plus stables et leur impact fonctionnel est certainement plus important (12).

Ainsi, il est possible d'imaginer que de très nombreuses variations stables puissent être générées dans la nature de la même manière que dans les epiRIL, suite à une mutation dans un gène contrôlant la méthylation des séquences répétées. Un autre scénario, particulièrement attractif, place l'environnement au cœur de l'émergence des épi-allèles. Bien qu'encore disparates, plusieurs observations vont en effet dans ce sens. Par

*4 Quantitative trait locus ou *locus* à effet quantitatif, c'est-à-dire contribuant à la variation observée entre individus pour un trait quantitatif (comme la taille ou le poids).

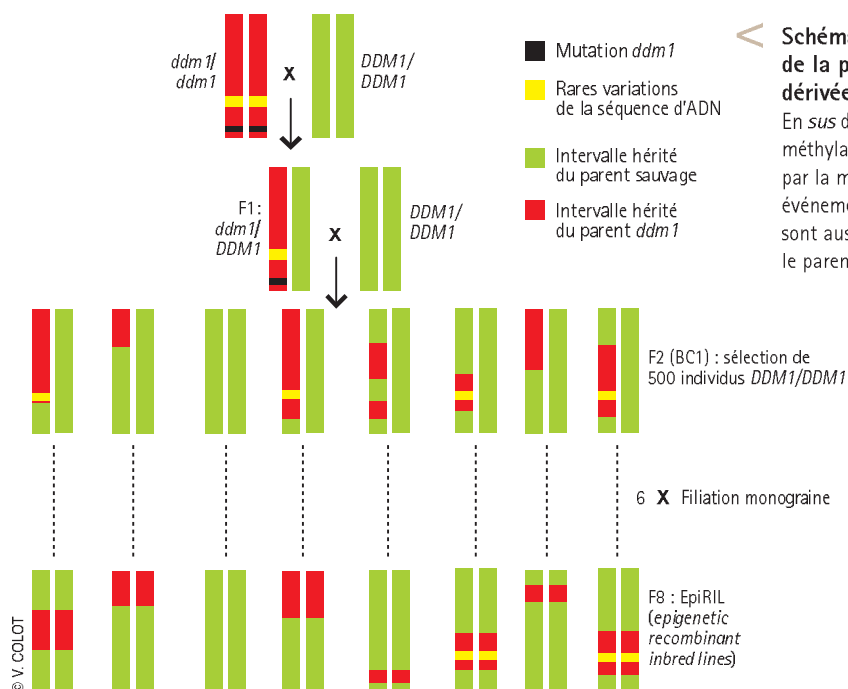


Schéma d'obtention de la population d'epiRIL dérivée de *ddm1*.

En sus des différences de méthylation de l'ADN induites par la mutation *ddm1*, de rares événements de transposition sont aussi observés dans le parent mutant.

*3 Fécondation d'une fleur par du pollen issu de la même plante.

exemple, la machinerie de l'interférence ARN est sensible à la température, avec des conséquences avérées sur la stabilité des complexes formés entre les petits ARN et leur cible. Des changements de méthylation de l'ADN ont par ailleurs été observés en réponse à des stress biotiques⁴⁵ ou abiotiques⁴⁶. Cependant, à l'exception de quelques cas (13), les effets ne perdurent généralement pas à travers les générations successives. Une explication à cet effacement pourrait être apportée par des travaux récents, qui suggèrent que l'action conjointe de la protéine DDM1 et d'un autre facteur de remodelage de la chromatine, MOM1, pourrait limiter la transmission à la descendance de changements induits par le stress (14). Dans tous les cas, la mise en évidence d'une « mémoire épigénétique » à proprement parler doit être formellement démontrée par reséquençage des individus concernés, afin d'exclure l'implication de mutations de la séquence de l'ADN.

QUID DU RÈGNE ANIMAL ?

L'hérédité épigénétique transgénérationnelle n'est certainement pas l'apanage des plantes et n'implique pas nécessairement la méthylation de l'ADN. Des observations démontrant ou suggérant une mémoire épigénétique transgénérationnelle ont en effet été faites dans le monde animal, non seulement chez les mammifères (encadré p. 36), mais aussi chez des organismes dépourvus de méthylation de l'ADN, comme la drosophile ou le nématode (15). Il s'agit généralement de la transmission de phénotypes particuliers en réponse à un stimulus environnemental, notamment nutritionnel, perçu dans les générations précédentes, mais sans que les bases moléculaires de cette mémoire soient identifiées.

Néanmoins, il a pu être montré chez le nématode qu'une carence nutritionnelle sévère conduit en troisième génération à un

accroissement de la longévité. Ce phénotype est associé à la transmission de petits ARN non codants générés en réponse à cette carence, qui sont légués sur au moins trois générations et ciblent notamment des gènes associés au stockage des nutriments (16). Le lien de causalité avec la longévité accrue reste encore à établir, comme l'implication de modifications chromatiniques dans la transmission de ce phénotype, implication suggérée par d'autres études chez cet organisme montrant un rôle de la chromatine dans la mémoire épigénétique à travers les générations (17). Chez la drosophile cette fois, des effets transgénérationnels en lien direct avec des altérations de la chromatine ont été décrits en réponse à un choc thermique ou osmotique (17). Cependant, ces changements n'ont été étudiés qu'au niveau d'un transgène rapporteur. Il reste donc à déterminer jusqu'à quel point des gènes endogènes répondent de façon similaire, et avec quelles conséquences phénotypiques pour l'organisme.

PERSPECTIVES

Longtemps vue au mieux comme une bizarrerie, l'épigénétique transgénérationnelle est dorénavant acceptée comme une source possible de variations phénotypiques héréditaires, chez les plantes certainement, mais aussi dans le règne animal. Le développement des technologies de ciblage de régions précises du génome, notamment fondées sur le système d'édition moléculaire CRISPR-Cas9, devraient permettre très bientôt d'apposer ou d'effacer localement n'importe quelle modification de la chromatine et aider ainsi grandement au décryptage des mécanismes fins de cet héritage si particulier. Néanmoins, nous sommes toujours loin de comprendre, notamment, comment des changements de l'environnement peuvent se traduire par des modifications stables de la chromatine, transmises de génération en génération.

Si une telle forme d'hérédité, fondée sur des différences autres que celles de la séquence de l'ADN, peut suivre les lois de Mendel,

ce n'est pas toujours la règle et il arrive qu'elle s'en écarte considérablement (18). De plus, comparées aux mutations, les épimutations ont souvent une stabilité moindre et une sensibilité plus grande à l'environnement, ce qui suggère que les variations épigénétiques ne peuvent persister indéfiniment en absence de sélection. Soulignons à ce sujet que si le variant *peloric* a été initialement décrit, il y a plus de 250 ans, par le célèbre naturaliste suédois Carl von Linné, sa faible fertilité rend improbable l'hypothèse qu'il soit à l'origine des individus caractérisés moléculairement. En fait, nous n'avons pas de preuve certaine que le variant de Linné ait été causé par un événement épimutationnel, et il est donc impossible de conclure à la grande stabilité transgénérationnelle de cette épimutation. Les données obtenues sur les *epiRIL* confortent d'ailleurs l'idée d'une génétique se déroulant tout au plus sur quelques centaines ou milliers de générations. Pour autant, cette « hérédité transitoire » ne doit pas être négligée, puisque les épimutations – au même titre que les mutations – peuvent donner prise à la sélection, tant artificielle que naturelle (19). De plus, par sa sensibilité à l'environnement, l'épigénétique transgénérationnelle pourrait fournir la première étape du processus d'assimilation génétique décrit par Conrad Waddington, par lequel des changements phénotypiques accidentels, apparus en réponse à des agressions environnementales et sélectionnés sur plusieurs générations, finissent par être hérités en l'absence du signal inducteur. Par ailleurs, s'agissant de caractères complexes, la question du positionnement de l'hérédité épigénétique par rapport à l'« hérédité manquante » est incontournable. Même si la contribution des épimutations à la variation génétique naturelle reste à déterminer au cas par cas, nous pouvons déjà avancer que l'épigénétique transgénérationnelle est assurément l'une des composantes de cette énigmatique part de la variation héréditable que le généticien ne parvient pas à expliquer sur la base des seuls polymorphismes de la séquence d'ADN. ■

- (1) Bird A (2007) *Nature* 447, 396-8
- (2) Cubas P et al. (1999) *Nature* 401, 157-61
- (3) Manning K et al. (2006) *Nat Genet* 38, 948-52
- (4) Weigel D, Colot V (2012) *Genome Biol* 13, 249
- (5) Johannes F et al. (2008) *Nat Rev Genet* 9, 883-90
- (6) Reinders J et al. (2009) *Genes Dev* 23, 939-50
- (7) Johannes F et al. (2009) *PLoS Genet* 5, e1000530
- (8) Teixeira FK et al. (2009) *Science* 323, 1600-4
- (9) Roux F et al. (2011) *Genetics* 177, 1015-7
- (10) Cortijo S et al. (2014) *Science* 343, 1145-8
- (11) Pecinka A et al. (2013) *Trends Plant Sci* 18, 625-32
- (12) Niederhuth CE, Schmitz RJ (2014) *Mol Plant* 3, 472-80
- (13) Luna E et al. (2012) *Plant Physiol* 158, 844-53
- (14) Iwasaki M, Paszkowski J (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 8547-52
- (15) Lim JP, Brunet A (2013) *Trends Genet* 29, 176-86
- (16) Rechavi O et al. (2014) *Cell* 158, 277-87
- (17) Choi Y, Mango SE (2014) *Biochim Biophys Acta* doi:10.1016/j.bbaggm.2014.05.011
- (18) Heard E, Martienssen RA (2014) *Cell* 157, 95-109
- (19) Herman JJ et al. (2014) *Evolution* 68, 632-43
- (20) Daxinger L, Whitelaw E (2012) *Nat Rev Genet* 13, 153-62
- (21) Radford EJ et al. (2014) *Science* 343, 1255903
- (22) Dias BG, Ressler KJ (2014) *Nat Neurosci* 17, 89-96
- (23) Grant-Downton RT, Dickinson HG (2006) *Ann Bot* 97, 11-27

⁴⁵ Stress provoqué par un organisme vivant (attaque par un pathogène).

⁴⁶ Stress provoqué par des conditions environnementales : forte température, sécheresse, froid.