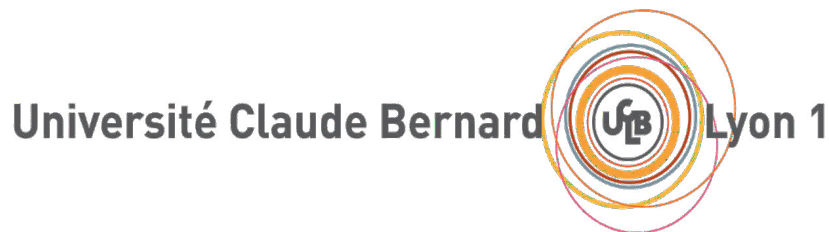


Les cellules souches pluripotentes et l'Épigénétique

Marielle Afanassieff



INSERM U846

Stem cell and Brain Research Institute

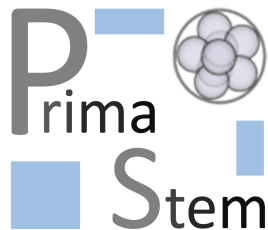
from life to intelligence



bwbw1079 www.fotosearch.com

Projet transversal:

Création d'un modèle de thérapie cellulaire chez le singe parkinsonien



Cellules souches pluripotentes:
Souris, Lapin, Singe, Homme et Poulet



Plan de l'exposé

1. Cellules souches pluripotentes

- ✓ *Définition et propriétés des cellules souches pluripotentes:*
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez la souris*
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez les animaux d'élevage*
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez l'Homme*

2. Epigénétique

- ✓ *Définition*
- ✓ *Organisation de la chromatine*
- ✓ *Méthylation de l'ADN*
- ✓ *Les gènes soumis à empreinte*
- ✓ *Mise en place de l'empreinte parentale*
- ✓ *Recherche des modifications épigénétique dans le projet transversal*

Les cellules souches pluripotentes

- ✓ *Définition et propriétés des cellules souches pluripotentes:*

 - Autorenouvellement, Pluripotence et Tumorigénèse*

 - Reprogrammation et Transdifférenciation*

- ✓ *Intérêts de ces cellules chez la souris:*

 - Techniques de Transgénèse*

 - Différents types de cellules souches pluripotentes*

- ✓ *Intérêts de ces cellules chez les animaux d'élevage:*

 - Techniques de dérivation des cellules ES et iPS*

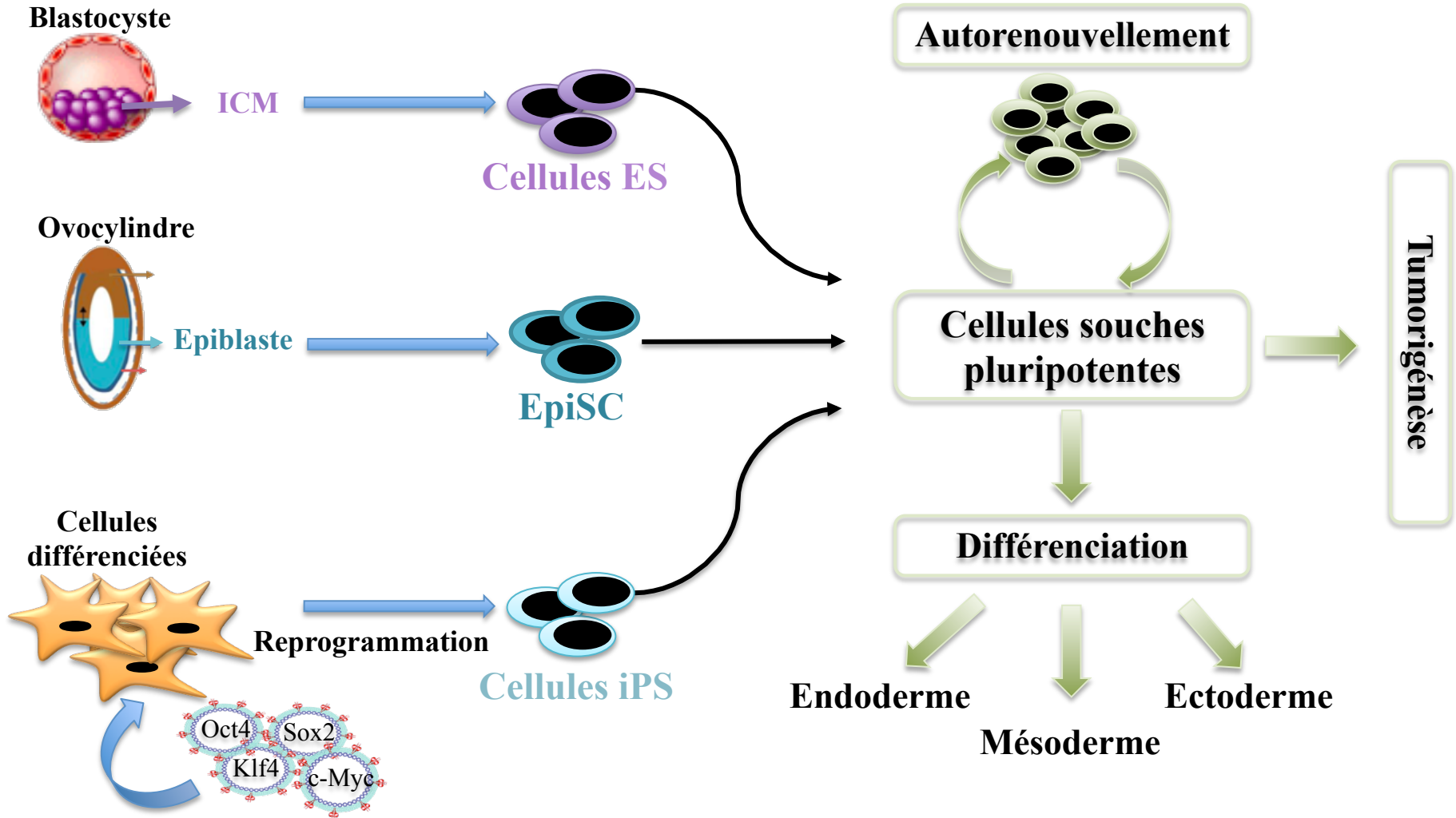
 - Les différents états de pluripotence*

- ✓ *Intérêts de ces cellules chez l'Homme:*

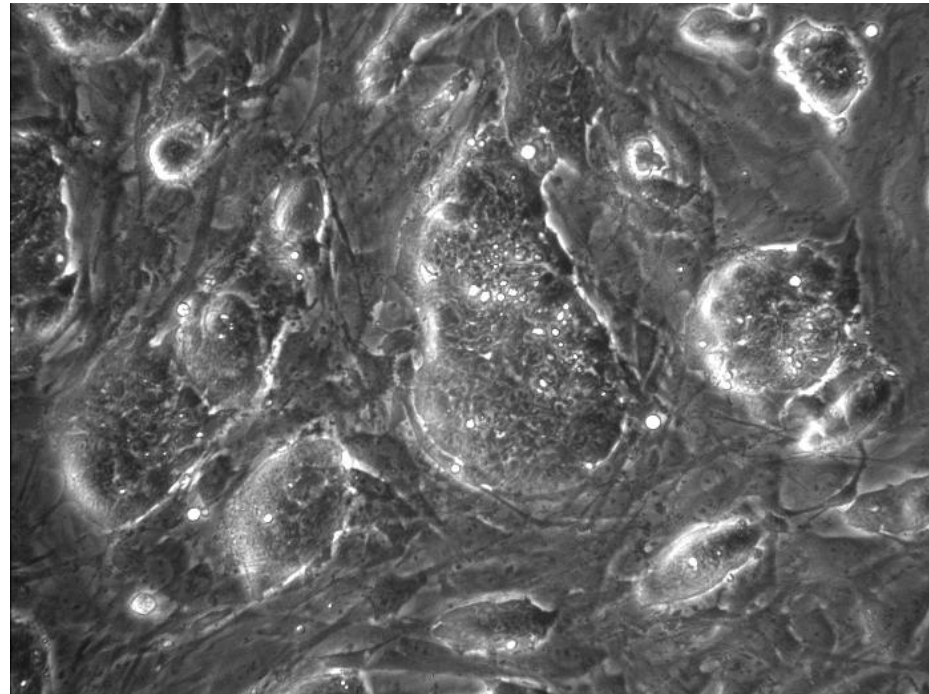
 - Thérapie par remplacement cellulaire*

 - Clonage thérapeutique*

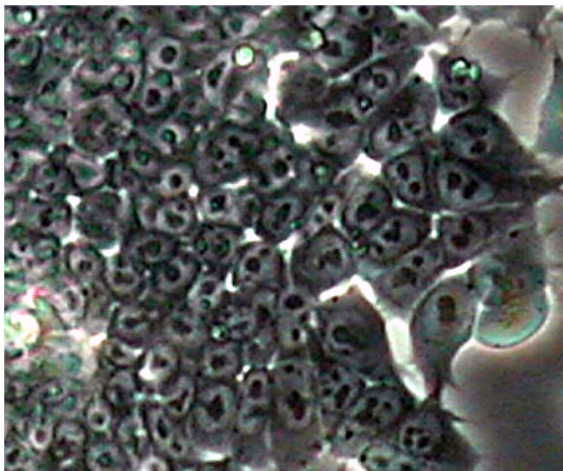
Origine et propriétés des cellules souches pluripotentes



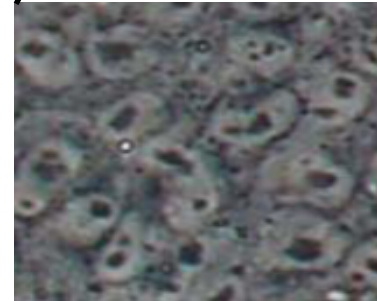
Morphologie des cellules souches pluripotentes



Souris



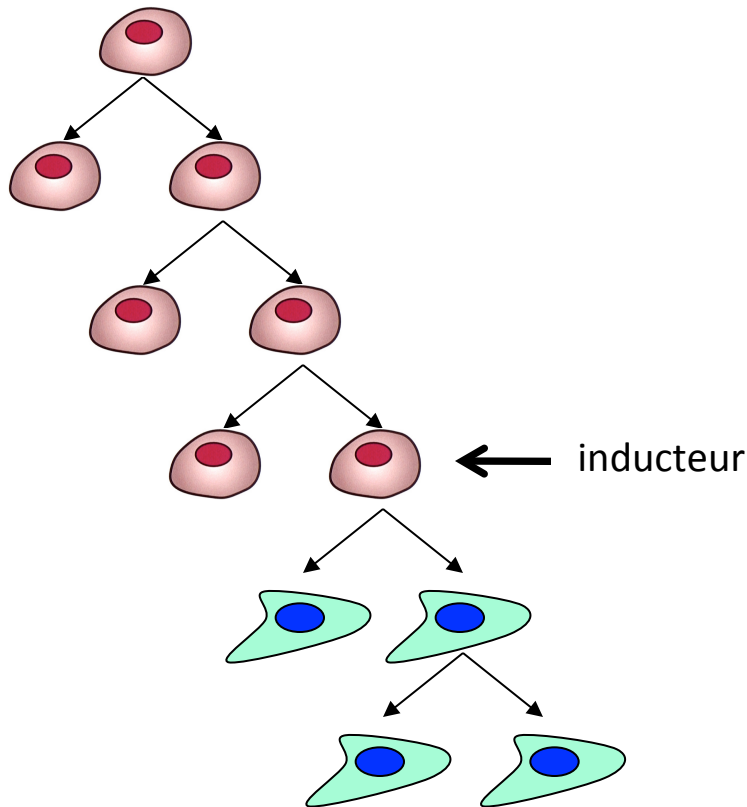
Homme



Autorenouvellement: Multiplication à l'infinie

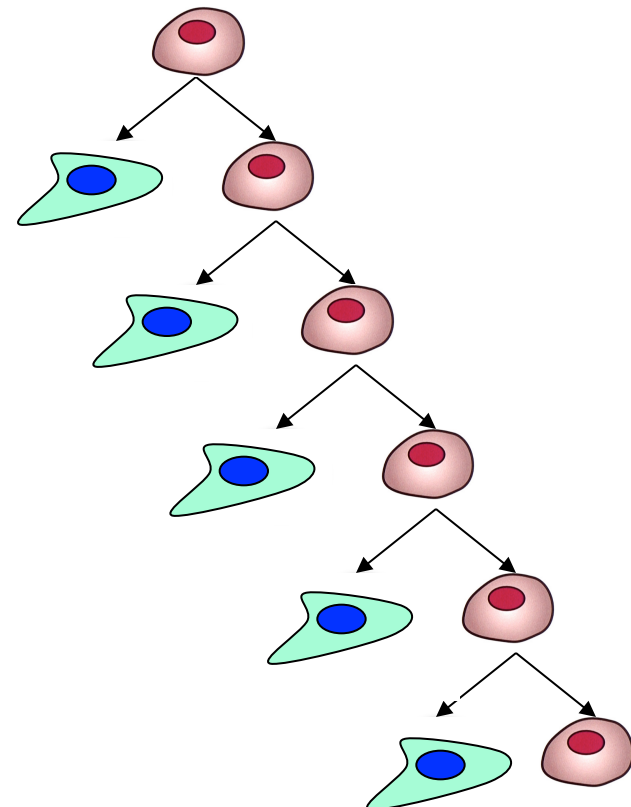
Cellules souches pluripotentes :

autorenouvellement par divisions symétriques

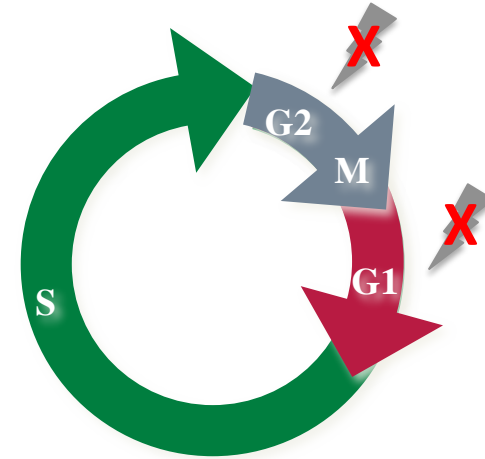
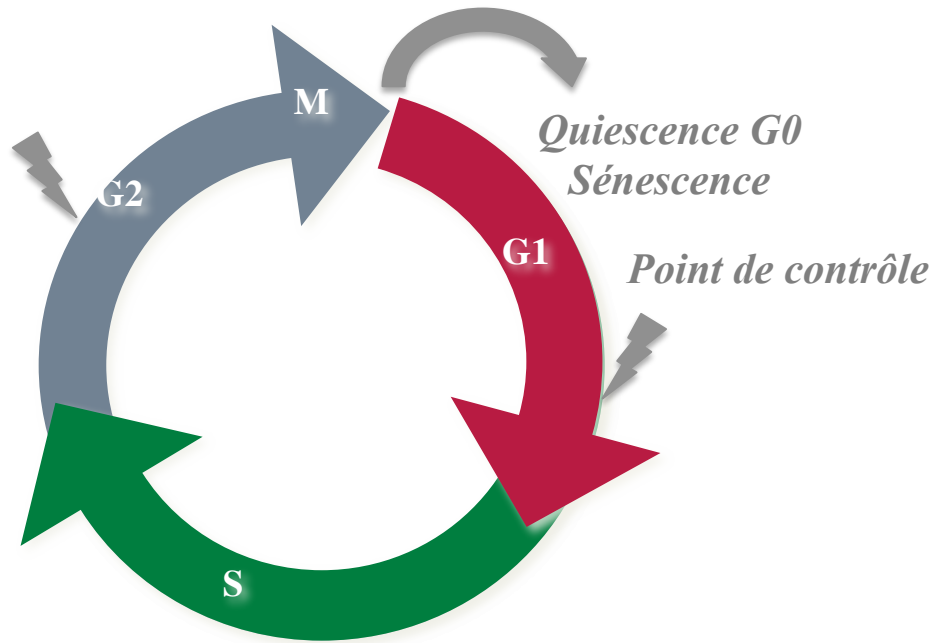


Cellules souches tissulaires :

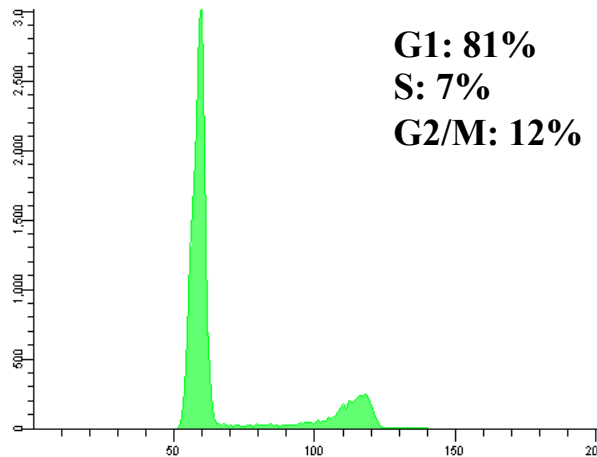
autorenouvellement par divisions asymétriques



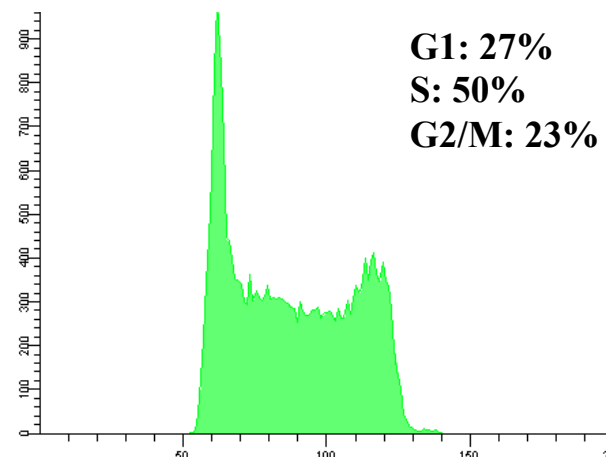
Cycle cellulaire et vitesse de prolifération



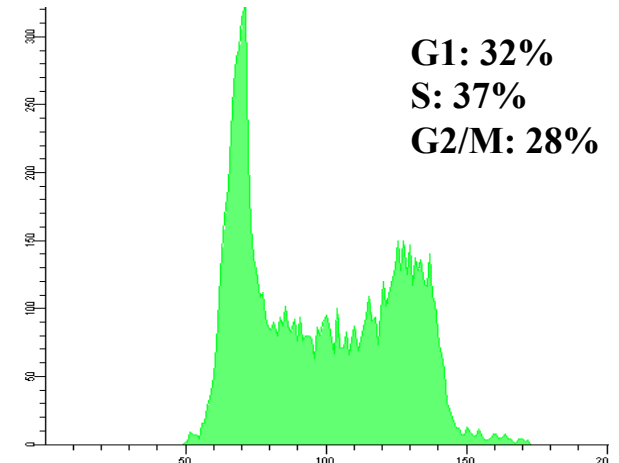
Fibroblastes



Cellules ES murines



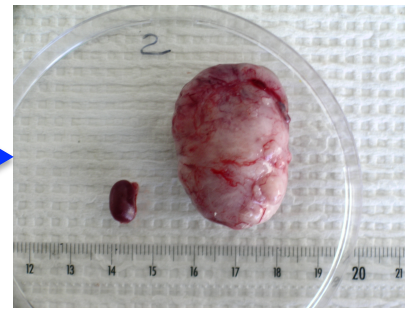
Cellules ES de primate



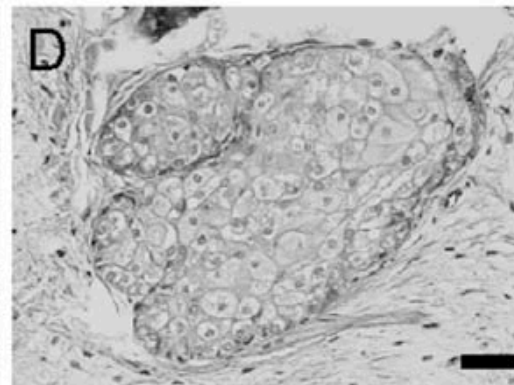
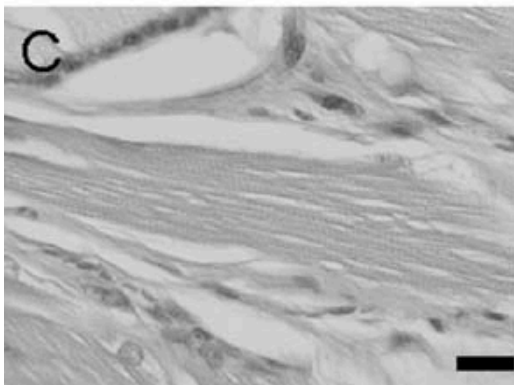
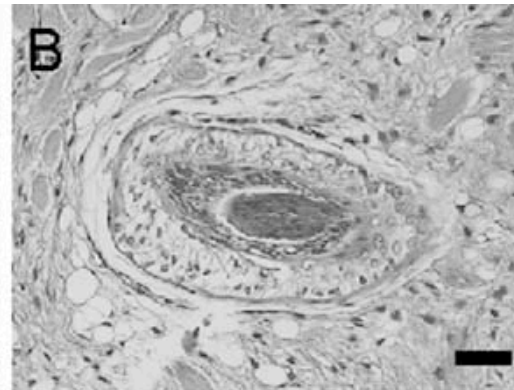
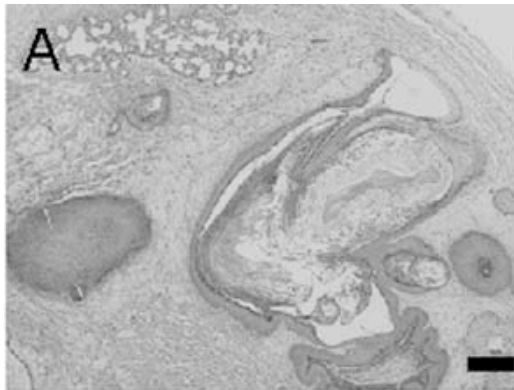
Tumorigénèse



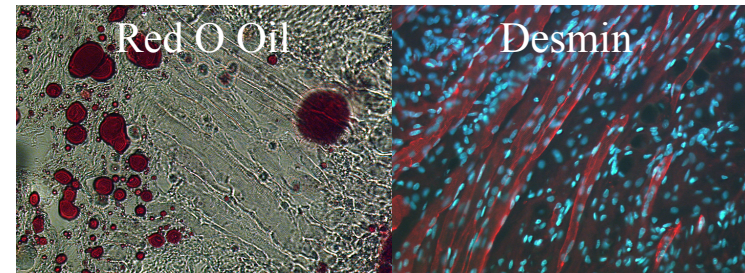
1 mois



Tératome

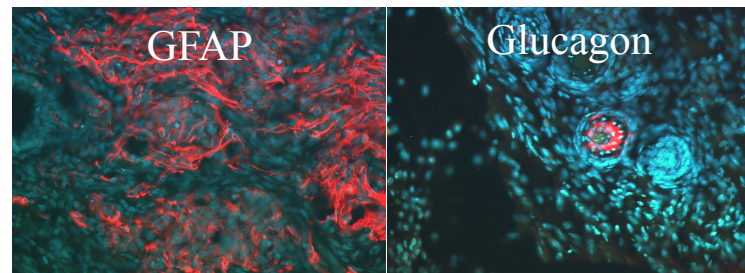


Mésoderme



Ectoderme

Endoderme



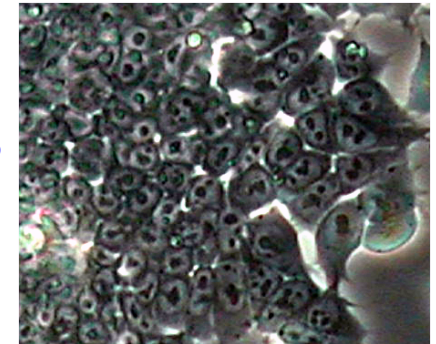
Pluripotence: Capacité de différenciation

Totipotence: ovocyte fécondé

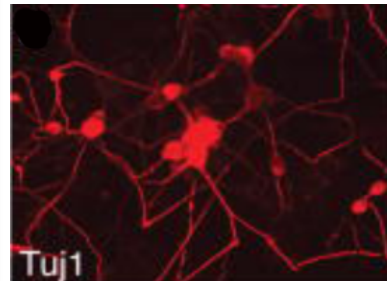
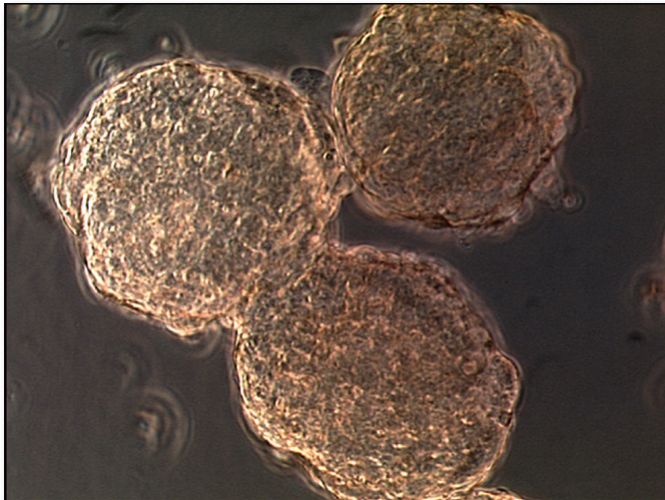
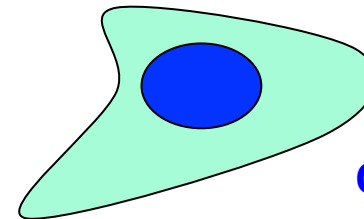
Pluripotence: cellules ES

Multipotence: cellules souches
hématopoïétiques

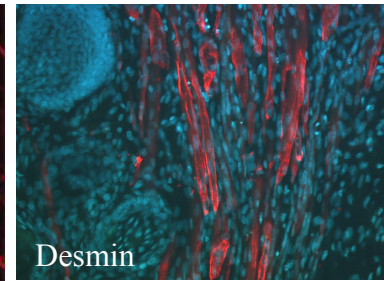
Unipotence: Pro-lymphocyte B



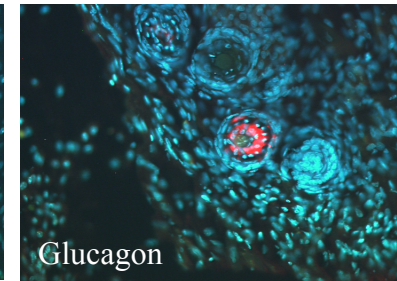
Différenciation



ECTODERME

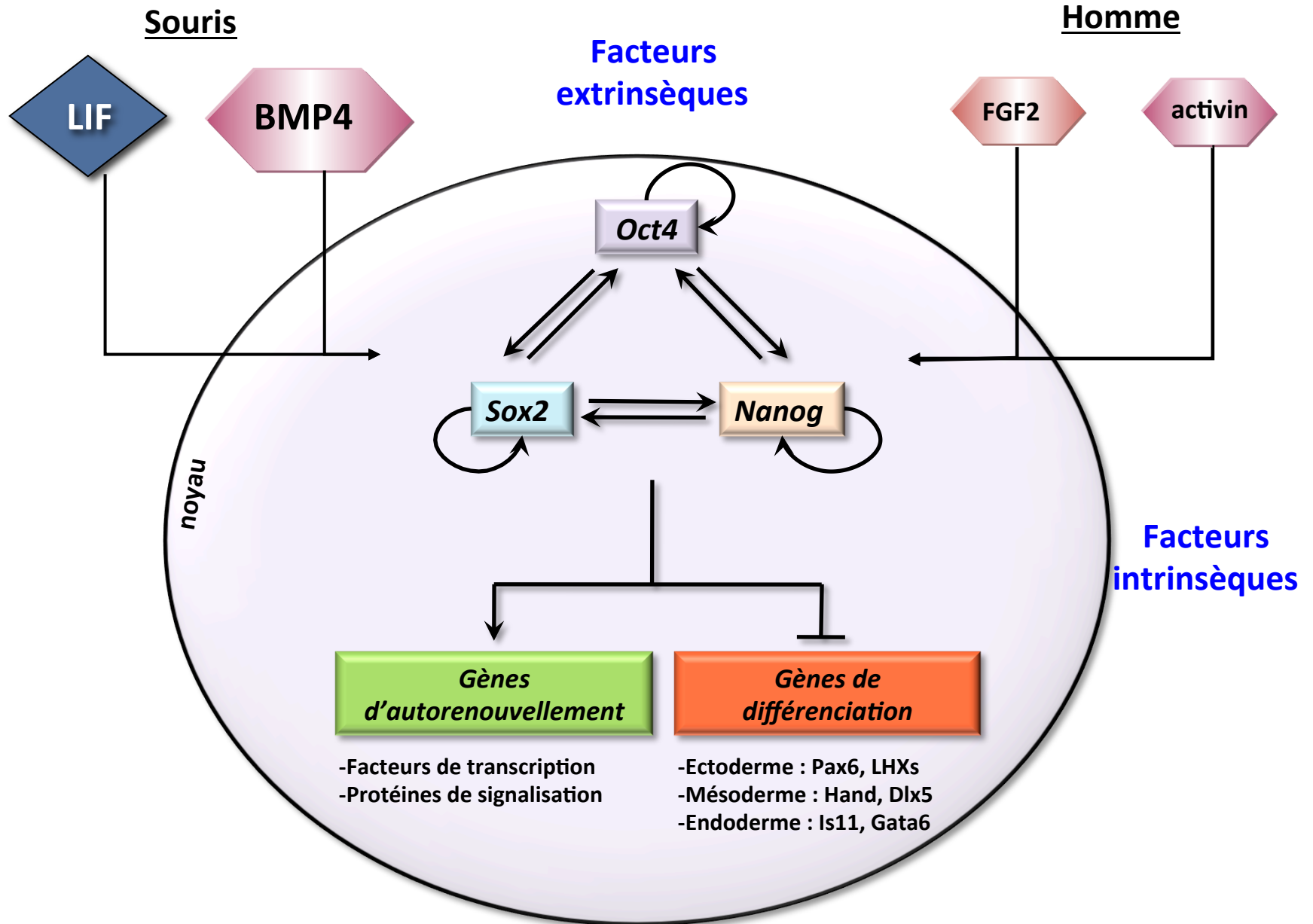


MESODERME

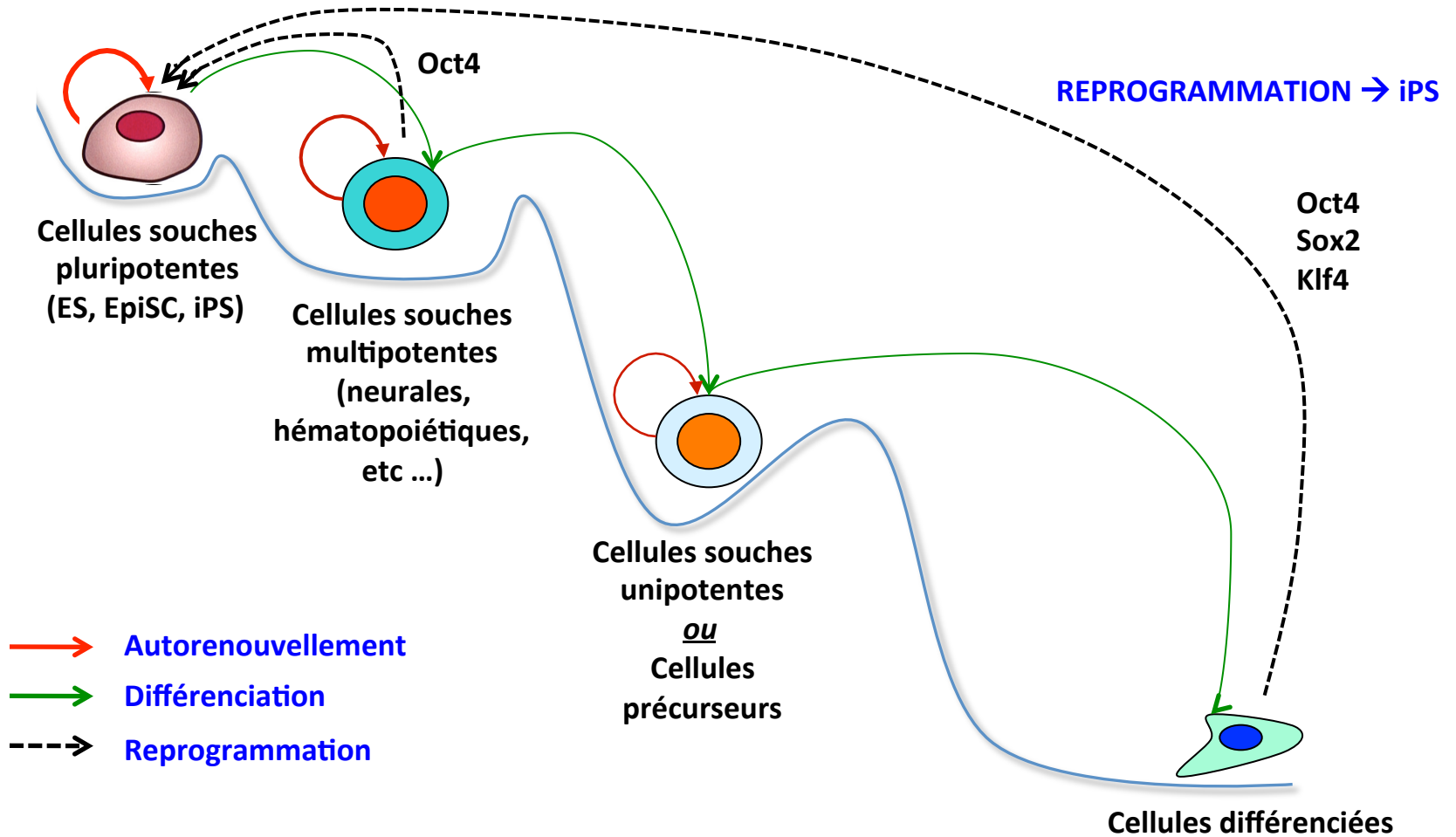


ENDODERME

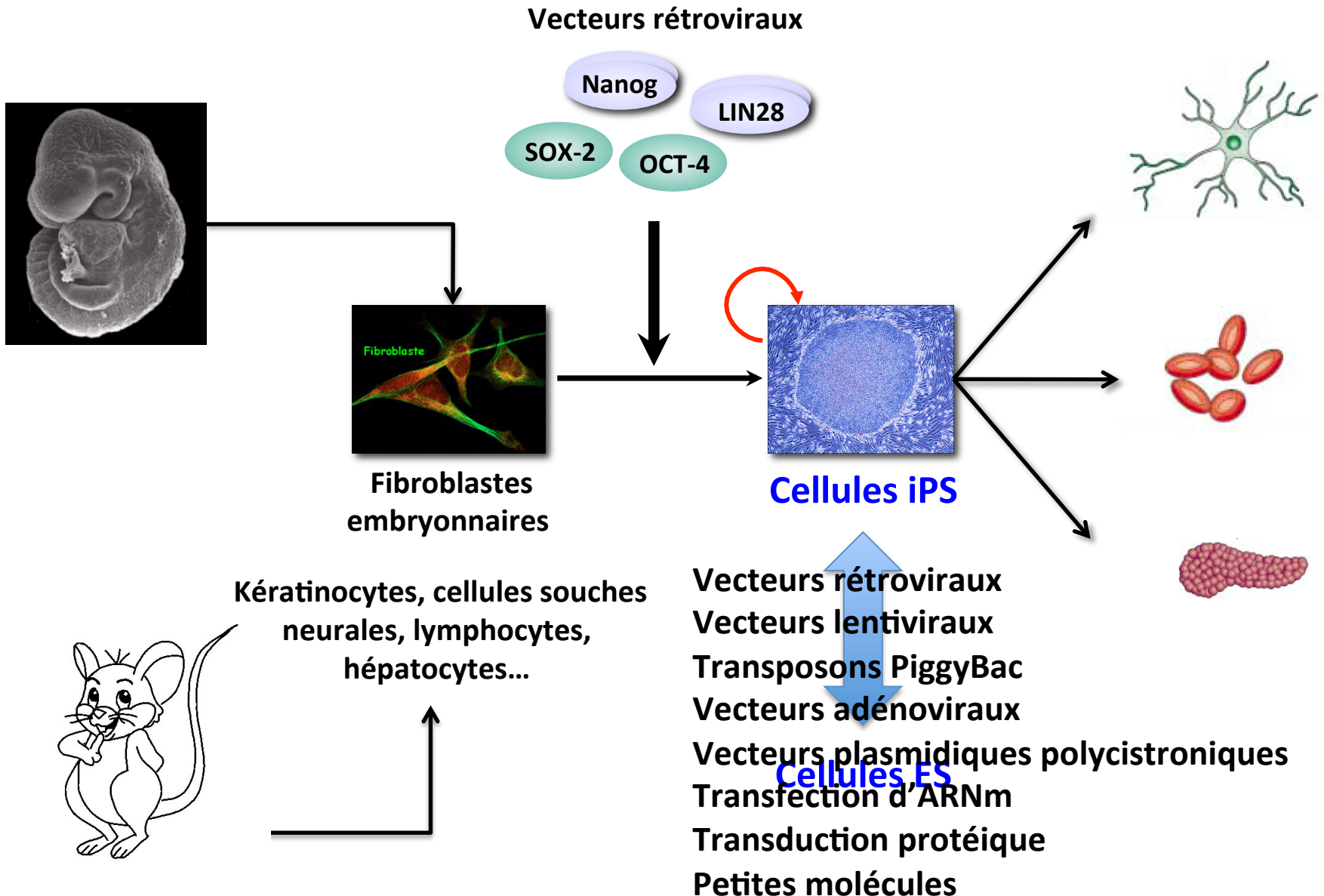
Régulation de la pluripotence



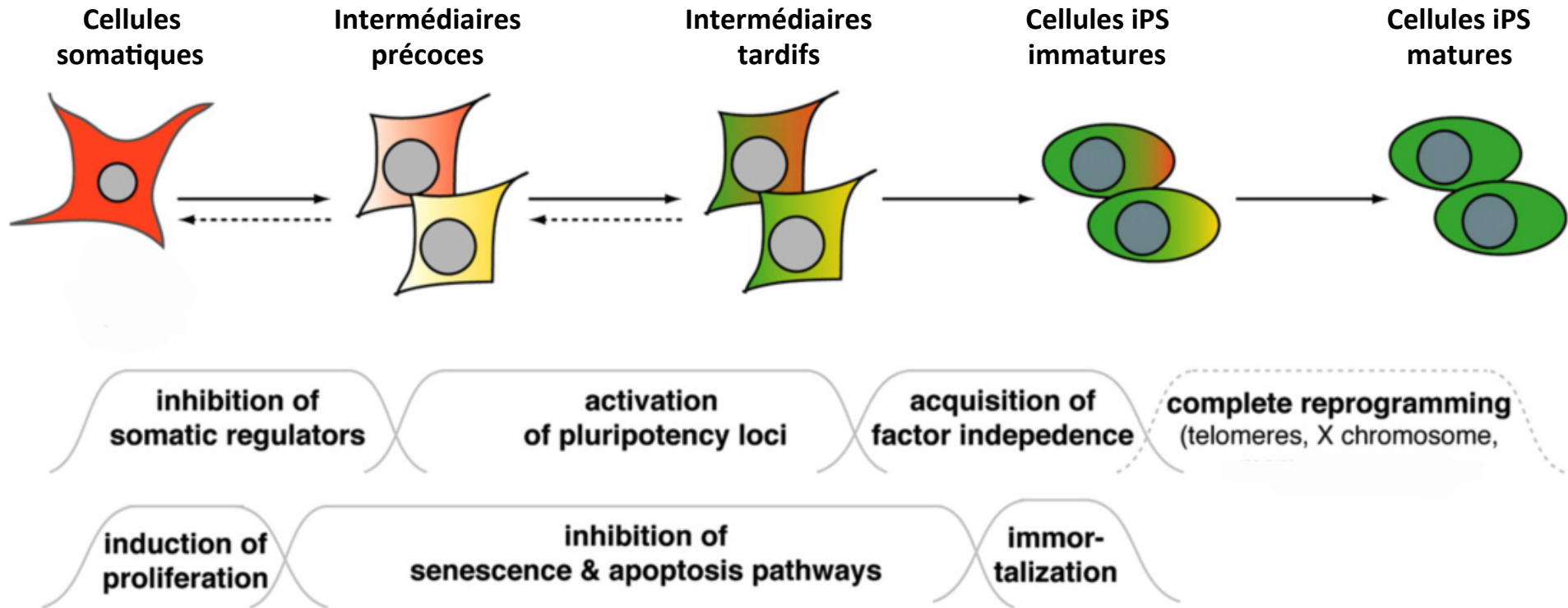
Différenciation et Reprogrammation

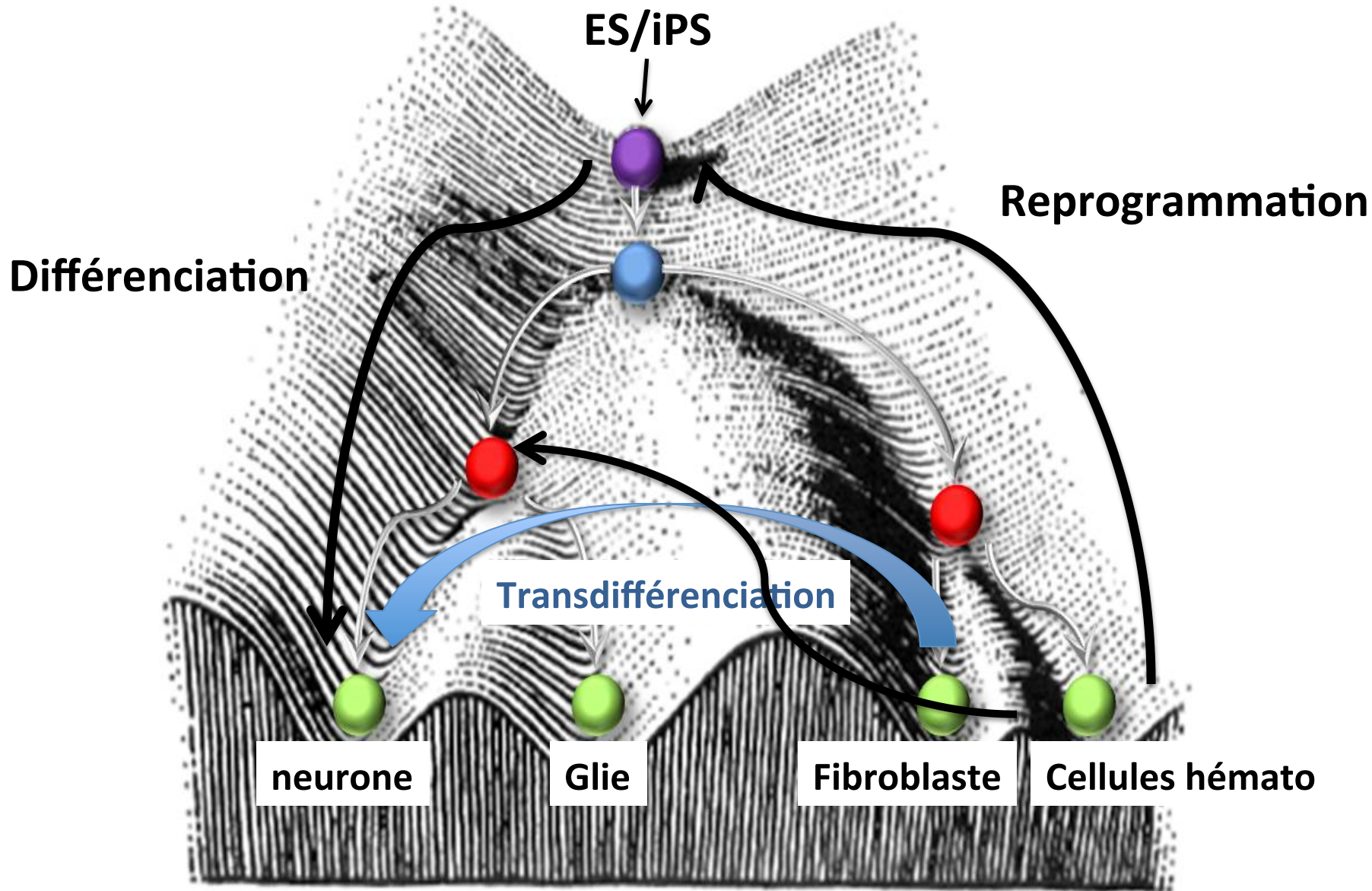


Reprogrammation de cellules somatiques en cellules iPS



Modèle de la reprogrammation cellulaire





Les cellules souches pluripotentes

- ✓ *Définition et propriétés des cellules souches pluripotentes:*

 - Autorenouvellement, Différenciation et Tumorigénèse*

 - Reprogrammation et Transdifférenciation*

- ✓ *Intérêts de ces cellules chez la souris:*

 - Techniques de Transgénèse*

 - Différents types de cellules souches pluripotentes*

- ✓ *Intérêts de ces cellules chez les animaux d'élevage:*

 - Techniques de dérivation des cellules ES et iPS*

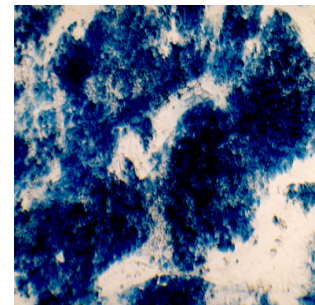
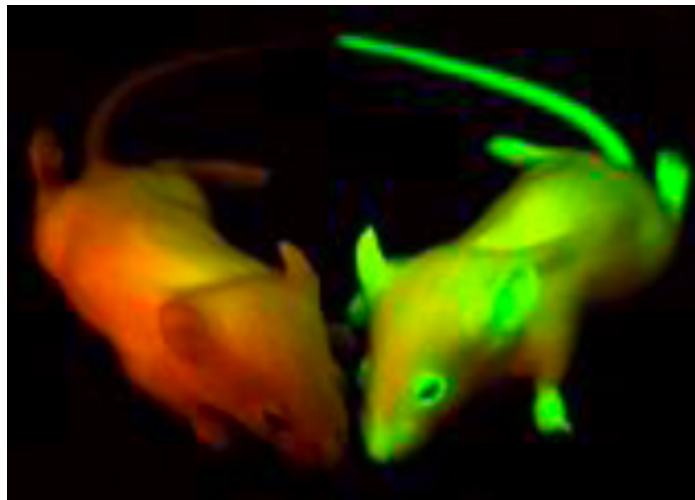
 - Les différents états de pluripotence*

- ✓ *Intérêts de ces cellules chez l'Homme:*

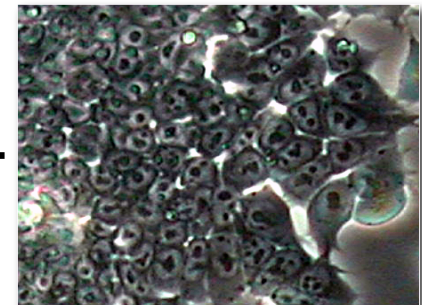
 - Thérapie par remplacement cellulaire*

 - Clonage thérapeutique*

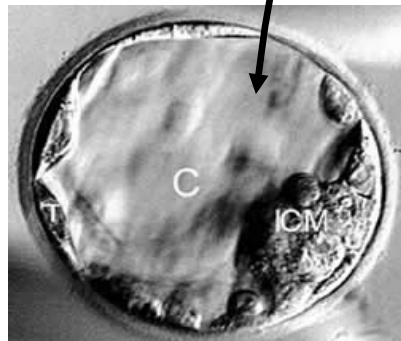
Intérêts des cellules souches pluripotentes: Souris



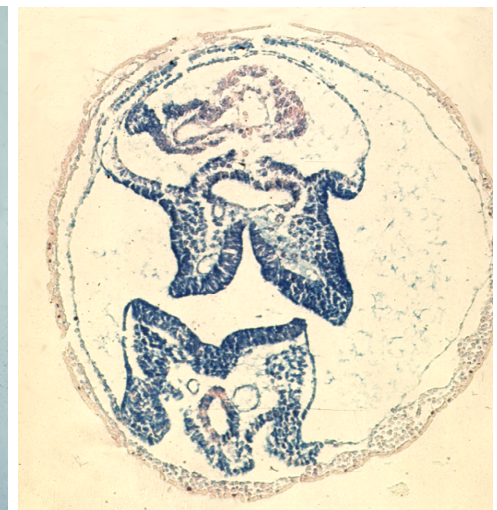
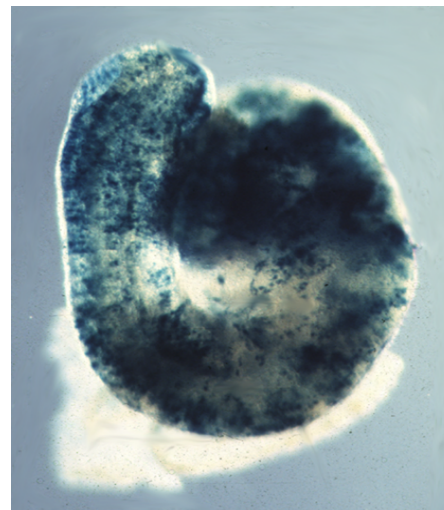
Cellules ES-LacZ



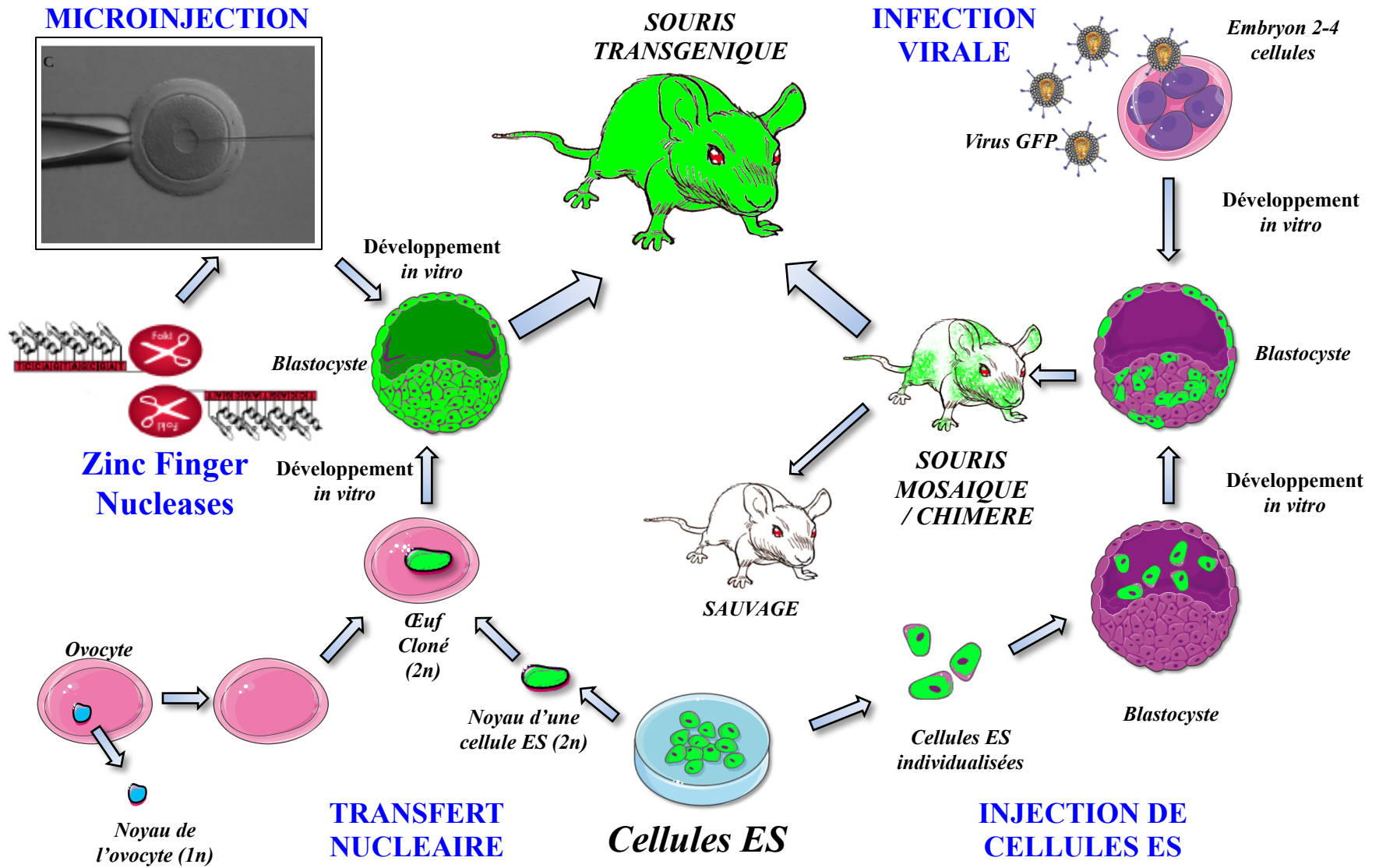
Cellules ES



Blastocyste



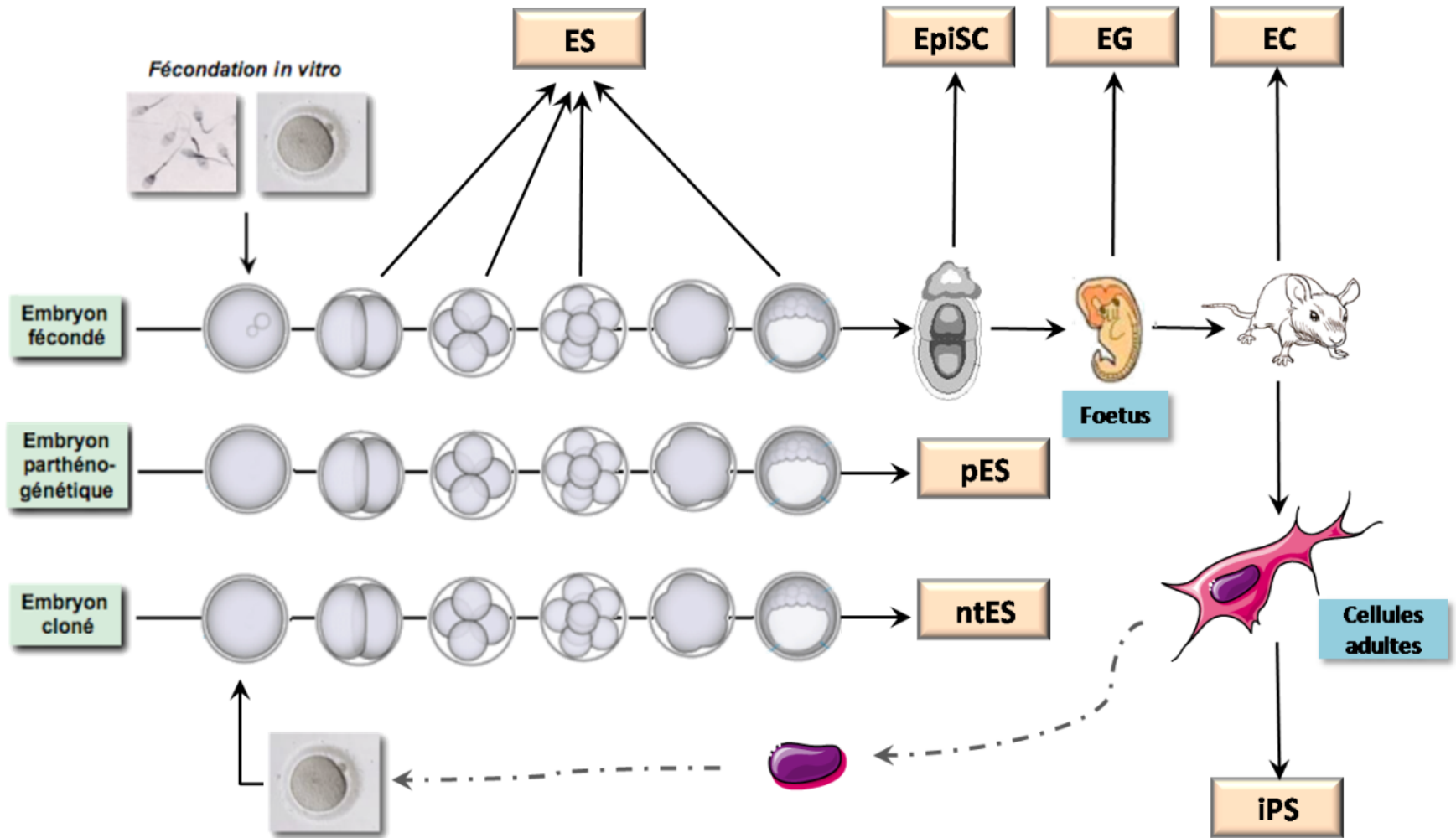
Les techniques de transgénèse



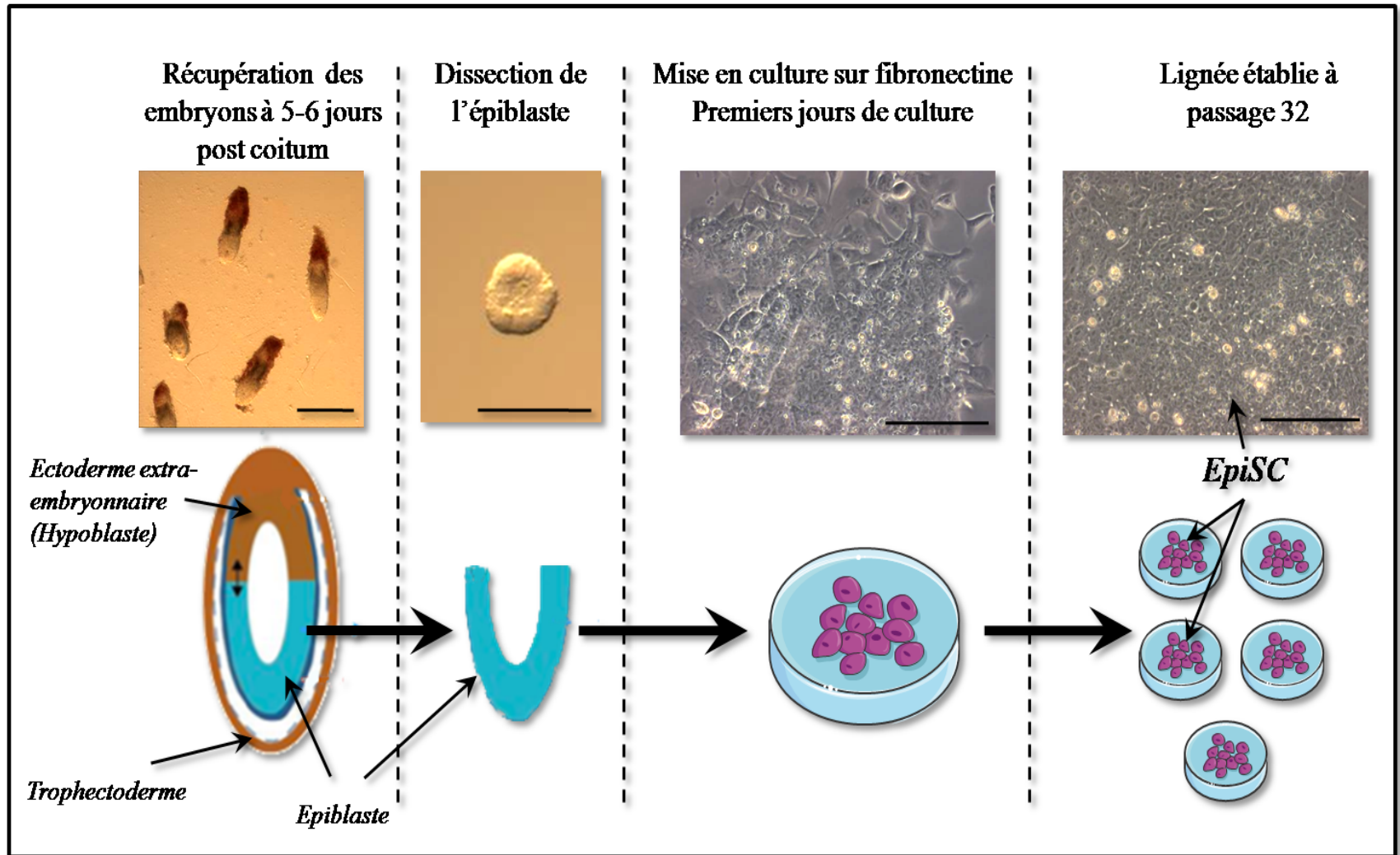
Comparaison des techniques de transgénèse

Vecteur	ADN	Virus	Noyau de cellules ES	Cellules ES
Techniques	Microinjection	Infection	Transfert nucléaire	Injection de cellules
Mécanismes d'insertion	Recombinaison aléatoire		Recombinaison homologue	
Locus d'insertion	Inconnu		Connu	
Nombre d'insertion	Multiple		Unique	
Inconvénients	Modification du génome importante, risque d'apparition de tumeurs. Difficulté d'obtention d'une activité spécifique de tissus.		Obtention de cellules ES (iPS) Nécessité d'obtention de chimères germinales	

Différents types de cellules souches pluripotentes



Dérivation des cellules EpiSC



Les cellules souches pluripotentes

- ✓ *Définition et propriétés des cellules souches pluripotentes:*

 - Autorenouvellement, Différenciation et Tumorigénèse*

 - Reprogrammation et Transdifférenciation*

- ✓ *Intérêts de ces cellules chez la souris:*

 - Techniques de Transgénèse*

 - Différents types de cellules souches pluripotentes*

- ✓ *Intérêts de ces cellules chez les animaux d'élevage:*

 - Techniques de dérivation des cellules ES et iPS*

 - Les différents états de pluripotence*

- ✓ *Intérêts de ces cellules chez l'Homme:*

 - Thérapie par remplacement cellulaire*

 - Clonage thérapeutique*

Intérêts des cellules souches pluripotentes: Animaux d'intérêt agronomique



- ***Recherche fondamentale:***

Modèles d'étude des grandes fonctions physiologiques
(reproduction, lactation, photopériodisme, croissance musculaire)

- ***Recherche médicale:***

Animaux modèles de maladies humaines
(athérosclérose, tuberculose, arythmie, obésité, infection virale...)

- ***Industrie:***

Bioréacteurs pour la production de molécules pharmacologiques dans le lait

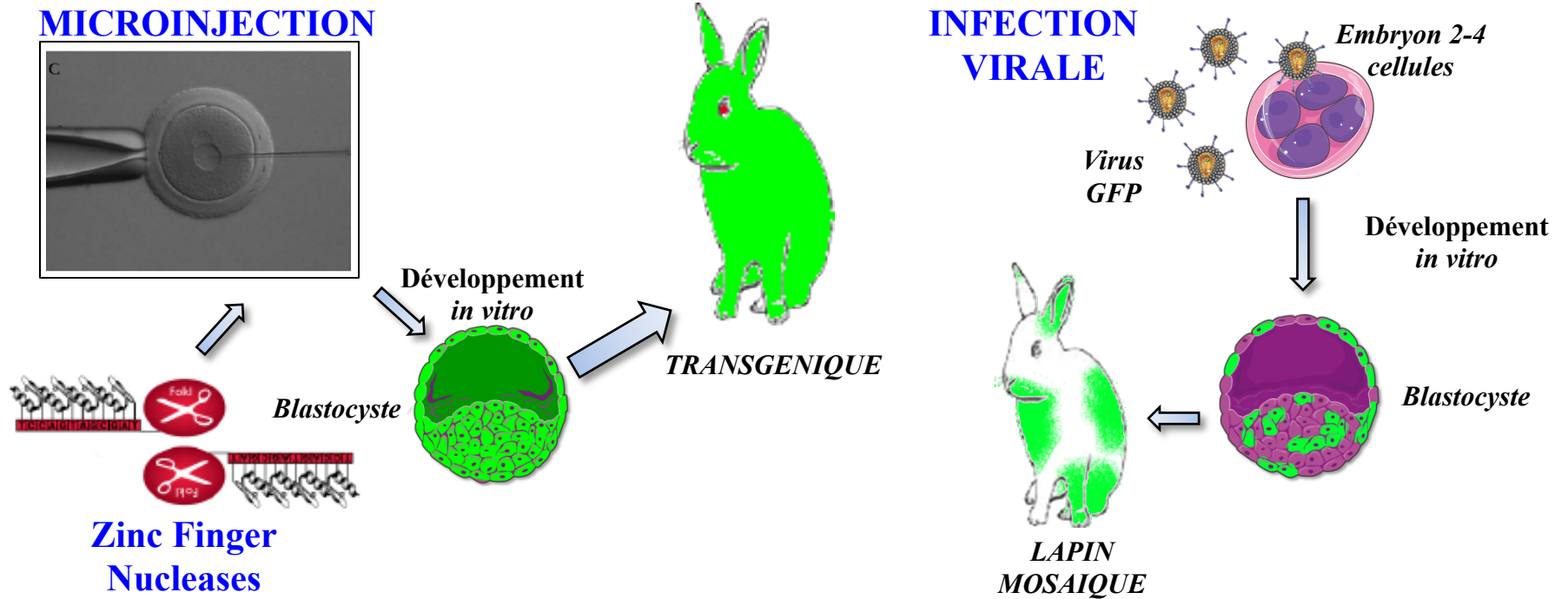
Animaux Bioréacteurs

- Modifications post-traductionnelles absentes chez les levures et bactéries.
- Moins coûteux qu'une production *in vitro* .

Espèce	Temps de gestation (mois)	Maturation (mois)	Volume de lait par lactation (Litre)	Temps entre la microinjection et la production de lait (mois)	Production de protéines recombinantes (Kg/an)	Fraction de protéines (%)
Souris	0.75	1	0.0015	3-6	-	-
Lapin	1	5-6	1-1.5	7-8	1	14
Porc	4	7-8	200-400	15-16	100	6
Mouton	5	6-8	200-400	16-18	100	7
Chèvre	5	6-8	600-800	16-18	100	6
Vache	9	15	8000	30-33	1000	3

Différences entre les espèces d'intérêt agronomique (Fan & Watanabe, Pharmacology & Therapeutics, 2003)

Transgénèse chez le lapin



?

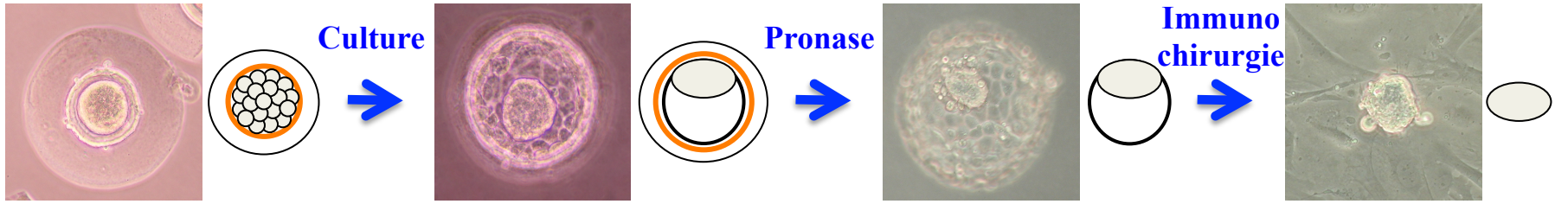


Cellules Souches pluripotentes



Projet de recherche

Dérivation de cellules ES de lapin



Morula

Blastocyste

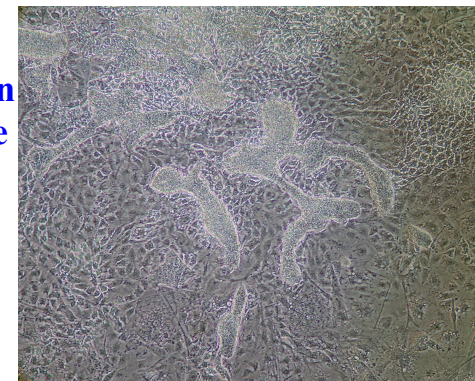
**Blastocyste sans
manteau muqueux
ni zone pellucide**

ICM isolé

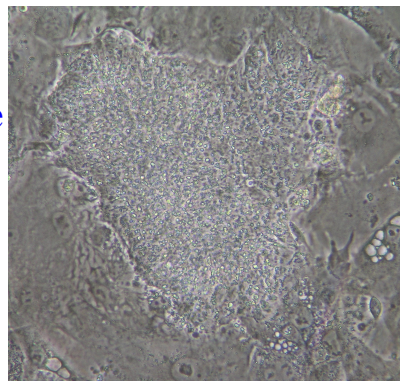
**Culture sur feeders
DMEM/F12 medium
+ 20% KOSR
+ 13ng/ml FGF2**



5 jours de culture



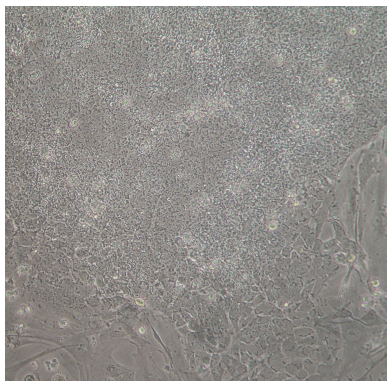
P0: Excroissances



P1: Colonie de cellules ES

Collagénase

**Dissociation
mécanique**



**Lignée de cellules ES
P28**

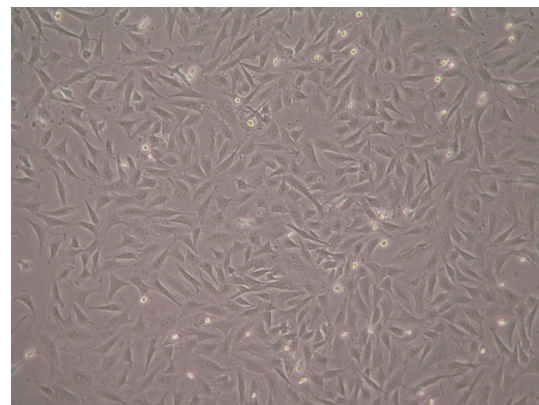
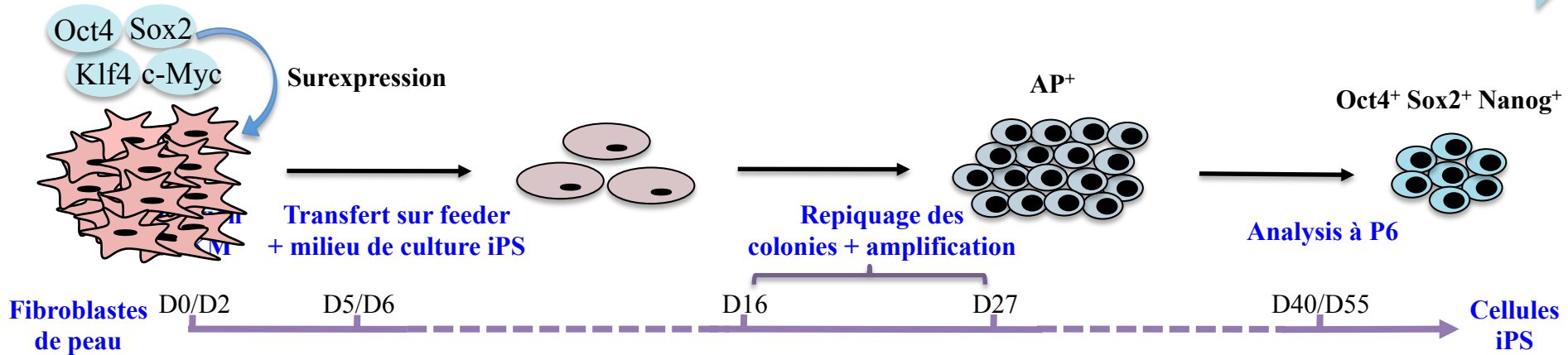
Génération de cellules iPS de lapin

Cellules différenciées

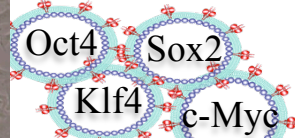
Perte de la morphologie

Formation des colonies

Cellules souches pluripotentes

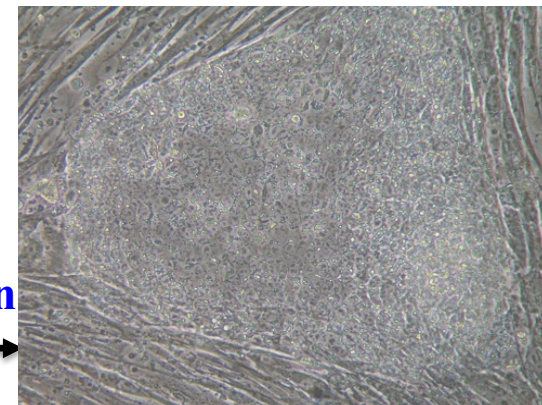


Fibroblastes de peau de jeune lapin



Infection

Reprogrammation



Colonie de cellules iPS de lapin

Caractérisation des cellules souches pluripotentes

✓ Morphologie et vitesse de prolifération

✓ Expression des gènes d

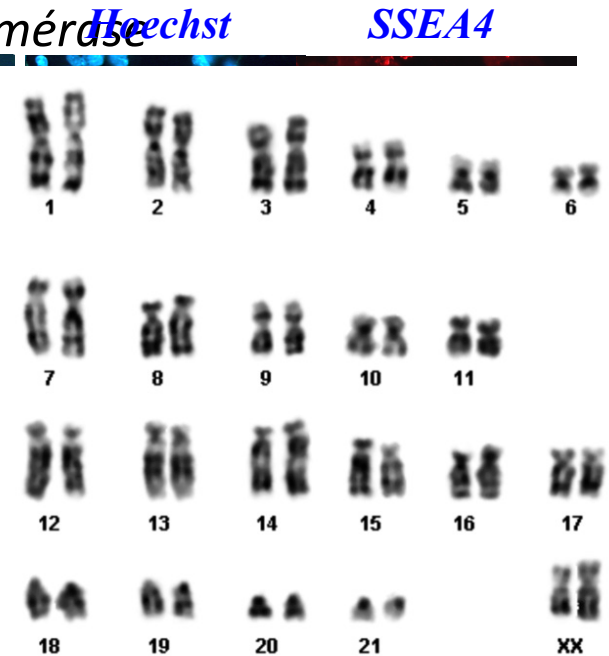
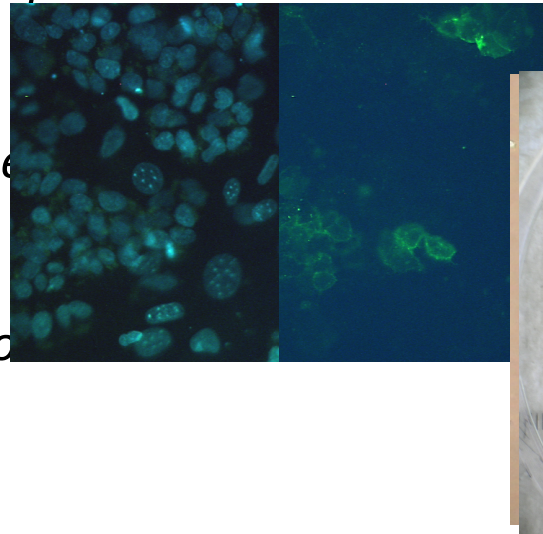
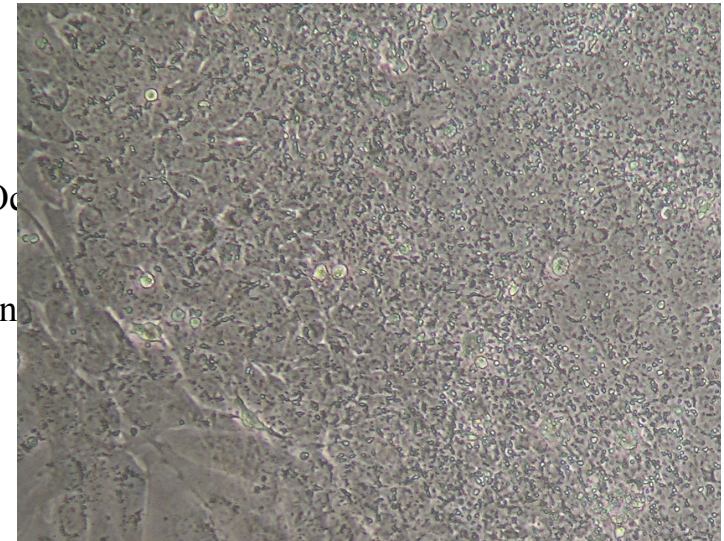
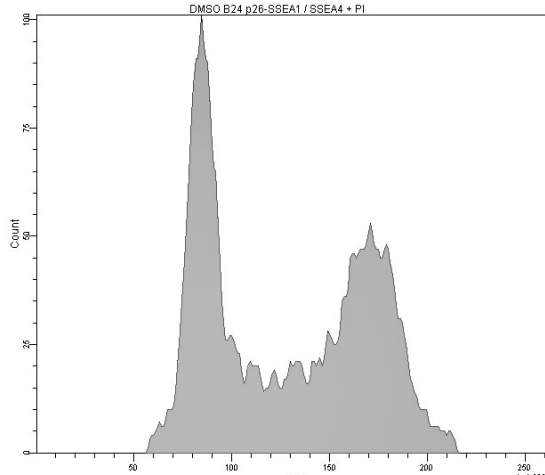
✓ Expression de marqueur

✓ Activités enzymatiques: Phosphatase alcaline et Télomérase

✓ Pluripotence in vitro: Corps e

✓ Pluripotence in vivo: Inductio

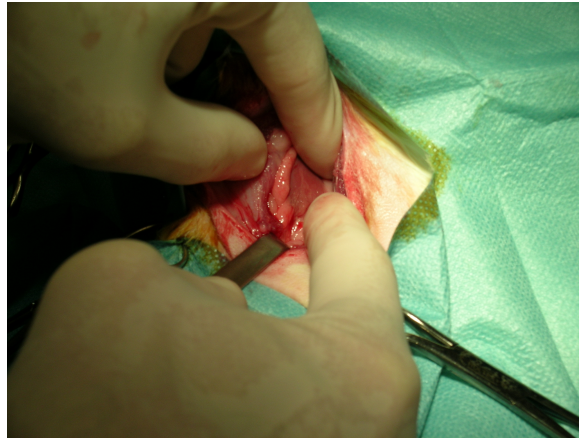
✓ Caryotype normal



Greffes autologues de cellules iPS



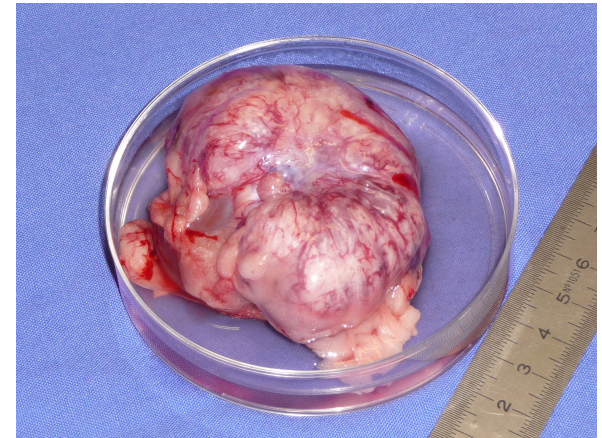
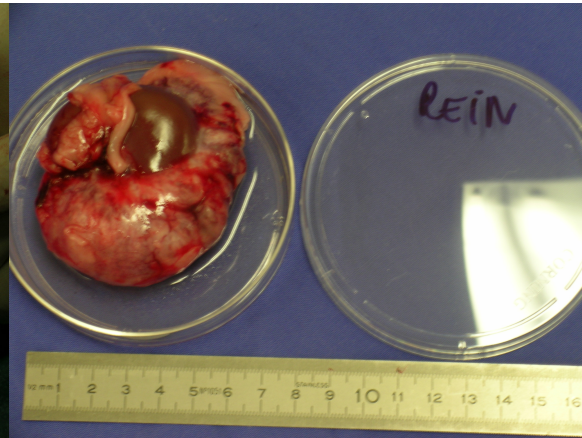
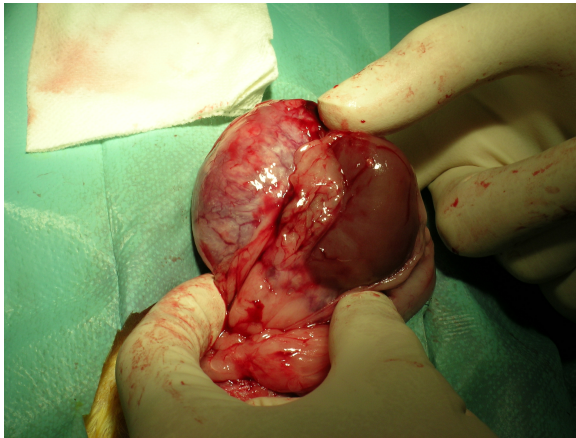
Intramusculaire



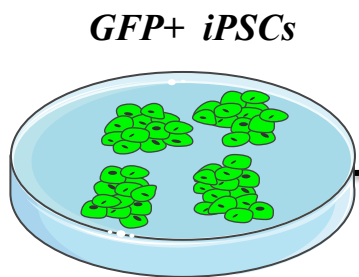
Sous la capsule rénale



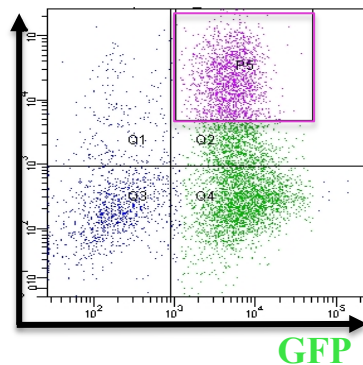
Sous-cutanée



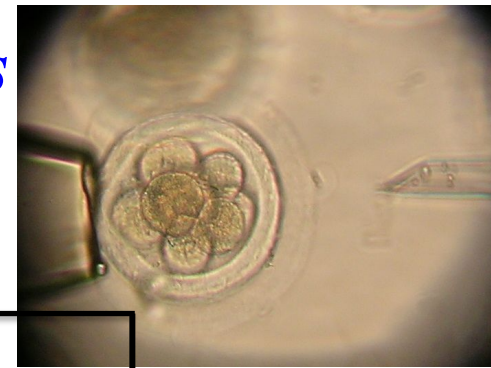
Production de lapins chimères par microinjection



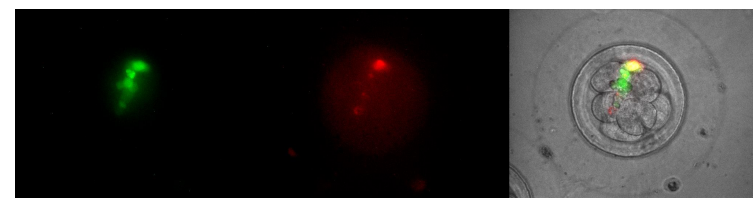
Marquage
SSEA1



Tri cellulaire



Micro-injection dans des embryons au stade 8-cellules

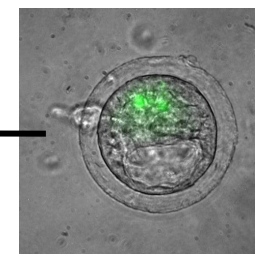
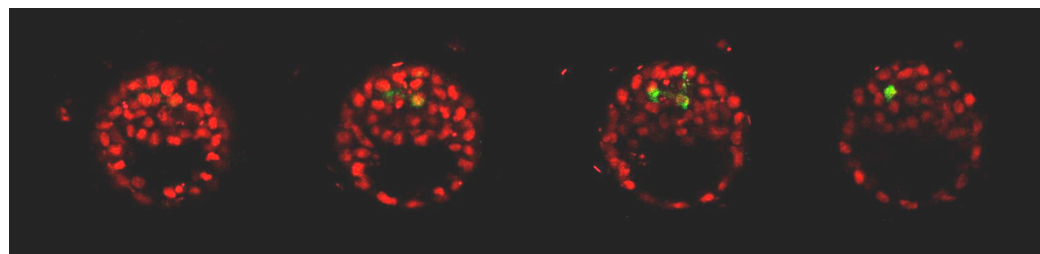
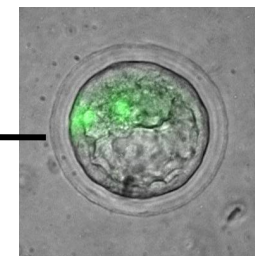
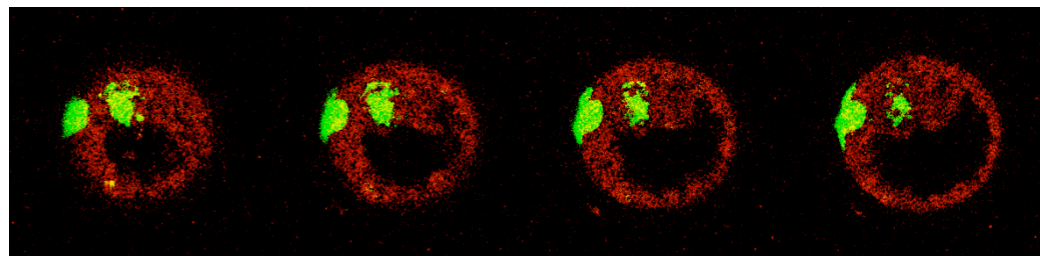


GFP

SSEA1

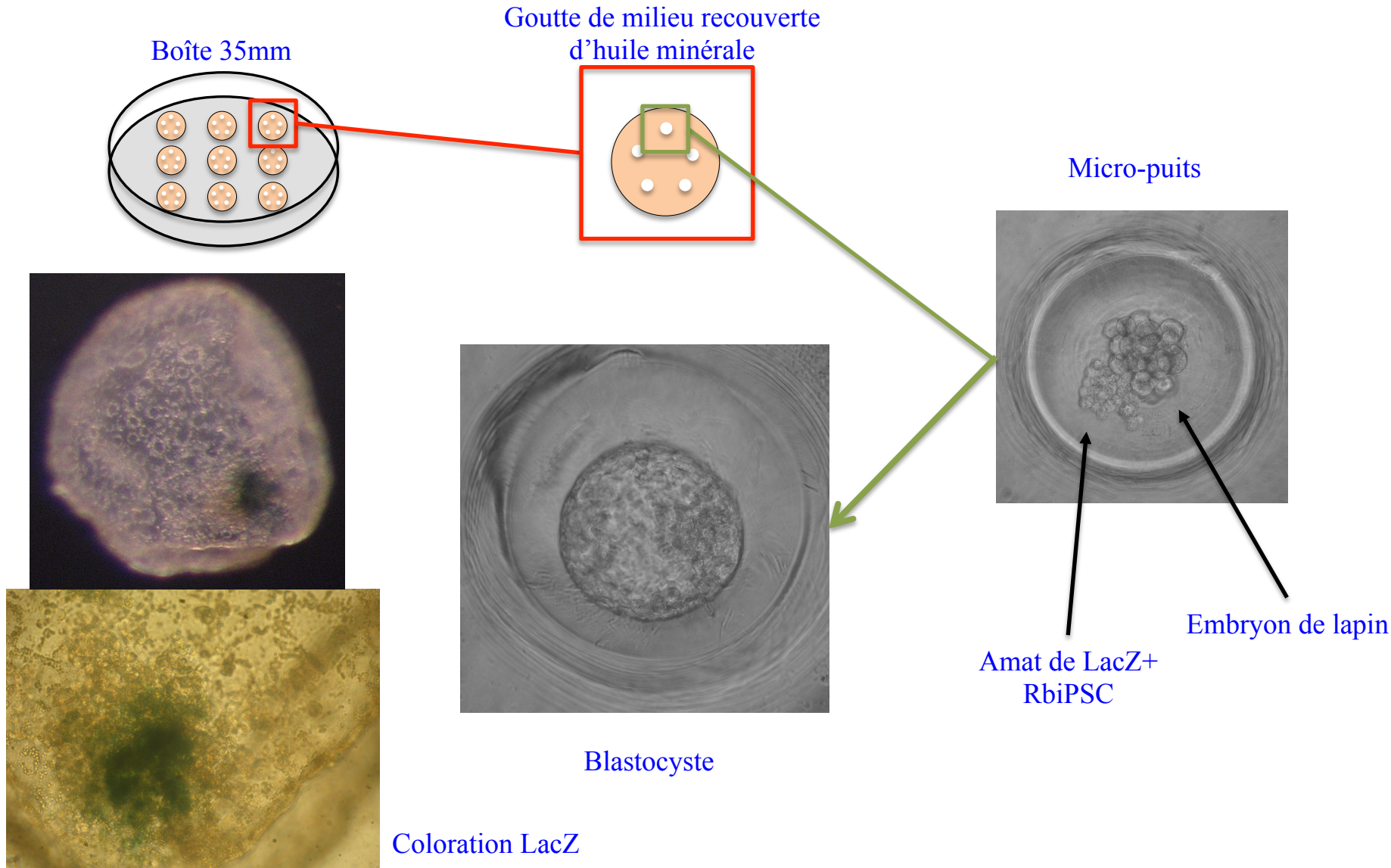
Merge

↓ Développement *in vitro* jusqu'au stade blastocyste ↓

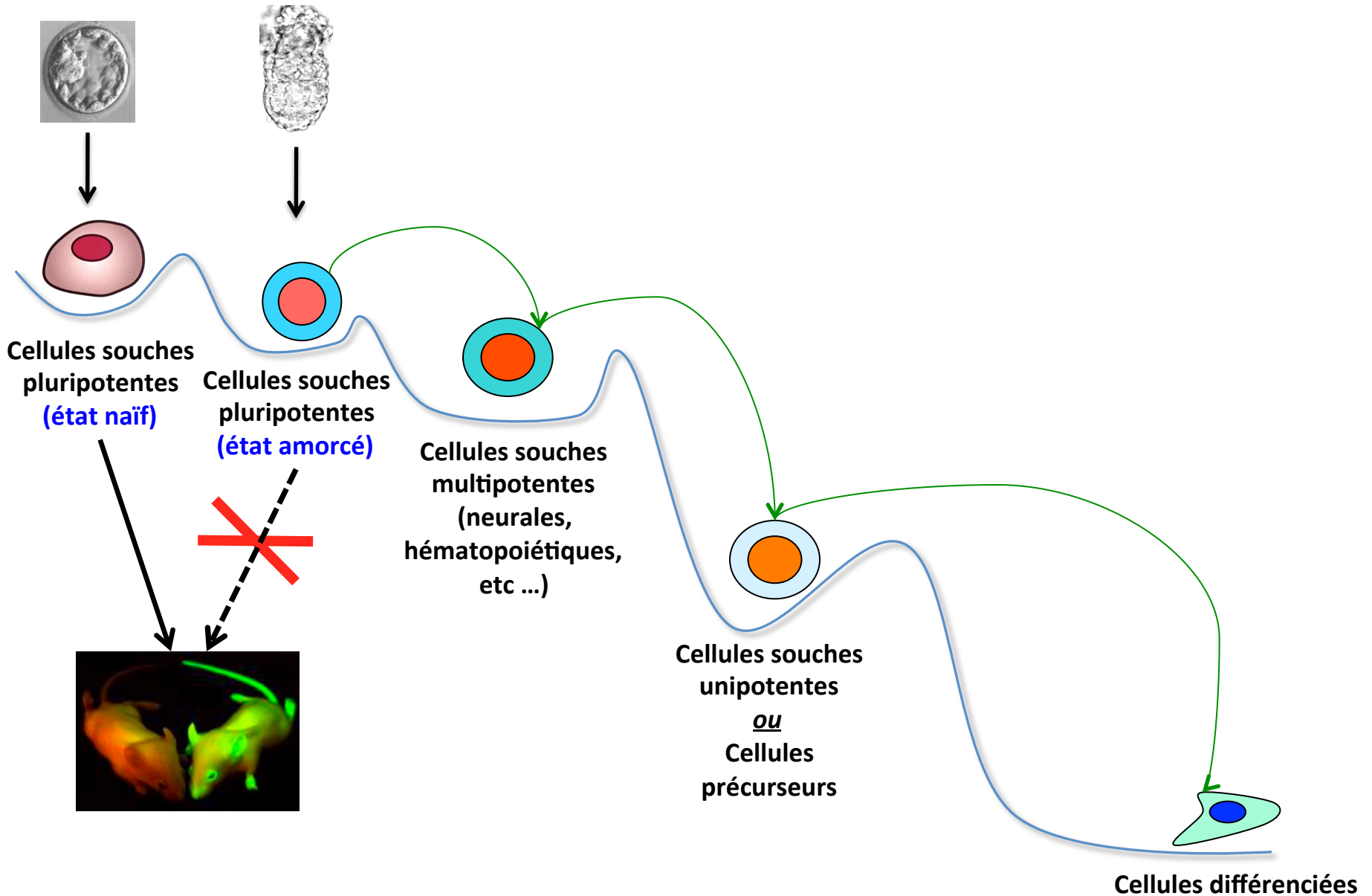


SSEA1+ / GFP +
Embryons injectés : 112
Blastocystes GFP⁺ : 2

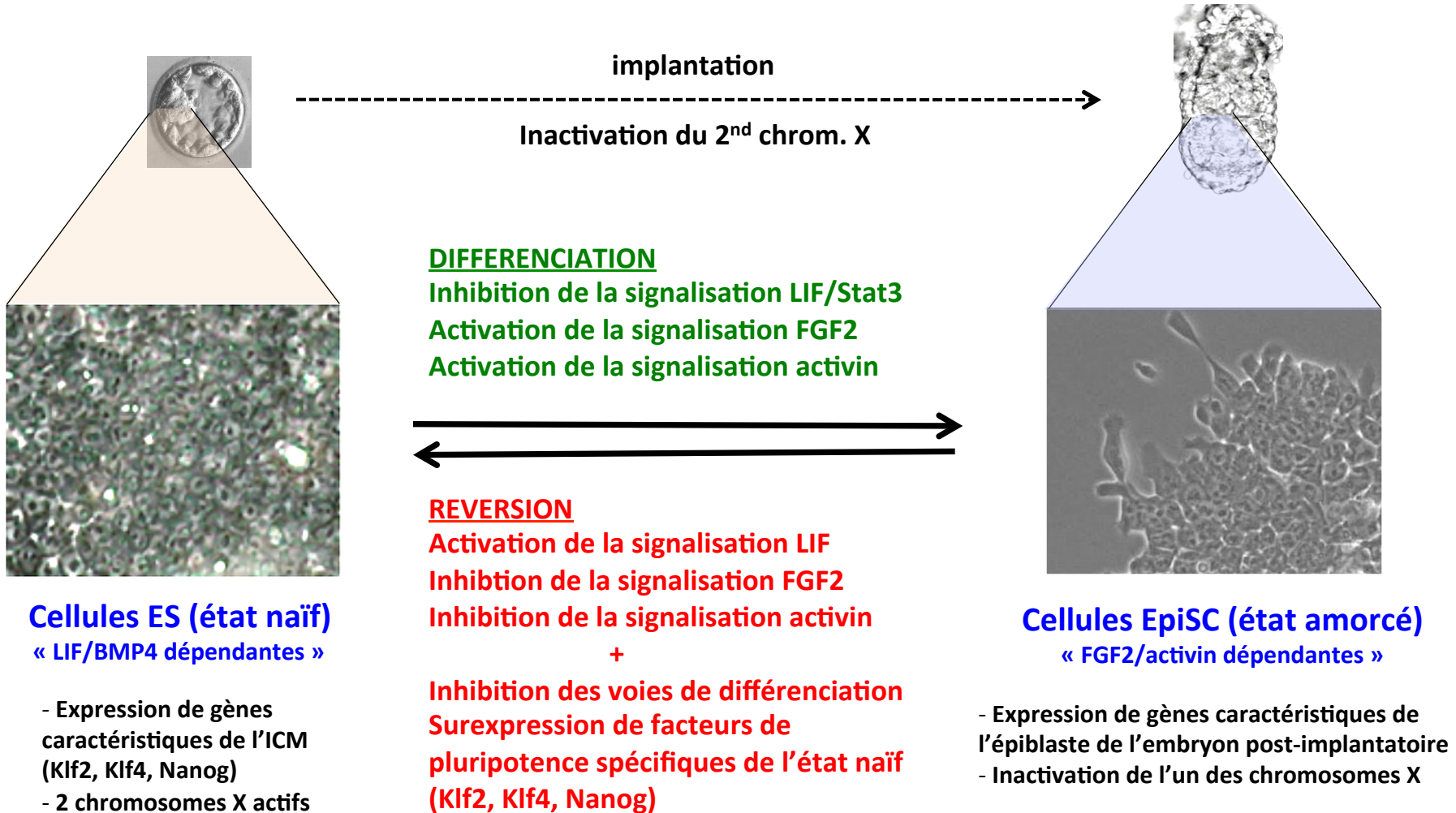
Production d'embryons chimères par aggrégation



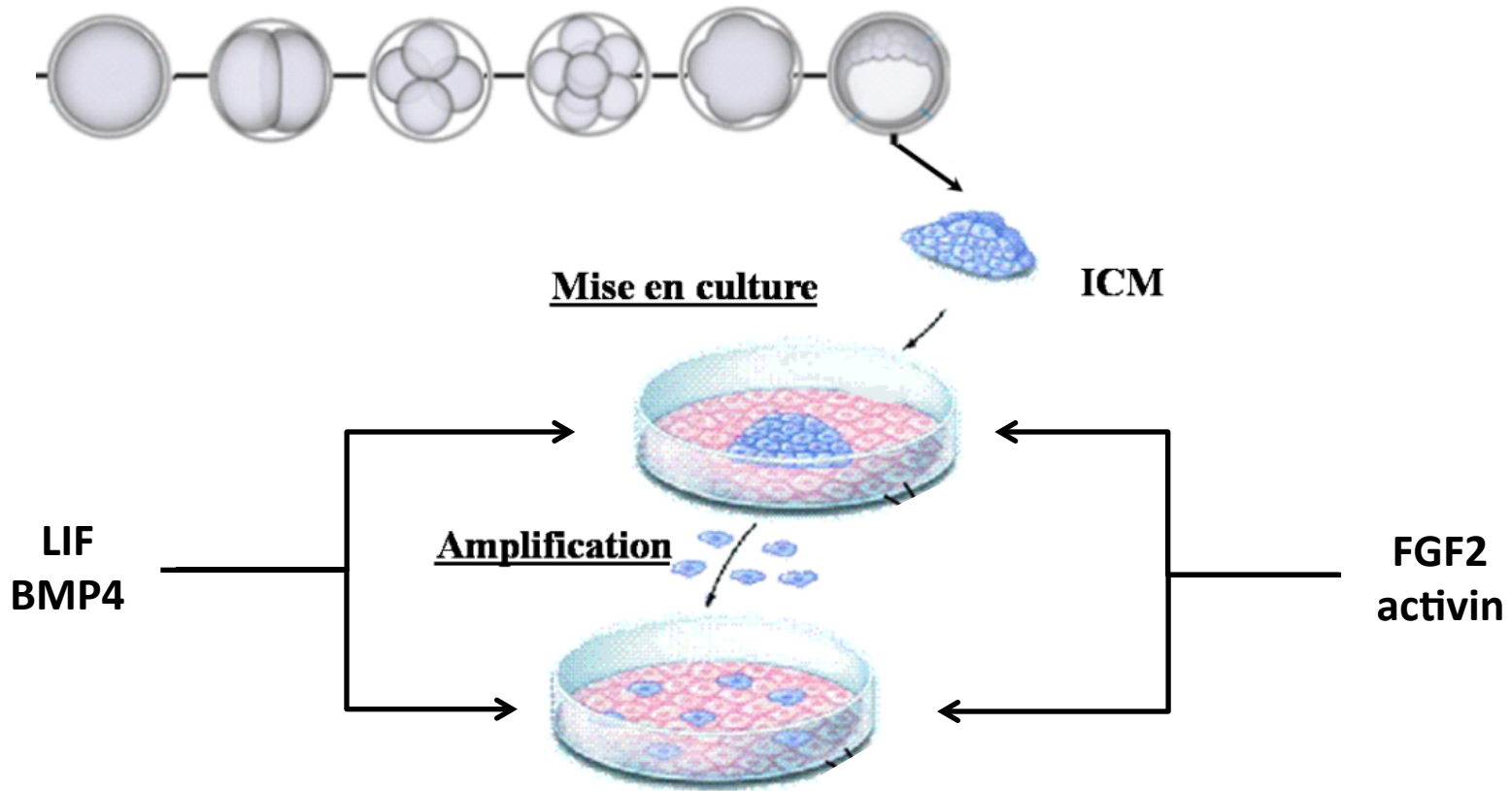
Etats naïf et amorcé de pluripotence chez les rongeurs



Etats naïf et amorcé de pluripotence: différenciation et réversion



Etat de pluripotence des cellules ES non murines



- Expression de gènes caractéristiques de l'ICM
- 2 chromosomes X actifs

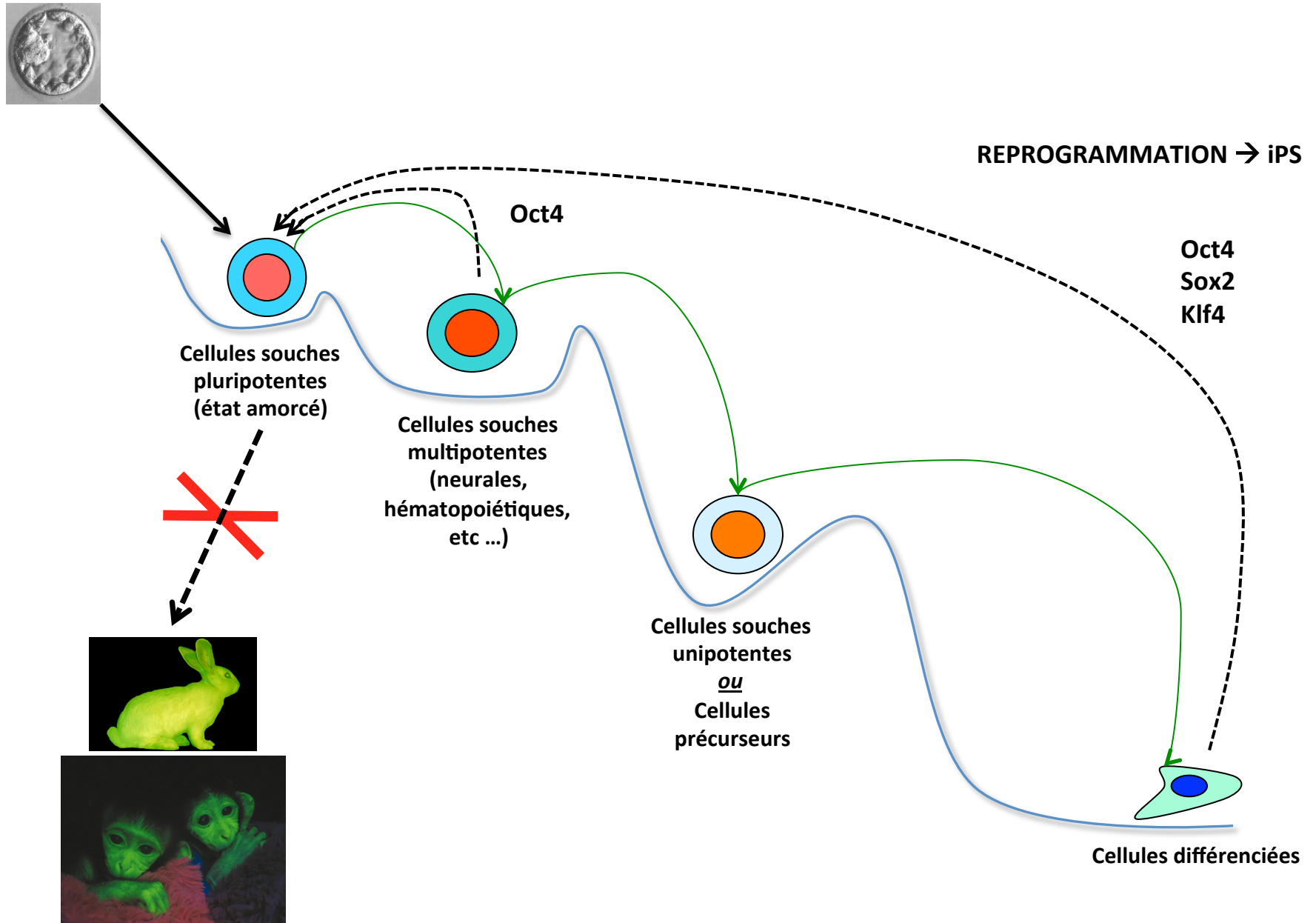
SOURIS, RAT

- Expression de gènes caractéristiques de l'épiblaste de l'embryon post-implantatoire
- Inactivation de l'un des chromosomes X

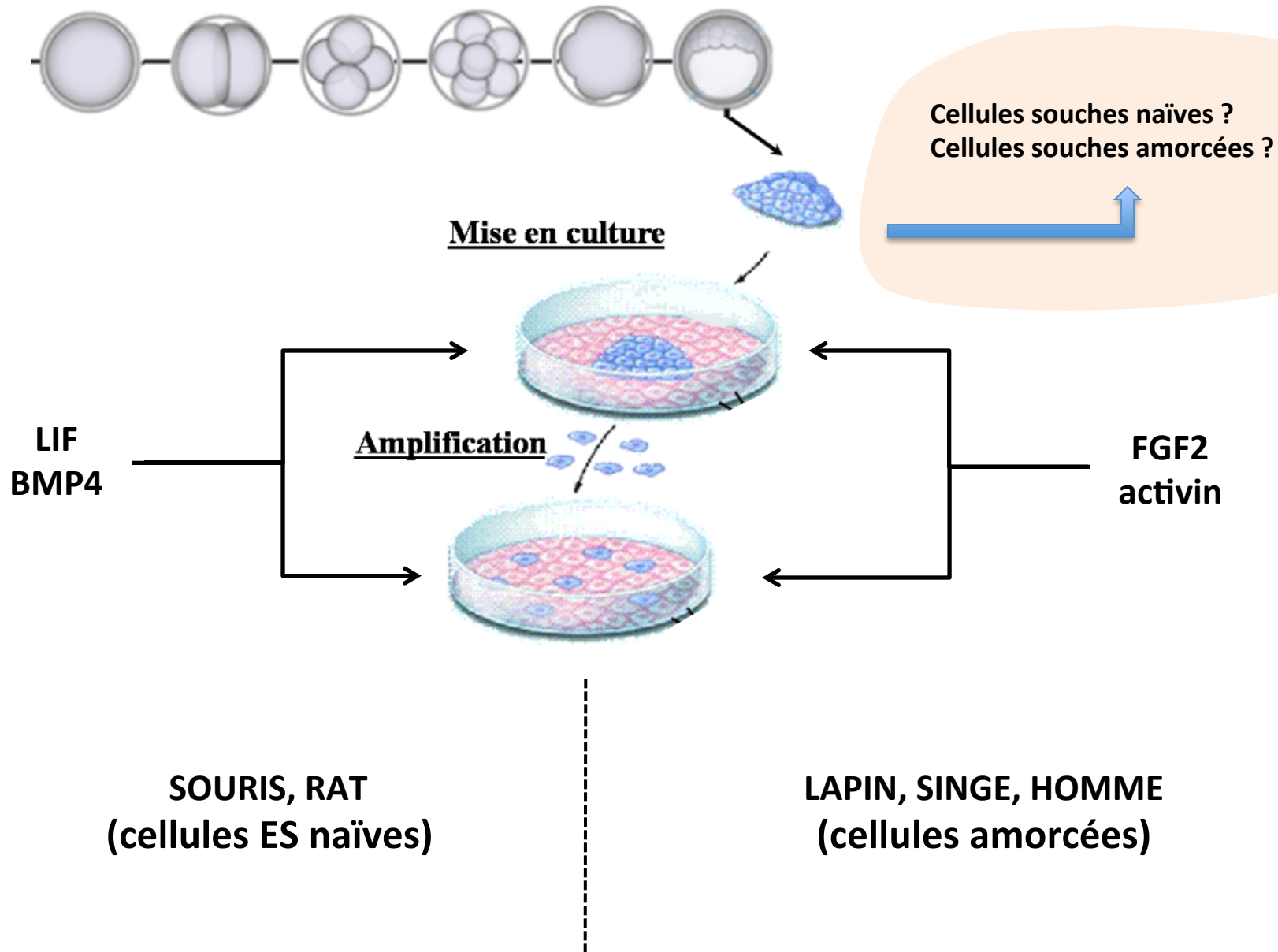
Proche des cellules EpiSC murines

LAPIN, SINGE, HOMME

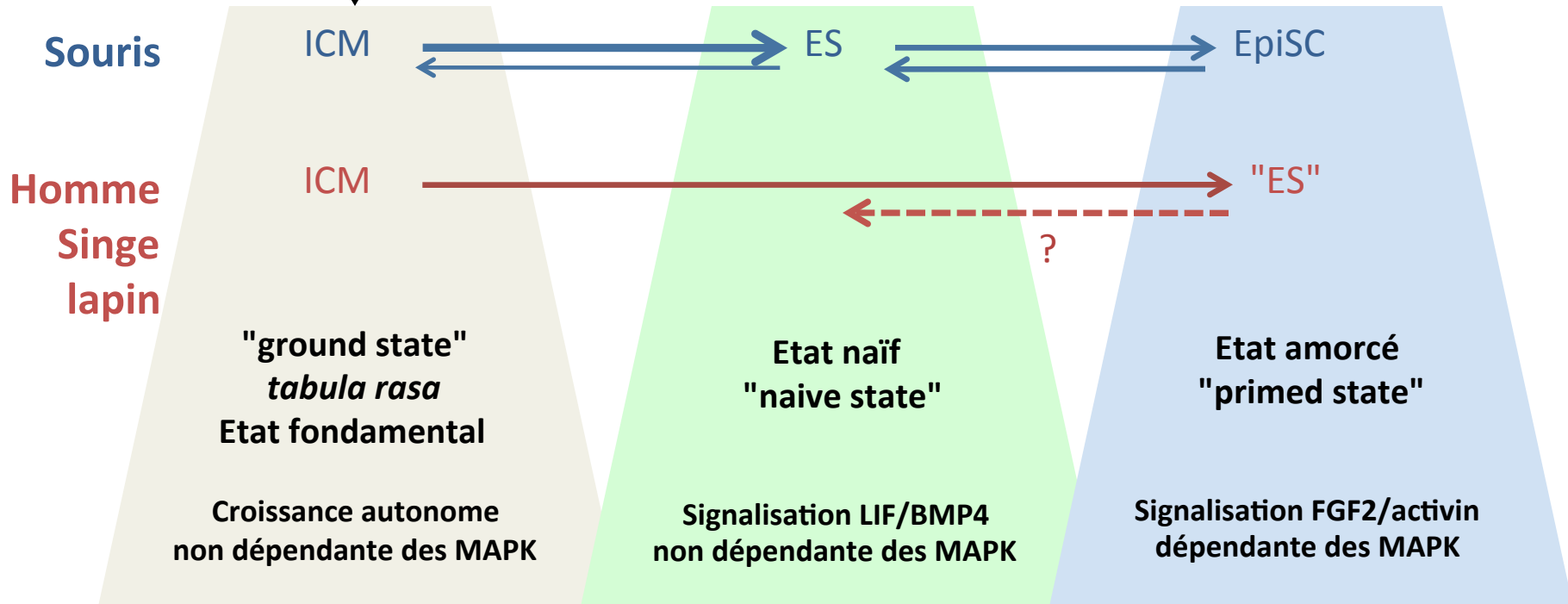
Les cellules ES et iPS non murines sont des cellules amorcées



Etat de pluripotence des cellules de l'ICM?



La pluripotence dans tous ses états



Transgénése et cellules amorcées



Cellules ES
Homme, rhesus, lapin
amorcées
(FGF2 + Activine-Smad)

Cellules iPS
Homme, rhesus, lapin
amorcées
(FGF2 + Activine-Smad)

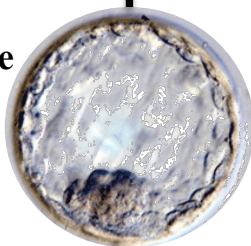
Capacité à coloniser l'embryon après micro-injection dans un blastocyste

Cellules ES de souris naïves
(LIF-Stat3)
Rex1⁺, Stella⁺, Klf2⁺, Klf4⁺

Cellules iPS de souris naïves
(LIF-Stat3)
Rex1⁺, Stella⁺, Klf2⁺, Klf4⁺

EpiSC de souris amorcées
(FGF2 + Activine-Smad)
Fgf5⁺, Tbra⁺, Sox17⁺

Blastocyste (E3.5)

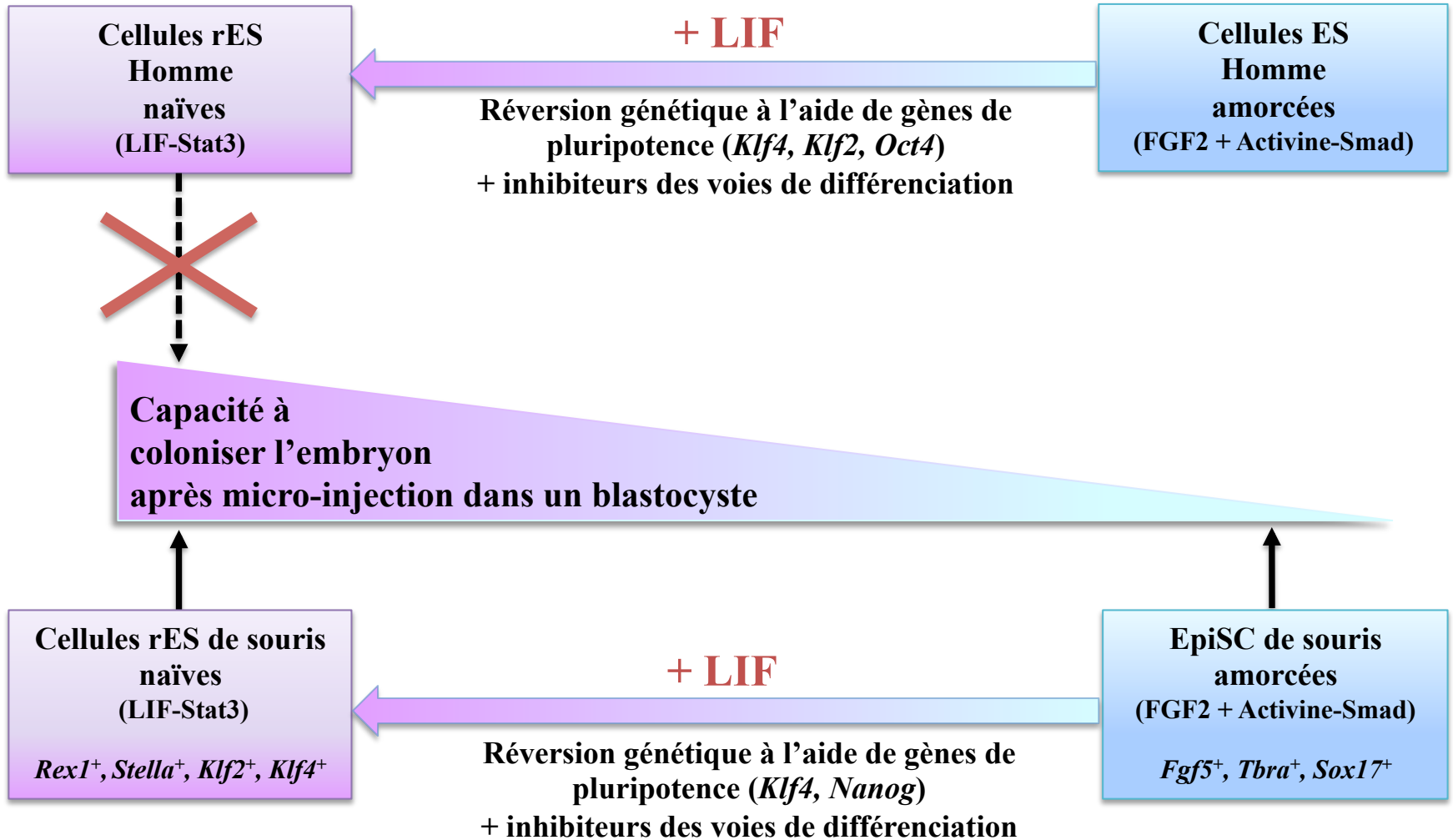


implantation

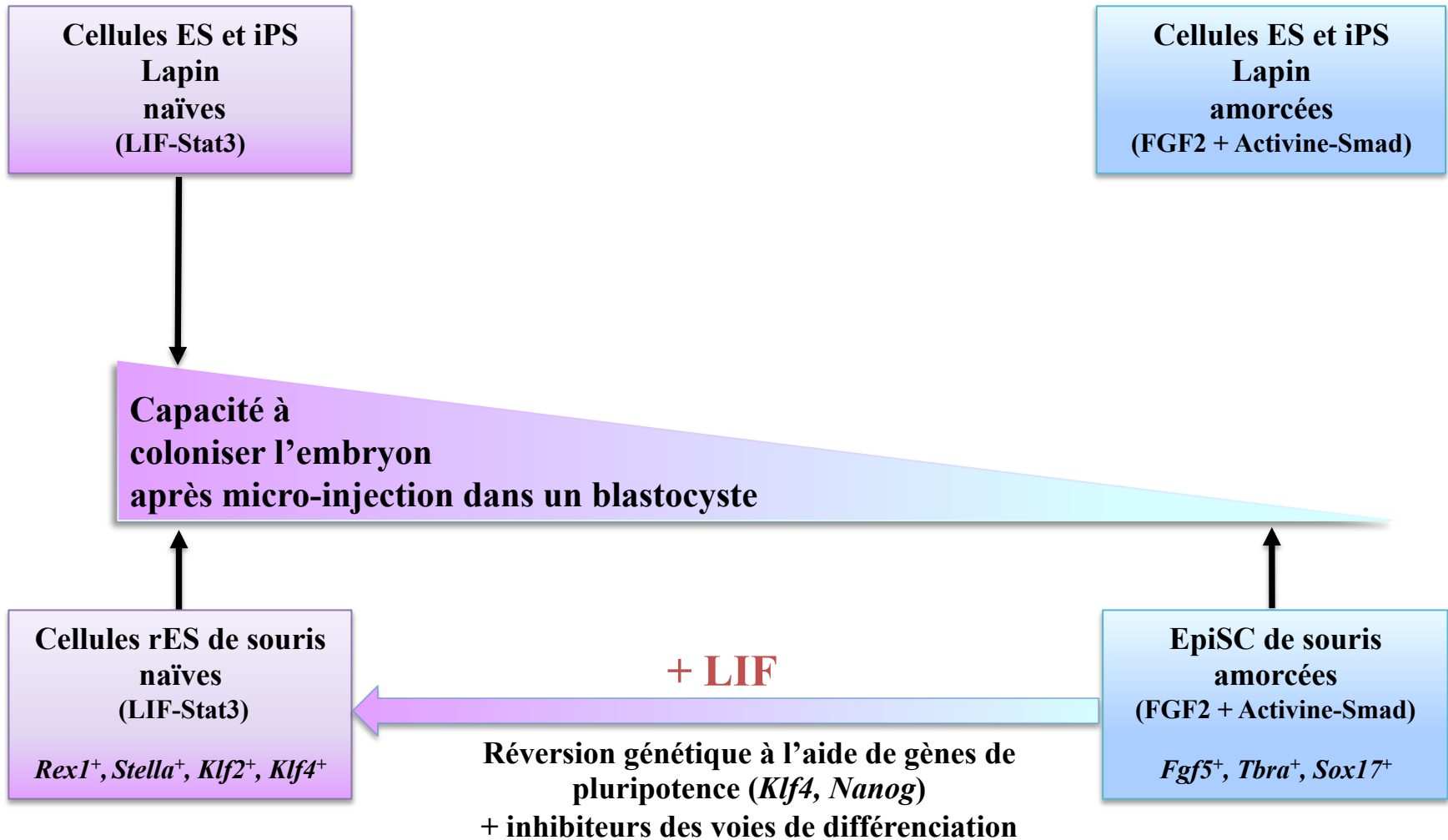


Ovocylindre (E6.5)

Réversion des cellules amorcées vers un état naïf



Réversion des cellules souches pluripotentes de lapin



Les cellules souches pluripotentes

- ✓ *Définition et propriétés des cellules souches pluripotentes:*

 - Autorenouvellement, Différenciation et Tumorigénèse*

 - Reprogrammation et Transdifférenciation*

- ✓ *Intérêts de ces cellules chez la souris:*

 - Techniques de Transgénèse*

 - Différents types de cellules souches pluripotentes*

- ✓ *Intérêts de ces cellules chez les animaux d'élevage:*

 - Techniques de dérivation des cellules ES et iPS*

 - Les différents états de pluripotence*

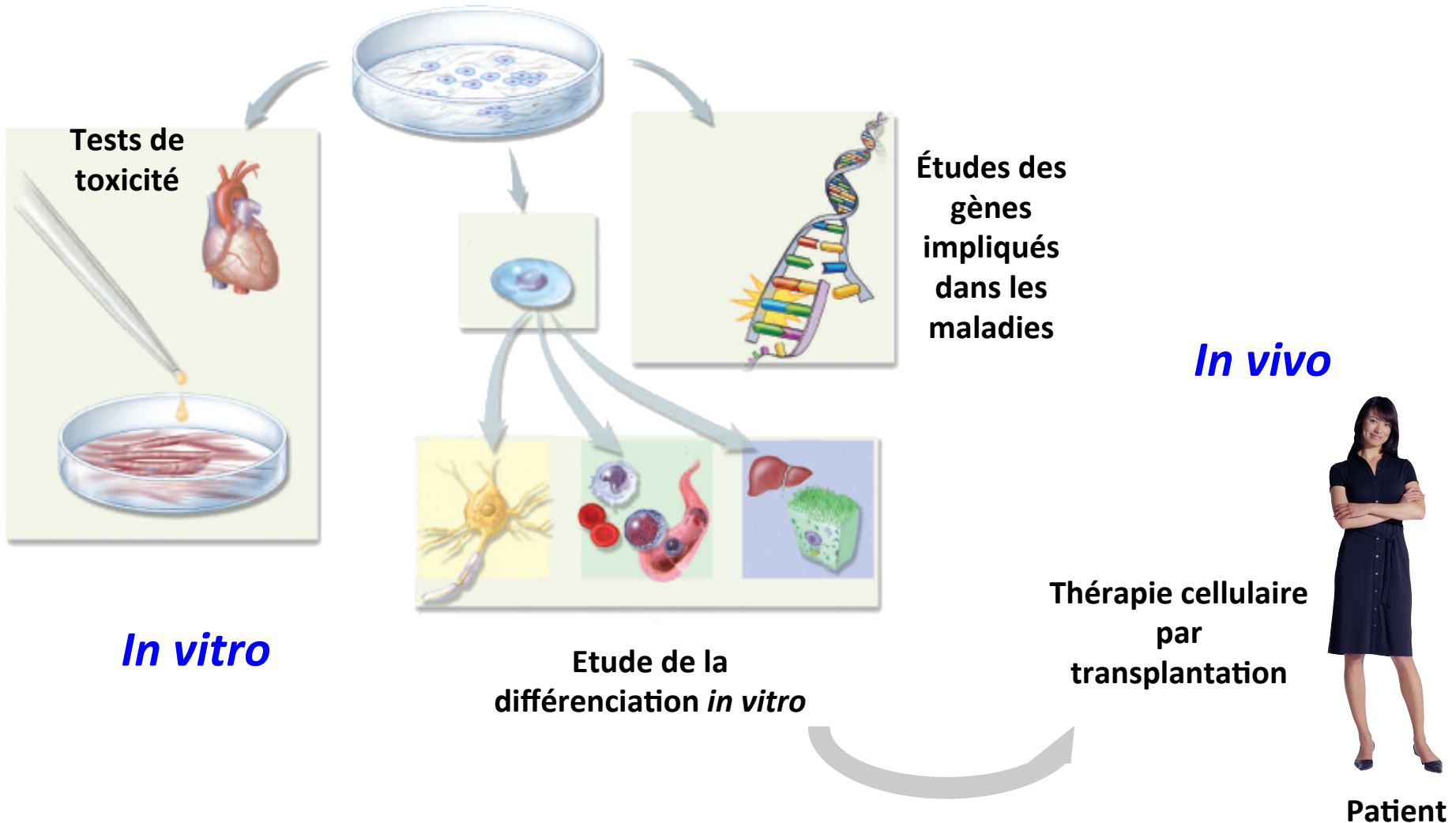
- ✓ *Intérêts de ces cellules chez l'Homme:*

 - Thérapie par remplacement cellulaire*

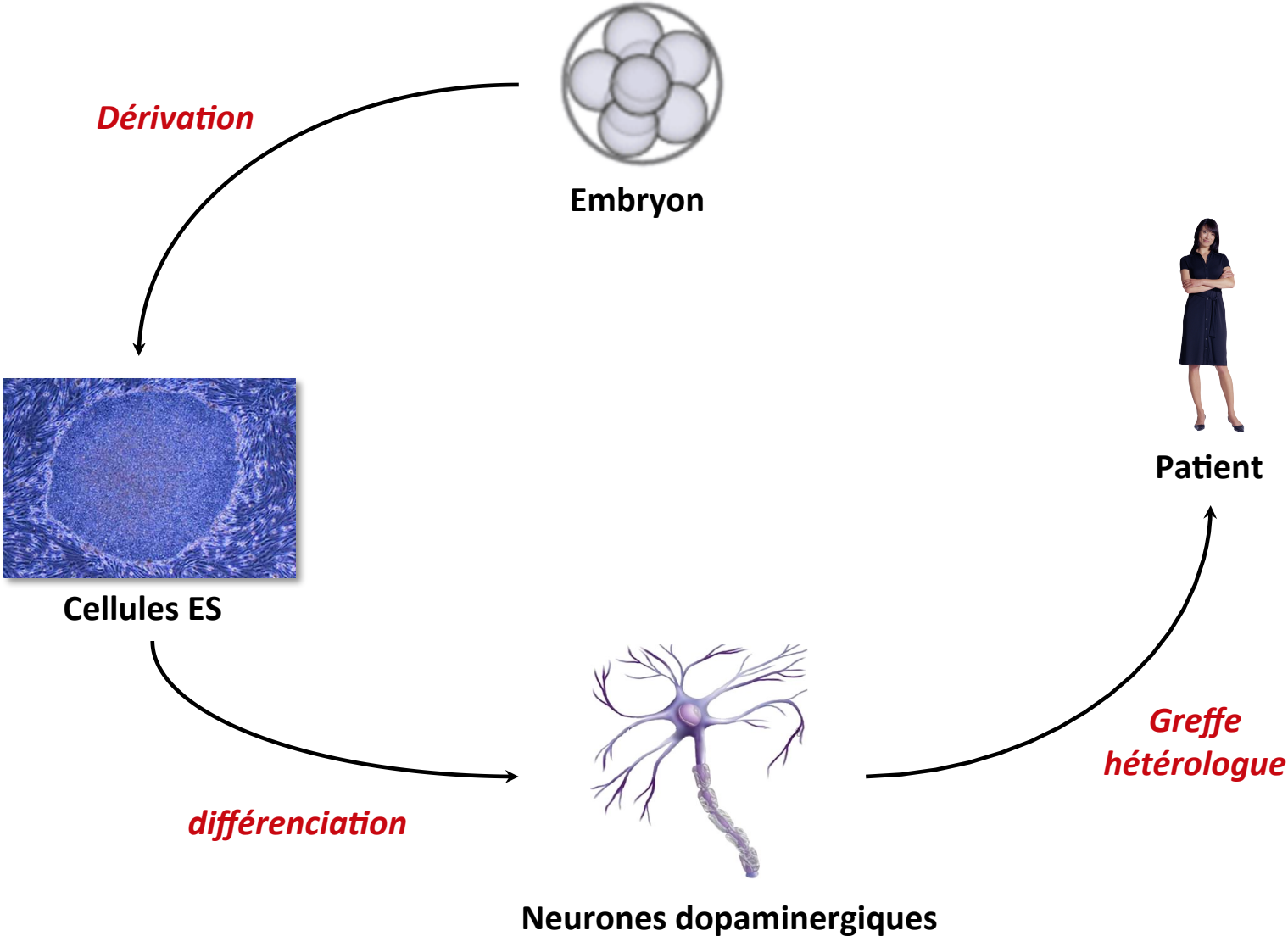
 - Clonage thérapeutique*

Intérêts des cellules souches pluripotentes: Homme

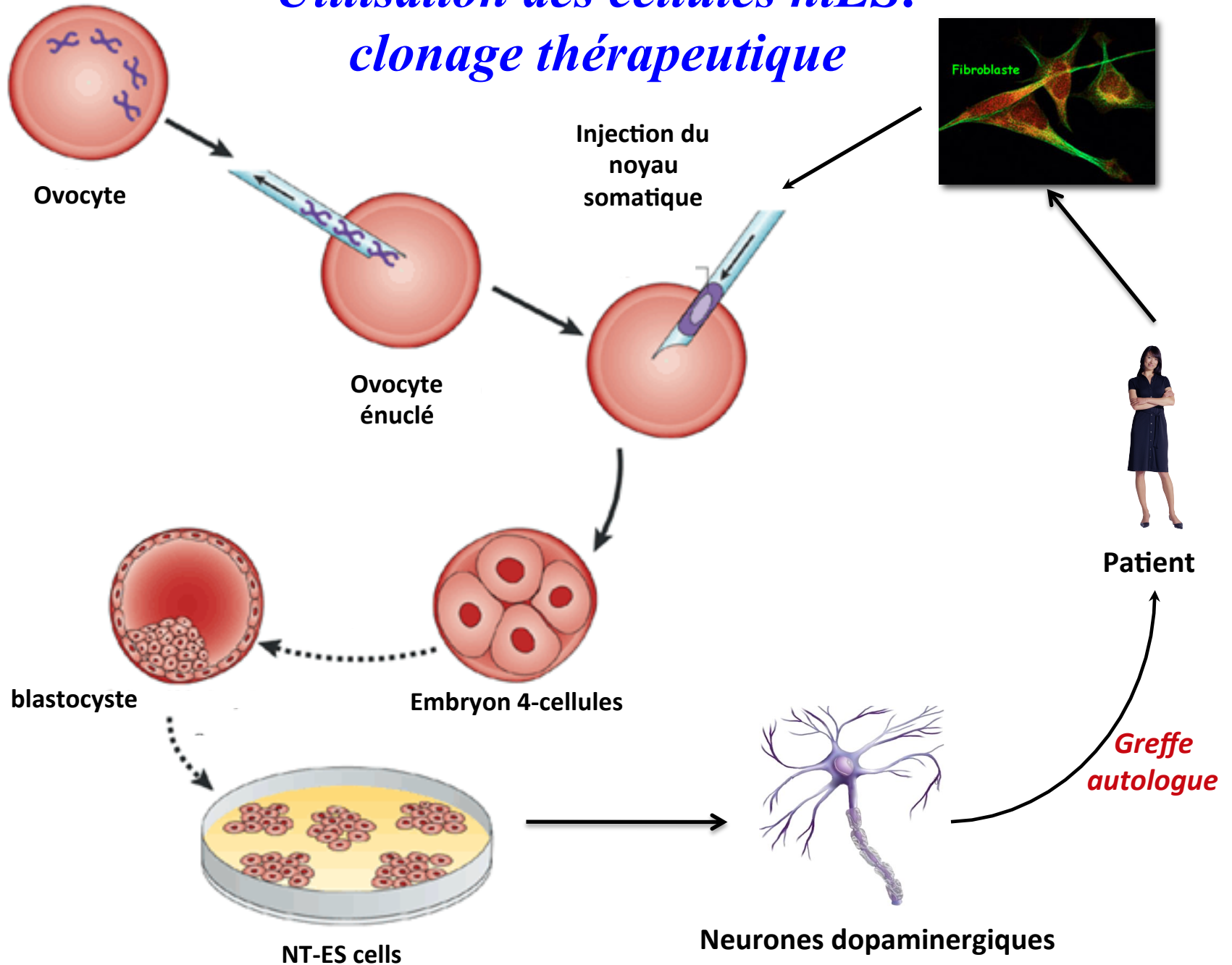
Cellules Souches Pluripotentes



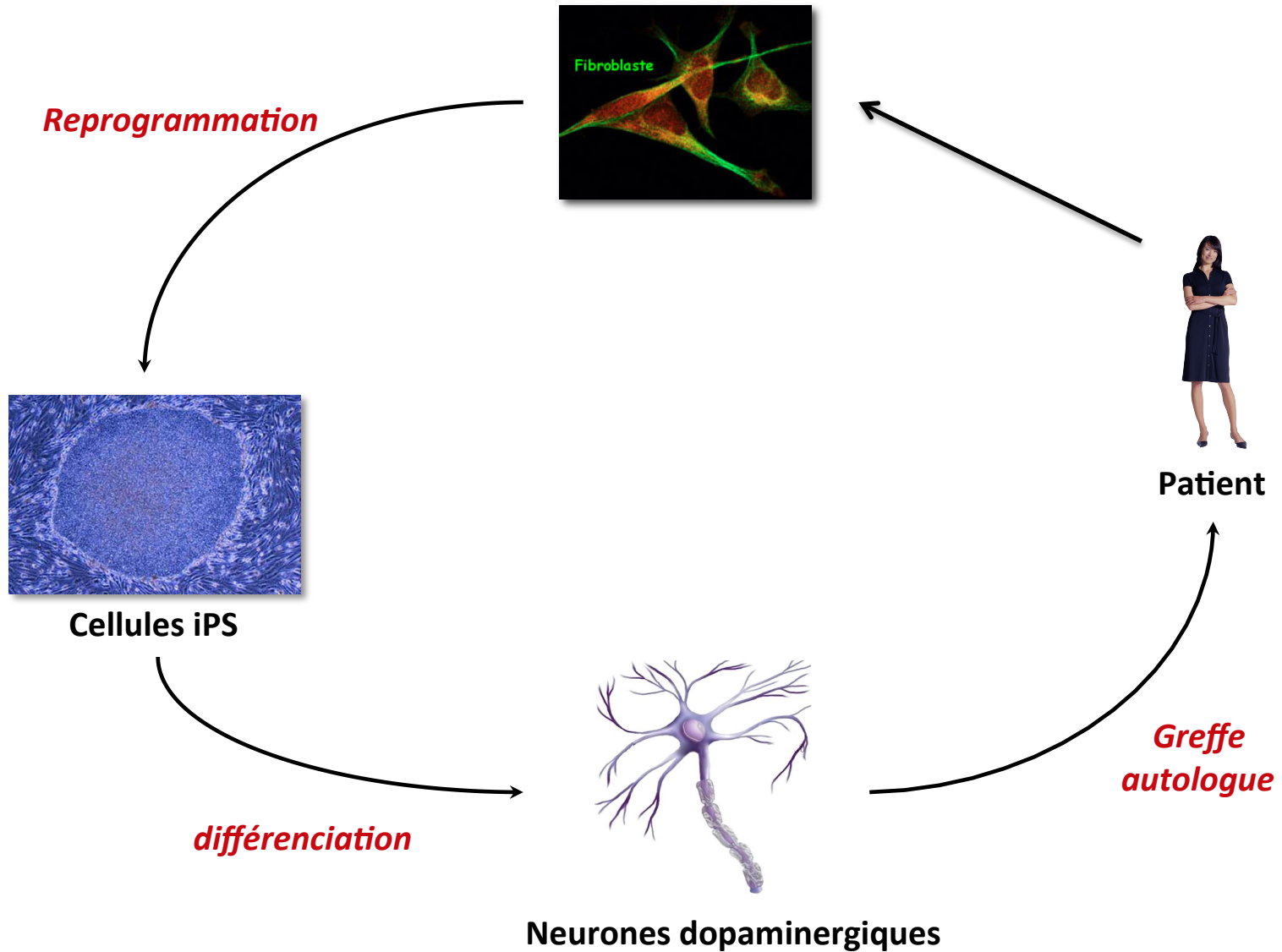
Utilisation des cellules ES: greffes hétérologues



Utilisation des cellules ntES: clonage thérapeutique



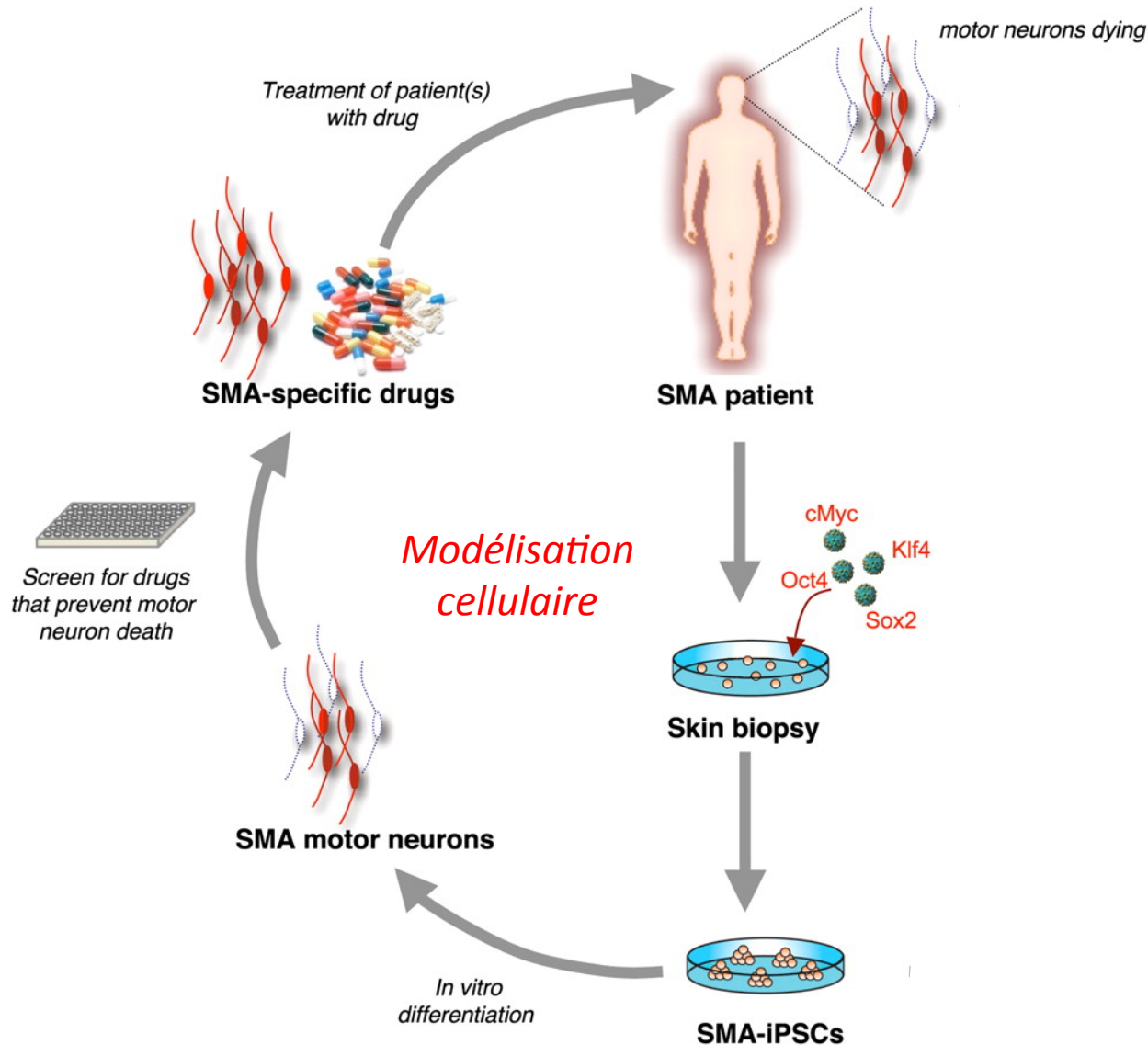
Utilisation des cellules iPS: greffes autologues



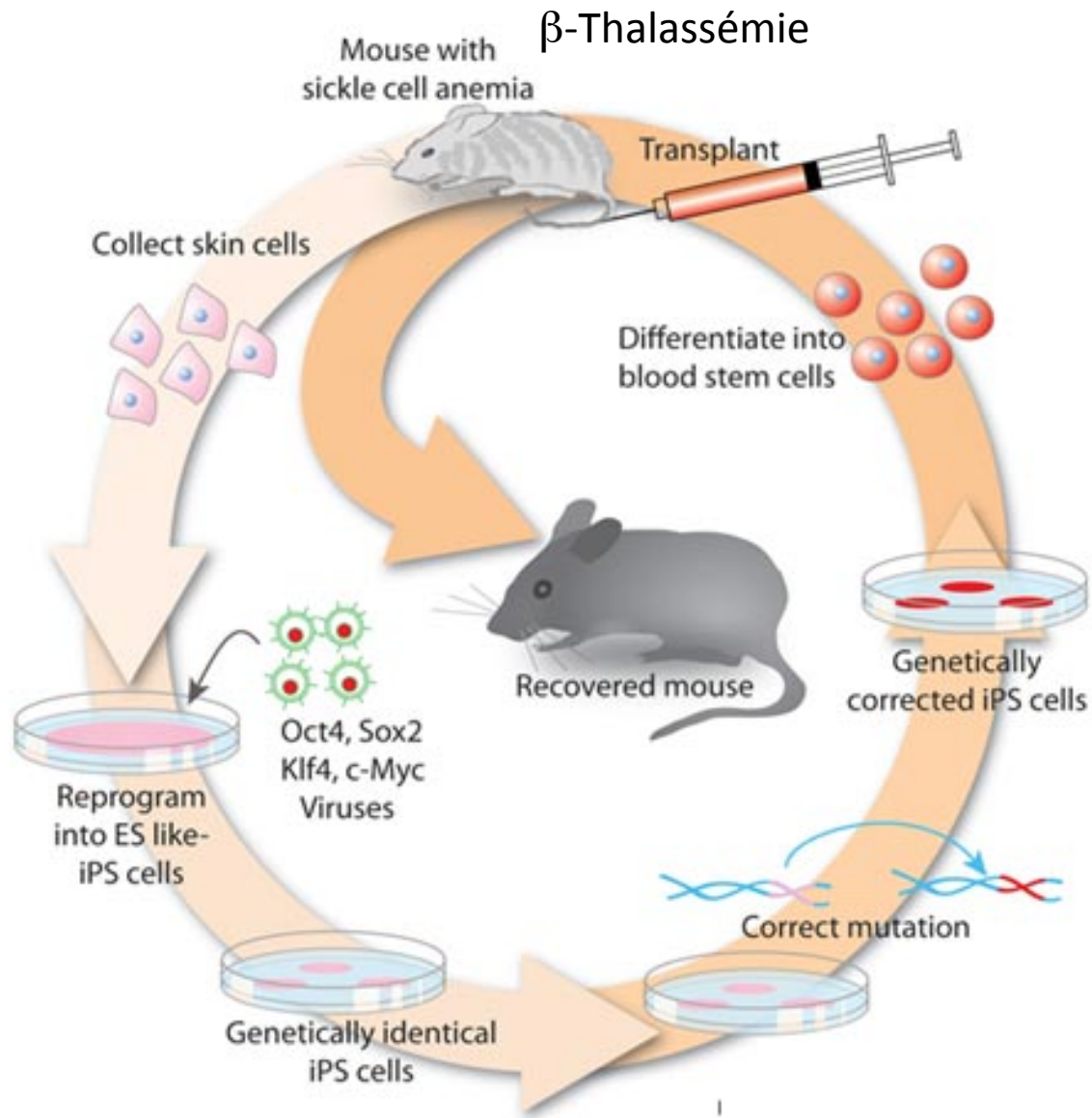
Exemple d'utilisation des cellules iPS:

SMA (Spinal Muscular Atrophy)

dégénérescence des neurones moteurs dues à une mutation du gène SMN

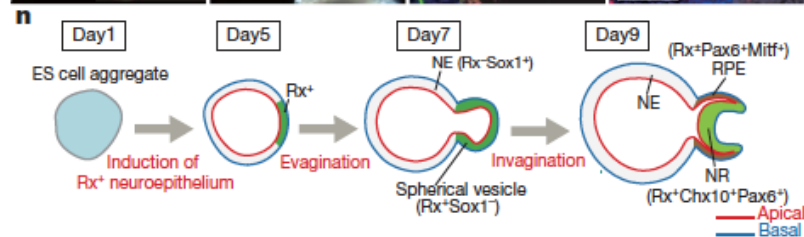
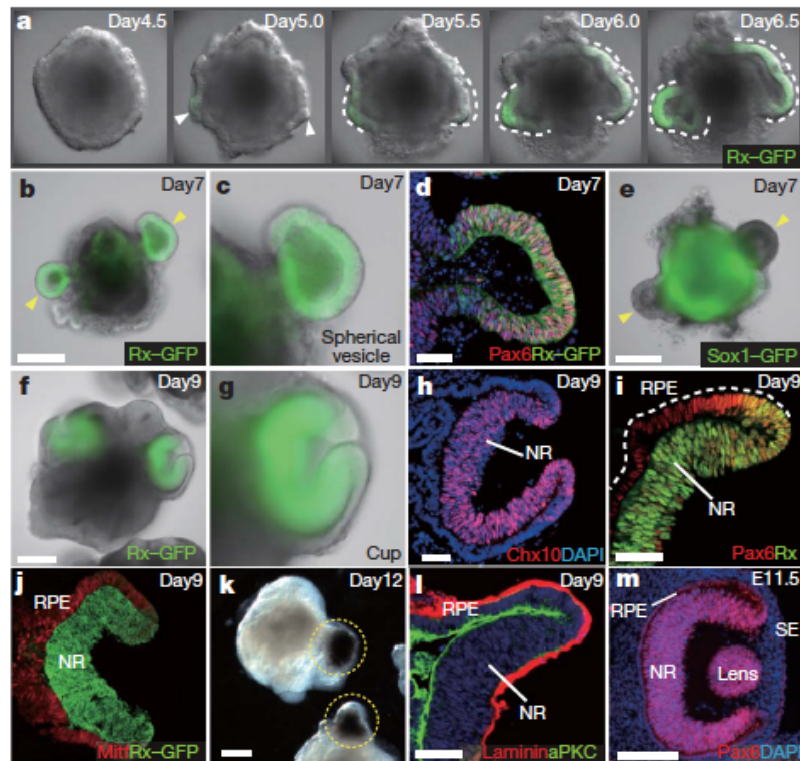


Modèle de thérapie cellulaire et génique



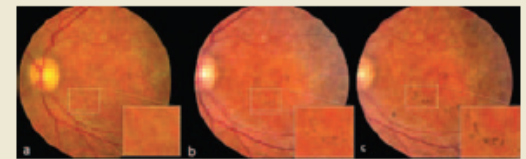
Les avancées récentes dans le monde des ESCs

Formation *in vitro* de rétines
 → Premier essais clinique



ES cell therapy in two patients with eye disease

Preliminary data from two ongoing trials that aim to assess the safety of transplantation

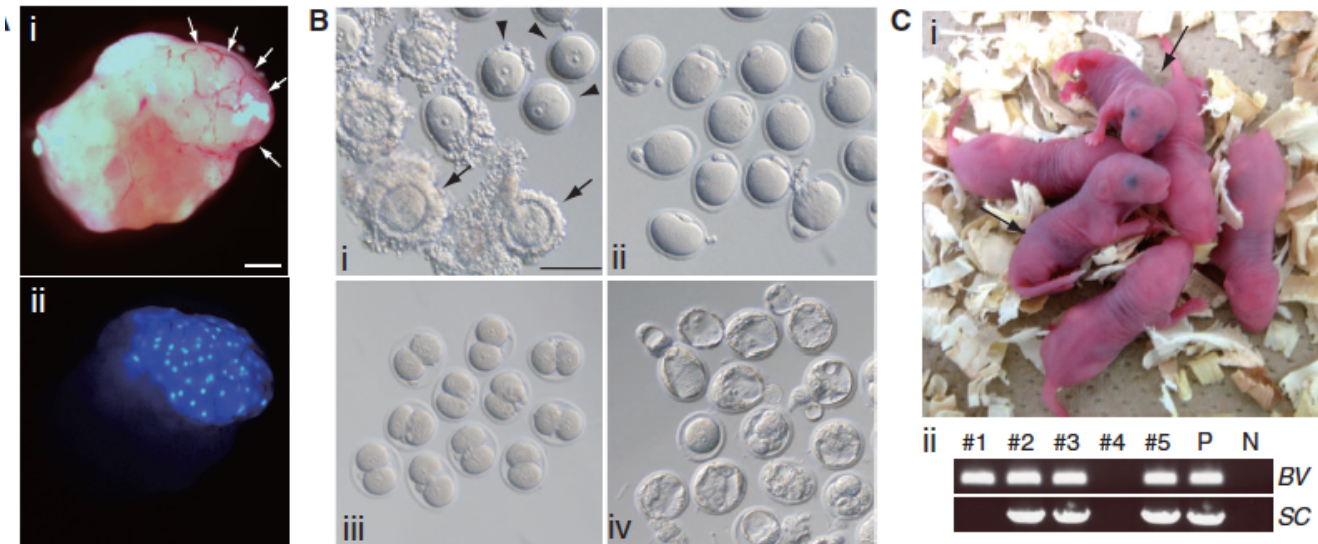
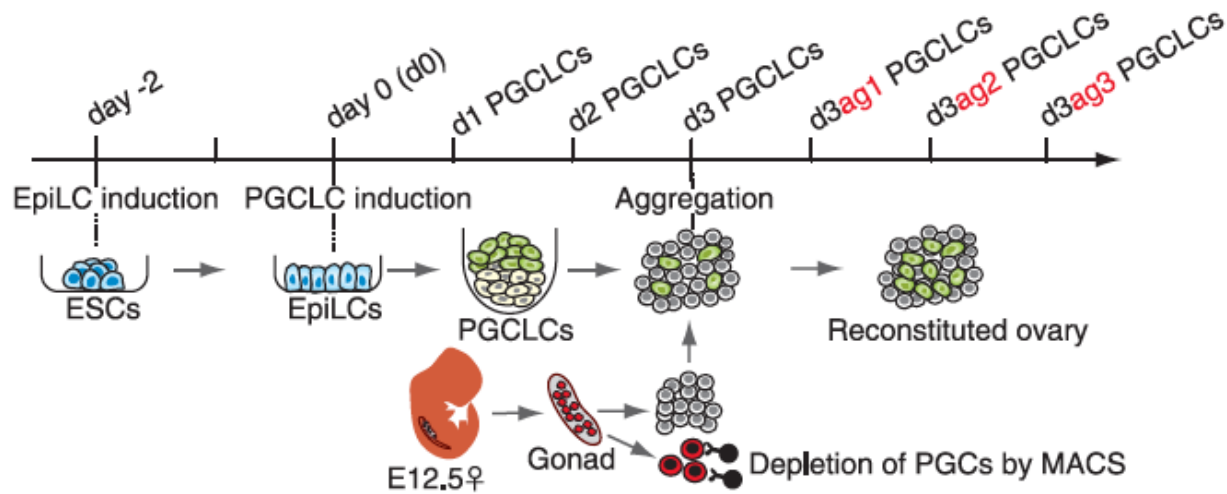


of human embryonic stem cells (hESCs) into human eyes to treat blindness are encouraging, according to Schwartz *et al.* One trial is for age-related macular degeneration, the other is for Stargardt's macular dystrophy (SMD). The researchers prepared differentiated hESC-derived retinal pigmented epithelial (RPE) cells and tested them preclinically by transplantation into rat retinas to ensure the hESC-RPEs were pure and did not form teratomas. The stage of hESC-RPE differentiation mattered: cells with less melanin engrafted more efficiently than those with more melanin and were judged suitable for testing in humans. Two patients (one from each trial; each trial will eventually enroll 12 patients) had 50,000 hESC-RPEs transplanted into a part of one retina where degeneration was incomplete. Outcomes measured included demonstration of successful engraftment of hESC-RPEs, but only in the patient with SMD. At 4 months after engraftment, neither patient had any adverse outcomes, such as hyperproliferation, transplant rejection or teratoma. Both phase 1/2 trials will also assess clinical endpoints, such as visual acuity, for future efficacy trials. The trials will be fully enrolled in 2012, but pivotal phase 3 trials will then be needed to evaluate whether hESC-RPEs can improve clinical outcomes. (*Lancet*, doi:10.1016/S0140-6736(12)60028-2, published online 24 January 2012)

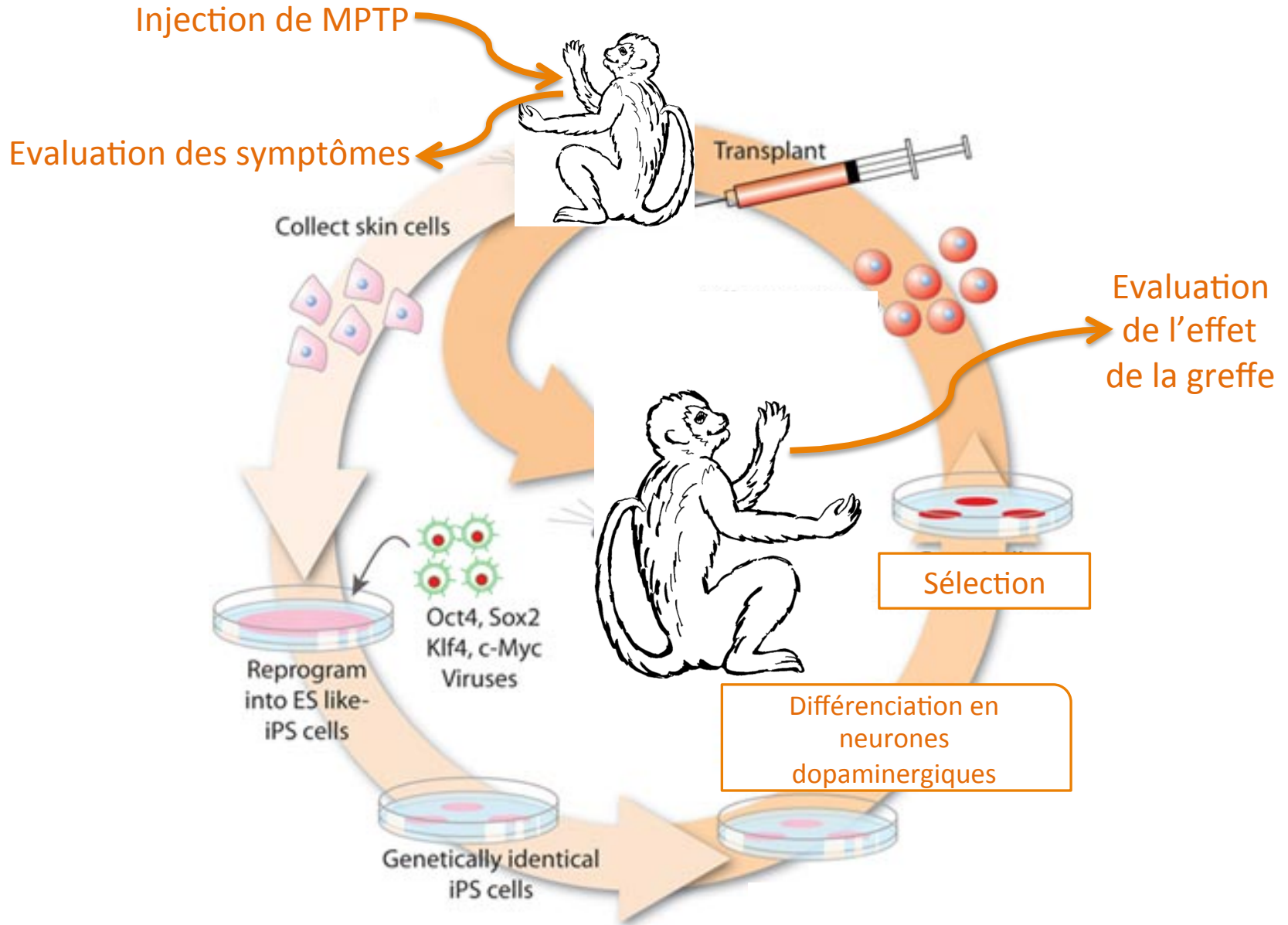
Les avancées récentes dans le monde des ESCs

Différentiation *in vitro* de spermatozoïdes et d'ovocytes

➔ application en reproduction humaine



Modèle de thérapie cellulaire chez le singe parkinsonien



Conclusion

Cellules souches pluripotentes

=

Puissants outils biotechnologiques

Enormes espoirs thérapeutiques

?

Obtention de cellules naïves chez des espèces non murines

Maîtrise des processus de différenciation et de sélection

Contrôle des mécanismes de reprogrammation

Merci

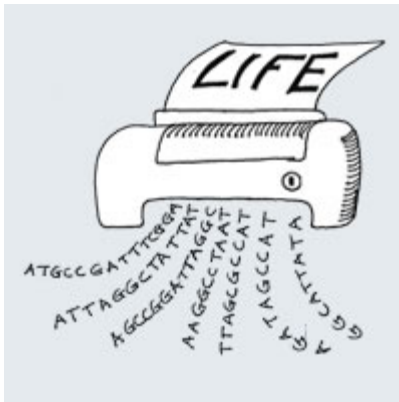


L'épigénétique

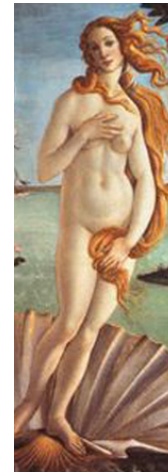
- ✓ *Définition*
- ✓ *Organisation de la chromatine*
- ✓ *Méthylation de l'ADN*
- ✓ *Les gènes soumis à empreinte*
- ✓ *Mise en place de l'empreinte parentale*
- ✓ *Recherche des modifications épigénétiques*
dans le projet transversal

« Régulations épigénétiques de l'expression des gènes »

2001 : **Séquençage** complet du génome humain, les secrets de l'héritabilité dévoilés NATURE VOL 409 | 15 FEBRUARY 2001 |



2007 : **ENCODE** ...



..... mais l'accès à l'information génétique seule ne permet pas de comprendre l'ensemble des caractères individuels observables et les maladies.

Qu'est ce que l'épigénétisme ?



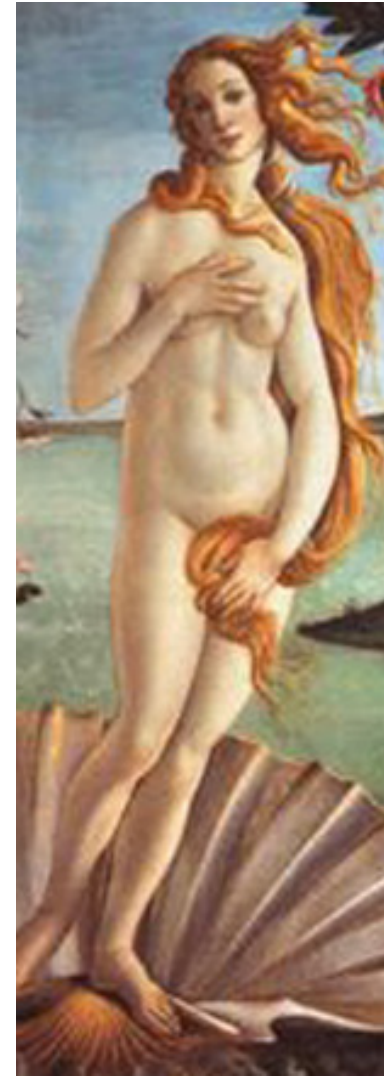
Zygote

Modifications épigénétiques



Modifications **transmissibles** et **réversibles de l'expression des gènes** qui ne s'accompagnent pas de modification de la séquence d'ADN et qui sont transmissible d'une cellule mère à une cellule fille .

Wolff et al., 1998



Pathologies associées à des anomalies épigénétiques chez l'homme :

Cancers : colon, ovaire, foie ...

Syndromes : Beckwith-Wiedman, Prader Willi, Angelman et Silver Russel

Maladies métaboliques : ostéodystrophie, diabètes etc...

Maladies psychiques : autisme....



- A. macroglossie (89%)
- B. hernie ombilicale (78%)

Beckwith-Wiedman

L'épigénétique

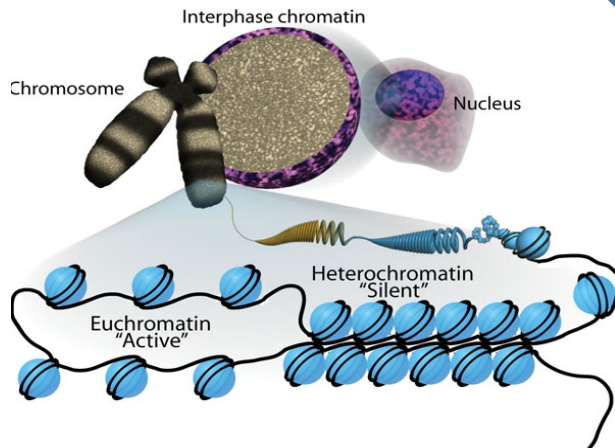
- ✓ *Définition*
- ✓ *Organisation de la chromatine*
- ✓ *Méthylation de l'ADN*
- ✓ *Les gènes soumis à empreinte*
- ✓ *Mise en place de l'empreinte parentale*
- ✓ *Recherche des modifications épigénétiques*
dans le projet transversal

Les fonctions du génome dépendent de la structure de la chromatine.

Modifications épigénétiques

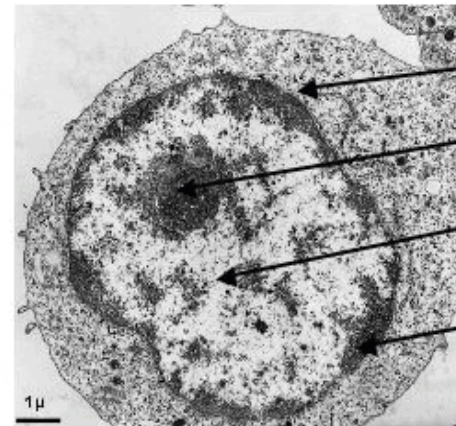


Modification de la structure de la chromatine



Euchromatine
active

Hétérochromatine
non active



Enveloppe nucléaire

Nucléole

Euchromatine
(centrale)

Hétérochromatine
(périphérique)

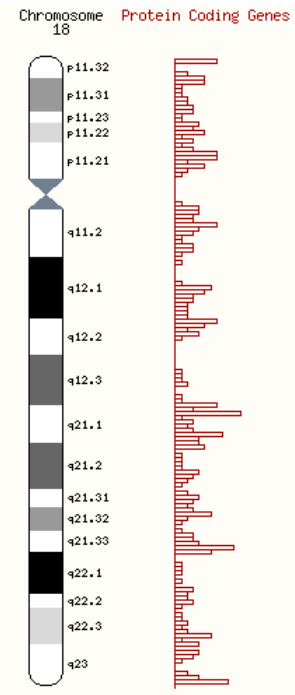


Régulation de l'expression des gènes

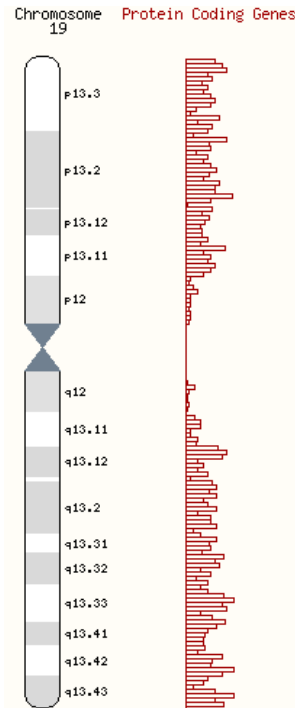
La chromatine est organisée en domaines dans les cellules différenciées

Génome humain : 28 000 gènes
1% du génome codant.

Chr. 19 = rouge
Chr. 18 = Vert

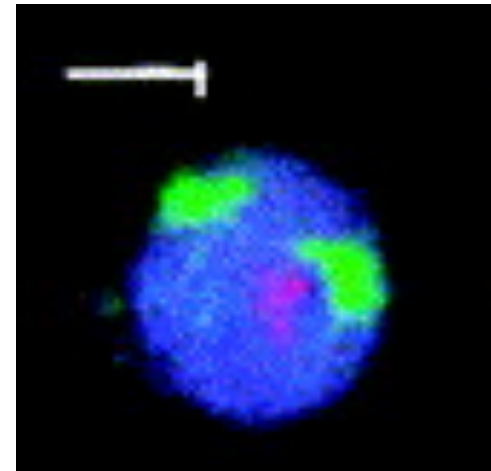


Chr 18 78,077,248 pb
290 séquences codantes



Chr 19 59,128,983 pb
960 séquences codantes

Noyau d'un lymphocyte humain / FISH



Les chromosomes riches en gènes (chr.19) se localisent dans la région centrale du noyau.

Tanabe et al, 2002 Mutation Research

A quel moment dans le développement se met en place l'organisation des chromosomes en domaines ?

Bovin
Lapin

Activation du génome du zygote

Transcrits maternels

B Human



Zygote



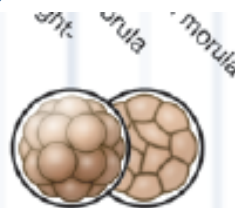
Two-cell



Four-cell



Eight-cell

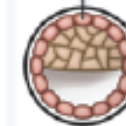


Sixteen-cell morula
Compacted sixteen-cell morula



Thirty-two-cell morula

Partially Cdx2-positive



Early blastocyst

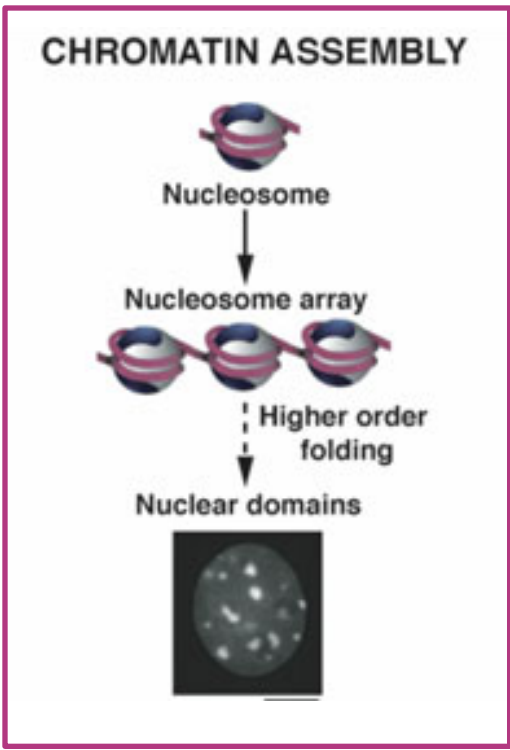
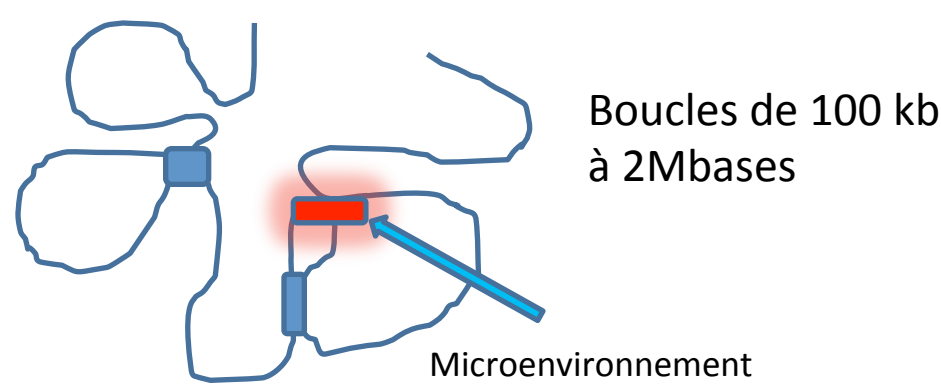
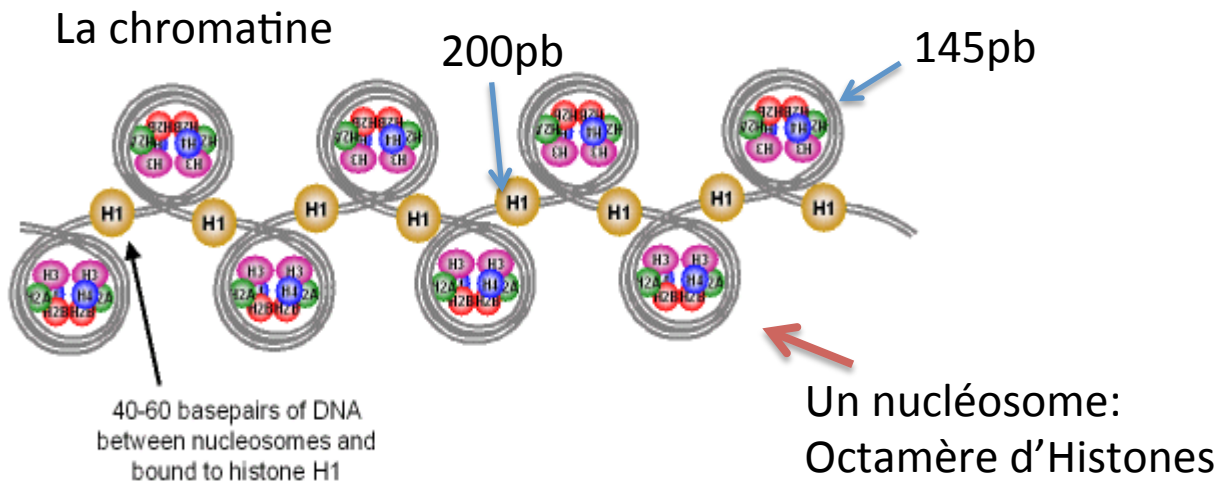


Blastocele cavity

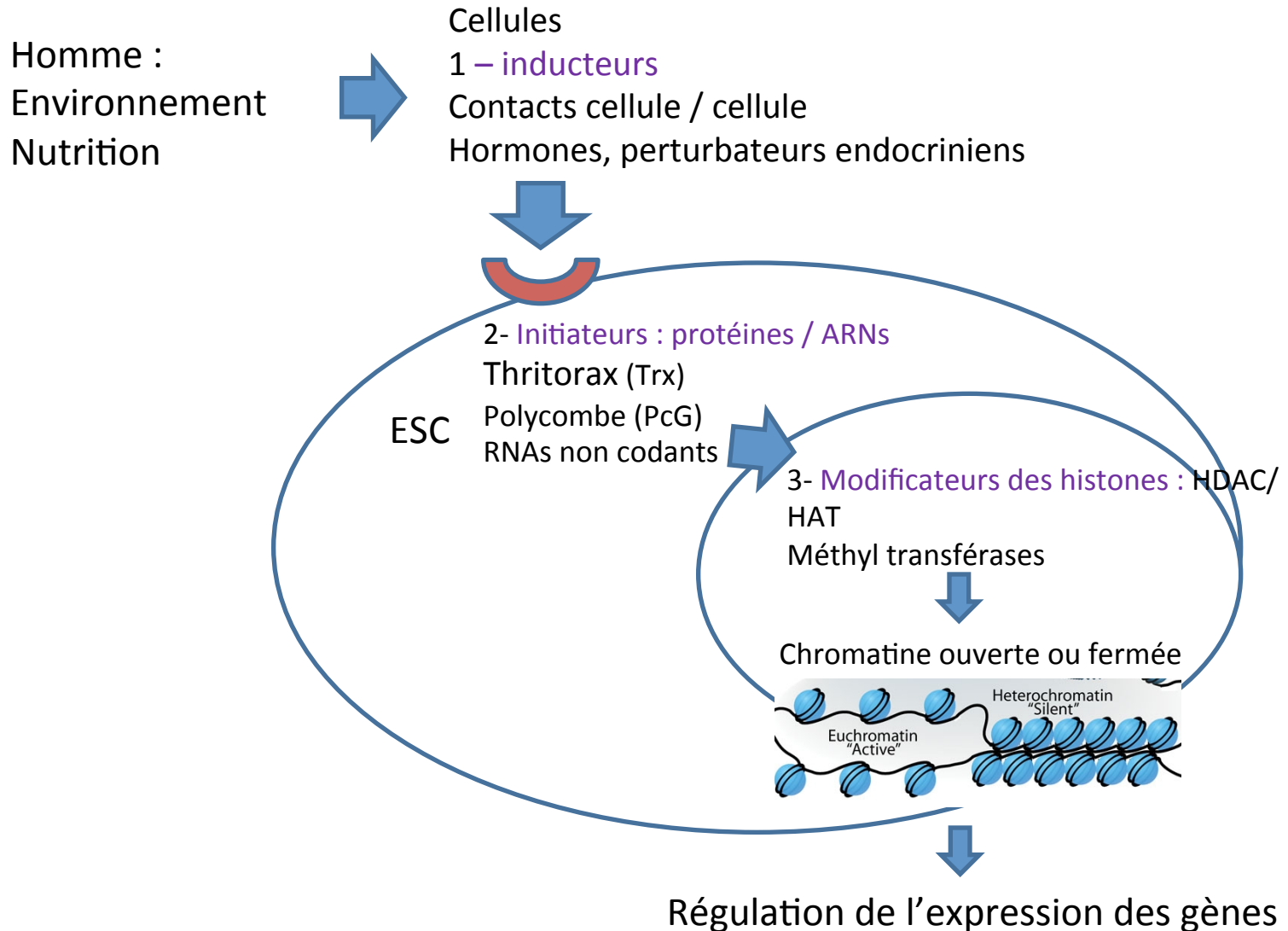
Late blastocyst

Lien entre la structure de la chromatine et la transcription du génome
L'organisation de la chromatine change en fonction du type cellulaire

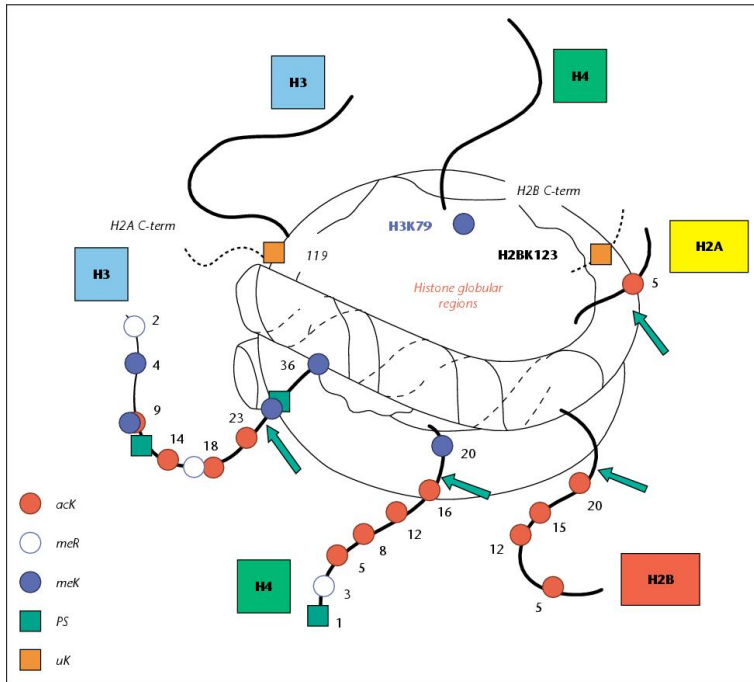
Importance du contexte chromatinien dans la régulation de l'expression des gènes.



La structure de la chromatine dépend des modifications chimiques des protéines histones.



Les modifications post-traductionnelles de la séquence N-terminale des histones régulent l'état de condensation de la chromatine (structure colloïdale).

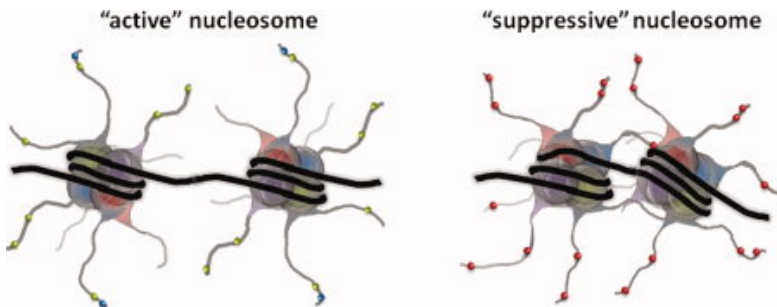


Le nucléosome est chargé –
La séquence N-ter. des histones est chargée + => compaction en présence de cations. L'interaction entre nucléosomes voisins va dépendre de la charge globale portée par la queue des histones. Rôle sur la compaction de la chromatine et sur l'activité transcriptionnelle de la cellule.

Modifications post-traductionnelles :
Acétylation (neutralisation des charges + = relâchement) HAT / HDAC

Méthylation
Phosphorylation

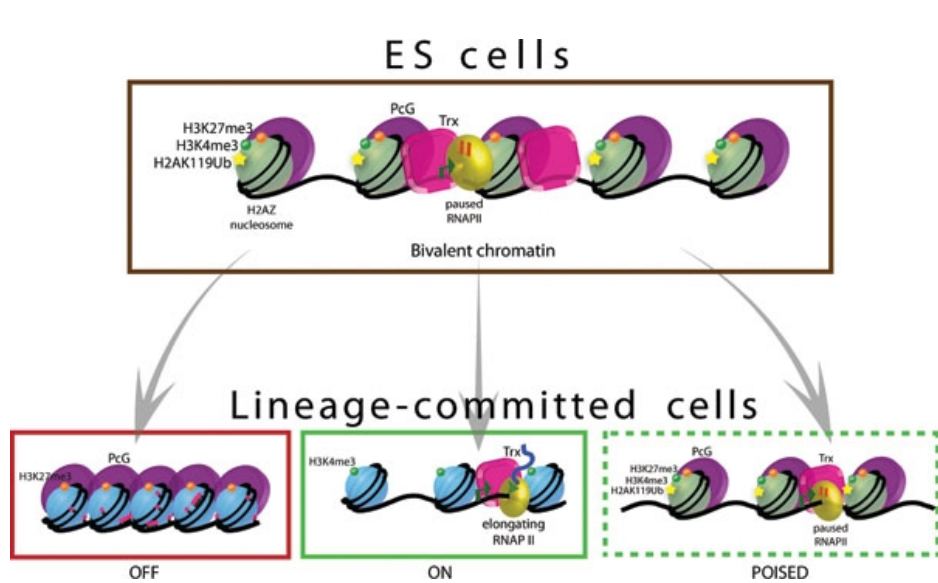
Ubiquitylation
Sumoylation



« Code histone » plus de 10 000 combinaisons possibles, une quinzaine ont été identifiées (9 marques d'histone). (Ernst et al., 2011)

Nombre limité d'état chromatinien. Equilibre compétitif entre domaines exprimés et réprimés.

Méthylation de l'histone H3 dans les régions promotrices des ES et des iPS.



Polycombe
H3K27me3



Trithorax
H3K4me3



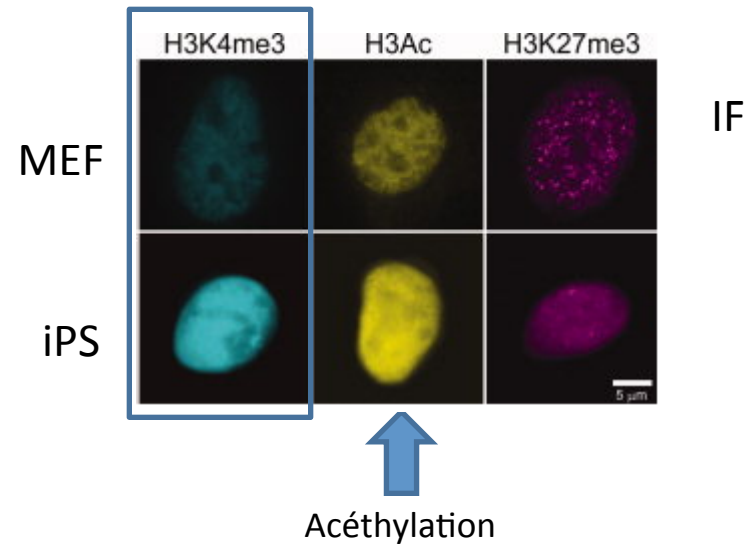
Gènes Oct4, Nanog, Sox2 transcrits.

Bivalents



Bivalents : **H3K27me3** + **H3K4me3**

présents dans les régions promotrices des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire. Répression dans les ES.



Dans les ES et iPS, la chromatine est sous forme de euchromatine : ouverte acétylée => transcription active.

L'épigénétique

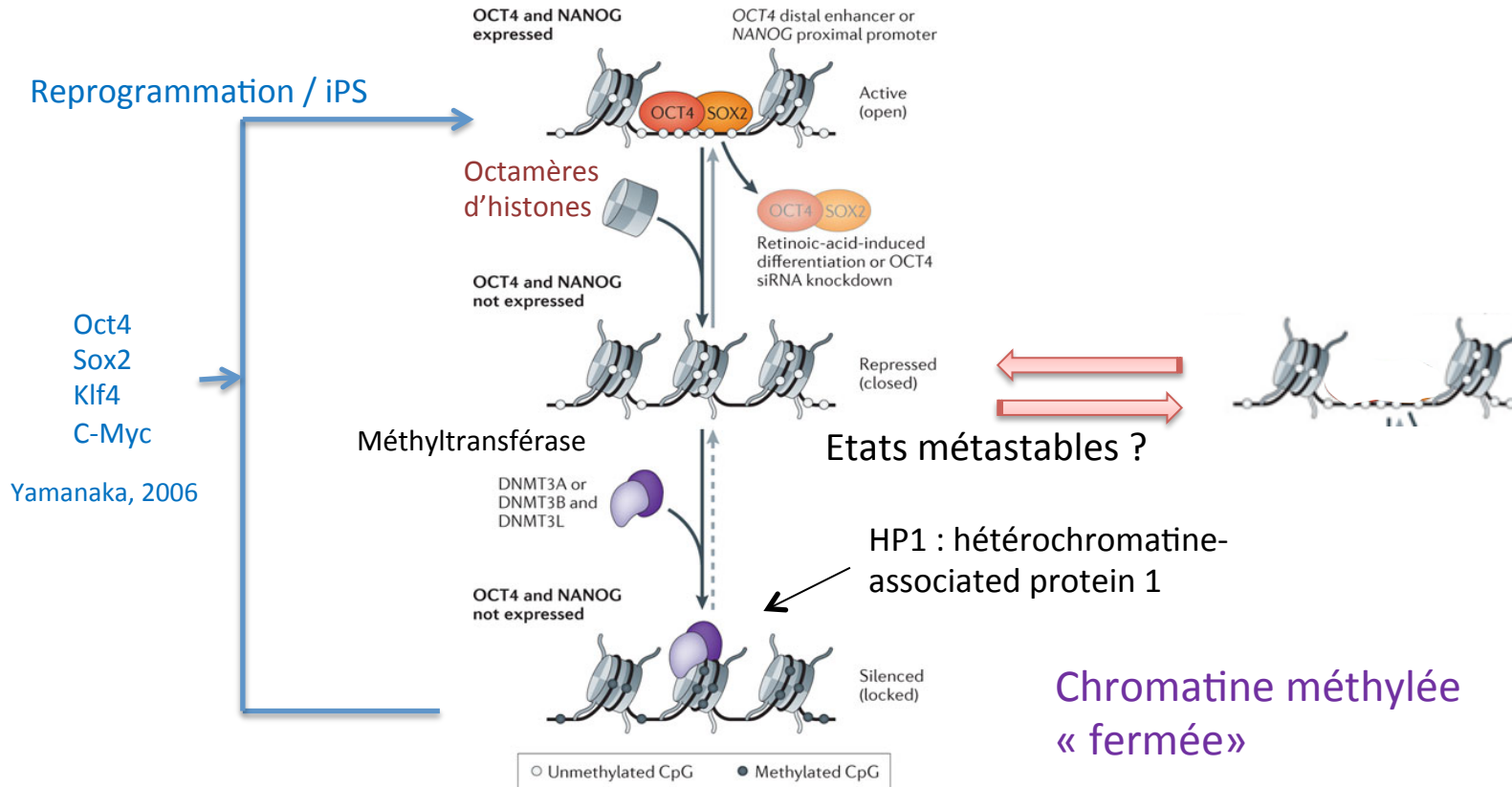
- ✓ *Définition*
- ✓ *Organisation de la chromatine*
- ✓ *Méthylation de l'ADN*
- ✓ *Les gènes soumis à empreinte*
- ✓ *Mise en place de l'empreinte parentale*
- ✓ *Recherche des modifications épigénétiques*
dans le projet transversal

Rôle des nucléosomes dans la mise en place de la méthylation de l'ADN au cours de la différenciation.

Dans les ESC :

Enhancer distal (CR4) de Oct4
Promoteur proximal de Nanog

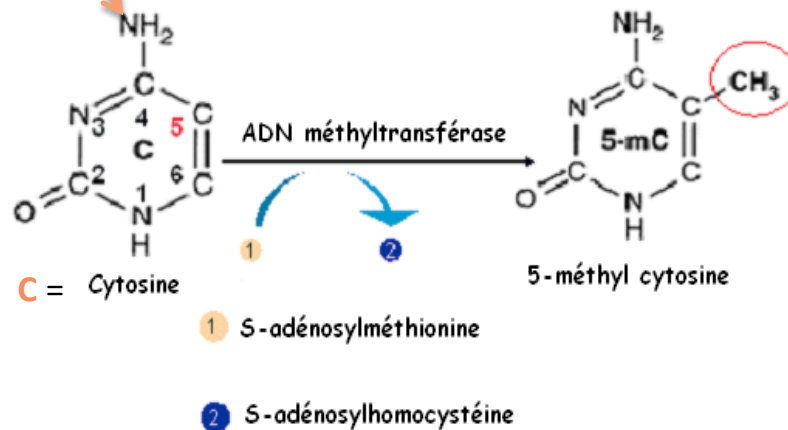
Chromatine non méthylée
« ouverte »



Chromatine méthylée
« fermée »

Promoteur proximal du gène Nanog chez le lapin.

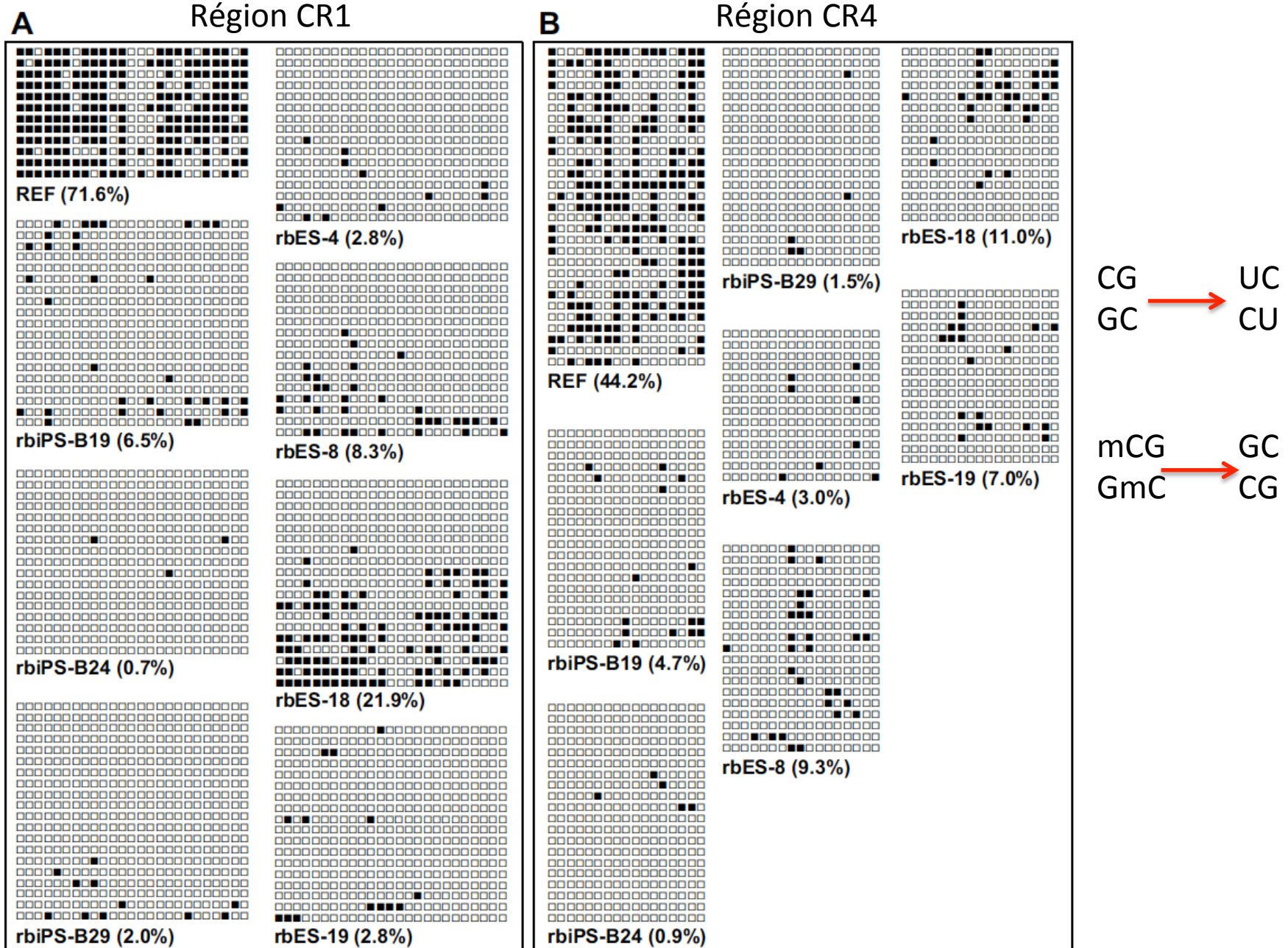
TGGGG**CG**CTGCCTGGAGGGG**CG**GGTCCAGGGTGTGATAGAGTCTTCAAATAAATCTAGAGACTCTAAAGCTT**CG**
CGCTATTGC**CG**GGTTGCACTGGCTGCCTTCTGTTATTGA**CG**GGGGATCCTGTACTTTTTCTGTCTTTTCTGATCATT
TGACCTCTGCAAAACTTCCATTTTCTCCAAGACCTT**CG**CCTGCTTGTTAATTCTTAAAGTCAGTCTTGTTACAGTCA
GTCCTTGAATTGCTTTTACCCCTTCTCAATAAC**ATG**AGTGTGGATCCAGCTTGTCCAGCAAGTCTACCAGCCTCA
GAAG



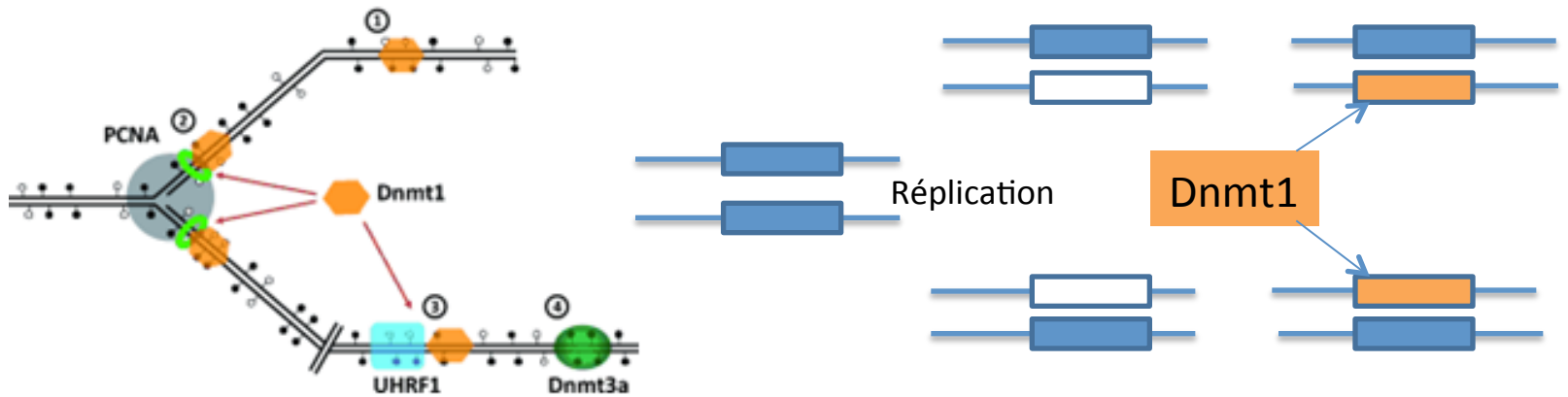
- Cible les dinucléotides **CpG** dans des « ilots » situés dans les promoteurs des gènes.
- La méthylation de l'ADN stabilise l'ADN non transcrit.

Méthylation des régions enhanceur du promoteur du gène Oct4 chez le lapin.

Séquençage génomique après mutagénèse au bisulfite



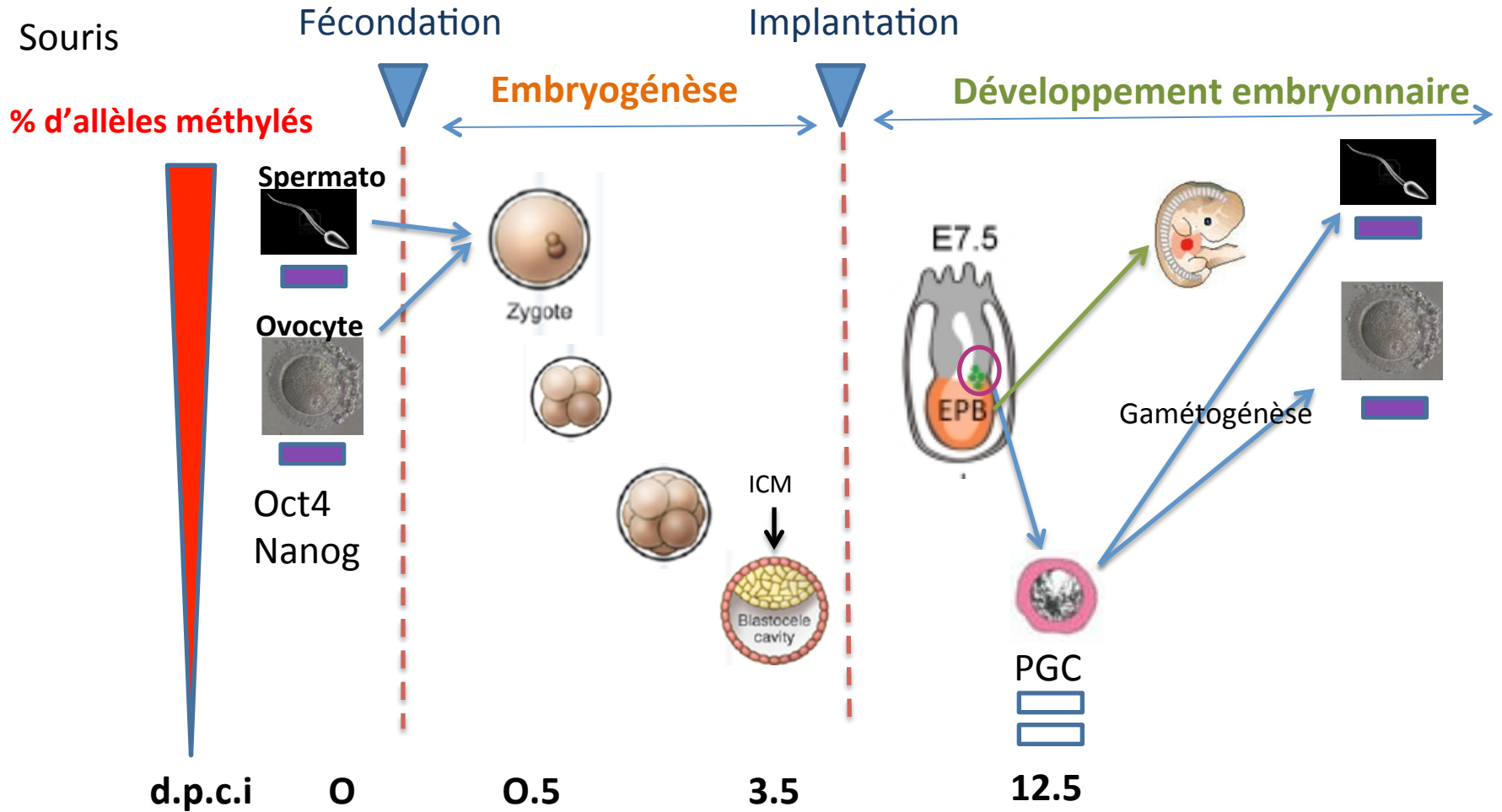
Héritabilité de la méthylation des îlots CpG de l'ADN au cours des divisions cellulaires : conservation indispensable à la constitution de tissus homogènes au cours du développement.



Jurkowska et al., 2010

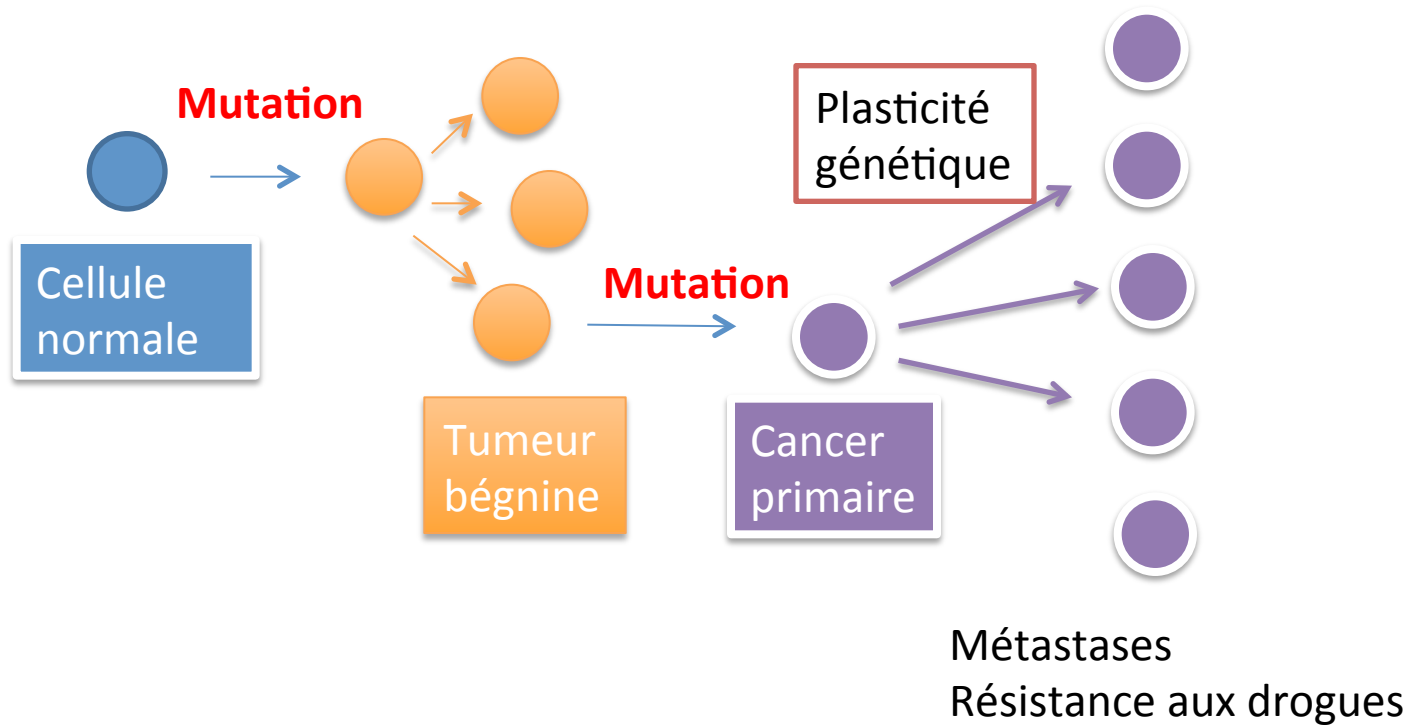
Maintien de la méthylation pendant la réplication : rôle de la Dnmt1
Méthylation *de novo* au cours du développement: Dmmt3

Déméthylation globale du génome au cours de l'embryogénèse et reméthylation au cours du développement embryonnaire.

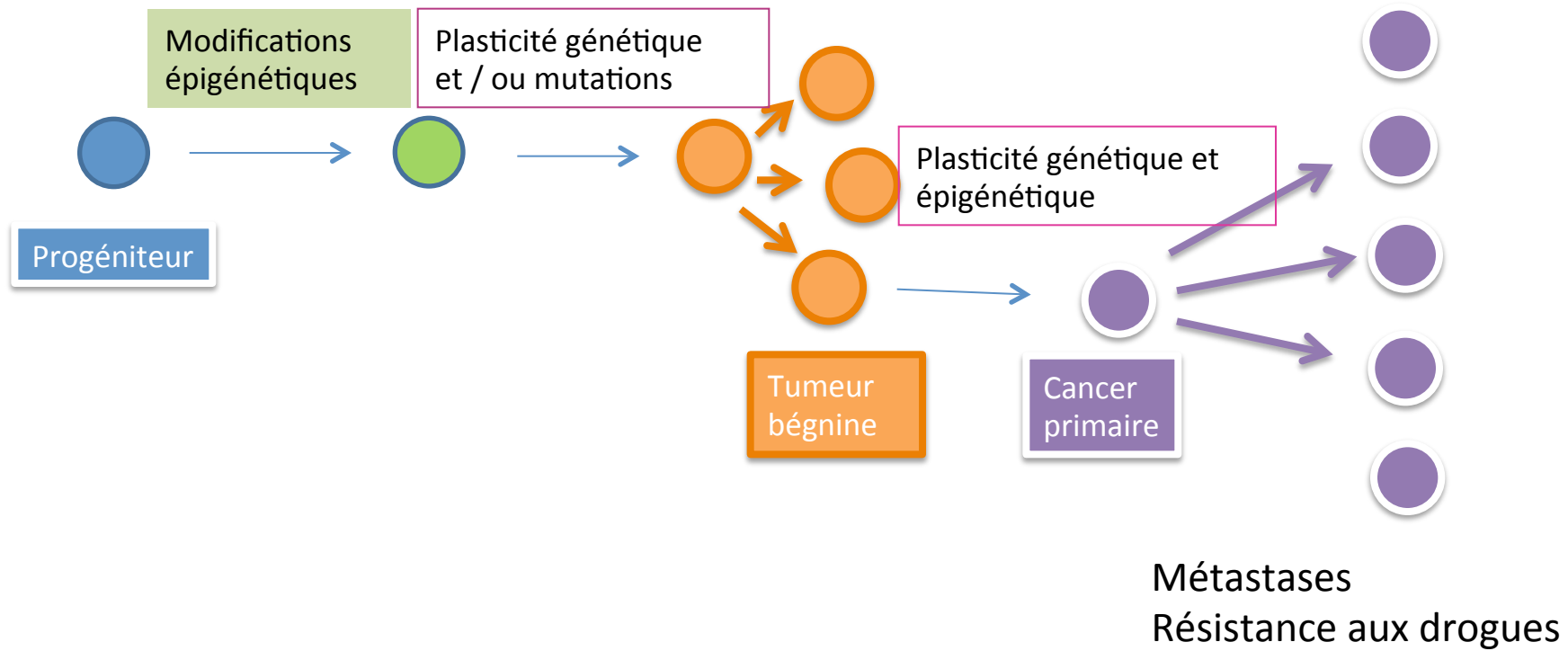


Déméthylation des régions régulatrices de Oct4 et Nanog. :
ré-expression ++ dans l'ICM du blastocyste.

Modèle génétique de la mise en place du cancer



Model épigénétique de l'origine du cancer d'après AP Feinberg (2005)

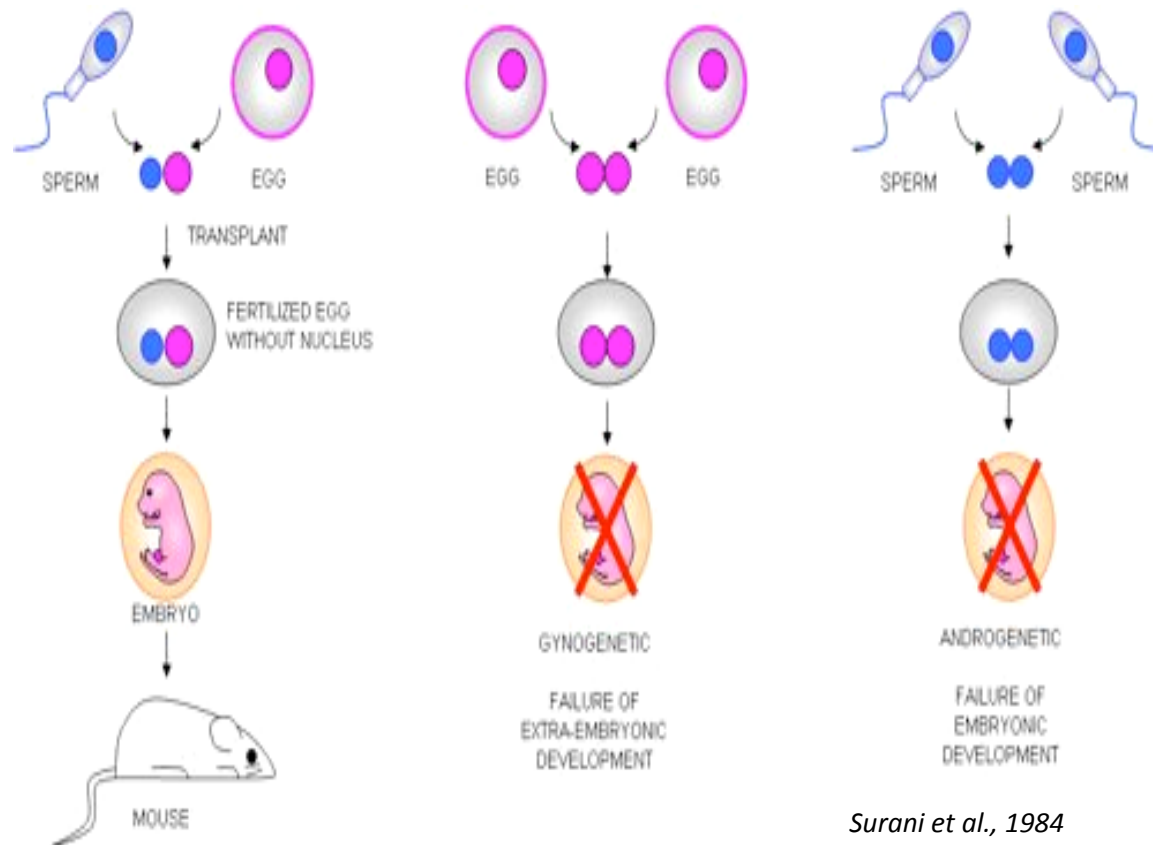


L'épigénétique

- ✓ *Définition*
- ✓ *Organisation de la chromatine*
- ✓ *Méthylation de l'ADN*
- ✓ *Les gènes soumis à empreinte*
- ✓ *Mise en place de l'empreinte parentale*
- ✓ *Recherche des modifications épigénétiques*
dans le projet transversal

Régulation de l'expression des gènes soumis à empreinte parentale

Le développement embryonnaire harmonieux nécessite un génome maternel et un génome paternel . Les deux génomes ne sont pas équivalents.

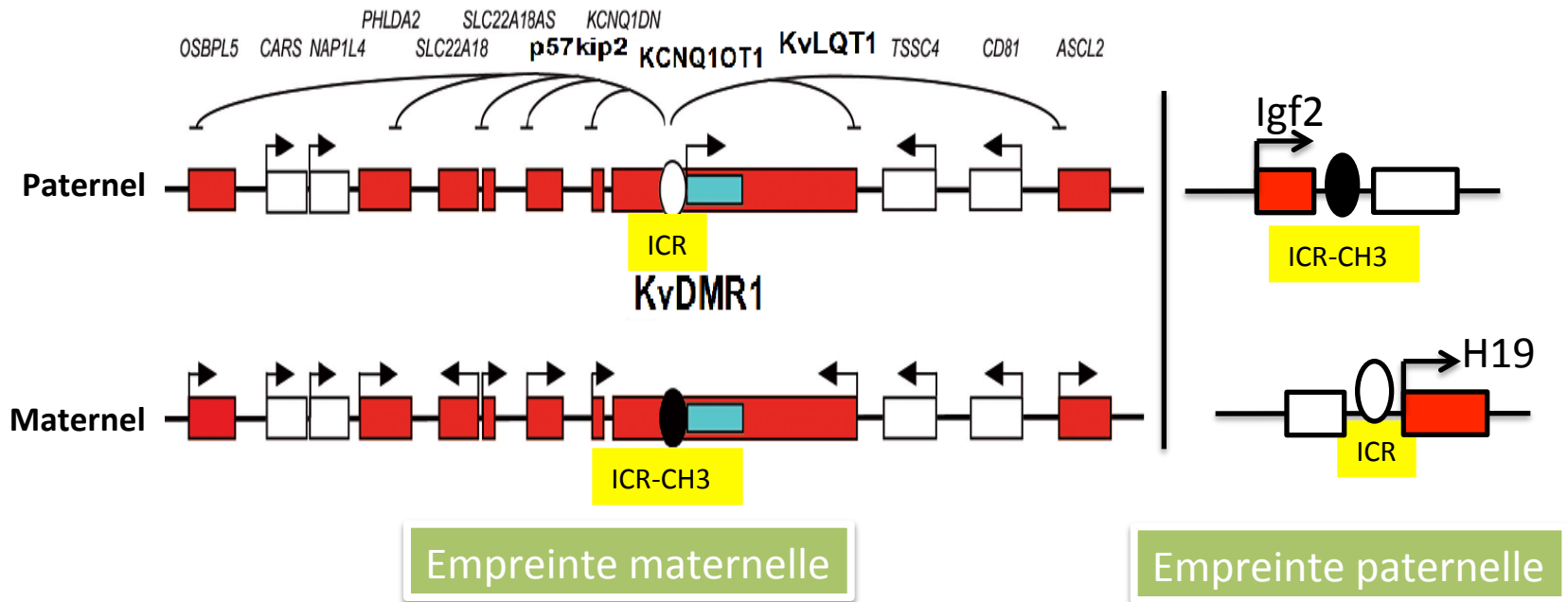


Surani et al., 1984

Gènes soumis à empreinte parentale

- Parmi les 28 000 gènes identifiés, 100 gènes ont une expression **mono-allélique**, ce qui permet le dosage approprié de l'expression de ces gènes.
- Organisation des gènes en clusters
- Rôle clé dans le développement embryonnaire précoce.
- L'expression mono-allélique de ces gènes chez les mammifères repose sur la méthylation différentielle des dinucléotides CpG dans l'ICR (imprinting control region) suivant l'origine parentale de la gamète : ovocyte ou spermatozoïde
- Ex. si soumis à empreinte paternel, c'est l'ICR de **l'allèle paternel** qui est **méthylé** => **Pas d'expression** du (des gènes) soumis au contrôle de l'ICR.

Deux locus KvLQT1 et H19 / Igf2 (chr. 11 humain) soumis à empreinte parentale



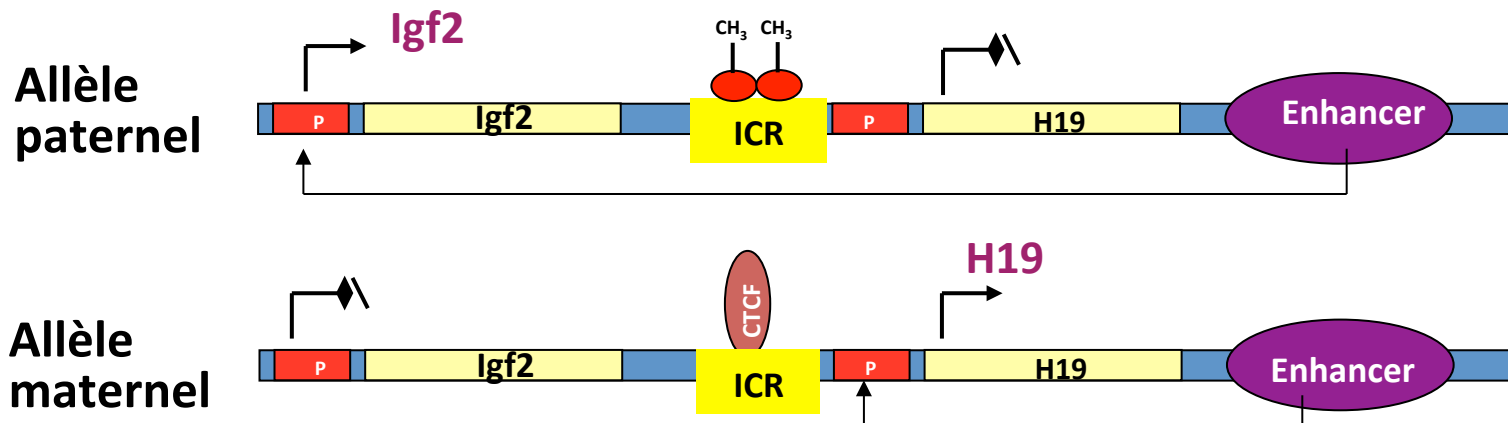
ICR : Imprinting control region

Igf2 (insuline growth factor) : facteur de croissance. Rôle dans le développement embryonnaire et du placenta.

H19 : code pour un ARN non traduit. Rôle suppresseur de tumeurs. Modère la croissance foétale. Embryon : expression ++ endoderme et mésoderme.

Régulation de l'expression des gènes H19 et Igf2 soumis à empreinte paternel par méthylation de l'ICR sur l'allèle paternel.

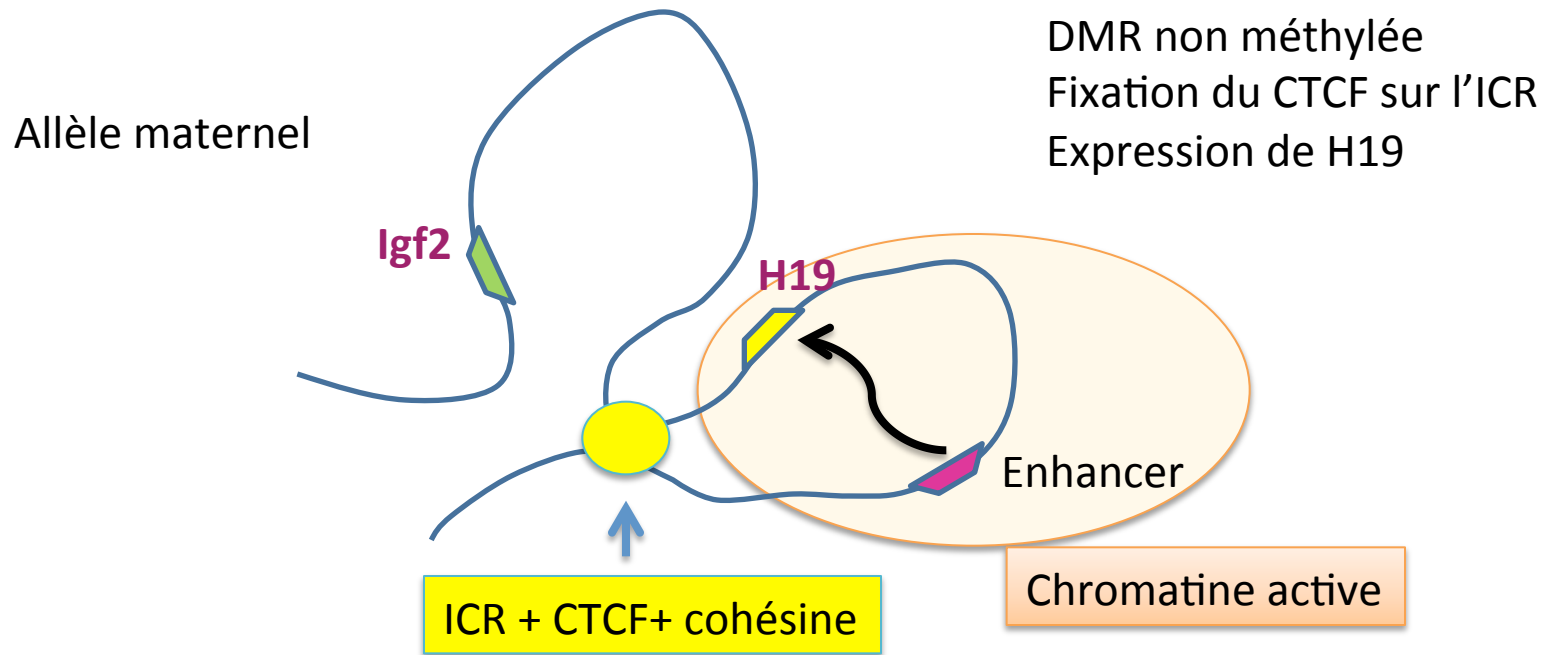
15 Kb entre Igf2 et H19



CTCF : insulateur avec la cohésine qui se fixe sur une séquence spécifique dans la séquence de l'ICR

ICR : Imprinting control region

Modèle de la structure chromatinienne de l'allèle maternel du locus H19/Igf2 d'après S Kurukuti (2006)



Structure particulièrement sensible à l'environnement.

L'épigénétique

- ✓ *Définition*
- ✓ *Organisation de la chromatine*
- ✓ *Méthylation de l'ADN*
- ✓ *Les gènes soumis à empreinte*
- ✓ *Mise en place de l'empreinte parentale*
- ✓ *Recherche des modifications épigénétiques*
dans le projet transversal

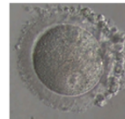
Mise en place de l'empreinte parentale

L'empreinte parentale (DMR primaires) est mise en place au cours de la différenciation des gamètes dans les lignées germinales mâles et femelles => reprogrammation de l'empreinte héritée des parents.

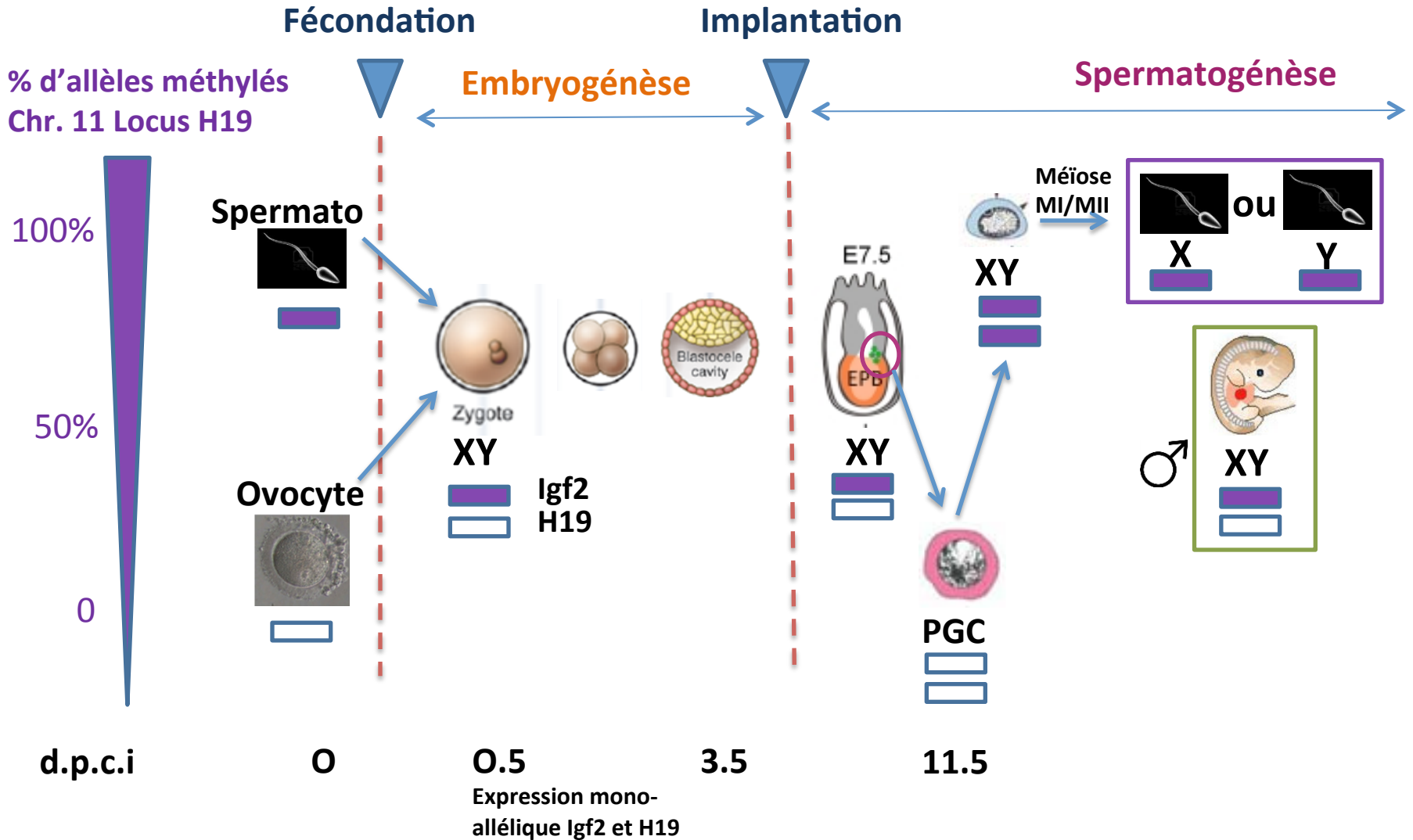
Spermato



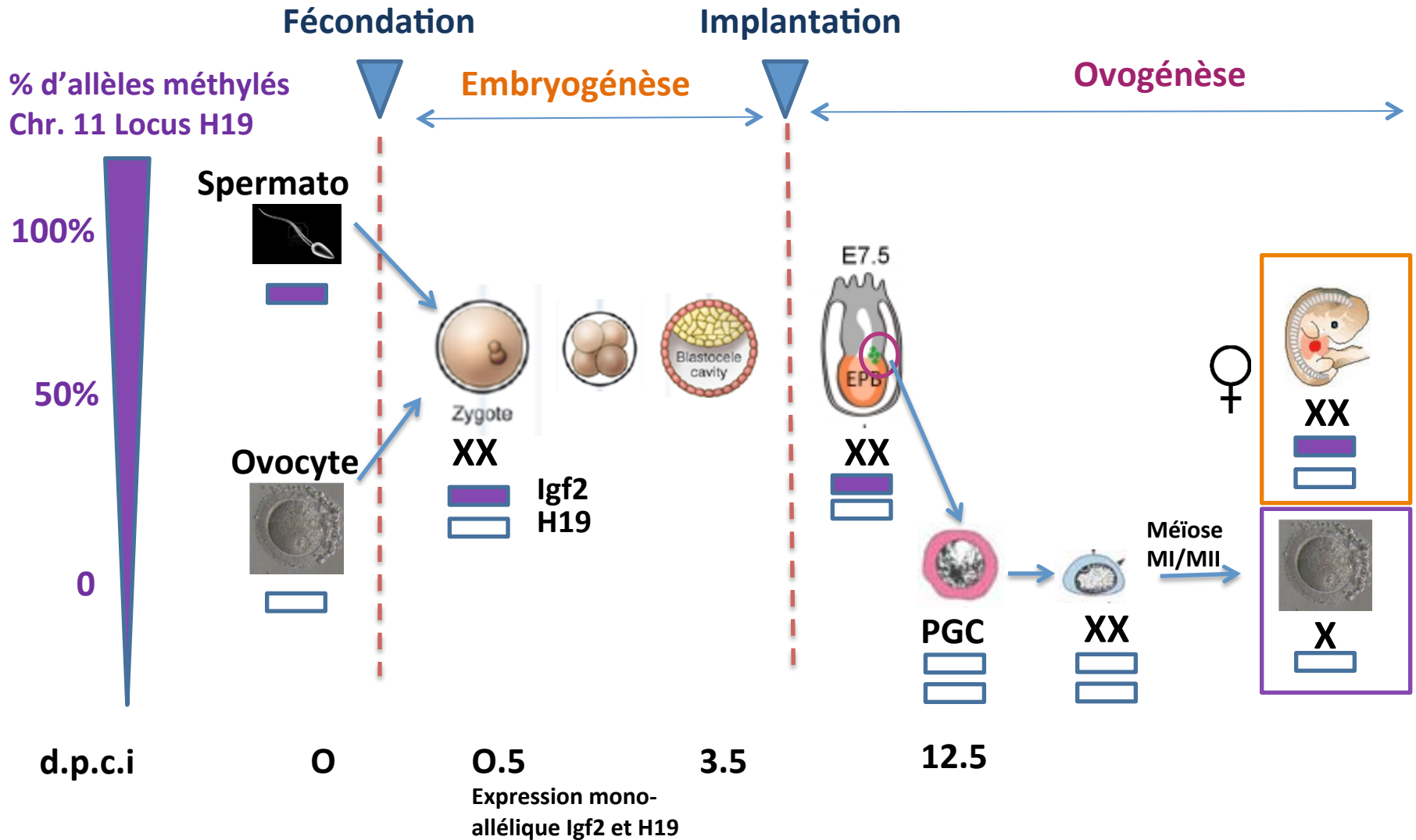
Ovocyte



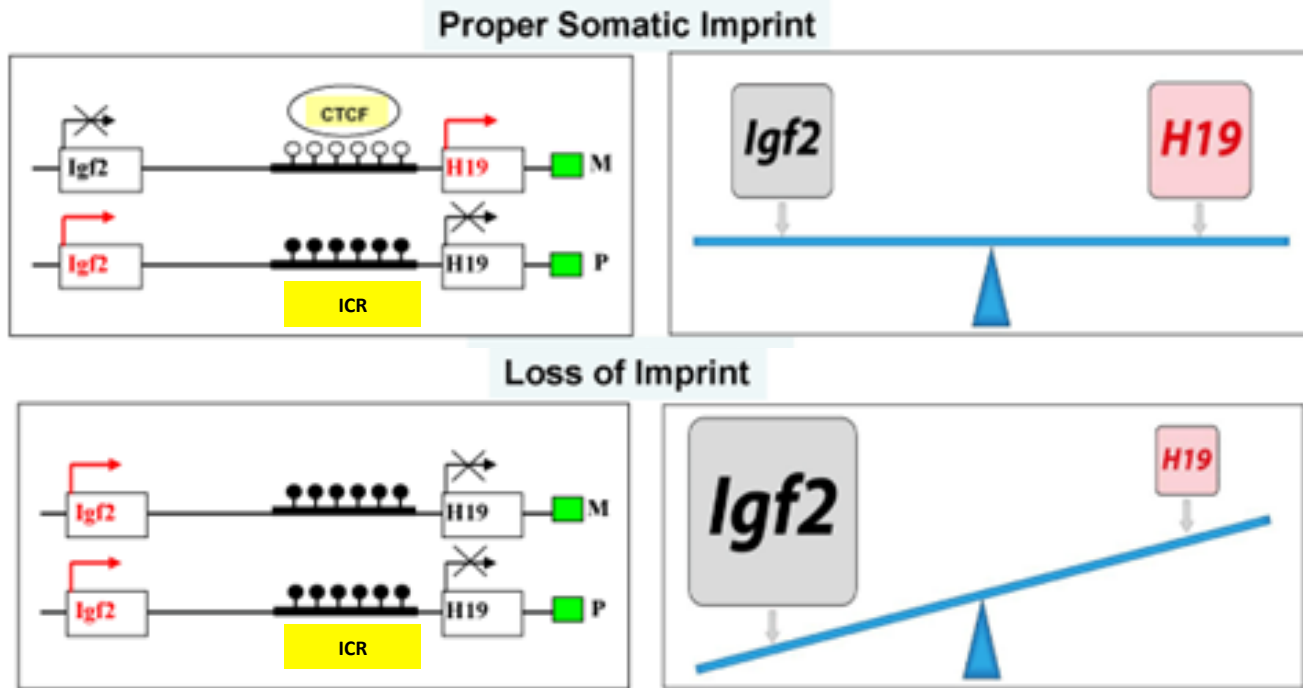
Transmission de la méthylation d'un gène soumis à empreinte paternelle H19/Igf2 au cours du développement dans un embryon humain masculin.



Transmission de la méthylation d'un centre soumis à empreinte paternelle H19/Igf2 au cours du développement **dans un embryon humain féminin**.



Pathologies associées à l'expression bi-allélique de l'Igf2



- Hyperméthylation de l'ICR du locus *Igf2* / *H19* => **surexpression *Igf2***

In vivo :

- Syndrome de Beckwith-Wiedman chez l'homme.
- Syndrome du gros veau (transfert nucléaire).
- Favorise le développement de cancers : colon (tumeurs de Wilms).

In vitro : Epigénome très sensible à l'environnement.

- Anomalies de l'empreinte parentale de l'ICR du locus *Igf2* / *H19* identifiées dans des lignées de cellules souches embryonnaires, comme dans les cellules **ES de singe rhésus**.

L'épigénétique

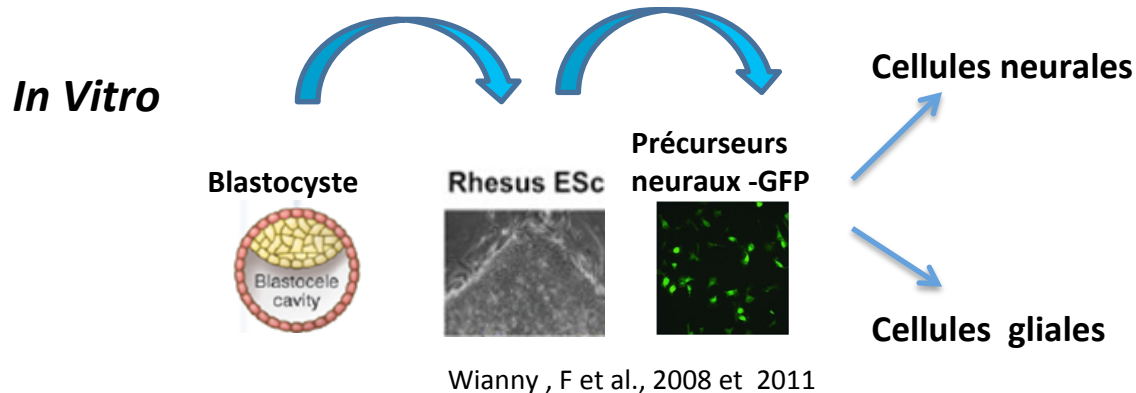
- ✓ *Définition*
- ✓ *Organisation de la chromatine*
- ✓ *Méthylation de l'ADN*
- ✓ *Les gènes soumis à empreinte*
- ✓ *Mise en place de l'empreinte parentale*
- ✓ *Recherche des modifications épigénétiques
dans le projet transversal*

Projet de thérapie cellulaire régénératrice par greffe de cellules souches dans un modèle primate de la maladie de Parkinson.

- Destruction des neurones dopaminergiques. Remplacement par injection de précurseurs neuronaux capables de survivre et de se différencier en neurones.
- Importance de tester l'impact des étapes qui précèdent la greffe sur la méthylation de la chromatine aux locus *Igf2/H19* et *Snrpn*.

Etude de la stabilité de l'empreinte parentale dans les cellules ES de singe rhésus, et de leurs dérivés différenciés *in vitro* et après greffe *in vivo*.

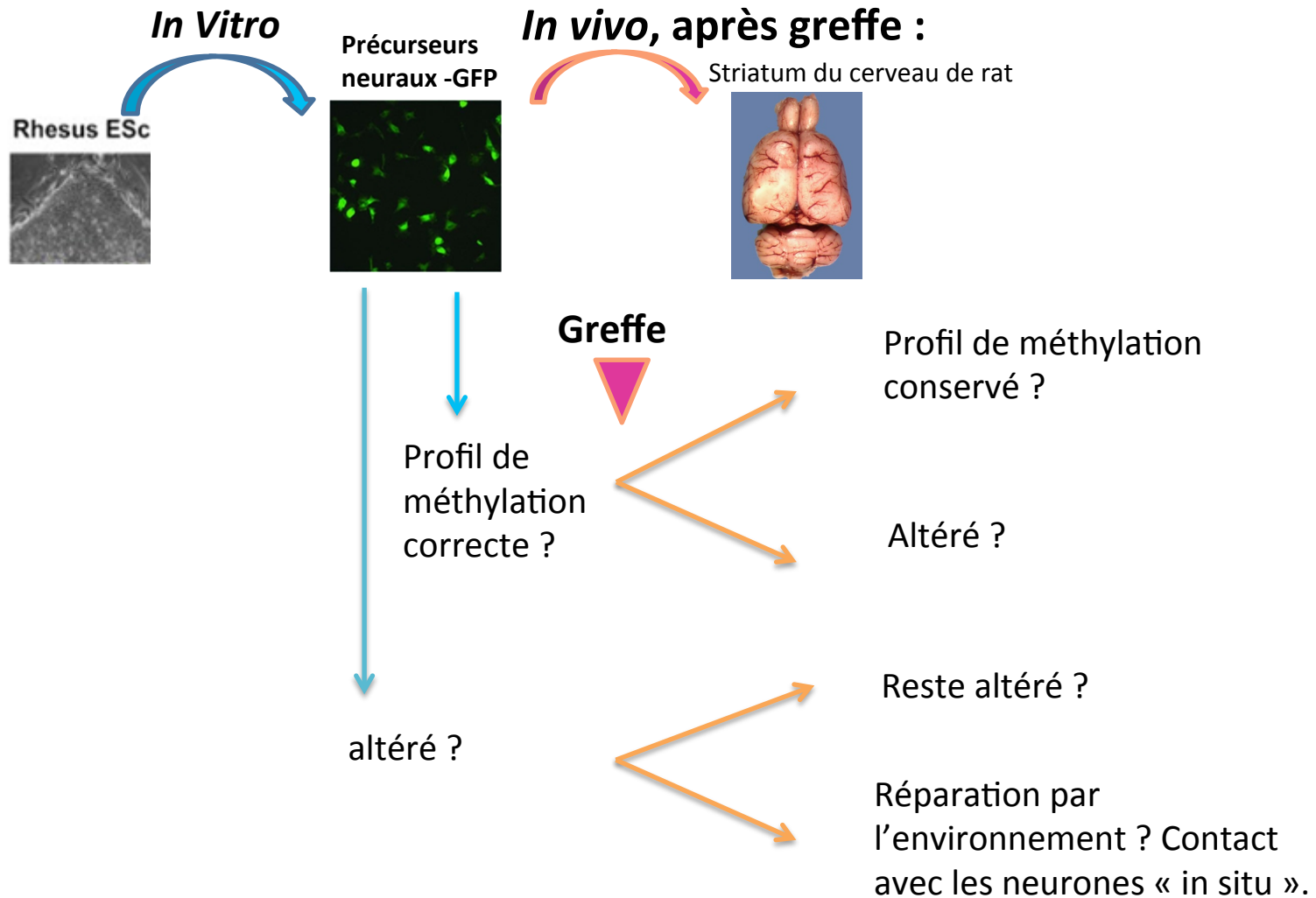
Culture et différenciation des cellules souches de singe rhésus.



Culture des cellules LYON-ES1 (ES de singe Rhésus) : sur fibroblastes embryonnaires + KO-DMEM + FGF2 (Fibroblast Growth Factor).

- Pour une utilisation en clinique : adaptation des cellules ES de singe rhésus à la culture en absence de cellules nourricières, dans un milieu chimiquement défini.
- Suivi de l'impact de la culture à long-terme et de la différenciation en cellules neurales et gliales sur la **méthylation** des régions régulatrices du locus **H19/Igf2** (empreinte paternel) et **Snrpn** (maternel).

Influence du contexte cellulaire *in situ* sur l’empreinte aux locus H19/Igf2 et Snrpn après greffe ?



Merci

