



Christian Bréchet,
Directeur général de l'Inserm

Pour une recherche clinique innovante et de grande qualité

L'acquisition des connaissances, le transfert de ces connaissances de la recherche fondamentale à la clinique, la thérapeutique et la santé publique, le continuum entre ces différentes composantes de la recherche définissent la mission de l'Inserm. Soutenu depuis sa création en 1964 à la fois par les ministères de la recherche et de la santé, l'Inserm a contribué de manière décisive au progrès scientifique et médical. Entièrement dédié à la recherche biomédicale et en santé publique, il a donné la capacité à la France de mener une politique scientifique d'excellence, cohérente et efficace, grâce au recrutement de chercheurs et ingénieurs-techniciens, à l'intégrité et à la qualité de son évaluation, à la création d'unités de recherche majoritairement insérées dans l'hôpital, à la conduite de programmes thématiques et au renforcement des partenariats public-privé, se plaçant ainsi au coeur de la politique de santé en France. De fait, l'Inserm, par la diversité de composition de ses formations de recherche, associant aux 5 700 chercheurs et ingénieurs-techniciens statutaires environ 2 500 médecins hospitaliers et hospitalo-universitaires, est le creuset d'une alchimie complexe qui met en contact des individus de formation, d'objectifs et de sensibilités différents.

Le terme de recherche translationnelle est maintenant classiquement utilisé pour décrire le transfert de connaissances de la recherche fondamentale à la clinique. Pour être efficace, elle doit associer les compétences qui permettront de poser des questions pertinentes parce que dérivées de ou appliquées à la clinique, de disposer des moyens expérimentaux *in vitro* et *in vivo*, d'analyser les mécanismes fondamentaux impliqués et de dégager ainsi de nouvelles hypothèses physiopathologiques et de nouvelles pistes pour la prévention, le diagnostic et le soin. Ces hypothèses, ces pistes doivent être évaluées dans des infrastructures de recherche clinique respectant les critères d'assurance qualité et d'éthique et favorisant des études et essais

libres et innovants.

Mettre en place une recherche translationnelle efficace implique donc, et c'est la spécificité et la force de l'Inserm, un soutien sans faille de la recherche d'amont qui alimentera ce transfert, de la recherche clinique qui l'inspirera et en bénéficiera et donc d'infrastructures de recherche clinique performantes. Dans ce contexte, l'évaluation favorable, au cours de ces dernières années, par les commissions et le conseil scientifique de l'Inserm de projets de création d'unités de recherche impliquant une recherche très majoritairement clinique, innovante et de grande qualité, doit être soulignée ; le temps est fini où ce type de projet se heurtait à un a priori négatif ; c'est également dans cet esprit que, depuis 2005, l'appel d'offres pour la création d'unités de recherche centrées sur l'innovation technologique et méthodologique (Unit-M) a été ouvert à des équipes cliniques.

La qualité de la recherche clinique à l'Inserm est reconnue aux niveaux national et international ; ces résultats ne doivent cependant pas masquer le besoin d'une évolution de l'organisme qui lui permettra de mieux s'adapter à cet enjeu qu'est le transfert de connaissances. Cette évolution doit s'intégrer dans le panorama complexe de la recherche biomédicale et en santé en France et, en particulier, s'inscrire dans le partenariat développé avec les CHU. La recherche clinique menée dans les CHU a en effet connu un essor considérable avec le programme hospitalier de recherche clinique (PHRC, 1992), la création des délégations à la recherche clinique (DRC, 1994) puis, en 2005, des délégations inter-régionales (DIRC) ; les CHU et les CLCC y jouent un rôle majeur et l'Inserm ne se place pas dans une situation de « duplication », voire de « compétition », en particulier pour les promotions d'essais et d'études. Bien au contraire, il doit se centrer sur ses missions : soutenir des études physiopathologiques innovantes et des essais cliniques de phase I-IIa, s'impliquer dans des projets pour lesquels sa valeur ajoutée est claire, interagir avec les partenaires industriels et les associations caritatives dans des projets qui « respectent » l'esprit de la recherche à l'Inserm et son éthique et jouer un rôle moteur dans l'ouverture européenne et internationale de cette recherche.

Dans ce contexte, la politique de l'Inserm est de soutenir la recherche clinique en associant quatre objectifs complémentaires, réalisés en partenariat avec les CHU et les CLCC, les ministères de tutelle et, en fonction des projets, les industriels et associations caritatives :

A. Se doter d'infrastructures de recherche clinique performantes, les intégrer dans des réseaux européens et internationaux, renforcer l'utilisation de ces infrastructures par les unités de recherche de l'Inserm.

Ces dernières années ont vu le renforcement considérable des infrastructures de recherche clinique en France : le nombre de CIC est passé de 10 en 2000 à 41 en 2006 ; un soutien spécifique a été apporté à des CIC, ou des extensions de CIC, spécialisés dans les études épidémiologiques et essais cliniques ainsi que dans les biothérapies ; plus de 797 études (+ 3,5 % par rapport à 2005) ont déjà débutées et 45 000 patients sont inclus dans la file

active 2006. Des réseaux thématiques ont permis de mettre en synergie leurs activités et d'augmenter de façon significative le nombre mais aussi, et surtout, la rapidité de recrutement. De plus, l'Inserm coordonne le premier projet de mise en réseau de centres de recherche clinique au niveau européen (projet ECRIN). La mise en place, mais également le suivi de cohortes est un outil incontournable, en particulier pour des études analysant l'impact de polymorphismes génétiques, leurs interactions avec des facteurs d'environnement, la recherche de biomarqueurs, etc. L'Inserm a permis le recensement des cohortes existantes, l'identification d'un petit nombre d'entre elles à soutenir de façon prioritaire avec nos partenaires, en particulier dans le cadre des activités des programmes nationaux de recherche et de l'institut virtuel de recherche en santé publique. Par ailleurs, 47 collections de tissus biologiques ont pu être mises en place, complétant dans le domaine des tumorothèques l'action du ministère de la santé puis de l'INCa. Pour l'ensemble de ces composantes, l'Inserm joue un rôle de coordination important dans les réflexions actuelles sur l'ouverture du 7e PCRDT aux infrastructures de recherche clinique (forum ESFRI notamment). Reste que les liens entre nos unités de recherche et les CIC sont insuffisants et doivent être renforcés. L'Inserm a été en 1994, en concertation avec les CHU, et avec le soutien du ministère de la santé, un élément moteur de la création des CIC ; les CIC sont un outil majeur de la recherche de transfert et sont maintenant insérés dans des réseaux européens. Pourtant, malgré cette « paternité » revendiquée, le pourcentage de projets réalisés dans les CIC qui dérivent des activités de nos unités et centres de recherche est resté très faible (en moyenne environ 20 % !!). Ce point ne remet nullement en cause la valeur des autres études, essentiellement des essais cliniques réalisés par des équipes cliniques non inscrites au profil des unités et des partenaires industriels. Cependant, cette situation ne répond pas à l'ambition qu'affiche l'Inserm en soutenant les CIC.

C'est donc dans ce contexte que l'Inserm prend les orientations suivantes :

Les CIC sont pour l'Inserm des formations de recherche à part entière, gérés comme les unités en partenariat avec les hôpitaux, certaines universités et les CLCC : des chercheurs statutaires et, quand cela est possible, des ingénieurs–techniciens peuvent y être recrutés et/ou affectés. Ils peuvent bénéficier, comme toutes les unités de l'Inserm, des appels d'offres pour les jeunes chercheurs et post–doctorants, les postes d'accueil pour internes et les contrats d'interface pour médecins. Cette politique a déjà débuté avec 2 chercheurs et 13 ingénieurs–techniciens statutaires ainsi que 4 chercheurs et 10 ingénieurs–techniciens en CDD présents sur les profils des CIC et sera amplifiée. De plus, et c'est une évolution importante, il est possible depuis 2005, pour une équipe de recherche, de solliciter soit sa création d'emblée au sein d'un CIC, soit sa mobilité dans un CIC, permettant une intégration beaucoup plus forte de l'activité de transfert dans la vie de l'Institut.

Les budgets des CIC verront donc leur équilibre modifié et le financement de l'Inserm amplifié. Les CIC sont soutenus par l'Inserm et le ministère de la santé ; les CHU et CLCC assurent actuellement une part essentielle de leur financement, une situation cohérente avec la revendication légitime des

hôpitaux universitaires d'un rôle majeur dans la recherche clinique. Avec la même cohérence, l'Inserm renforcera sa contribution financière : le soutien de base sera maintenu ; il associe depuis deux ans une dotation annuelle et un soutien sur projets qui permettent à l'Inserm, en concertation avec ses partenaires, de mieux identifier, parmi les nombreux projets réalisés dans les CIC, ceux qui répondent aux missions de l'Inserm (je suis cependant conscient de l'importance de la dotation annuelle et de la nécessité de ne pas multiplier les évaluations). De plus, l'affectation de chercheurs et ingénieurs–techniciens temporaires et permanents représentera un investissement financier important, qui sera complété quand une équipe sera créée au sein d'un CIC par la prise en compte de cette équipe dans la dotation du CIC. Dans ce contexte, il me paraît également logique d'envisager, en 2007, une contribution financière (limitée ...) des unités de recherche au fonctionnement des CIC, contribution qui leur garantirait l'accès à ces infrastructures (de même que pour le fonctionnement des autres infrastructures de recherche au sein des IFR).

Ces évolutions impliqueront une modification importante des modalités d'évaluation des CIC. L'Inserm a mis en place en 2006, en concertation étroite avec les CHU et les universités, une commission « recherche clinique » qui n'est pas destinée à se substituer aux instances scientifiques de l'Inserm pour l'évaluation des structures et des chercheurs mais dont le champ de compétences regroupe des appels d'offres auparavant évalués par des comités distincts : CIC, contrats d'interface et postes d'accueil, CTRS et réseaux de recherche clinique, etc. L'évaluation des CIC fera participer dans l'avenir, outre les experts de la commission de la recherche clinique, les commissions et le conseil scientifique ; cette évolution tiendra compte de la mise en place, en 2007, de l'agence d'évaluation de la recherche et de l'enseignement supérieur.

B. Assurer la promotion d'études cliniques et d'essais thérapeutiques innovants.

L'Inserm est un promoteur académique essentiel, avec 146 études et essais dans la file active 2006, en augmentation de 39 % depuis 2001, participant activement aux débats sur les modifications législatives et les nouveaux textes réglementaires issus de la transposition de la directive européenne sur les essais cliniques, ainsi qu'à la réflexion sur les registres d'essais cliniques. C'est dans cet esprit que la création du département de Recherche clinique et thérapeutique (DRCT) a concrétisé la volonté de la direction de soutenir de façon plus efficace ce domaine d'activité. La création du comité d'orientation stratégique et de suivi des essais cliniques (Cossec) permet maintenant à un investigateur de rencontrer d'emblée, évitant les réunions itératives et la « course d'obstacle » habituelle, l'ensemble des intervenants : scientifiques et cliniciens, autorités compétentes dans le domaine réglementaire (Afssaps, DGS) et la protection des personnes (CPP), industriels, associations de patients. Les différents sous-comités thématiques ont déjà traité, en deux ans, 78 dossiers et je salue leur enthousiasme et activité. De plus, la participation de notre filiale privée Inserm–Transfert à certains projets renforce considérablement l'action de l'Inserm, permettant de valider de façon

plus rapide un concept émergent, offrant aux investigateurs de nouveaux partenariats et inscrivant cette politique dans un partenariat public–privé quand les conditions en sont réunies. Enfin, l’Inserm représente la France dans les phases actuelles de préfiguration d’une plateforme technologique « Innovative Medicines for Europe (IMI) » qui devrait favoriser, dans le cadre d’un partenariat public–privé, la mise en place d’essais innovants en Europe.

L’ampleur des délais auxquels doivent faire face les investigateurs reste cependant un point négatif majeur, souligné par l’ensemble des acteurs de la recherche clinique et thérapeutique en France. En ce qui concerne l’Inserm, il me semble honnête de reconnaître, contrairement à certaines prises de position superficielles, la qualité du travail accompli malgré le trop faible nombre de personnes affectées à cette activité. Reste que ces délais doivent être fortement réduits ; la mise en place d’une cellule de présélection des demandes de promotion, qui se réunit de façon hebdomadaire, permet de distinguer d’emblée les dossiers (largement majoritaires) qui peuvent bénéficier d’un traitement « simple » de ceux qui doivent faire l’objet d’une présentation devant le Cossec ; cette approche a d’ores et déjà permis de réduire significativement une partie des délais et sera amplifiée ; elle se heurte malheureusement au fait qu’une part importante des délais est due aux autres institutions impliquées et parfois aux investigateurs eux–mêmes....

C. Assurer la formation des médecins à la recherche et des chercheurs à la clinique, en partenariat avec l’université et les grandes écoles, et permettre aux médecins de disposer d’un véritable « temps–recherche ».

Pour être efficace, la politique de l’Inserm dans ce domaine clef doit associer la formation et l’accueil de médecins dans les unités de recherche et les CIC en leur garantissant un « temps–recherche » suffisant ; par ailleurs, cette politique doit prendre en compte le rôle décisif des chercheurs et ingénieurs–techniciens Inserm, comme des médecins, dans la recherche en santé.

L’école de l’Inserm a déjà permis d’accueillir trois promotions d’étudiants en médecine qui bénéficient d’une formation à la recherche précoce et de haut niveau. Elle conduit à la mise en place pour certains de ces étudiants de véritables cursus de type MD–PhD. L’école de l’Inserm se veut un programme profondément élitiste, complémentaire des enseignements des facultés de médecine et des programmes MD–PhD qui débutent dans des universités comme Paris V et à l’Ecole normale supérieure de Paris.

Les postes d’accueil pour internes complètent les autres dispositifs existants (année–recherche, bourses de fondations et associations) ; les contrats d’interface, en partenariat avec les CHU, permettent à des médecins hospitaliers de travailler à mi–temps pendant trois–cinq ans ou à plein temps pendant un à deux ans dans une formation de recherche Inserm ; à ce jour, plus de 100 médecins hospitaliers et hospitalo–universitaires bénéficient de ces contrats. Ils sont complémentaires des contrats d’interface avec l’hôpital des chercheurs de l’Inserm, soutenus par le ministère de la santé, dont les premières évaluations montrent, dans la très grande majorité des cas, l’intérêt

et la pertinence.

Par ailleurs, l'école de l'Inserm comporte, outre la formation à la recherche des jeunes médecins, la formation à la clinique et la santé publique de chercheurs et ingénieurs statutaires à l'occasion de séminaires, éventuellement associés à des stages dans des services cliniques ; je me réjouis du succès croissant de ces séminaires qui ont déjà attiré plus de 630 personnes.

Nous sommes tous conscients que l'efficacité de ces mesures, essentielles pour l'avenir de l'organisme, est limitée par l'évolution de la démographie médicale qui verra pendant au moins encore cinq ans diminuer le nombre de médecins, ainsi que par les difficultés financières des hôpitaux ; reste que cette politique montre progressivement son efficacité et sera poursuivie.

D. Intégrer le continuum entre recherche fondamentale et clinique dans le fonctionnement des formations Inserm, en particulier dans le cadre de centres de recherche.

D'une façon générale, une unité ne peut être soutenue par l'Inserm si le transfert à la clinique et la santé publique n'est pas pris en compte ; même une unité développant une recherche très fondamentale peut parfaitement jeter les bases de collaborations et de transfert, en particulier en utilisant des formules comme les contrats d'interface et les postes d'accueil.

La création des centres de recherche doit contribuer, quels que soient les modes d'organisation proposés, à renforcer ce continuum et le conseil scientifique comme la direction générale examine attentivement ce point. Les centres thématiques de recherche et de soins (CTRS), dont les cinq premiers ont été créés en 2006, seront un outil très important pour renforcer l'intégration entre le soin, la recherche clinique et la recherche d'amont ; ils doivent permettre de dynamiser les interactions entre chercheurs et ingénieurs–techniciens statutaires avec les médecins, utilisant et amplifiant les dispositifs cités précédemment.

Il est maintenant nécessaire que soient rapidement clarifiées les orientations respectives de « véritables » centres CTRS, offrant une unité de lieu aux services cliniques et aux unités de recherche, et de réseaux thématiques de recherche et de soin (RTRS) intégrés dans la politique de création, par le ministère de la recherche, de réseaux thématiques de recherche avancée (RTRA).

Les réseaux de recherche clinique ont déjà en partie amorcé cette stratégie ; ils ont été renforcés, permettant de mettre en synergie les activités d'équipes de recherche clinique non liées à l'Inserm et d'unités de recherche Inserm ou soutenues par d'autres organismes de recherche. C'est ainsi qu'en 2002 un premier appel d'offres a permis la labellisation de 13 réseaux, évalués récemment de façon très favorable. Trois nouveaux réseaux ont été créés en 2006 et un nouvel appel d'offres a été publié par l'Inserm.

Globalement, la France dispose d'atouts majeurs en recherche biomédicale et en santé. L'Inserm joue un rôle essentiel et est un acteur incontournable de cette recherche ; le pays bénéficie, grâce à ses CHU, d'une tradition de recherche clinique très forte ; le système de santé français pose des questions économiques difficiles mais offre une qualité et un dispositif de recherche clinique et en santé publique remarquable.

Une évolution forte est nécessaire pour s'adapter aux enjeux et à la compétition ; elle doit se faire dans un climat de confiance et de coordination et non de défiance. L'avenir dépendra en effet de notre capacité à nous unir et lutter contre la fragmentation de notre système de recherche ; regardons les choses en face : les investissements de notre pays sont nettement inférieurs à ceux de pays comme les USA, le Royaume–Uni, certains pays d'Europe du nord et d'Asie. Les CHU ont considérablement renforcé leurs activités de recherche clinique ; ce point est très positif et doit être encouragé. Il est par contre profondément regrettable de voir parfois certains directeurs de CHU, doyens ou présidents d'université penser ce renforcement comme une « compétition » vis-à-vis de l'Inserm, alors que l'union et la complémentarité doivent être la règle. Les CHU et les universités doivent faire, comme l'Inserm, des choix dans l'utilisation des dotations budgétaires. L'enjeu commun est la prise en compte des activités de recherche clinique dans les budgets des hôpitaux et c'est le sens des discussions, essentielles, menées actuellement sur le contenu des MERRI (missions d'enseignement, recours, recherche et innovation) dans le cadre du budget des CHU.

Les USA, le Royaume–Uni ou le Canada ont parfaitement compris la nécessité de cette coordination, intégrant dans une politique globale et cohérente leur soutien à des hôpitaux universitaires et à des agences nationales (les NIH, le MRC, le FRSQ, etc.). Les soutiens à la recherche clinique fournis par le PHRC, l'Inserm, les CHU, les partenaires industriels et les associations caritatives doivent être mieux coordonnés, évitant de retomber dans les anciens contentieux et définissant une politique cohérente. L'exemple du Royaume–Uni est particulièrement illustratif avec les rapprochements en cours de discussion entre le Medical Research Council (MRC) et le département recherche et développement du National Health Service (NHS). C'est dans cet esprit, et je salue cette orientation, que les programmes du PHRC dans le domaine des biothérapies seront en partie évalués par le Cossec pour éviter les redondances de ces évaluations.

Christian Bréchet
Directeur général de l'Inserm

Conrad
Waddington

Petit survol historique

Au XVIII^e siècle, deux théories s'affrontent pour expliquer le développement embryonnaire : la préformation et l'épigenèse. Les biologistes partisans de la première considèrent que l'œuf contient l'être en devenir miniaturisé, parfaitement formé. Ce postulat suppose que tous les individus sont en germes dans les gamètes d'un des deux sexes, emboîtés comme des poupées russes, les uns dans les autres. Ceux qui soutiennent l'épigenèse défendent l'idée que l'œuf, indifférencié, se développe par formation successive de parties nouvelles pour atteindre le stade adulte. Toutes les informations nécessaires au développement correspondent à des modalités de construction. C'est cette théorie qui s'est imposée au fil du temps.

Les mécanismes épigénétiques expliquent en partie comment un œuf indifférencié donne naissance à une multiplicité de types cellulaires spécialisés. Alors que toutes les cellules d'un organisme ont le même patrimoine génétique, un neurone n'a pas la même propriété qu'une cellule musculaire ou une cellule hépatique : le profil d'expression de leurs gènes n'est pas le même. Mais l'épigénétique ne se limite pas seulement au développement et à la différenciation cellulaire.

Au-delà de la génétique, l'épigénétique

Le mot « épigénétique » est inventé par Conrad Waddington en 1942 pour désigner le mécanisme de formation du phénotype à partir du génotype. En créant ce mot et la science inédite qu'il définit, Waddington souligne l'incapacité de la génétique à expliquer le développement embryonnaire. Entre les années 1940 et 1970, l'épigénétique est invoquée dès que la génétique mendélienne n'explique pas un phénomène. On qualifie alors d'épigénétiques des mécanismes qui n'en sont pas stricto sensu. Au milieu des années 1970, le mot épigénétique prend le sens qui lui est accordé aujourd'hui. Il désigne depuis les processus d'hérédité réversibles qui ne sont pas fondés sur des changements dans la séquence d'ADN.

En 1975, Arthur Riggs et Robin Holliday proposent simultanément et

indépendamment que certaines modifications chimiques de l'ADN comme la méthylation, c'est-à-dire l'ajout d'un groupement méthyl sur certaines cytosines, pourrait influencer l'expression des gènes (Riggs, Cytogenet Cell Genet, 1975 et Holliday et al. Science, 1975). Cette hypothèse est prouvée expérimentalement des années plus tard.

En effet, les molécules d'ADN d'une cellule mises bout à bout peuvent mesurer jusqu'à plusieurs mètres et doivent être compactées pour entrer dans un noyau de quelques microns. Les molécules d'ADN associées à des protéines de structure telles que les histones forment la chromatine dont la condensation est contrôlée par un mécanisme complexe. Celle-ci peut s'enrouler sur elle-même jusqu'à devenir très compacte et interdire aux facteurs de transcription l'accès aux gènes. Cette forme condensée, baptisée « hétérochromatine », est associée à la méthylation de l'ADN. A l'inverse, « l'euchromatine », la « vraie » chromatine, structure plus lâche qui permet l'expression du génome, est constituée d'ADN peu méthylé.

1984 : Découverte de l'empreinte parentale chez la souris

En 1984, Davor Solter fabrique des embryons avec deux noyaux femelles (gynogénotes) ou deux noyaux mâles (androgénotes) en échangeant des noyaux dans des oeufs de souris fécondés (McGrath et al. Cell, 1984). Ces embryons, constitués de deux demi-génomes, n'atteignent jamais le terme. Les gynogénotes permettent à l'embryon de se développer convenablement alors que les annexes embryonnaires (placenta, cordon ombilical) sont anormales. Dans les androgénotes, la situation est symétrique : l'embryon ne se développe pas normalement alors que les annexes embryonnaires sont intactes.

Cette expérience permet de mettre en évidence les rôles différents et complémentaires des génomes mâles et femelles. L'observation fine des séquences d'ADN révèle qu'elles ne sont pas méthylées de la même façon : une empreinte permet de distinguer l'origine maternelle ou paternelle de la molécule. Ainsi les gènes soumis à empreinte parentale sont exprimés de façon mono-allélique, à partir du génome maternel ou paternel. Il en résulte une différence fonctionnelle des deux génomes, qui sont tous deux nécessaires au développement normal de l'embryon.

A chaque génération nouvelle, cette empreinte parentale est effacée. Ceci se traduit par une déméthylation des chromosomes parentaux dans les cellules précurseurs des gamètes mâles et femelles. Puis une nouvelle empreinte est formée par méthylation de l'ADN, en fonction du sexe de l'embryon.

Ce sont des souris portant une délétion dans le gène DNMT1 qui ont révélé le rôle prépondérant de la méthylation dans l'établissement de l'empreinte (Li et al. Cell, 1992). Ce gène code une ADN méthyltransférase indispensable au développement des mammifères. Ainsi les souris embryonnaires délétées meurent précocement.

Il existe des gènes soumis à empreinte chez tous les mammifères. Chez l'homme, des dérèglements de certains d'entre eux sont associés à des maladies telles que le syndrome de Prader-Willi, le syndrome de Beckwith-Wiedmann, l'ostéodystrophie héréditaire d'Albright, le diabète

néonatal transitoire ou le syndrome d'Angelman.

1990 : Découverte du RNA interférent chez les plantes

C'est le monde végétal qui révèle l'existence du phénomène d'interférence ARN ou RNAi. Jorgensen, en 1990, cherche à intensifier la couleur des pétunias. Il fabrique alors des plantes qui portent un transgène codant pour un pigment, la chalcone synthase. Contrairement à ses attentes, les fleurs qui apparaissent sont soit entièrement blanches, décolorées, soit blanches mouchetées de violet (Napoli et al. Plant Cell, 1990). Il vient de découvrir que lorsqu'un gène est fortement exprimé, lorsqu'un grand nombre d'ARNs est présent dans une cellule, un mécanisme peut se déclencher et empêcher l'expression de ce gène en bloquant sa transcription en ARN messager (Transcriptional gene silencing ou TGS) ou en détruisant les ARN messagers synthétisés (Post-transcriptional gene silencing ou PTGS). Le silencing concerne aussi les séquences homologues à ce gène. Dans le cas du pétunia, l'expression du transgène est réprimée, ainsi que celle du gène endogène.

Le RNAi conduit souvent à la méthylation de l'ADN aux loci réprimés et peut être, dans certains cas, transmis à la génération suivante.



Ce phénomène mime l'infection d'une plante par un virus. En effet, les virus détournent la machinerie cellulaire de leur hôte pour produire en grande quantité des ARNs viraux. Le RNAi permet à la cellule infectée d'empêcher la traduction des ARNs viraux en protéines ou de les détruire. Ce mécanisme semble aussi jouer un rôle très limité dans le développement des plantes, en régulant quelques gènes du développement.

1995 : Découverte du RNAi chez le nématode

En 1995, Guo et Kemphues cherchent à empêcher l'expression d'un gène chez *C. elegans*, un petit vers, très aimé des généticiens, pour étudier sa fonction. Il utilisent donc un ARN complémentaire de l'ARNm ciblé, appelé antisens (Guo et Kemphues, Cell, 1995). Ils pensent que l'ARN antisens va s'apparier à l'ARNm, créant un ARN double-brin, et empêcher sa traduction en protéine. En injectant des ARN antisens dans les gonades du ver, l'expression du gène cible est effectivement inhibée dans sa descendance. Mais ils sont étonnés de constater que l'injection du brin sens

utilisé comme contrôle, c'est-à-dire la même séquence que celle de l'ARNm cible, donne un résultat semblable !

En 1998, Fire et Mello injectent dans les gonades du petit ver des ARNs doubles-brins. Cette injection se révèle dix fois plus performante pour inhiber l'expression du gène cible que l'injection du brin sens ou antisens seul (Fire et al. 1998, Nature). De plus, l'injection d'un très petit nombre de molécules d'ARN double-brin par cellule suffit à réprimer complètement le gène homologue. Enfin, l'injection de ces ARNs dans l'intestin du nématode supprime l'expression du gène non seulement dans l'animal entier mais aussi dans sa descendance.

Plus surprenant encore, la même année, Fire et Timmons font avaler des bactéries programmées pour produire des ARN doubles-brins homologues d'un gène du ver. L'expression du gène cible est annulée dans l'animal (Timmons et Fire, Nature, 1998).

Pour finir, Tabara et Mello, toujours en 1998, font tremper le nématode dans des ARNs doubles-brins. Le gène cible est là encore éteint (Tabara et al. Science, 1998).



Le mécanisme d'interférence ARN semble jouer le rôle de « système immunitaire » primitif, en protégeant les cellules contre l'invasion de virus. Mais les petits ARNs sont aussi impliqués dans la régulation de certains gènes du développement chez *C. elegans*. Ceci pourrait être une forme d'exaptation, un détournement d'une fonction première de protection vers une seconde fonction de régulation de gènes.

2006 : Parution du premier journal entièrement dédié à l'épigénétique

"Epigenetics journal", le journal officiel de la DNA Methylation Society, couvre tous les domaines de l'épigénétique. Le premier numéro de ce bi-mensuel est paru en janvier dernier.

- [Petit survol historique](#)
- [Intérêt de l'épigénétique](#)
- [Des souris et des femmes](#)
- [Des maladies épigénétiques](#)
- [Paramutations chez la souris : une première](#)
- [Polycomb ou comment les mouches ont de la mémoire](#)

Programme Epigénome

Le réseau d'excellence « Epigénome » a été mis en place le 24 septembre 2004, en République Tchèque. Baptisé NoE pour Network of Excellence, il rassemblait à l'origine 25 laboratoires européens à la pointe de l'épigénétique et 26 laboratoires associés. Le réseau est soutenu par le 6ème Programme Cadre de la Recherche et du Développement Technologique de l'Union européenne qui lui aura versé 12,5 millions d'euros sur cinq ans. Ce réseau est coordonné par Thomas Jenuwein du Research Institute of Molecular Pathology de Vienne, assisté de Geneviève Almouzni de l'Institut Curie et de Philip Avner de l'Institut Pasteur. L'Epigénome NoE s'est fixé quatre objectifs :

- Le premier est de faire avancer plus efficacement la recherche européenne en épigénétique, en intensifiant les échanges entre les équipes. Cet objectif concerne l'ensemble des laboratoires membres et leurs associés. Parmi ces équipes, on trouve sans surprise celles d'Edith Heard, de Giacomo Cavalli, de Robert Feil, d'Evani Viegas–Pequignot et bien sûr celles de Geneviève Almouzni et de Philip Avner. « Ce point est capital car nous avons en Europe une compétence et une richesse intellectuelle tout à fait concurrentielles vis-à-vis des Etats–Unis ! » indique ce dernier.
- Le second objectif est d'aider à l'éclosion de jeunes talents en les incorporant au réseau. Douze chercheurs ont formé les premières NET, Newly Established Teams. Ils ont reçu des fonds et bénéficient des ressources techniques et des informations fournies par les principaux membres du NoE. Une seconde vague a intégré onze autres membres cette année.
- Le troisième objectif est de fournir à la communauté scientifique des informations à la pointe de la recherche en épigénétique et de centraliser les informations sur leur [site Internet](#).
- Le quatrième objectif est de tenir un colloque annuel organisé autour de thématiques de recherche spécifiques.

Mais le NoE cherche aussi à sensibiliser tous les publics aux questions épigénétiques. Il organise à cette fin des événements scientifiques ouverts à tous, réserve une rubrique de son site Internet à des questions et édite des

documents de vulgarisation destinés à être lus par des néophytes en la matière.

Bibliographie

Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 1975, 14 : 9–25.

Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 1975, 187 : 226–32.

Mc Grath J, Solter D. Completion of embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 1984, 37 : 179–83.

Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992, 69 : 915–26.

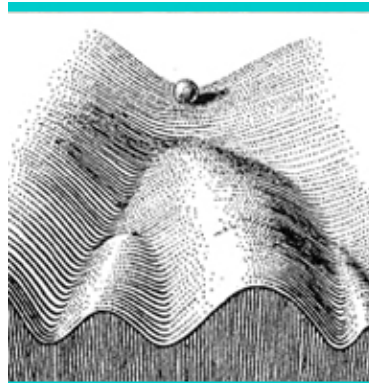
Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co–Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 1990 2 : 279–289.

Guo S, Kempfues KJ. Par–1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995, 81 : 611–20.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double–stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, 391 : 806–811.

Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 1998, 395 : 854.

Tabara H, Grishok A, Mello CC. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 1998, 282 : 430–1.



paysage épigénétique
imaginé par Conrad
Waddington

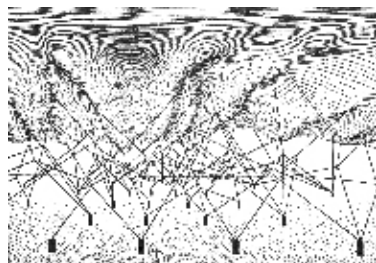
Intérêt de l'épigénétique

par **Michel Morange**

Professeur de Biologie à l'ENS et à l'Université Paris 6, Directeur du Centre Cavailles d'histoire et de philosophie des sciences de l'ENS.

Comme cela est rappelé dans l'historique, le terme « épigénétique » fut introduit en 1942 par Conrad Waddington pour désigner l'étude des processus par lesquels le génotype engendre le phénotype, c'est-à-dire par lesquels les gènes contrôlent le développement de l'organisme et son fonctionnement. L'épigénétique est l'héritière de l'épigenèse, la théorie proposée au milieu du XVIIIe siècle, selon laquelle l'organisme n'est pas formé dans l'oeuf, mais se construit progressivement au cours de l'embryogenèse. L'épigénétique avait pour ambition de compléter la génétique qui, selon Waddington, s'était limitée à une énumération des gènes, et à leur positionnement sur les chromosomes.

Les paysages épigénétiques imaginés par Waddington traduisaient sa vision de l'action des gènes. Au cours de l'embryogenèse et de la différenciation cellulaire, les cellules se déplacent dans un paysage dont le relief est dessiné par les gènes. Le rôle des gènes dans le développement embryonnaire est donc indirect, et l'environnement peut lui-même contribuer à dessiner le paysage épigénétique.



Le terme épigénétique a été à nouveau utilisé pour désigner un ensemble de travaux qui sont apparus ou se sont développés à la fin des années 1960s et au début des années 1970s, visant à caractériser les mécanismes moléculaires contrôlant l'expression des gènes au cours du développement embryonnaire. Les mécanismes ainsi mis en évidence – méthylation de l'ADN, variation de l'état de la chromatine – sont globaux, et peuvent affecter simultanément l'expression de multiples gènes. Ils s'opposaient donc aux mécanismes ciblés de régulation de l'activité des gènes par les facteurs de transcription, dérivés du modèle de l'opéron. L'épigénétique actuelle est l'héritière de cette deuxième épigénétique.

Les circonstances qui ont entouré la double naissance de l'épigénétique – considérée à chaque fois comme une réponse aux « faiblesses » de la génétique – marquent encore aujourd'hui ce domaine de recherche. L'épigénétique porte toujours sur elle un petit parfum d'hérésie et de scandale. Mais le développement rapide des travaux au cours de ces dernières années et l'ampleur des résultats obtenus lui ont aussi donné des caractéristiques nouvelles. Celles-ci permettent d'imaginer assez bien ce que sera la biologie de demain.

Le champ de l'épigénétique est d'abord caractérisé – mais, en cela, il ne se distingue pas de l'ensemble de la biologie actuelle – par la place importante réservée à la description structurale. La notion vague d'« état de la chromatine » est aujourd'hui remplacée par la description précise des interactions entre les formes modifiées des histones et les multiples protéines qui condensent ou décondensent celle-ci. Mais cette description structurale a deux caractéristiques additionnelles : elle est dynamique, et elle n'est pas limitée aux interactions locales. L'architecture chromosomique et l'organisation tri-dimensionnelle du noyau sont l'objet d'un nombre croissant de travaux, car considérés (cf. par exemple, l'article sur les travaux d'Edith Heard) comme l'explication de phénomènes complexes comme l'inactivation sélective d'un chromosome X sur deux.

Une deuxième caractéristique de ce domaine de recherches, évidente à la lecture de ce dossier, est son caractère unificateur. Les études rassemblées ici appartiennent aussi bien au champ de la biochimie – par la description précise des modifications protéiques – qu'à celui de la biologie moléculaire. Des processus cellulaires jusqu'alors séparés comme la régulation de l'expression génétique, la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire, des phénomènes génétiques rares comme les paramutations ou les

épimutations et même le contrôle du rythme circadien se trouvent réunis par la nature des mécanismes mis en jeu. De même que des mécanismes distincts – contrôle de l'expression génétique par l'action de facteurs de transcription ou par l'état de la chromatine, l'interférence ARN, sont montrés concourir aux mêmes processus au sein de la cellule.

Cette unification ne se fait donc pas autour d'un principe explicatif unique et nouveau, mais par la description progressive d'un réseau complexe d'interactions. Des mécanismes apparus, peut-être, pour assurer la condensation et la séparation des chromosomes au cours de la division cellulaire ou comme défense contre les virus, ont été réutilisés et recombinaisonnés pour assurer de nouvelles fonctions. Le domaine de l'épigénétique est certainement l'un des champs de recherche où le concept de bricolage cher à François Jacob trouve les meilleures illustrations.

Ces caractéristiques font de l'épigénétique un domaine frontière de la biologie actuelle, où une nouvelle vision du fonctionnement du vivant se construit peu à peu. L'isolement physique et fonctionnel des gènes, et leur domination au sein de la cellule, postulés par la génétique classique et confortés par la notion d'information génétique et la découverte par les biologistes moléculaires du code génétique, n'a plus sa place au sein de l'épigénétique. La vision épigénétique d'une cellule est plus structurale et dynamique que les visions génétique et moléculaire antérieures. Une vision informationnelle désincarnée du vivant cède la place à une nouvelle représentation mécanistique. La vision épigénétique ne remplace pas la vision génétique, elle la transforme. C'est pour cela qu'il est absurde, comme certains le font, de parler de « code histone » ou de « code épigénétique ». Car l'intérêt de l'épigénétique est précisément d'être une vision du contrôle de l'information génétique complémentaire de la vision moléculaire antérieure ; non une simple théorie concurrente.

L'importance de l'épigénétique est donc considérable du point de vue fondamental, mais aussi du point de vue pratique. De nombreuses pathologies – en particulier, mais pas seulement, celles liées à l'âge – ont sans doute leur origine dans des altérations épigénétiques. Le cancer en est un bon exemple ; ce qui n'exclut pas l'importance, aussi, des mutations somatiques dans la genèse de cette maladie. Les modifications épigénétiques étant le fruit du fonctionnement cellulaire, elles sont sensibles aux variations de celui-ci liées à des changements de l'environnement. Elles participent ainsi à la plasticité cellulaire et organismale.

Tout cela n'est pas une raison pour faire de l'épigénétique « l' » explication de tous les processus restés jusqu'alors inexpliqués, ni une forme d'hérédité concurrente de l'hérédité génétique. L'hérédité épigénétique est fondamentale au niveau cellulaire – où elle contribue dans l'organisme à la mémoire de l'identité cellulaire – ; sa place, dans l'hérédité inter-générationnelle est réelle – comme le montre le magnifique exemple des paramutations –, mais limitée dans le temps et dans la nature des processus impliqués. L'épigénétique ne remplace pas la génétique et la

biologie moléculaire – la nature du message génétique, et en particulier le codage précis de la structure des protéines, n'est pas remise en cause –, mais elle les enrichit et les transforme. Elle révèle l'extraordinaire richesse et diversité des mécanismes de contrôle de l'expression génétique.

- Petit survol historique
- Intérêt de l'épigénétique
- Des souris et des femmes
- Des maladies épigénétiques
- Paramutations chez la souris : une première
- Polycomb ou comment les mouches ont de la mémoire

Des souris et des femmes

En 1949, Murray Barr découvre une structure sombre et dense dans les cellules de mammifères femelles. Il ne sait pas encore que ce corpuscule éponyme est le chromosome X inactivé. L'histoire de cette découverte fait un grand pas avec des chattes calicots, des souris bigarrées et une chercheuse anglaise. En 1961, Mary Lyon propose pour la première fois l'idée que l'un des deux chromosomes X est inactivé aléatoirement, en observant des souris et des chats mutés pour un gène contrôlant la couleur du poil porté par l'X. Les mâles mutés affichent un pelage modifié monochrome, alors que les femelles ont la fourrure chamarrée, formée de zones sauvages d'une couleur, et de zones mutantes d'une autre couleur. Suite de l'histoire avec une chercheuse anglo – parisienne et dame souris.

Chez les mammifères, la différence sexuelle entre les femelles et les mâles est liée à un couple de chromosomes. Les femelles portent deux X alors que les mâles ont un X et un Y. Le Y est un petit chromosome qui porte peu de gènes, pour la plupart impliqués dans la détermination du sexe. L'X est un grand chromosome portant environ 1 300 gènes qui interviennent dans des fonctions générales. Afin d'égaliser le dosage génique avec les mâles, l'un des deux chromosomes X est inactivé chez les femelles. L'expression de la quasi-totalité des gènes est ainsi supprimée : une répression d'une telle ampleur est unique dans la cellule et c'est l'un des exemples les plus cités de régulation épigénétique.

Initiation de l'inactivation aléatoire

« Trois opérations semblent nécessaires pour déclencher l'inactivation aléatoire du chromosome X. La cellule doit premièrement compter le nombre de X présents dans la cellule. Si la cellule contient plus d'un chromosome X, elle va en laisser un seul actif, et inactiver l'autre ou les autres.

Deuxièmement, elle doit choisir quel chromosome X doit être inactivé. Dans les cellules de l'épiblaste, qui formeront l'embryon, l'inactivation se fait au hasard : elle touche soit l'X paternel, soit l'X maternel. Troisièmement, l'inactivation du chromosome X (XCI pour X Chromosome Inactivation) est amorcée. Chacune de ces étapes requière une zone du chromosome X, le centre d'inactivation du chromosome X, Xic pour X inactivation center », explique Edith Heard, Directrice de Recherche au CNRS, UMR 218 « Dynamique nucléaire et plasticité du génome » à l'Institut Curie.

L'XCI débute avec l'accumulation d'un ARN non codant, Xist, pour « X inactive specific transcript », dont le gène est situé au locus Xic. L'ARN Xist

s'accumule le long du chromosome dont il est transcrit et va l'inactiver en cis, en induisant des changements dans la structure de la chromatine. 1 000 à 2 000 copies de Xist vont décorer le chromosome. La nature de cette interaction est inconnue : Xist pourrait se lier à la matrice nucléaire et/ou à la chromatine directement.

Sur l'autre chromosome, le futur X actif, l'expression continue de l'ARN antisens de Xist empêche la transcription et l'accumulation de Xist. Cet ARN antisens de Xist, baptisé Tsix, est lui-même régulé par un autre transcrit, Xite. La délétion d'une petite zone en 3' de Xist, dans laquelle se trouvent Tsix et Xite, affecte le processus de choix aléatoire du X : c'est toujours le chromosome portant l'allèle délété qui est inactivé. Cette même délétion affecte le comptage des chromosomes puisque dans une cellule mâle, elle induit l'inactivation de l'unique chromosome X.

Comment expliquer l'inactivation d'un seul chromosome X dont deux exemplaires sont présents au même moment, dans le même noyau ? « Certains chercheurs pensaient qu'il y avait un facteur limitant, une protéine, par exemple, qui bloquerait l'action d'un Xic par cellule diploïde, indique Edith Heard. Mais pour que ce modèle soit valable, il faudrait qu'une seule molécule soit présente dans le noyau, ce qui est physiquement peu probable. Autre hypothèse : les deux chromosomes entrent en communication. Dans ce cas, un contact entre les deux X pourrait faciliter le comptage et le choix. Nous avons donc regardé de plus près la localisation des loci Xic dans le noyau de cellules souches embryonnaires (ES) de souris femelles en cours de différenciation, en collaboration avec l'équipe de R. Eils en Allemagne, spécialisée dans l'analyse d'images. Nous avons mis en évidence le rapprochement des deux Xics dans les premiers instants de l'XCI, alors qu'ils sont séparés avant la différenciation, quand les deux chromosomes sont encore actifs.

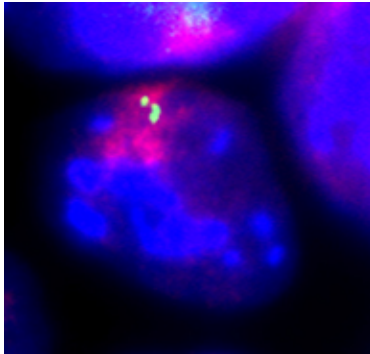
Nous avons ensuite cherché si les Xics se rapprochaient dans des cellules souches embryonnaires mâles qui contiennent un chromosome artificiel de levure porteur d'un transgène Xic en multcopie. Nous avons auparavant montré que dans cette souche, le Xic du chromosome artificiel était capable d'être reconnu comme un Xic ectopique et d'induire l'inactivation en cis de l'autosome ou du chromosome X endogène. Dans ces cellules, encore, nous avons mis en évidence la colocalisation des Xics. »

Mais les investigations ne s'arrêtent pas là. L'équipe a ensuite prouvé que les deux Xics se rejoignent juste avant l'accumulation de Xist à partir d'un des deux allèles, suggérant ainsi un lien entre la colocalisation et l'initiation de l'inactivation.

Enfin, des études sur des cellules ES femelles portant la délétion de Tsix et Xite ont permis de mettre en évidence un lien entre appariement des Xics, choix et comptage. Dans ces cellules, où les fonctions de comptage et de choix sont altérées, aucune colocalisation n'a pu être observée, à aucun stade de différenciation. Cette délétion est donc importante pour l'interaction des Xics.

D'autres expériences montrent que la colocalisation est nécessaire mais pas suffisante pour induire le comptage et le choix (Bacher et al., Nat Cell Biol 2006).

Une autre étude des interactions au locus Xic a montré, par des moyens similaires, que deux petites régions sont importantes pour l'appariement (Xu et al., Science 2006). Des délétions dans Tsix ou Xite, qui affectent les fonctions de comptage et de choix, diminuent ou abolissent la colocalisation des Xics. Lorsque des transgènes de ces deux petites zones sont intégrés à un autosome, ce dernier est capable de s'apparier avec un chromosome X dans une cellule ES XX. « Très récemment, Sandrine Augui, étudiante dans notre équipe, a découvert une deuxième zone d'appariement. Les résultats préliminaires suggèrent que cette zone est impliquée dans une première interaction entre les deux X, qui pourrait favoriser la deuxième, en rapprochant les loci de chaque chromosome », ajoute Edith Heard.



Cellule femelle ES au début de la différenciation (à 2 jours), technique DNA Fish fluorescence in situ hybridisation
DNA Fish : chromosome X en rouge, centre d'inactivation Xic en vert, noyau en bleu (DAPI)

Marques épigénétiques

« A l'heure actuelle, personne ne sait comment Xist induit l'XCI. Des travaux récents indiquent que Xist est un facteur multi-tâches qui ne joue pas uniquement un rôle dans l'initiation du silencing, mais qui participe aussi à son maintien en recrutant directement ou indirectement des protéines du groupe Polycomb » explique Edith Heard.

Le silencing du chromosome X s'opère en plusieurs étapes dans les cellules ES de souris femelles. Dans les premiers instants de l'inactivation, juste après que Xist soit venu décorer le chromosome, les histones sont modifiées. Cette transformation est due à l'action répressive de Xist, mais ce mécanisme reste inconnu. Des histones désacétylases et/ou des histones déméthylases modifient les histones. Mais d'autres mécanismes peuvent être envisagés, comme le clivage protéolytique de la queue des histones, le remodelage des histones ou leur remplacement. A ce stade, les gènes soumis à l'inactivation cessent d'être transcrits.

Puis les histones subissent d'autres modifications, comme la méthylation et l'ubiquitinylation. Etant donné leur apparition précoce, les modifications des histones pourraient jouer un rôle dans l'initiation et/ou le maintien de l'état inactif.

Les histones méthyltransférases impliquées dans ces changements ne sont pas toutes clairement identifiées, mais le rôle de certaines commence à être

élucidé. Le complexe PRC2 est détecté sur le chromosome inactivé à ce stade. PRC2 est un grand complexe multi–protéique, formé notamment de protéines du groupe Polycomb, qui est impliqué dans le maintien initial d'un état réprimé d'expression génique dans différents systèmes. L'une de ses protéines est très probablement impliquée dans la méthylation de l'histone H3. Le complexe PRC1 apparaît juste après PRC2 sur le chromosome. Le recrutement de PRC2 et PRC1 dépend de la présence de Xist, bien qu'aucune interaction directe entre l'ARN et les complexes Polycomb n'ait été prouvée. Jusqu'à la fixation de PRC2 et PRC1 sur l'X, l'XCI est réversible. A l'étape suivante, le processus ne l'est plus.

Les modifications des histones et les protéines du groupe Polycomb ne sont pas seules garantes du maintien de l'état inactif du chromosome X. D'autres caractéristiques y concourent. La réplication asynchrone du X inactivé est une forme de ségrégation temporelle des deux chromosomes qui permet probablement de limiter la présence de facteurs de transcriptions aux alentours du X inactif.

Puis, macroH2A1 s'associe au X inactif. Ce variant de l'histone H2A, dont le rôle dans l'inactivation est obscur, semble empêcher le remodelage efficace de la chromatine par SWI/SNF.

A la fin d'une longue série de transformations épigénétiques, le chromosome X est réprimé de façon stable, et le taux de réactivation de gènes liés à l'X est plus faible que le taux de mutation dans les cellules somatiques. Mais dans tous les types cellulaires, l'X n'a pas nécessairement subi les mêmes modifications épigénétiques, et la stabilité de son inactivation en dépend.

Ainsi, chez les mammifères euthériens, la méthylation des cytosines de l'ADN, qui est l'une des marques épigénétiques les plus résistantes, concerne seulement les cellules de l'embryon. Dans les cellules extra–embryonnaires, qui ne portent pas ce verrouillage épigénétique, on observe un taux de réactivation plus important. Cette différence peut s'expliquer simplement.

Dans l'embryon, la mémoire du silencing doit être très solide car les cellules vont être fonctionnelles tout au long de la vie de l'individu. A l'inverse, les cellules extra–embryonnaires, comme celles qui forment le placenta, n'ont pas besoin d'une inactivation très stable car elles sont importantes lors de la gestation uniquement.

Depuis quelques temps, on découvre que l'architecture du noyau est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes. Certains indices laissent penser que la position du chromosome X dans le noyau pourrait jouer un rôle dans cette inactivation.

A ce jour, on ne sait absolument pas comment Xist décore le chromosome X en cis ni comment il induit sa répression transcriptionnelle. Ces deux questions constituent des interrogations majeures dans le domaine.

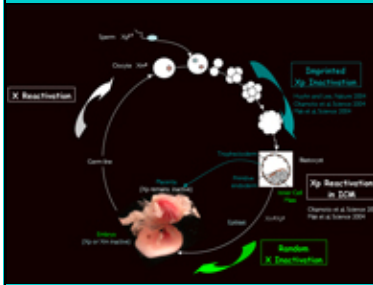
Par ailleurs, il existe, chez les mammifères, des gènes non soumis à l'empreinte mais à expression mono–allélique. La détermination de l'allèle à réprimer se fait–elle au même moment que l'XCI? Ces deux phénomènes partagent–ils des mécanismes similaires? Ces questions sont aujourd'hui sans réponse. « Nous cherchons maintenant à mieux comprendre le rôle de chaque marque épigénétique et leur interdépendance dans l'inactivation du chromosome X, explique Edith Heard. Mais l'impact de ces travaux dépasse le strict cadre de l'XCI, dans la mesure où les phénomènes épigénétiques

apparaissent de plus en plus déterminants dans des maladies comme le cancer. Lorsqu'une cellule perd une marque épigénétique, le profil d'expression de ses gènes peut s'en trouver complètement dérégulé. Elle peut alors prendre le chemin de la prolifération anarchique et générer un cancer. »

Focus sur ...

Cycle d'activation et d'inactivation

Avant l'inactivation aléatoire du X dans l'embryon murin, on observe, dès le stade 4/8 cellules, la mise en place de l' inactivation du X paternel. Cette inactivation perdure jusqu'au stade blastocyste précoce. Le chromosome X paternel reste inactivé dans les cellules extra-embryonnaire, c'est-à-dire dans le placenta essentiellement. Dans le bouton embryonnaire, 4,5 jours après la fécondation, au moment de l'implantation de l'embryon dans l'utérus, le X paternel est réactivé. Durant un court moment, les cellules du futur fœtus auront à nouveau deux chromosomes X actifs. Puis l'un des deux est inactivé, de façon aléatoire cette fois. Dans les cellules de la lignée somatique, cette inactivation est maintenue. Par contre, dans les cellules de la lignée germinale, qui produiront les ovocytes, le chromosome X est à nouveau réactivé 10,5 jours après la fécondation.



[cliquer pour agrandir](#)

- [Petit survol historique](#)
- [Intérêt de l'épigénétique](#)
- [Des souris et des femmes](#)
- [Des maladies épigénétiques](#)
- [Paramutations chez la souris : une première](#)
- [Polycomb ou comment les mouches ont de la mémoire](#)

Histoire de Xist

Xist n'a pas toujours été un ARN non codant

L'origine de l'ARN non codant Xist était inconnue jusqu'au mois de juin dernier. Le gène Xist, très conservé chez les euthériens (appelés aussi placentaires), n'avait jusqu'à cette date pas d'homologue connu chez les autres mammifères, marsupiaux et monotrèmes. Philip Avner, Directeur de Recherche au CNRS, dirige à l'Institut Pasteur de Paris, l'Unité de Génétique moléculaire murine. Son équipe, en collaboration avec Laurent Duret et le Génoscope, vient de montrer que Xist dérive partiellement d'un gène ancestral qui codait une protéine (Duret et al., Science 2006). Après la divergence entre les euthériens et les marsupiaux, l'ancêtre de Xist a perdu la fonction de coder cette protéine. Ceci indique que l'inactivation du chromosome X a évolué indépendamment dans ces deux branches. Chez la souris, petit mammifère placentaire, il existe deux types d'XCI. Le premier est aléatoire et concerne les cellules du futur embryon. Le second est soumis à l'empreinte : c'est toujours l'X paternel qui est inactivé dans les cellules du trophoblaste. Ces deux mécanismes requièrent la présence de Xist. Chez les marsupiaux, l'XCI est également soumise à l'empreinte et c'est encore l'X paternel qui est inactivé. Mais dans ce cas, le mécanisme ne dépend pas de Xist ; il semblerait qu'il soit dissemblable de ceux qui ont lieu chez la souris. L'inactivation paraît moins stable chez les marsupiaux que chez les euthériens et pourrait être un processus plus individuel de répression des gènes, qui seraient éteints les uns après les autres, et non une inactivation du chromosome entier. «Pour une même finalité, on trouve des mécanismes épigénétiques très différents chez les euthériens et les marsupiaux, conclut Philip Avner. Ceci nous montre une fois de plus que François Jacob avait raison de parler de bricolage évolutif ! »

Bibliographie

Bacher C, Guggiari M, Brors B, Augui S, Clerc P, Avner P, and Heard E. Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. *Nat Cell Biol* 2006, 8 (3) : 293–9.

Xu N, Tsai CL, and Lee J. Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. *Science* 2006, 311 : 1149–52.

Okamoto I, Heard E. The dynamics of imprinted X inactivation during preimplantation development in mice. *Cytogenet Genome Res* 2005, 113 : 318–24.

Heard E. Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr Opin Genet Dev* 2005, 15(5) : 482–9.

Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 2004, 303 : 644–9.

Duret L, Chureau C, Samain S, Weissenbach J, Avner P. The Xist RNA gene evolved in eutherians by pseudogenization of a protein-coding gene. *Science* 2006, 312 : 1653-5.

Des maladies épigénétiques

Le syndrome de Silver-Russell (SRS) et le syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) sont deux maladies dramatiques. Elles affectent la croissance fœtale chez l'homme. Les enfants atteints de SRS sont nains et présentent une dysmorphie faciale, une macrocéphalie, une asymétrie du squelette, une puberté précoce et des anomalies génitales. Le BWS est un désordre complexe caractérisé par une sur-croissance fœtale, une taille excessive des organes internes et des anomalies de développement à la naissance qui prédisposent à des tumeurs embryonnaires. Dans certains cas, ces syndromes ont une étiologie génétique. Mais plus souvent, c'est une altération épigénétique de gènes soumis à empreinte génomique qui en est responsable.

Les gènes soumis à l'empreinte sont des gènes dont l'expression est mono-allélique. Une seule de leurs copies, maternelle ou paternelle, est exprimée, l'autre étant silencieuse. On dénombre à ce jour environ 70 gènes soumis à empreinte chez l'Homme. Ils ont, pour la plupart d'entre eux, un homologue chez la souris, lui-même soumis à l'empreinte. Ces gènes sont majoritairement impliqués dans le développement de l'embryon et du placenta, dans le contrôle de la prolifération cellulaire et dans le comportement.

Régulation de l'empreinte

Les gènes soumis à l'empreinte sont généralement réunis en clusters dans le génome humain comme dans le génome murin. Ces grandes zones géniques, appelées domaines soumis à l'empreinte, sont régulées par autant de régions de contrôle de l'empreinte, baptisées ICRs pour Imprinting Control Region. L'allèle maternel d'une ICR porte des marques épigénétiques différentes de l'allèle paternel : l'un des deux seulement est actif. Ainsi le gène est régulé de façon allèle spécifique.

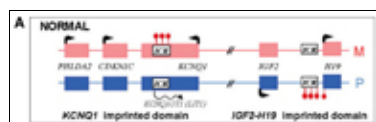
Robert Feil, Directeur de Recherche, travaille depuis cinq ans sur ce sujet à l'Institut de génétique moléculaire de Montpellier, UMR 5535 du CNRS. « C'est la méthylation de l'ADN qui régule habituellement les ICRs, en touchant l'une des deux copies. Mais d'autres modifications épigénétiques peuvent être impliquées dans ce contrôle. Nous avons montré, avec David Umlauf et Katia Delaval, que des modifications chimiques des histones, comme la méthylation ou l'acétylation, peuvent aussi déterminer l'empreinte » (Umlauf D et al., Nature Genet 2004 ; Delaval K, Feil R. Curr Opin Genet Dev 2004). Au cours du développement d'un individu, l'empreinte des ICRs est maintenue dans la lignée somatique. Dans la lignée germinale, elle est effacée et une nouvelle empreinte est façonnée au cours de la

gamétogenèse. « Les mécanismes de maintien de l’empreinte dans la lignée somatique sont encore largement inconnus, mais nous savons que les méthyltransférases, les enzymes qui méthylent l’ADN, sont impliquées dans ce processus, ajoute Robert Feil. Nous avons montré que les enzymes qui modifient les histones y participent aussi. » (Fournier et al. EMBO J, 2002).

Les domaines IGF2-H19 et KCNQ1

L’une des multiples causes du syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) est la surexpression d’IGF2 (Insulin-like growth factor 2), un gène codant pour un facteur de croissance exprimé uniquement à partir de l’allèle paternel. Le produit de ce gène est impliqué dans la croissance fœtale. IGF2 est situé sur le chromosome humain 11p15. Cette région comporte deux domaines d’empreinte : le domaine IGF2-H19 et le domaine KCNQ1. « Chez la souris, on retrouve une organisation similaire sur le chromosome 7, les domaines sont très conservés entre les deux espèces. La souris est donc un très bon modèle animal pour étudier les mécanismes épigénétiques impliqués dans le SRS et le BWS » indique Robert Feil qui travaille depuis longtemps avec le petit rongeur.

Lorsqu’IGF2 est surexprimé chez la souris, elle présente un phénotype de sur-croissance dès le début du développement fœtal. A l’inverse, quand l’expression du gène IGF2 est réduite, la souris est naine. A côté d’IGF2 se trouve le gène H19 qui code un ARN non codant dont la fonction est inconnue. L’ICR de ce domaine se trouve en amont de H19. Sur l’allèle maternel, l’ICR n’est pas méthylée. Des études chez la souris ont permis de mettre en évidence la fixation de protéines sur cette ICR non méthylée. Le gène IGF2 est ainsi isolé de son enhancer situé en aval de H19 : il n’est pas transcrit. Le gène H19, quant à lui, est transcrit. Sur l’allèle paternel, à l’inverse, l’ICR est méthylée et empêche les protéines de se lier à l’ADN. L’enhancer n’est plus isolé du gène IGF2, qui est transcrit. L’allèle paternel du gène H19, progressivement méthylé au cours du développement, reste silencieux.



(cliquer pour agrandir)

Les domaines d’empreinte KCNQ1 et IGF2-H19 situés sur le chromosome humain 11p15 et sur le chromosome 7 murin

En aval de la zone IGF2-H19 se trouve le domaine d’empreinte KCNQ1. Les gènes du cluster sont régulés par une ICR qui se situe dans un intron de

KCNQ1. Cette ICR, baptisée KvDMR1, renferme un promoteur. Ainsi sur l'allèle paternel, où KvDMR1 n'est pas méthylée, un ARN non codant, KCNQ1OT1, est transcrit. « Cet ARN est très probablement impliqué dans le silencing de tout le domaine sur le chromosome paternel. A proximité de KCNQ1, l'expression d'autres gènes est supprimée sur la copie paternelle. Parmi eux, on trouve CDKN1C, appelé aussi P57KIP2, un supresseur de tumeur, ou encore PHLDA2, un gène important pour la croissance du placenta » explique le chercheur de Montpellier. Sur l'allèle maternel, à l'inverse, KvDMR1 est méthylée et l'ARN non codant n'est pas transcrit.

Etiologie épigénétique du SRS et du BWS

Les marques épigénétiques des ICRs sont installées dans les cellules germinales et sont maintenues lors du développement, après la fécondation. « Lorsque le maintien de ces marques épigénétiques ne se fait pas correctement au cours de l'embryogenèse, le bébé peut devenir malade ou risque de développer certains cancers » ajoute Robert Feil.

Les équipes coordonnées par Yves Le Bouc, directeur de l'Unité Inserm 513 « Croissance, différenciation et processus tumoraux » à Paris, ont repéré une perte de méthylation au niveau de l'ICR H19 chez un tiers des patients atteints du SRS (Gicquel et al. Nat Genet, 2005). Le SRS survient de façon sporadique dans la plupart des cas, et le caryotype des patients est normal. Lorsqu'il y a perte de méthylation de l'allèle paternel, l'expression du gène IGF2 est très fortement réduite, d'où le nanisme, alors que H19 est exprimé à partir des deux allèles.

A l'opposé, dans 10% des cas, le syndrome de Beckwith–Wiedemann est associé à un gain de méthylation sur l'ICR H19. Ainsi, le gène IGF2 est exprimé de façon bi-allélique, ce qui explique la sur-croissance, alors que le gène H19 est réduit au silence. Ce syndrome survient de façon sporadique dans la plupart des cas après des modifications épigénétiques dans la région 11p15.

Le BWS, dans la moitié des cas, résulte de dérégulations épigénétiques à l'ICR KvDMR1. Une perte de méthylation à cet endroit induit l'expression bi-allélique du transcrit non codant KCNQ1OT1, et la réduction de l'expression de CDKN1C. Ce dernier étant un facteur de limitation de la croissance, il est tentant de le désigner comme responsable du syndrome dans cette configuration. Le fait que certains cas de BWS sont dus à une mutation génétique de CDKN1C vient renforcer cette hypothèse.

Accident au début du développement

Mais à quel moment les modifications épigénétiques qui conduisent au BWS

et au SRS se produisent-elles? Il semblerait que ces événements se passent à un stade précoce du développement, après la fécondation, nous apprend Robert Feil. « En effet, chez la plupart des patients atteints de SRS, la perte de méthylation de l'ADN au niveau de l'ICR H19 n'affecte pas toutes les cellules du sang. De la même manière, les fibroblastes dérivés des tissus montrent une perte de méthylation mosaïque ». Ces observations suggèrent que la perte de méthylation, chez ces patients sporadiques, n'a pas eu lieu dans le spermatozoïde. Dans ce cas, toutes les cellules de l'individu seraient identiques et présenteraient une perte de méthylation homogène.

Que le BWS découle d'une perte de méthylation au niveau de KvDMR1 ou d'un gain de méthylation sur l'ICR H19, l'altération épigénétique semble survenir tôt dans le développement de l'embryon. Cependant, l'hypothèse que cet événement puisse avoir lieu dans la lignée germinale, au cours de la formation des gamètes, ne peut être exclue.

L'étude des jumeaux monozygotes renforce l'hypothèse d'un événement embryonnaire précoce. Chez les jumeaux homozygotes, qui sont issus d'un œuf unique qui se scinde, il arrive que l'un des jumeaux soit atteint du SRS, alors que l'autre est sain. La transformation épigénétique a donc eu lieu après la scission de l'embryon précoce, sinon les deux jumeaux seraient touchés. Des observations similaires ont été faites chez des jumeaux atteints du BWS. Dans certains cas l'un des jumeaux présente un BWS lié à une perte de méthylation au niveau de la KvDMR1 alors que l'autre en est préservé. Pour être précis, il faudrait dire « jumelles » car presque toutes les études relatives concernent des femmes.

Ce détail n'est pas sans importance. Il a conduit plusieurs équipes dans le monde, dont celle de Robert Feil, à penser que cette augmentation de la fréquence de perte de méthylation au niveau de l'ICR H19 et KvDMR1 pouvait être liée à la présence de deux chromosomes X dans les cellules des embryons femelles.

Les chromosomes X impliqués

« En collaboration avec Neil Brockdorff, de Londres, nous avons testé cette hypothèse en utilisant des cellules souches embryonnaires (ES) de souris. Dans différentes lignées de cellules femelles ES XX indifférenciées, lorsque les deux chromosomes X sont actifs, nous avons remarqué de nombreuses séquences d'ADN hypométhylées. Nous avons alors étudié l'état de méthylation des régions qui contrôlent l'empreinte de H19 et KCNQ1. L'ICR H19 était déméthylée sur l'allèle paternel – alors qu'elle est normalement méthylée – dans ces cellules. La région KvDMR1 se trouvait aussi hypométhylée, alors qu'elle est ordinairement méthylée sur l'allèle maternel. Cette hypométhylation était associée à une diminution de la quantité des ADN méthyltransférases Dnmt3a et Dnmt3b. Après différenciation in vitro, ces cellules ne retrouvaient pas leur état de méthylation normal au niveau de ces ICRs » (Zvetkova et al. Nature Genet, 2005).

Des spectres variés

Le phénotype d'un individu atteint de SRS est-il variable suivant le moment où la perte de méthylation au niveau de l'ICR H19 advient ? Si elle a eu lieu précocement, elle touche alors la plupart, voire toutes les cellules. Si elle est plus tardive, une plus petite fraction des cellules est concernée par l'événement. Il existe effectivement une corrélation. Chez tous les patients présentant le spectre total du SRS, et seulement chez eux, on observe une perte totale de méthylation sur cette région. Chez les individus mosaïques, le syndrome est plus atténué.

Un problème de maintenance

Si les altérations de l'empreinte qui sont responsables du BWS et du SRS se produisent tôt au cours du développement embryonnaire, cela signifie qu'elles n'étaient pas présentes dans l'œuf. Un dérèglement de la maintenance de l'empreinte est donc survenu. Ce processus, qui implique le maintien de la méthylation de la chromatine et des modifications des protéines associées à l'ADN, reste jusqu'à ce jour une énigme.

Un problème similaire de maintien de l'empreinte advient dans les cellules souches embryonnaires et les embryons extraits de leur milieu naturel et cultivés in vitro. Après une FIV ICSI (fécondation in vitro avec injection du spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovule), la fréquence de BWS et SRS augmente, bien que le mécanisme causal reste inconnu. Il est possible que ces manipulations prédisposent à une instabilité épigénétique dans les régions qui contrôlent l'empreinte.

L'étude du processus de maintien de la méthylation allèle-spécifique au niveau des ICRs est très importante pour comprendre l'étiologie de désordres comme le SRS ou le BWS. Ces recherches occupent actuellement une partie de l'équipe de Robert Feil. « Nous nous intéressons notamment au rôle de la méthylation des histones dans ce mécanisme. Alexandre Wagschal, par exemple, essaie de déterminer quelles histones méthyltransférases y sont impliquées en utilisant des souris KO. »



Souris d'une lignée consanguine M. m. molossinus, qui proviennent du Japon, utilisées pour les recherches sur l'empreinte

- Petit survol historique
- Intérêt de l'épigénétique
- Des souris et des femmes
- Des maladies épigénétiques
- Paramutations chez la souris : une première
- Polycomb ou comment les mouches ont de la mémoire

Bibliographie

Delaval K, Feil R. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* 2004, 14 : 188–195.

Umlauf D, Goto Y, Cao R, Cerqueira F, Wagschal A, Zhang Y, Feil R. Imprinting along the *Kcnq1* domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes. *Nat Genet* 2004, 36 : 1296–300.

Fournier C, Goto Y, Ballestar E, Delaval K, Hever AM, et al. Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *EMBO J* 2002, 23 : 6560–6570.

Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, Houang M, Steunou V et al. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver–Russell syndrome. *Nat Genet* 2005, 37 : 1003–1007.

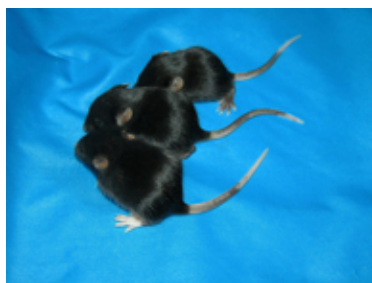
Zvetkova I, Apedaile A, Ramsahoye B, Mermoud JE, Crompton LA et al. Global hypomethylation of the genome in XX embryonic stem cells. *Nature Genet* 2005, 37 : 1274–1279.

Lewis A, Mitsuya K, Umlauf D, Smith P, Dean W, Walter J, Higgins M, Feil R, Reik W. Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. *Nat Genet* 2004, 36 :1291–5.

Paramutation chez la souris : une première

« Les gens sérieux pensent volontiers qu'un résultat déconcertant obtenu par hasard est synonyme d'échec. Persévérer, essayer de comprendre une bizarrerie des années durant leur semble pure folie. C'est pourtant ce que j'ai fait, et j'ai découvert un phénomène épigénétique inédit chez l'animal ! »
Minoo Rassoulzadegan, Directrice de Recherche à l'Inserm, UMR 636 « Génétique du développement normal et pathologique » à Nice, vient en effet de trouver la première paramutation chez la souris. Elle était considérée jusque là comme le propre des plantes. Récit d'une découverte.

Minoo Rassoulzadegan et son équipe travaillaient sur des souris mutantes depuis plusieurs années. La mutation en question invalide la synthèse du récepteur à tyrosine kinase Kit qui joue un rôle dans différents processus de développement comme la différenciation des cellules germinales, l'hématopoïèse et la mélanogenèse. Cette mutation est très facilement repérable chez la souris. Alors que les souris sauvages ont une couleur uniforme sur tout le corps, les hétérozygotes, portant un allèle sauvage + et un allèle muté m, donnent l'impression d'avoir marché dans la neige : leurs pattes et le bout de leur queue sont blancs. Quant aux homozygotes, qui présentent deux allèles mutés, ils meurent rapidement après la naissance.



Souris paramutantes aux extrémités blanches

Une étrange ségrégation

« Nous avons repéré une ségrégation anormale des phénotypes après avoir croisé entre elles des souris hétérozygotes m/+. Selon les lois de Mendel, nous attendions un tiers de sauvages +/+ et deux tiers d'hétérozygotes m/+ étant donné le caractère léthal de la mutation à l'état homozygote m/m. A la première génération, 54 souris avaient la queue et les pattes blanches, et 3 souris seulement présentaient la coloration uniforme caractéristique du phénotype sauvage. La plupart des souriceaux de génotype sauvage +/+ se

camouflaient donc derrière un phénotype mutant ! » explique Mino Rassoulzadegan. Cette forme dite « paramutée » de l'allèle Kit se traduit par un phénotype mutant noté Kit*. Le terme de paramutation décrit des modifications épigénétiques transmises de façon clonale lors du développement d'un organisme et susceptibles d'être héritées par sa descendance après croisement. Dans ce cas, la ségrégation des phénotypes ne suit pas les lois de Mendel.

D'autres croisements ont été réalisés afin de savoir si l'allèle paramuté pouvait se transmettre par les deux sexes. Des souris femelles sauvages +/- croisées avec des mâles mutants m/+ ont donné naissance à 40 souriceaux tachetés de blanc et 4 petits au phénotype sauvage. Des souris femelles mutantes m/+ croisées avec des mâles sauvages +/- ont engendré 36 souriceaux au phénotype mutant, tacheté de blanc, et 5 petits au pelage uniforme.

« Nous avons ainsi vérifié que l'allèle paramuté se transmet par les femelles et par les mâles » indique Mino Rassoulzadegan.

Des souris mâles Kit* porteurs de l'allèle paramuté croisés avec des femelles sauvages +/- donnent à la première génération 26 souriceaux partiellement tachetés de blancs et 40 rejetons sauvages. Le croisement réciproque de femelles Kit* avec des mâles sauvages engendre 23 petits partiellement tachetés et 34 souris de couleur uniforme.

Ainsi, le phénotype mutant est plus ou moins prononcé selon le type de croisement. Il se dilue progressivement au fil des générations.

Les ARNs en cause

« Nous avons découvert une paramutation chez la souris, restait à en trouver l'origine moléculaire. L'étude de la séquence primaire de l'ADN n'avait révélé aucune différence entre les souris sauvages et les paramutantes. Ce fut l'état de méthylation de l'ADN et des histones dans le promoteur minimal de Kit qui nous intéressa ensuite, indique Mino Rassoulzadegan. Là encore, aucun changement significatif ne fut détecté ni du côté de la méthylation de l'ADN ni du côté de celle des histones entre les sauvages, les mutants et les paramutés. L'altération d'un élément régulateur très éloigné du locus Kit restait envisageable. Malheureusement, nous n'avons pu étudier cette hypothèse faute de pouvoir localiser un tel élément. »

La chromatine n'étant pas affectée au niveau du promoteur de Kit, ce sont les ARNs qui ont été ensuite étudiés. La recherche fut cette fois fructueuse ! Une étude antérieure avait montré que chez les mutants hétérozygotes, le phénotype tacheté de blanc était le résultat de la diminution de l'expression du récepteur Kit. Une étude chez les paramutants prouva qu'il en était de même. La quantification des ARNs messagers matures de Kit chez les hétérozygotes et les paramutants révéla qu'ils étaient deux fois moins nombreux que chez les sauvages. Cependant, à côté de cette diminution d'ARNm matures, des ARNs Kit de tailles anormales dérivés de l'allèle génétiquement sauvage furent détectés en grande quantité.

Une accumulation inhabituelle

« Après avoir découvert un indice moléculaire associée à la paramutation, il nous fallait trouver comment l'état paramuté se transmet de génération en génération. La paramutation étant transmise par les mâles et les femelles, nous avons choisi d'étudier les spermatozoïdes, beaucoup plus faciles d'accès que les ovules, et moins encombrés d'ARNs et de protéines que leurs homologues femelles » ajoute Minoou Rassoulzadegan.

L'étude de la spermatogenèse chez les hétérozygotes a montré que la transcription d'ARNs Kit dans les spermatides était trois fois plus élevée que chez les sauvages. Résultat de cette dérégulation : des ARNs Kit sont détectés dans le sperme mature des hétérozygotes, ainsi que dans celui des paramutants, alors qu'ils sont indétectables dans le sperme sauvage. Cette découverte est d'autant plus intéressante que, chez l'homme, la présence d'ARNs a été récemment mise en évidence dans les spermatozoïdes, sans qu'on puisse en donner une interprétation précise (Krawetz SA, Nat Rev Genet, 2005). Certains types d'ARNs paternels, comme les micro-ARNs, pourraient jouer un rôle dans l'embryogenèse humaine précoce. Cette étude chez la souris ouvre peut-être de nouvelles perspectives.

Induction du phénotype mutant

« Cette accumulation d'ARNs Kit dans le noyau des spermatozoïdes nous a interpellés. L'événement qui induit le phénotype paramuté serait-il le transfert d'ARNs dans l'œuf fécondé ? s'interrogea la chercheuse niçoise. Nous avons donc micro-injecté des ARNs provenant soit des souris sauvages soit des hétérozygotes dans des embryons au stade une cellule. »

Les ARNs des hétérozygotes injectés, la descendance était viable, et la moitié des souriceaux arborait des extrémités blanches, que ces ARNs soient d'origine somatique, en provenance du cerveau, ou qu'ils soient préparés à partir du sperme.

« Ces résultats nous ont conduit à penser que ce sont les produits partiels de dégradation des ARNs Kit qui sont responsables de l'état paramuté » expose Minoou Rassoulzadegan.

Pour induire la dégradation des ARNs Kit, deux micro-ARNs simples-brins de 21 nucléotides, spécifiques de l'ARNm Kit, ont été injectés dans un embryon de souris. L'effet attendu a effectivement été observé : les souriceaux sont nés avec la queue et les pattes blanches, et ce phénotype était transmis à leur progéniture. Ainsi le génome d'un embryon précoce mis en présence de micro-ARNs subit une transformation épigénétique stable et transmissible à sa descendance.

Beaucoup de questions et quelques pistes

Comment une telle paramutation survient-elle ? Comment est-elle transmise de génération en génération ? L'allèle sauvage porte-t-il une marque qui n'aurait pas été détectée ? Ces questions sont sans réponse. Dans le monde végétal, où ce phénomène est connu depuis cinquante ans, le mécanisme qui provoque des paramutations reste indéterminé, même chez les modèles les plus étudiés.

Cependant, on soupçonne un appariement incomplet des chromosomes homologues à la méiose d'être l'événement déclencheur du phénomène d'ARN interférence, nommé co-suppression chez les plantes et silencing méiotique chez *Neurospora*. Des études chez d'autres mutants du gène *Kit* semblent concorder avec cette idée.

Un nouveau mode d'hérédité vient d'être découvert pour la première fois chez la souris. Mais rien ne nous dit que c'est un mode de transmission généralisé chez cet animal ! « Si ! rétorque Mino Rassoulzadegan. Nous injectons d'autres micros-ARNs, qui ciblent différents loci, et nous voyons apparaître d'autres phénotypes mutants ! » Affaire à suivre...

- [Petit survol historique](#)
- [Intérêt de l'épigénétique](#)
- [Des souris et des femmes](#)
- [Des maladies épigénétiques](#)
- [Paramutations chez la souris : une première](#)
- [Polycomb ou comment les mouches ont de la mémoire](#)

Bibliographie

Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 2006, 441 : 469–74.

Krawetz SA. Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat*

Rev Genet 2005, 6 : 633-42.

Polycomb ou comment les mouches ont de la mémoire

Polycomb est une protéine identifiée pour la première fois par Pamela Lewis en 1947, chez *Drosophila melanogaster*, la petite mouche favorite des généticiens. Elle a donné son nom à un groupe de protéines clé de la mémoire de l'identité cellulaire, très conservé au cours de l'évolution. Pendant longtemps, ces protéines ont été considérées comme de fidèles mais simples gardiennes de certains états chromatinien. Des études récentes indiquent que leur rôle s'avère plus complexe que prévu...

Au début du développement, les cellules d'un organisme se différencient : un destin cellulaire leur est attribué. Une fois cette identité établie, elle doit être maintenue toute la vie durant. Chez *Drosophila*, insecte métamérique, l'identité de chaque cellule d'un segment est déterminée par le profil d'expression de gènes spécifiques le long de l'axe antéro-postérieur de l'animal. Ces gènes, baptisés gènes homéotiques, sont répartis en deux clusters sur un même chromosome, appelés complexes Antennapedia et Bithorax. L'établissement du profil d'expression des gènes homéotiques, qui confère à chaque cellule son identité, résulte d'une cascade de facteurs de transcription maternels et zygotiques qui ne sont présents dans l'embryon que provisoirement. La majorité des facteurs de transcription disparaissent au milieu de l'embryogenèse, mais l'état transcriptionnel des gènes homéotiques est maintenu tout au long de la vie par les protéines du groupe Polycomb, PcG, et celles du groupe trithorax, trxG. Leur rôle est antagoniste : les protéines du PcG maintiennent la répression des gènes homéotiques qui ont été inactivés au cours de l'embryogenèse précoce, alors que les protéines du trxG maintiennent l'état actif de gènes qui ont été transcrits au début du développement.



PRC1 et PRC2/3

Les protéines du PcG opèrent sous forme de complexes multimériques,

PRC1 et PRC2/3 pour Polycomb Repressive Complex. Ces complexes se fixent à l'ADN pour réprimer des gènes. Le complexe PRC1 comporte entre autres les protéines Polycomb (PC) et Polyhoméotic (PH).

Les complexes PRC2/3 maintiennent le silencing de gènes réprimés pendant l'embryogenèse précoce en méthylant l'histone H3 et l'histone H1 sur des acides aminés spécifiques. Le complexe PRC1 est recruté par l'histone H3 méthylée et peut réprimer la transcription en empêchant le remodelage de la chromatine par le complexe Swi/Snf ou en établissant des contacts directs avec la machinerie de transcription. Ainsi les PRC condensent la chromatine et la rendent inaccessible aux facteurs de transcription.

Un rôle plus dynamique que prévu

« Nous avons étudié la fixation des protéines PC et PH sur une partie du chromosome X et une portion du chromosome 2 de la drosophile, à différents stades de développement (Nègre et al., 2006). La méthode employée s'appelle ChIP on chip. La chromatine est immunoprécipitée avec des anticorps anti-PC et anti-PH. Les séquences d'ADN qui sont fixées à PC et PH sont récupérées. Pour les identifier, elles sont ensuite marquées avec un fluorochrome et utilisées pour hybrider des puces à ADN contenant une grande part du génome de la drosophile. Le résultat est inattendu et surprenant ! Jusque là, nous pensions que lorsque les protéines PC et PH se fixaient sur des séquences cibles, elles n'en bougeaient plus, maintenant ainsi de façon stable la répression à ces loci. Cela n'est pas ce que nous avons constaté. PC et PH sont fixées à certains sites au début du développement embryonnaire alors qu'elles n'y sont plus détectées à des stades plus tardifs, explique, Giacomo Cavalli, Directeur de recherche au CNRS, UPR 1142, « Chromatine et biologie cellulaire » à l'Institut de Génétique Humaine, à Montpellier. A l'inverse, sur d'autres séquences cibles, PC et PH ne sont pas repérables chez l'embryon alors qu'elles y sont liées lorsque la mouche atteint le stade adulte. » Ces résultats suggèrent que le rôle des protéines du groupe Polycomb n'est pas aussi univoque que prévu, à certains loci. A la fonction de mémoire de l'identité cellulaire, il faut ajouter celle de régulation de certains gènes. « Cette interprétation corrobore les résultats que nous avons obtenus peu avant. Nous avons montré que les protéines du PcG régulent le gène Cycline A, un gène impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire (Martinez et al., 2006) » ajoute Giacomo Cavalli. Une autre étude émanant du même Institut de Génétique Humaine avait révélé que le gène hedgehog est lui aussi régulé par des protéines du PcG (Chanas et al., 2005). Cycline A et hedgehog sont des cibles directes de PcG. Cependant, dans certains tissus et à certains stades de développement précis, ils ne sont pas liés aux protéines du PcG et sont régulés indépendamment de ces protéines.

Une différence entre les sexes

Ce sont l'embryon et le mâle adulte qui présentent le profil de distribution des protéines PC et PH le plus dissemblable. Une étude précédente avait montré que les protéines du PcG sont impliquées dans la régulation spécifique de la différenciation de la lignée germinale mâle chez la petite mouche (Chen et al., 2005). Ces nouvelles données suggèrent que la régulation de certains gènes par les protéines du PcG est différente chez les mâles et chez les femelles dans les cellules somatiques également.

Régulation de facteurs de transcription

Dans cette portion du chromosome X et du chromosome 2, la répartition des sites de fixation des protéines PC et PH circonscrit 37 gènes cibles potentiels des deux protéines. Parmi ces gènes, plusieurs catégories de fonctions sont représentées. Le plus frappant, c'est que 38% de ces gènes sont des facteurs de transcription, alors qu'ils ne représentent que 6,4% des gènes portés par les séquences étudiées. Ces facteurs régulent une grande variété de processus de développement, mais la plupart d'entre eux sont impliqués dans le patterning embryonnaire et dans la neurogenèse. « Nous en concluons que les protéines du PcG pourraient agir comme des régulateurs transcriptionnels pléiotropes et coordonner différents processus de développement, en plus d'être des répresseurs stables d'autres gènes. Maintenant que nous savons cela, il faudrait étendre ce genre d'analyses à tout le génome et les approfondir en étudiant différents types cellulaires à des stades de développement divers » indique Giacomo Cavalli.

Des foyers Polycomb

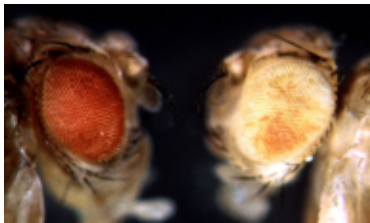
Dans toutes les cellules de tous les organismes, les molécules d'ADN sont compactées dans les trois dimensions pour entrer dans un noyau qui mesure 5 à 10 μm en moyenne. L'architecture des chromosomes n'est pas monotone, elle est utilisée pour réguler le fonctionnement des gènes. « La protéine Polycomb régule ses gènes cibles en se fixant directement à la chromatine. Lorsqu'on cherche à la localiser dans le noyau, on observe des points de forte concentration alors qu'elle est peu présente dans le reste du noyau. On ne compte que trente à cinquante foyers Polycomb par noyau alors que les études Chip on chip montrent que cette protéine se lie à deux cents loci génomiques différents environ. Nous pensons que les gènes cibles des protéines du PcG se regroupent dans le noyau pour mieux organiser leur régulation, en ségrégeant dans des compartiments plus ou moins favorables à leur répression » ajoute Giacomo Cavalli.

Importance de la compartimentation des gènes dans le noyau

Chez la drosophile, les complexes PRC1 et PRC2/3 répriment des gènes en se fixant directement sur des séquences d'ADN appelées PREs pour PcG Response Elements. Les protéines du trxG agissent de façon antagoniste en se fixant directement sur d'autres séquences d'ADN, les TREs, pour TrxG Response Elements.

Fab-7 est un élément régulateur du gène homéotique Abdominal-B qui contient un PRE. Chez les mouches homozygotes pour l'élément Fab-7, la répression du gène adjacent est accrue quand les chromosomes homologues s'apparient. Ce phénomène a été mis en évidence chez des drosophiles transgéniques portant un gène responsable de la pigmentation rouge des yeux sous contrôle d'un élément Fab-7. Quand les mouches sont homozygotes, la répression du gène est forte et les yeux sont dépigmentés. Ce phénomène, appelé pairing-sensitive silencing, suggère que la proximité de deux séquences PREs homologues renforce leur fonction individuelle de répression.

Chez d'autres mouches transgéniques, plusieurs copies de Fab-7 sont insérées à des loci situés sur différents chromosomes : c'est la configuration trans-hétérozygote. Là encore, Fab-7 est capable d'intensifier la répression des gènes voisins.



Chez ces deux mouches transgéniques, le gène responsable de la pigmentation rouge de l'œil est sous contrôle de l'élément Fab-7, séquence cible des protéines du PcG.

A droite, le gène est réprimé et l'œil est dépigmenté.

A gauche, chez la mouche mutante pour une protéine du PcG, la répression est levée : l'œil est rouge.

« Il y a trois ans, nous avons montré que l'élément Fab-7, présent en plusieurs copies, dans des régions chromosomiques éloignées les unes des autres, était capable d'induire une interaction entre les loci à longue distance dans le noyau. Résultat : la répression des gènes contigus était potentialisée. Il est peu probable que ces éléments se donnent rendez-vous n'importe où dans le noyau. Comme les protéines du PcG sont organisées en foyers, il est vraisemblable qu'ils s'y retrouvent pour réprimer les gènes de façon plus efficace (Bantignies et al., 2003) » explique Giacomo Cavalli. Ces interactions chromosomiques sont conservées au cours du développement et requièrent d'une part une homologie de séquence parfaite entre les séquences Fab-7,

d'autre part des protéines du PcG sauvages. Lorsque ces interactions à grande distance sont perturbées et détruites, cet état de non appariement est transmis aux générations suivantes. Ainsi les protéines du PcG semblent capables de perpétuer non seulement des états chromatinien, mais aussi l'architecture chromosomique du noyau. Cette hérédité de l'agencement tridimensionnel des gènes dans le noyau pourrait même contribuer à la transmission des états de la chromatine.

Des éléments de la machinerie du RNAi impliqués

Des travaux récents montrent que des composants de la machinerie du RNAi sont impliqués dans ce processus de répression dépendant des protéines du PcG aux loci Fab-7 (Grimaud et al., 2006). Ces composants sont aussi nécessaires à la production de small interfering RNAs, des petits ARNs produits au cours du RNAi, ainsi qu'à l'interaction à longue distance des éléments Fab-7. « Nous avons mis en évidence la colocalisation de Dicer-2, PIWI et Argonaute1, trois facteurs protéiques impliqués dans le RNAi, avec des foyers Polycomb. Une mutation dans un de ces complexes réduit significativement la fréquence d'appariement des loci Fab-7, sans empêcher le recrutement de protéines du PcG sur ces éléments cibles » indique Giacomo Cavalli. Ces résultats indiquent que la machinerie du RNAi pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'organisation nucléaire des PREs.

Chez les mammifères

Les protéines du PcG sont essentielles à l'embryogenèse précoce chez tous les métazoaires, mais leur rôle précis chez les mammifères reste flou. Aucun PRE n'a été identifié à ce jour chez ces organismes. Par contre, les gènes cibles de ces protéines ont été récemment déterminés dans des cellules souches humaines et murines, grâce à une approche Chip on chip (immunoprécipitation de la chromatine puis hybridation avec une puce à ADN) (Boyer et al., 2006, Lee et al., 2006). Pour la plupart, ces gènes sont impliqués dans le développement embryonnaire. Les protéines du PcG apparaissent donc comme d'importants facteurs de maintien de l'état indifférencié de ces cellules souches. Ce genre d'approche devrait permettre de caractériser les séquences cibles des protéines du PcG chez les mammifères et de les comparer entre elles et avec celles de la drosophile. Les recherches sur ce groupe de protéines et leur action sont d'autant plus cruciales que des mutations dans les gènes qui les codent et leur sur-expression sont associées à plusieurs types de cancers fréquents chez l'homme, tels que le cancer de la prostate ou le cancer du sein.

- Petit survol historique
- Intérêt de l'épigénétique

- Des souris et des femmes
- Des maladies épigénétiques
- Paramutations chez la souris : une première
- Polycomb ou comment les mouches ont de la mémoire

Bibliographie

Grimaud C, Bantignies F, Pha–Bhadra M, Ghana P, Bhadra U, Cavalli G. RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. *Cell* 2006, 124 : 957–971.

Nègre N, Hennetin J, Sun LV, Lavrov S, Bellis M, White KP, Cavalli G. Chromosomal Distribution of PcG Proteins during *Drosophila* Development. *Plos* 2006, 4 : e170.

Martinez AM, Colomb S, Dejardin J, Bantignies F, Cavalli G. Polycomb group–dependent Cyclin A repression in *Drosophila*. *Genes Dev* 2006, 20 : 501–513.

Bantignies F, Grimaud C, Lavrov S, Gabut M, Cavalli G. Inheritance of Polycomb–dependent chromosomal interactions in *Drosophila*. *Genes Dev* 2003, 17 : 2406–20.

Chanas G, Maschat F. Tissue specificity of hedgehog repression by the Polycomb group during *Drosophila melanogaster* development. *Mech Dev* 2005, 122 : 975–87.

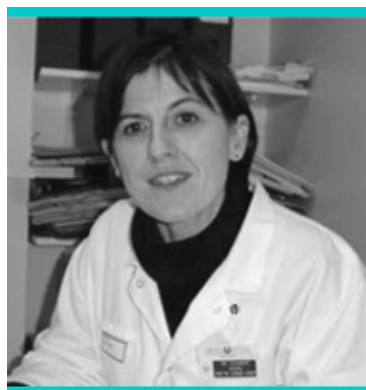
Chen X, Hiller M, Sancak Y, Fuller MT. Tissue–specific TAFs counteract Polycomb to turn on terminal differentiation. *Science* 2005, 310 : 869–872.

Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 2006, 441 : 349–353.

Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K, et al. Control of developmental regulators by polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 2006, 125 : 301–313.

Rédaction : Anne de Reyniès

Remerciements à : Jean–Claude Ameisen, Michel Morange et tous les chercheurs cités, pour la relecture des textes.



Karine Clément, du gène à l'Homme

Au dehors tintent les cloches de Notre-Dame de Paris, tandis qu'à l'intérieur du petit bureau au désordre savamment organisé chante la voix douce d'une jeune femme qui parle de son travail avec une passion sans retenue : « *Notre objectif est de trouver des biomarqueurs et des prédicteurs moléculaires de ce qui survient au cours de l'obésité, dans son installation, sa chronicisation, ses complications mais aussi lors d'essais d'intervention, que ce soit au niveau clinique ou au niveau biologique.* » En quelques mots, tout est dit, ou presque. Cet axe de recherche se situe complètement à la croisée des chemins entre plusieurs disciplines, la clinique, la biologie cellulaire, la génomique fonctionnelle et la bioinformatique.

En somme, le petit nom de son unité qu'elle me fait visiter avec fierté résume bien cette diversité d'horizons : "Nutriomique", un néologisme né de la contraction du nom officiel de cette toute jeune unité créée en janvier 2006, l'unité monothématique 755 "NUTRItion et Obésité : approches génétique et transcriptOMIQUE". Mais toute neuve qu'elle soit, celle-ci n'est en fait que le prolongement des travaux que Karine Clément avait conduit au sein de son équipe Avenir 2001 : "Etude du transcriptome en réponse aux changements métaboliques, hormonaux et génétiques de l'obésité", programme dont elle fut l'une des premières lauréates en 2001.

« *Une vraie opportunité ! s'exclame-t-elle. En combinant des études d'expression génique et des approches cellulaires, nous avons montré l'importance de l'inflammation du tissu adipeux lors des modifications du statut nutritionnel. Ces travaux publiés dans le FASEB Journal, puis dans Diabetes, ont fait l'objet d'un communiqué de presse Inserm. Cette reconnaissance "Avenir" nous a permis de contribuer à de grands projets européens, Nugenob entre 2001 et 2004 et Diogenes de 2005 à 2009, dans le cadre du 6ème PCRDT, en compagnie d'Hubert Vidal à Lyon et Dominique Langin à Lyon.* »

Une chance aussi de construire une équipe solide : « *L'une des forces de la*

création de cette unité a été l'interaction scientifique depuis 2002 entre d'une part les médecins, les enseignants chercheurs, les biologistes spécialistes du tissu adipeux (Danièle Lacasa, Michèle Guerre–Millo) qui ont rejoint l'équipe, et d'autre part l'équipe informatique de Jean–Daniel Zucker avec une orientation toute particulière autour de la bioinformatique du transcriptome. De fait, ces interactions que nous avons voulu créer avec Jean–Daniel Zucker nourrissent à la fois les thématiques de recherches en biologie et en informatique. Il faut encore que cette équipe bioinformatique s'enrichisse de nouveaux chercheurs et d'ingénieurs. »

Sise en plein cœur de l'Hôtel–Dieu, l'unité jouit d'une véritable synergie, d'un « *pont permanent* » entre le laboratoire de recherche fondamentale au 3ème étage et le service de Nutrition de l'hôpital au second. Enfilant sa blouse, la PUPH déroule son parcours : d'un côté, un Doctorat en Médecine en 1995 à l'université Paris 6, de l'autre, un Doctorat es Sciences "Physiologie et pathophysiologie de la nutrition" en 1996. Le tout complété en 1999 par un post–doctorat à Stanford (Etats–Unis) sous la direction de Greg Barsh, consacré à des travaux sur les profils d'expression des gènes en fonction des perturbations de l'environnement dans la balance énergétique – déjà se profilaient ses futures recherches dans la nutriginomique, alors que la discipline n'en était qu'à ses balbutiements.

Et puis il y a eu l'habilitation à conduire des recherches en 2001, Avenir dans la foulée, et désormais sa propre unité Inserm. Et à côté, le service de Nutrition de l'Hôtel–Dieu qu'elle n'a plus quitté depuis 1996, sauf pour son post–doc. Le service s'articule autour de plusieurs unités différentes : l'hospitalisation classique, qui concerne essentiellement des patients atteints d'obésité sévère, voire très sévère ; un système d'hospitalisation à la semaine dédié à des bilans d'obésité et des suivis de chirurgie bariatrique ; et une formule originale, une hospitalisation de jour avec une unité d'éducation thérapeutique où les visiteurs apprennent – ou réapprennent – à choisir leurs aliments, à faire à manger ainsi qu'à reprendre une activité physique en fonction de leur possibilité.

« Mais l'outil primordial pour nos travaux de recherche, insiste Karine Clément, c'est le centre d'exploration fonctionnelle qui permet à proprement parler de faire le lien entre la recherche et la clinique. C'est un outil d'investigation majeure qui dépend du Centre de recherche en nutrition humaine Ile–de–France (CRNH), dirigé par Serge Hercberg, et qui réunit l'AP–HP, l'Inserm, les universités de Paris 6 et Paris 13, et le CNRS. Pour nous, c'est essentiel et l'avantage, c'est que nous avons tout sur place pour mener nos programmes hospitaliers de recherche clinique (PHRC) »

C'est toujours avec une lueur de passion dans les yeux que la chercheuse évoque ces étudiants en stage qui, pour la première fois, découvrent une réelle connexion entre le monde de la recherche fondamentale et l'enjeu réel, les "vrais" patients. Cette connexion, cela fait des années que Karine Clément l'a faite, elle n'a pas eu à faire un choix entre les deux. La visite s'achève, et je laisse derrière moi les voix de Notre–Dame, et celle, douce et enjouée, de Karine Clément....

Ils/Elles disent d'elle

"Karine Clément est l'exemple à suivre pour les jeunes médecins qui veulent s'investir dans la recherche sans renier leurs origines. La pratique clinique permet de poser les questions pertinentes qui doivent alors être traduites en protocoles de recherche novateurs. C'est cette double gageure qu'a relevé Karine Clément depuis plusieurs années dans le domaine de l'obésité et de la génomique. Elle a su faire fructifier le service clinique et le laboratoire mis en place par les professeurs Bernard Guy–Grand et Arnaud Basdevant à l'Hôtel–Dieu de Paris et s'entourer de collaborateurs complémentaires et efficaces. L'association au sein de l'unité 755 de cliniciens, de chercheurs spécialistes de modèles cellulaires et animaux et de bioinformaticiens est une illustration des interfaces nécessaires à une recherche de haut niveau."

Dominique Langin

Unité de recherches sur les obésités

Inserm UPS U586IFR31, Institut Louis Bugnard, Toulouse

"Une jeune et très dynamique collègue qui a joué un rôle important dans l'identification de gènes impliquées dans l'obésité."

Denis Lairon

Unité Inserm 476, Faculté de Médecine Timone, Marseille

Le vivant au-delà de ses gènes ?

L'épigénétique est depuis ces dernières années un domaine de recherche fascinant en expansion constante. Malgré l'identification de quelques mécanismes, nombreuses sont les questions sur les processus de base et la reprogrammation du génome. Les travaux en cours permettent d'aborder un autre niveau de complexité dans la compréhension du fonctionnement du génome des organismes vivants.

Recueil de propos ...

Vos réactions

Vous souhaitez nous faire partager votre opinion

Contactez la [rédaction d'Inserm Actualités](#)

L'OPINION DE...

La question de la préformation et de l'épigénèse est très ancienne. Il est apparu, dès que l'idée qu'un animal puisse provenir d'un oeuf, qu'il y avait une différence entre l'hérédité transmise au cours des générations (qu'on peut appeler "hérédité génétique") et l'hérédité qui fait que le devenir de l'oeuf sera sous la forme de cellules de types différents, qui seront cependant capables de donner systématiquement des cellules du même type (l'épiderme de l'épiderme, le sang du sang etc). Cette hérédité là est évidemment épigénétique.

Il y a une très grande variété dans les mécanismes de maintien de l'hérédité épigénétique. Ce qui est appelé par un de ces nombreux mots à la mode "épigénomique", rend compte d'une très petite partie de ces mécanismes. Pour l'essentiel il s'agissait là initialement de l'étude des mécanismes de transmission de la modification par méthylation de certains motifs dans l'ADN d'organismes évolués. L'empreinte parentale en est une illustration. La découverte de la présence ubiquiste d'ARN codés par des gènes qui ne spécifient pas la synthèse de protéines est aussi en train de mettre en évidence le principe d'un nouveau pan entier de l'épigénétique. Mais il y a bien d'autres manières de considérer l'épigénèse. Dans un travail sur la mémoire et l'apprentissage que nous avons développé avec Philippe Courrège et Jean-Pierre Changeux, nous avons montré comment une

gestion particulière de la connectivité des réseaux nerveux permettait l'épigenèse. Et j'ai exposé quelques conséquences de ces conjectures au cours du séminaire de Claude Lévi-Strauss au Collège de France (20 janvier 1975!). De même, la synthèse de protéines membranaires permet, même chez les bactéries, de maintenir une hérédité épigénétique. Cela est illustré par des expériences de Cohn et Horibata (1959) et j'ai détaillé l'importance de cet exemple extrait du comportement du modèle de l'expression génétique, l'opéron lactose dans La Barque de Delphes.

La réflexion et les expériences permettant de comprendre comment s'établit l'hérédité épigénétique ont toujours eu une importance considérable, mais généralement mal comprise. Le concept lui-même est très abstrait, et cela explique que, depuis l'origine, il reste insuffisamment apprécié. Pourtant, ce concept est central pour comprendre, bien sûr, le dialogue entre l'inné et l'acquis. Il se relie aussi à une interprétation néo-lamarckiste des faits biologiques du type de celle que le zoologiste devenu psychologue Jean Piaget n'a cessé de proner toute sa vie. Cela explique sans doute le rôle négatif de barrières idéologiques dans la prise de conscience de son importance. Beaucoup ont du mal à comprendre la différence entre l'héritage d'un programme (hérédité génétique), et l'héritage des conditions d'expression de ce programme (hérédité épigénétique). Et beaucoup ont tendance, pour cette raison, à dire que tel ou tel caractère est x% génétique et y% environnemental, ce qui n'a, tout simplement, "aucun" sens. Les données de la génétique et de l'épigénétique ne sont en aucune manière additives. Il me semble que l'usage de la métaphore alphabétique du programme génétique, qui fait l'analogie entre la cellule et l'ordinateur, permet assez bien de comprendre comment on peut séparer le programme, écrit sur un disque dur ou un CD, de son usage (qui n'en utilise, le plus souvent qu'une petite partie). Bien des utilisateurs d'ordinateurs automatisent les procédures qu'ils utilisent quotidiennement : c'est typiquement un usage épigénétique du programme. Et cette image permet de comprendre facilement à la fois l'intérêt du programme, et l'intérêt de la transmission de son usage.

Antoine Danchin
Institut Pasteur

LOPINION DE...

Epigenetic phenomena are of broad interest and the contribution of epimutations especially to human disease which has been underestimated is or will be subject of numerous research project in present and future.

Karin Buiting
Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen, Germany

Epigenetics is one of the hottest topics in cancer research. We know that human tumors undergo a major disruption of their DNA methylation and histone modification patterns. The aberrant epigenetic landscape of the cancer cell is characterized by a massive genomic hypomethylation, CpG island promoter hypermethylation of tumor suppressor genes, an altered histone code for critical genes and a global loss of monoacetylated and trimethylated histone H4. But what we know is just a minimal percentage of the epigenetic 'earthquake' present in the transformed cell. We need to make an ambitious step to understand the DNA methylation and histone changes underlying tumorigenesis. The launching of an International Human Epigenome Project should be the response to this necessity.

Manel Esteller

Cancer Epigenetics Laboratory, Spanish National Cancer Centre (CNIO),
Madrid, Spain

During the twentieth century the gene emerged as the major driving force of biology. Initially, even the nature and behavior of gene vehicles, the chromosomes, were subjected to doubts. The basic or standard gene concept, as a unit of function, mutation, and recombination, had to be revised. Half a century was required for reaching a general consensus about the chemical nature of the genetic material, DNA and RNA. The relationship between single genes and individual proteins was a great milestone at the middle of the twentieth century, but within two decades it was realized that the relationship was more complex. Understanding of genetic coding, transcription, and translation during the 1960s laid a firm foundation to the "nucleic doctrine," harking back to the dicta of Lederberg (1959) and meaning that single nucleic acid genes alone were responsible for each separate function within the cell. However, important aspects of gene expression are recognized now as a function of the genome and many genes collaborate in circuits. It has come to light that genes may be mobile, exist in plasmids and cytoplasmic organelles, and can be imported by nonsexual means from other organisms or as synthetic products. Epigenetics has reborn as a new field of developmental genetics. The unorthodox prion proteins can even simulate some gene properties. Genetics was to an extent reincarnated as of the twenty-first century by assimilating the tools of cybernetics and of many formerly distant areas of science. This overview highlights some of the historical milestones that contributed to the development of our image of the gene, extending elements of issues laid down by Redei (2003).

Jane D. Phillips

University of Missouri, Life Sciences Center, Columbia, Missouri 65203, USA

Mode d'action du paracétamol : le mystère se dissipe

Bien qu'employé depuis plusieurs décennies, le paracétamol garde encore une large part de mystère quant aux mécanismes exacts de son action analgésique. Or des essais précliniques chez l'animal réalisés dans l'U 766 "Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur" de Clermont-Ferrand ont fait apparaître qu'un antagoniste des récepteurs de type 3 à la sérotonine (5-HT₃, 5-hydroxytryptamine), le tropisétron, couramment utilisé, comme tous les membres de cette famille, contre les nausées lors des chimiothérapies cancéreuses, inhibait l'action analgésique du paracétamol.

Cela pouvait suggérer l'existence d'un lien entre l'action analgésique du paracétamol et le système sérotoninergique. Afin de le vérifier chez l'Homme, l'U766 et le CIC501 du CHU de Clermont-Ferrand ont recruté 26 volontaires sains métabolisant rapidement le tropisétron ou le granisétron (les métaboliseurs lents, identifiés par analyse pharmacogénétique, ont été exclus) pour une étude croisée en double aveugle. Après consentement éclairé, les sujets ont reçu chaque semaine une dose orale d'1 g de paracétamol, associée à 5 mg de tropisétron, ou à 3 mg de granisétron administrés par voie intraveineuse, ou à une solution saline en guise de placebo.

A chaque séance, le seuil de détection de la douleur était mesuré 5 fois au cours des 4 heures après administration, suite à l'application d'un stimulus électrique grâce à un appareil, le Pain Matcher[®]. Ainsi, il a été possible aux chercheurs de comparer l'aire sous la courbe de l'évolution du pourcentage du score individuel de douleur au cours du temps entre la combinaison paracétamol/placebo d'une part, et les combinaisons paracétamol/tropisétron et paracétamol/granisétron d'autre part. Il s'est avéré que l'effet analgésique du paracétamol était totalement inhibé par le tropisétron ($p = 0,007$) comme par le granisétron ($p = 0,002$). Par ailleurs, l'analyse des taux plasmatiques de paracétamol n'a pas fait apparaître de différences de concentration entre les trois bras, excluant ainsi une interaction pharmacocinétique.

Par conséquent, il est clairement démontré « pour la première fois chez l'homme », que la coadministration d'antagonistes des récepteurs 5-HT₃ avec le paracétamol bloque complètement l'effet analgésique de ce dernier. « Ces résultats soutiennent l'hypothèse que le mécanisme de l'action analgésique du paracétamol pourrait impliquer le système sérotoninergique central », soulignent les auteurs. Par ailleurs, ces résultats indiquent qu'il existe une interaction entre ces deux types de composés, ce qui est à souligner car ils peuvent être associés, en particulier dans certaines situations post-opératoires. L'équipe clermontoise a d'ailleurs initié une étude dans ce contexte en collaboration avec le CHU de Saint-Etienne.

Pickering G, Lorient MA, Libert F, Eschalier A, Beaune P, Dubray C. Analgesic effect of acetaminophen in humans: first evidence of a central serotonergic mechanism. Clin Pharmacol Ther. 2006 Apr;79(4):371-8.

Contact : [Gisèle Pickering](#)

Inserm, Centre d'Investigation Clinique 501, CHU universitaire de Clermont–Ferrand

Variabilité de réponse au clopidogrel : une origine génétique

La réponse pharmacodynamique au Clopidogrel, un agent anti–plaquettaire largement utilisé dans la prévention des accidents athéro–thrombotiques, présente une grande variabilité inter–individuelle. Environ 20% des patients recevant un traitement à posologies standard présentent en effet une « résistance biologique » au clopidogrel, qui pourrait être associée à la récurrence d'accidents thrombotiques. C'est du–moins ce que suggèrent des études préliminaires incluant un faible nombre de patients. Cette variabilité de la réponse thérapeutique est en partie liée, chez le volontaire sain, au statut génétique du CYP2C19, gène codant une enzyme hépatique impliquée dans l'activation métabolique du clopidogrel. Cette découverte résulte d'une étude pharmacogénétique issue d'une collaboration entre les unités Inserm U621, U765 et le CIC 92–01. L'étude a été conduite sur vingt–huit sujets sains présentant une fonction plaquettaire normale et recevant un traitement conventionnel par le clopidogrel à 75 mg par jour, pendant 7 jours. Le test pharmacodynamique d'agrégation plaquettaire ex vivo en réponse à l'ADP (voie antagonisée par la forme active du clopidogrel) a été mesuré quotidiennement. L'analyse montre que l'inhibition des fonctions plaquettaires sous clopidogrel dépend fortement de la présence du variant allélique *2 codant pour un CYP2C19 non fonctionnel. En effet, l'agrégation plaquettaire en réponse à 10 µmol/L d'ADP diminue progressivement chez les 20 sujets homozygotes sauvages (CYP2C19 *1/*1), de 76.2 plus ou moins 6.8% à l'état initial à 48.9 plus ou moins 14.9% au 7ème jour de traitement ($p < 0.0001$). En revanche, elle est inchangée chez les 8 sujets hétérozygotes CYP2C19 *1/*2, dont l'agrégation moyenne est de 77.2 plus ou moins 4.3% à l'état initial et de 71.8 plus ou moins 14.6% à J7 ($p = 0.22$, $p < 0.003$ en comparaison aux sujets CYP2C19 *1/*1 à J7). Cet effet est retrouvé indépendamment de la dose d'ADP utilisée. Enfin, l'influence significative du variant allélique CYP2C19*2 sur la réponse pharmacodynamique au clopidogrel a également été observée en mesurant le niveau de phosphorylation de VASP, un marqueur de l'état d'activation du récepteur plaquettaire P2Y12 à l'ADP, cible spécifique du métabolite du clopidogrel. Cette étude est la première à identifier une origine génétique à la variabilité de réponse au clopidogrel et ouvre la voie à de nouvelles investigations sur l'influence du variant génétique CYP2C19*2 sur l'efficacité thérapeutique du clopidogrel chez le patient. Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvallée C, Aiach M, Lechat P, Gaussem P. Cytochrome P450 2C19 loss–of–function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 2006 Oct 1 ; 108 (7) : 2244–7. Contact : Jean–Sébastien Hulot Inserm UMRS621, CHU Pitié–Salpêtrière, Paris

Comment le Transforming Growth Factor bêta 1 contrôle-t-il le développement de maladies auto-immunes?

Comprendre comment notre système immunitaire est régulé est essentiel. Des déficiences dans cette régulation entraîne des troubles graves, parmi eux des maladies dites auto-immunes telles que le diabète de type I, la sclérose en plaque, les myocardites, thyroïdites, ou encore la polyarthrite rhumatoïde. Ces maladies reposent sur un même mécanisme de base : une perte de la tolérance au soi.

Le Transforming Growth Factor bêta (TGF- β) est une cytokine polypeptidique dont la sécrétion est ubiquitaire. Les trois formes, TGF- β 1, 2 et 3 servent de régulateurs positifs et négatifs aux programmes de différenciations et de proliférations de nombreux types cellulaires. En se liant à leur récepteur commun, les trois isoformes du TGF- β induisent l'activité kinase du domaine intracellulaire de leur récepteur TGF β -RII qui, en retour, phosphoryle le domaine kinase la sous-unité TGF- β RI. La phosphorylation de cette dernière facilite la régulation de gènes « Smad-dépendants » et active d'autres voies de signalisation indépendamment des facteurs de transcription Smad. Au sein du système immunitaire, le TGF- β 1 est prévalant et joue un rôle crucial dans la régulation de la réponse immunitaire. Des souris déficientes en TGF- β 1 développent des pathologies auto-immunes sévères, touchant différents organes (pancréas, foie, cœur), responsables de la mort des animaux dès 4-6 semaines de vie. Du fait des effets multiples du TGF- β sur une grande variété de tissus et, de la large distribution, au sein mais aussi en dehors du système immunitaire, du récepteur au TGF- β , la compréhension des mécanismes cellulaires responsables des graves troubles auto-immuns observés chez ces animaux déficients en TGF- β 1 était très difficile.

Julien Marie et son équipe ont entrepris de déterminer les cellules cibles de l'effet immuno-régulateur du TGF- β . Les lymphocytes T sont généralement impliqués dans un grand nombre de maladies auto-immunes. Par ailleurs, *in vitro*, la privation des lymphocytes T en TGF- β conduit à leur prolifération. Cette population lymphocytaire est donc apparue aux chercheurs, en toute logique, comme une cible potentielle des effets immuno-régulateurs du TGF- β sur le contrôle des maladies auto-immunes. Afin d'adresser le rôle du TGF- β spécifiquement sur la biologie des lymphocytes T, les chercheurs ont généré des souris dont uniquement les lymphocytes T (CD4 et CD8) sont déficients en TGF- β RII. Privés ainsi de signaux émis par le TGF- β les lymphocytes T deviennent spontanément des cellules capables d'endommager de très nombreux organes comme le pancréas, le foie, le cœur, la moelle épinière etc, conduisant à de nombreuses maladies auto-immunes et à la mort des animaux des 4 semaines de vie. Ainsi la simple ablation de la voie de signalisation du TGF- β dans les lymphocytes T induit des symptômes similaires à la privation de la cytokine elle-même, révélant l'activité régulatrice majeure du TGF- β au niveau des lymphocytes T. Si leur développement au sein du thymus semble non ou peu affecté, en périphérie les lymphocytes T privés de

la voie de signalisation du TGF- β s'engage spontanément mais spécifiquement dans un programme de différenciation cytotoxique et pro-inflammatoire (Granzyme A+ et B+, Lamp1+, FasLHigh, IFN- γ high, TNF- α high) à l'origine de la destruction de très nombreux organes.

Cette perte de tolérance au soi a conduit Julien Marie à analyser les compartiments des lymphocytes T régulateurs CD4+ CD25+ (Treg) et NKT connus pour jouer un rôle majeur dans la régulation de nombreuses maladies auto-immune. Les Treg sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription Foxp3 qui contrôle leur différenciation et fonction. Les cellules NKT, quant à elles, expriment des marqueurs de cellules « natural Killer » (NK) mais également des lymphocytes T dont un récepteur T présentant la particularité de reconnaître des antigènes lipidiques. Si le développement thymique des Treg semble normal, aucune cellule NKT ne se développe en l'absence de signalisation via le TGF- β . Par ailleurs, à la périphérie, les cellules régulatrices Foxp3+ sont quasi inexistantes. Ainsi, le TGF β joue un rôle fondamental dans le développement thymique des cellules NKT et dans la maintenance à la périphérie des Treg.

Une analyse plus fine des populations lymphocytaires T a permis aux chercheurs de révéler la présence de cellules exprimant des marqueurs de cellules NK et un récepteur T qui, contrairement aux cellules NKT conventionnelles, reconnaît des antigènes protéiques. Par analogie, ils ont qualifié cette population de ncNKT pour non-conventionnelle NKT. Les ncNKT représentent 20% des lymphocytes T spléniques chez les animaux déficients en TGF- β RII au niveau de leur lymphocyte T, alors que d'ordinaire ils ne constituent que 1 à 2% des lymphocytes T. Les cellules ncNKT, semblent constituer un stade final de différenciation lymphocytaire T, expriment de très fort niveau de cytokine pro-inflammatoire et présentent une activité cytotoxique exacerbée contre les cellules du soi.

En contrôlant le programme de différenciation cytotoxique des lymphocytes T, et le développement de deux acteurs majeurs de la régulation de la réponse immunitaire (Treg et NKT), le TGF- β permet de maintenir un état de tolérance au soi et donc de prévenir du développement de maladies auto-immunes.

Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular Mechanisms of Fatal Early-Onset Autoimmunity in Mice with the T Cell-Specific Targeting of Transforming Growth Factor- β Receptor. *Immunity* 2006 Sep ; 25 (3) : 441-54.

Contact : Julien Marie
Unité Inserm 404, Lyon

Une réaction inflammatoire embrase aussi l'îlot de Langerhans dans le diabète de type 2 (DT2)

Les preuves de l'importance de la composante inflammatoire dans le DT2 et l'obésité sont de plus en plus nombreuses. Ce syndrome inflammatoire est notamment bien argumenté dans ses aspects biologiques au niveau circulant et dans le tissu adipeux blanc. Jusqu'à présent le fait qu'il puisse affecter aussi le pancréas au cours du DT2 n'avait jamais été décrit, bien que la présence d'une fibrose et de dépôts de substance amyloïde niveau des îlots de Langerhans, ait été rapportée dans divers modèles animaux spontanés de DT2 et chez le patient diabétique.

L'approche transcriptomique de l'équipe de Françoise Homo-Delarche, utilisant des îlots isolés de rats Goto-Kakizaki (GK), modèle spontané de DT2, âgés de 4 mois, montrent que les îlots de rats GK (après 3 mois d'hyperglycémie modérée) surexpriment un nombre important de gènes codant pour des protéines en rapport avec la matrice extracellulaire/l'adhésion cellulaire (représentant 24% des gènes surexprimés, dont les collagènes I et III, la décorine, la fibronectine, la MT1-MMP (MMP-14) et le TIMP-1), avec l'inflammation (16,9% des gènes surexprimés, dont l'annexine 1 (ou lipocortine 1), la lipocaline 2 (ou NGAL), le LPS-induced TNF α et l'ostéopontine), avec le système immunitaire (16,9% des gènes exprimés, dont le CD53, le CD74 et le CMH de classe II) et enfin avec le stress oxydant (2,8%). Les immunomarquages effectués sur les pancréas GK âgés de 1, 2 et 4 mois (ce qui correspond respectivement à quelques jours, 1 et 3 mois d'hyperglycémie), montrent que la fibrose est déjà visible au niveau des îlots GK dès l'âge de 2 mois. Dans les îlots de taille moyenne, elle se manifeste par un épaississement du marquage intra- et péri-insulaire pour le collagène I, III et la fibronectine. Ces 3 molécules, étant connues pour être synthétisées et secrétées par les cellules endothéliales et/ou les cellules musculaires lisses, les chercheurs ont étudié la vascularisation insulaire en utilisant un anticorps anti-facteur de von Willebrand (vWF), spécifiquement synthétisé par les cellules endothéliales et connu pour être augmenté au niveau circulant dans le DT2 humain en tant que reflet de l'altération endothéliale. Chez le rat GK, les îlots apparaissent très hétérogènes en ce qui concerne la vascularisation: celle-ci peut être normale, hypertrophiée ou raréfiée. De plus, il est noté une colocalisation du vWF et de la fibronectine au niveau des îlots où celle-ci est hypertrophiée, ce qui suggère que la fibrose progresse à partir de la vascularisation, évoquant un processus de microangiopathie insulaire. Enfin, la surexpression des gènes codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (marqueur classique des macrophages) et le CD53 (marqueur des cellules myéloïdes et des lymphocytes périphériques) ont conduit les chercheurs à étudier la présence de cellules de l'immunité. Dans le pancréas GK de 2 et 4 mois, une infiltration macrophagique importante, détectée à l'aide de deux anticorps, un anti-CMH de classe II et ED1 (reconnaissant le CD68), a été retrouvée en situation péri- et intra-insulaire. La présence d'une infiltration macrophagique des îlots de Langerhans vient d'être aussi démontrée chez des souris rendues hyperlipidémiques et intolérantes au glucose et des

patients diabétiques de type 2 (Jan Ehses et Marc Donath, communication personnelle). De plus, les pancréas GK montrent une infiltration péri-insulaire CD53+, d'intensité variable d'un îlot à l'autre et inexistante chez les rats non diabétiques. A l'âge de 2 mois, les granulocytes adoptent les mêmes localisations que les cellules CD53+ et la présence de lymphocytes est exceptionnelle. L'accumulation de cellules de la réaction inflammatoire dans les îlots GK est corroborée par la surexpression de trois autres gènes : le premier codant pour le MCP-1 (macrophage chemoattractant protein-1), le second pour le CD74 (récepteur du MIF (macrophage inhibitory factor) et exprimé par les macrophages comme le CD68) et le troisième codant pour la galectine 3, connue pour attirer les granulocytes.

Ces résultats montrent, pour la première fois dans un modèle spontané de DT2, que l'îlot de Langerhans est le siège d'une réaction inflammatoire importante corrélée à des remaniements microvasculaires sévères et à l'installation d'une fibrose insulaire. Il est maintenant important de déterminer si cette inflammation des îlots est primaire ou secondaire à l'hyperglycémie chronique, voire à d'autres perturbations métaboliques (hyperlipidémie/hypercholestérolémie) et/ou vasculaires (légère hypertension artérielle). La compréhension fine des phénomènes physiopathologiques prenant place au niveau du pancréas dans le modèle spontané du rat GK devrait déboucher sur la validation de nouvelles approches thérapeutiques dans le DT2.

Homo-Delarche F, Calderari S, Irminger JC, Gangnerau MN, Coulaud J, Rickenbach K, Dolz M, Halban P, Portha B, Serradas P. Islet Inflammation and Fibrosis in a Spontaneous Model of Type 2 Diabetes, the GK Rat. *Diabetes* 2006 Jun ; 55 (6) : 1625-33.

Contact : Françoise Homo-Delarche
CNRS UMR 7059, Université Paris 7

En bref...

Sur le site institutionnel de l'Inserm

3 août 2006

Un gène responsable d'une nouvelle forme de diabète du nouveau-né et de l'adulte

17 août 2006

Cancer colo-rectal : vers un test de dépistage plus performant ?

23 août 2006

Une nouvelle cible pour contrôler l'infection par VIH

6 septembre 2006

L'organisation du cerveau du nourrisson pourrait-elle expliquer l'acquisition rapide de la langue maternelle ?

13 septembre 2006

L'encéphalite herpétique, maladie infectieuse, a également une origine génétique

15 septembre 2006

Un test de dépistage prénatal de la mucoviscidose sans risque pour le fœtus

Pour une recherche clinique innovante et de grande qualité

Christian Bréchet
Directeur Général de l'Inserm



RENCONTRE

Karine Clément
Du gène à l'Homme

PAROLE DE CHERCHEUR

François Le Naour

Rôle des complexes membranaires à tétraspanines dans la formation de métastases

ACTUALITÉ SCIENTIFIQUE

Mode d'action du paracétamol

le mystère se dissipe

TFG bêta 1

et maladies auto-immunes

Diabète de type 2

inflammation de l'îlot de Langerhans

Toutes les actualités...

ÉTHIQUE

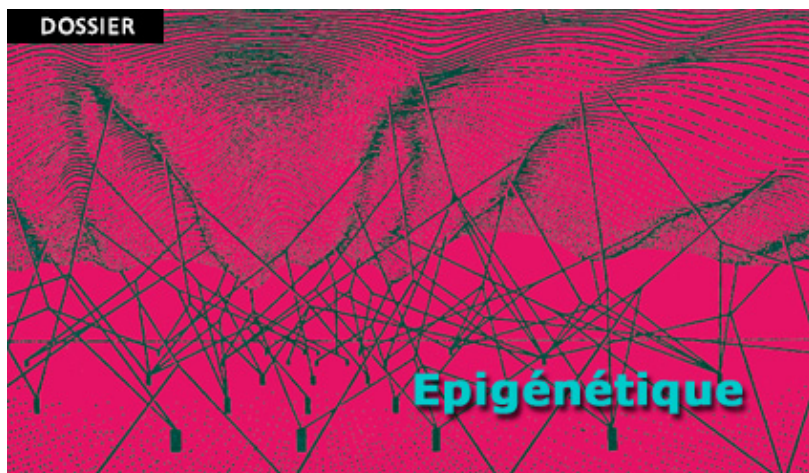
Régulation de la recherche médicale et gestion des risques

Analyse des enjeux de protection des personnes suite à l'accident londonien de mars 2006

N°201

SEPTEMBRE 2006

DOSSIER



Epigénétique

DÉBAT

Le vivant au-delà de ses gènes ?

NOTE

Pour une recherche clinique innovante et de grande qualité

Christian Bréchet
Directeur Général de l'Inserm



RENCONTRE

Karine Clément
Du gène à l'Homme

PAROLE DE CHERCHEUR

François Le Naour

Rôle des complexes membranaires à tétraspanines dans la formation de métastases

ACTUALITÉ SCIENTIFIQUE

Mode d'action du paracétamol

le mystère se dissipe

TFG bêta 1

et maladies auto-immunes

Diabète de type 2

inflammation de l'îlot de Langerhans

Toutes les actualités...

ÉTHIQUE

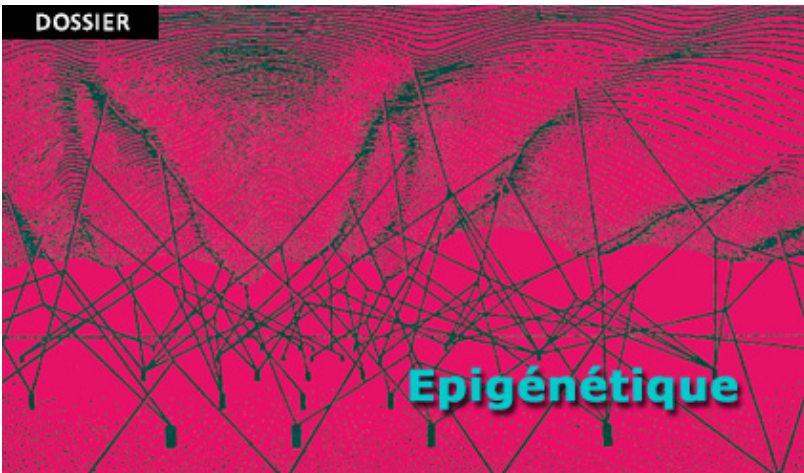
Régulation de la recherche médicale et gestion des risques

Analyse des enjeux de protection des personnes suite à l'accident londonien de mars 2006

N°201

SEPTEMBRE 2006

DOSSIER



Epigénétique

DÉBAT

Le vivant au-delà de ses gènes ?



Analyse protéomique des complexes membranaires à tétraspanines : rôle dans la formation de métastases

Par François Le Naour

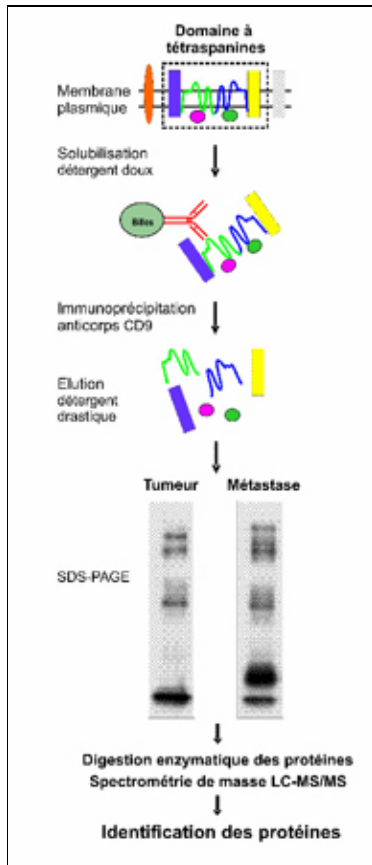
Les métastases sont la principale cause de mortalité des cancers. Notre équipe focalise son activité depuis plusieurs années sur l'étude d'une famille de glycoprotéines membranaires, les tétraspanines, impliquée dans le processus métastatique.

Plusieurs études expérimentales ont montré le rôle majeur des tétraspanines dans la formation de métastases, en agissant soit comme suppresseurs (dans la majorité des cas), soit comme promoteurs de métastases. Ainsi, la transfection du CD9, du CD63 et du CD82 réduit le potentiel métastatique de lignées cancéreuses. En revanche, l'expression des tétraspanines CD151 et Co-029 semble produire l'effet inverse. Ces résultats sont cohérents avec les nombreuses études cliniques qui ont démontré que dans plusieurs cancers (sein, poumon, oesophage, estomac, foie, pancréas, côlon, prostate, mélanome...), le CD9 et le CD82 sont moins exprimés sur les tumeurs primitives lorsqu'il y a métastase et que leur baisse d'expression prédit un taux de survie inférieur. Dans le cancer du poumon, la diminution combinée de l'expression du CD9 et du CD82 a été corrélée à un potentiel métastatique plus important que lorsque l'expression d'un seul de ces deux antigènes est réduite.

Les membres de notre laboratoire ont démontré que l'une des propriétés remarquable des tétraspanines est leur capacité à s'associer entre elles, ainsi qu'à un nombre important d'autres molécules de surface pour former des complexes macromoléculaires structurés. Au sein de ces complexes, nous avons montré que chaque tétraspanine est associée spécifiquement à une ou plusieurs molécules de surface formant ainsi des complexes primaires, constitués d'une tétraspanine et d'une molécule partenaire. De plus, nous avons montré que les tétraspanines sont des protéolipides portant plusieurs acides palmitiques sur leurs cystéines juxta-membranaires. La palmitoylation

joue un rôle dans l'association des tétraspanines entre–elles probablement via une interaction avec le cholestérol. Ainsi, nous avons suggéré que les tétraspanines peuvent organiser des microdomaines particuliers de la membrane plasmique au sein desquels elles recruteraient leurs partenaires moléculaires qui pourraient être couplés fonctionnellement. L'ensemble des interactions impliquant les tétraspanines a été dénommé « réseau des tétraspanines » ou « Tetraspanin Web ».

Nous avons émis l'hypothèse qu'une variation de la composition des complexes à tétraspanines pouvait se produire au cours du processus tumoral favorisant ainsi la formation de métastases. Aussi, nous avons entrepris l'étude de la composition de ces complexes par des approches protéomiques en utilisant des modèles cellulaires provenant de cancer du côlon (cancer très métastasiant, en particulier dans le foie). Ces modèles étaient constitués de lignées issues de tumeurs primitives et de métastases provenant des mêmes patients. La stratégie de l'analyse protéomique a été basée sur les propriétés biochimiques des complexes à tétraspanines. Les complexes ont été solubilisés par des détergents doux qui respectent la plupart des interactions protéine–protéines puis isolés par immunoprécipitation. Les constituants ont été élués à l'aide de détergent plus drastique dissociant les interactions entre tétraspanines. Après séparation, les protéines ont été digérées à la trypsine et les peptides résultants analysés par LC–MS/MS, c'est–à–dire par couplage de la nano–chromatographie HPLC à la spectrométrie de masse en tandem sur trappe ionique. Cette démarche permet d'analyser les peptides séparément pour en obtenir des informations de séquence ce qui conduit à l'identification des protéines. Elle est adaptée à l'identification de protéines membranaires (cf. Figure 1).



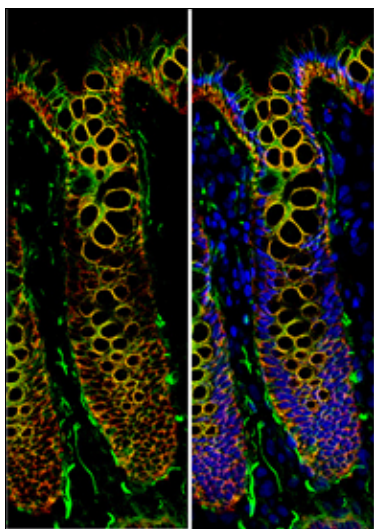
(cliquer pour agrandir)

Figure 1 : Approche protéomique pour la caractérisation des complexes à tétraspanines.

Un domaine membranaire à tétraspanine est schématiquement représenté (entouré de pointillés). Les tétraspanines sont des protéines possédant quatre domaines transmembranaires. Elles sont associées à d'autres molécules de surface et forment des complexes en s'associant entre elles. Ces complexes peuvent être solubilisés par des détergents doux (Brij58, Brij97, CHAPS). Après immunoprécipitation à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre la tétraspanine CD9, les constituants ont été dissociés et élués par un détergent plus drastique (Triton X-100, NP-40). Après séparation par SDS-PAGE, les protéines ont été visualisées par coloration argentique ou au bleu de Coomassie. Des profils différents peuvent être observés à partir de cellules issues de tumeurs primitives ou de métastases suggérant une différence de composition des complexes. Les protéines ont été découpées dans les gels et digérées à la trypsine. Les peptides résultants ont été analysés par spectrométrie de masse LC-MS/MS ce qui a conduit à l'identification des protéines.

L'analyse protéomique a permis d'identifier une quarantaine de protéines au sein des complexes à tétraspanines et de mettre en évidence la présence de plusieurs catégories de protéines : molécules d'adhérence, protéases membranaires, protéines de signalisation, protéines impliquées dans le trafic

vésiculaire et les processus de fusion de membranes ainsi que des protéines peu caractérisées. De façon intéressante, nous avons observé une expression différentielle de certains de ces constituants entre les cellules de tumeur primitive et les métastases. En effet, une diminution significative de l'expression de récepteurs de la matrice extra-cellulaire tels que l'intégrine alpha3bêta1 et de la protéine Lu/B–CAM a été observée concomitante au recrutement de l'intégrine alpha6bêta4 dans les complexes à tétraspanines. Ces variations d'expression, qui ont été confirmées pour certaines protéines dans une première série d'échantillons cliniques, pourraient induire un changement des propriétés d'adhérence et de migration des cellules tumorales favorisant la formation de métastases. Il faut noter que l'intégrine a6b4 est impliquée dans le processus invasif des cellules tumorales. Une autre molécule d'adhérence identifiée dans notre analyse protéomique est la protéine EpCAM. Cette protéine est surexprimée dans la majorité des carcinomes. Elle constitue également une cible majeure dans les protocoles de traitement des cancers du côlon par immunothérapie. Nous avons démontré une association directe de EpCAM avec la tétraspanine CD9. La co-localisation de ces deux protéines observée dans le côlon normal (cf. Figure 2) est perdue partiellement dans les tumeurs et les métastases. Il serait intéressant de déterminer si l'association de EpCAM aux tétraspanines est fonctionnellement liée à la migration cellulaire et à l'invasion.



(cliquer pour agrandir)

Figure 2 : EpCAM–CD9 constitue un nouveau complexe primaire dans le réseau des tétraspanines.

Microscopie confocale sur des coupes au cryostat de l'épithélium de côlon humain normal marqué par des anti–CD9 (vert) et des anti–EpCAM (rouge). Une co-localisation substantielle est observée pour ces deux molécules (jaune). A droite, la superposition avec une coloration au DAPI est montrée (bleue) donnant une estimation du nombre de cellules.

L'analyse protéomique a aussi révélé la présence des protéases membranaires CD26, ADAM10 et matriptase qui jouent un rôle dans la sécrétion et la régulation de l'activité d'un certain nombre de facteurs de croissance et de peptides bio-actifs. Par exemple, la matriptase est impliquée dans une cascade d'activation de protéases ou encore dans la maturation du facteur de croissance HGF, tandis que ADAM10 participe à la sécrétion de ligands du récepteur à l'EGF (EGFR). Des molécules de signalisation –des PKC et plusieurs protéines G– ont été identifiées également au sein des complexes à tétraspanines. Ces découvertes suggèrent que les microdomaines à tétraspanines pourraient jouer le rôle de plateforme pour certaines réactions enzymatiques et la transduction de signaux. L'altération au cours de la progression tumorale de ces réactions et de ces signaux pourrait jouer un rôle déterminant dans la formation de métastases.

Ces travaux qui mettent en évidence une variation importante de la composition des complexes à tétraspanines au cours de la progression tumorale, devraient se poursuivre par l'étude de l'organisation de ces complexes et de leur dynamique, ainsi que par des études fonctionnelles et cliniques. Ils devraient déboucher sur une meilleure connaissance du rôle des tétraspanines dans la formation de métastases et éventuellement sur de nouvelles stratégies thérapeutiques. Par ailleurs, ces travaux ouvrent la voie à l'exploration des complexes à tétraspanines dans d'autres systèmes ce qui permettra d'appréhender le rôle que jouent les tétraspanines dans des processus physiologique ou pathologiques tels que la fécondation ou certaines infection virales et parasitaires (hépatite C et malaria).

Présentation de l'équipe

L'équipe « Organisation membranaire : compartimentation moléculaire par les tétraspanines » est coordonnée par Eric Rubinstein au sein de l'Unité Inserm 602 dirigée par Claude Boucheix.

Contact : [François Le Naour](#)

Inserm U602
Hôpital Paul Brousse
94807 Villejuif Cedex

Constitution de l'équipe

François Le Naour, CR1 Inserm
Claude Boucheix, DR1 Inserm
Huynh Thien Duc, DR2 CNRS
Eric Rubinstein, CR1 Inserm

Philippe Mauduit, CR1, CNRS
Martine Billard, IE Inserm
Magali André, Doctorante
Céline Greco, Ecole de l'Inserm–Doctorante
Cécile Arduise, Doctorante
Toufik Abache, Doctorant
Sébastien Planchon, Stage M2, EPHE

Bibliographie

Publications majeures de l'équipe sur la thématique

Rubinstein E, Le Naour F, Lagaudrière–Gesbert C, Billard M, Conjeaud H and Boucheix C. CD9, CD63, CD81 and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA–DR and VLA integrins. *Eur J Immunol* 1996, 26 : 2657–2665.

Serru V, Le Naour F, Billard M, Azorsa DO, Lanza F, Boucheix C and Rubinstein E. Selective tetraspan–integrin complexes (CD81/a4b1, CD151/a3b1, CD151/a6b1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochem J* 1999 340 : 103–111.

Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M and Boucheix C. Severely reduced female fertility in CD9–deficient mice. *Science* 2000, 287 : 319–321.

Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 2001, 58 : 1189–1205. Review.

Silvie O, Rubinstein E, Franetich JF, Prenant M, Belnoue E, Renia L, Hannoun L, Eling W, Levy S, Boucheix C, Mazier D : Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nat Med* 2003, 9 : 93–96.

Charrin S, Manie S, Thiele C, Billard M, Gerlier D, Boucheix C, Rubinstein E. A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins. *Eur J Immunol* 2003, 33 : 2479–2489.

André M, Le Caer JP, Greco C, Planchon S, El Nemer W, Boucheix C, Rubinstein E, Chamot–Rooke J and Le Naour F. Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC–ESI–MS/MS and MALDI–FTICR–MS. *Proteomics* 2006, 6 : 1437–1449.

Le Naour F, André M, Greco C, Billard M, Sordat B, Emile JF, Lanza F, Boucheix C and Rubinstein E. Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. *Mol Cell Proteomics* 2006, 5 : 845–857.

La régulation de la recherche médicale et la gestion des risques :

Analyse des enjeux de protection des personnes suite à l'accident londonien de mars 2006.

par **Grégoire Moutel**

Laboratoire d'éthique médicale et de médecine légale, Faculté de médecine Paris 5 et Sffem, Société Française et Francophone d'éthique médicale

La protection des personnes est un impératif de la recherche médicale, car la recherche comporte par nature des risques.

Plusieurs thèmes principaux interdépendants sont à la base de l'éthique de la recherche biomédicale :

- le respect du sujet de recherche au travers notamment du consentement
- les responsabilités du chercheur à son égard
- l'expérience doit éviter toute souffrance et tout dommage non nécessaires
- tout risque de provoquer des blessures, l'invalidité ou la mort doit à priori être rejeté
- le sujet ne doit être invité à une recherche que si elle s'inscrit dans une démarche scientifique rigoureuse
- le sujet doit être libre avant et pendant l'expérience et doit pouvoir interrompre s'il estime avoir atteint l'état mental ou physique au delà duquel il ne peut aller.

Alors que ces règles sont connus dès 1947 de la communauté internationale, en 1966, le Dr Henry Beecher, occupant la chaire de recherche en anesthésie de l'université de Harvard, publie dans le New England Journal of Medicine, un article répertoriant 22 recherches effectuées aux Etats-Unis au mépris des principes éthiques énoncés précédemment. Il expose ainsi :

- l'injection de cellules cancéreuses vivantes à des personnes âgées et séniles placées en institutions pour analyse les résistances immunologiques
- la privation de pénicilline pour des syphilitiques d'un groupe témoin participant à une étude de longue durée sur l'évolution de la syphilis avec et sans traitement
- l'injection du virus de l'hépatite B à de jeunes résidents d'une institution psychiatrique de l'état de New York pour voir comment se développe la maladie
- l'insertion d'un cathéter dans la vessie de 26 nouveau-nés, avec prise d'une série de radio pour analyser le remplissage et la vidange vésicale.

Pour ces raisons toute la communauté scientifique et médicale, rappelle avec force l'importance des principes adoptés par les états démocratiques à Helsinki. Il est d'abord souligné que la médecine doit exercer la plénitude de son savoir et que dès lors il est nécessaire pour faire avancer le progrès médical d'effectuer des recherches diagnostiques, thérapeutiques et dans le domaine de la prévention. Mais dans le cadre d'une transparence impérative vis à vis du public il est rappelé que :

- La notion de risque est reconnue, mais que toutefois la recherche doit protéger au maximum la santé des participants, bien avant les intérêts de la science ou de la société.
- La validité scientifique doit être assurée par les pré-requis consistant en l'étude des publications scientifiques en laboratoires et sur l'animal, par l'écriture d'un protocole expérimental valide, et par un encadrement assuré par des médecins et scientifiques compétents et pleinement responsables de l'étude.
- Un comité indépendant doit examiner le protocole ; il doit être indépendant pour éviter les conflits d'intérêts avec les financeurs et les investigateurs.
- Quoi qu'il en soit et en toute circonstance le médecin doit protéger la vie, la santé, la dignité et l'intimité de la personne ainsi que son équilibre physique et psychologique.
- La balance bénéfice/risque doit être évaluée et jugée acceptable par le comité ; toutefois la recherche sur volontaire sain ou une prise de risque sur des patients est possible, à condition que l'importance de l'objectif recherché soit médicalement et humainement supérieure aux contraintes et aux risques encourus par le sujet.
- La recherche menée au cours d'un traitement n'est valable que dans un possible intérêt diagnostic, thérapeutique ou de prévention, si les méthodes existantes sont insuffisamment efficaces : il s'agit là de la reconnaissance de l'innovation thérapeutique pour offrir un espoir de sauver des vies ou de soulager la souffrance du malade. Mais cette reconnaissance ne peut avoir lieu que si la démarche est celle d'une démarche de recherche respectant les principes éthiques de toute recherche. La méthodologie doit de plus impérativement comparer le nouveau traitement au traitement de référence.
- L'information doit être appropriée, claire, compréhensible et complète sur les objectifs, les risques et les contraintes et le médecin doit s'assurer de sa bonne compréhension.
- Le médecin doit expliquer la prise en charge au patient en différenciant clairement celle liée aux soins et celle liée à la recherche tout en préservant la même relation médecin-malade à tout moment quel que soit l'acceptation du patient.
- Après l'information le consentement écrit doit être obtenu de manière libre, c'est à dire sans aucune pression. En cas de protocoles sur des personnes en état d'impossibilité juridique de consentir, il faut plusieurs conditions : le choix de cette population doit être justifié, la recherche doit leur apporter un bénéfice, il faut l'accord du comité et l'accord préalable du représentant légal.

En France, les principes d'Helsinki sont reconnus comme essentiels et au

début des années 1980. Le 2 juin 1988, le Pr Claude Huriel, dépose au Sénat une proposition de loi relative aux essais chez l'homme. Le Sénat, dans sa séance du 12 Octobre 1988, adopte une proposition de loi « relative à la protection des personnes qui se prêtent à la recherche biomédicale », transmise à l'Assemblée nationale. La loi n° 88–1138 est adoptée le 20 décembre 1998 Elle instaure des CCPPRB, comité consultatif de protection des personnes qui se prêtent à la recherche biomédicale, dans chaque région. Ces CCPPRB deviendront en 2004, lors de l'adaptation de la loi Huriel à la directive européenne des CPP, comité de protection des personnes. Les CPP perdent donc leur caractère uniquement consultatif, c'est à dire que leur rôle de passage obligatoire est renforcé, mais aussi que le contrôle de l'Etat est aussi renforcé.

Que s'est-il passé à Londres en Mars 2006 ?

Durant le mois de mars 2006, un essai médicamenteux a été mené dans un service de recherche clinique de l'hôpital Northwick Park, près de Londres, concernant l'anticorps TGN 1412 potentiellement intéressant dans le cadre du traitement de pathologies cancéreuses, infectieuses ou immunitaires dont la sclérose en plaques.

Six des huit volontaires ont présenté d'abord d'intenses douleurs (céphalées et douleurs abdominales), puis rapidement des vomissements suivis d'une perte de connaissance, tableaux nécessitant des transferts en réanimation et des soins intensifs. Les deux personnes indemnes sont celles ayant reçu le placebo.

La sévérité des tableaux cliniques et leur caractère exceptionnel et spectaculaire a déclenché une vague d'exposés médiatiques, plus ou moins discutables quant à l'exploitation intellectuelle qui en a été faite, mais a rappelé, quoi qu'il en soit, qu'aucun essai en recherche biomédicale sur l'homme n'est dénué de risque. Les termes de « patients cobayes » sont ressortis dans la grande presse, laissant croire parfois que ces essais auraient été réalisés sur des sujets malades et non volontaires, hors il s'agissait bien de sujets sains, volontaires et ayant donné leur consentement pour participer à une telle étude. Il n'en demeure pas moins des questions et quoi qu'il en soit deux nécessités : d'une part rappeler au public ce qu'est la recherche et la nature des risques qu'elle comporte inévitablement, d'autre part respecter les règles éthiques et les procédures d'encadrement de la recherche clinique, gage de limitations de ces risques et de protection des personnes.

Les enseignements à tirer

Cette situation de mars 2006 souligne qu'il convient de rappeler que toute recherche, par nature, comporte des risques, y compris graves, le but des recherches n'étant pas que d'étudier les effets bénéfiques d'une molécule, mais dans ses phases initiales, sa tolérance, sa pharmacocinétique et la

survenue d'effets secondaires éventuels (phase I de l'étude d'une molécule chez l'homme). Tous ces points doivent être rappelés car ils constituent le socle de la démarche d'information et de consentement des participants lors des recherches et un des éléments de la vision que le grand public doit avoir de la recherche médicale pour ne pas laisser croire que cette dernière ne renferme que des bénéfices directs pour les personnes.

Dans le même temps il convient d'expliquer au public que la prise de risque (si elle est raisonnable, exposée et surveillée) est incontournable, car le cas échéant ce serait la négation de la recherche clinique et de tout progrès en médecine.

Le fond du débat est alors de regarder comment gérer cette question des risques. Ceci englobe le fait d'essayer de prévoir et d'éviter les risques les plus graves d'une part et d'autre part d'informer les personnes sur tous ces risques, y compris peu grave et y compris s'ils sont en apparence potentiellement exceptionnels. Puis cette gestion impose de s'assurer de la liberté de choix des participants face à cette prise de risque et en cas de survenue du risque de leurs assurer une prise en charge médicale optimale (obligation de moyens et de sécurité dans les essais), ainsi qu'une prise en charge sociale et une prise en charge en terme indemnitaire en cas de survenue de l'incident et de l'accident entraînant un préjudice.

C'est là tout le sens de la notion de protection des personnes dans la recherche biomédicale, domaine dans lequel la France a une expérience reconnue depuis 1988, date de promulgation de la Loi Huriet encadrant la recherche biomédicale et de la mise en place des CCPPRB (Comité consultatif de protection des personnes dans la recherche biomédicale) devenu depuis la révision de la loi en 2004 les CPP , comité de protections des personnes.

Le protocole de Londres est un essai de phase I, c'est à dire de la phase initiale d'application sur l'homme de tout conception de nouveau médicament qui ne concerne qu'un petit nombre de personnes (en bonne santé ou parfois malades) qui ne visent pas à étudier une efficacité du principe actif, mais à étudier sa pharmacodynamique ainsi que sa toxicité éventuelle.

La molécule testée, un "anticorps monoclonal", de type CD28 avait été jugé en terme de pré-requis scientifique suffisamment intéressant pour que, en novembre 2003, une firme pharmaceutique signe un partenariat de recherche en vue d'étude et de fabrication pour application à l'homme dans le cadre de traitements à venir.

Peu de média ont souligné qu'il s'agit là d'une démarche normale et classique et nécessaire lors de la découverte de nouvelles molécules, démarche qui par le passé a permis de formidables progrès pour les patients dans tous les domaines de la médecine.

En avril 2005, l'Agence européenne des médicaments avait d'ailleurs annoncé que cet anticorps monoclonal pouvait être considéré comme un possible futur "médicament orphelin", destiné au traitement d'affections rares et qu'il pourrait être utilisée dans le traitement d'une forme relativement rare de leucémie chronique.

En juillet 2005, l'agence britannique chargée de la recherche sur les médicaments donnait l'autorisation aux premiers essais cliniques en phase I

pour cet anticorps, se fondant sur les pré-requis et les études chez les animaux dans le cadre de pathologies cancéreuses, infectieuses ou immunitaires dont la sclérose en plaques.

Personne ne sait encore à ce jour avec précision pourquoi, lors de cet essai, les personnes ont été atteintes d'une violente réaction immunitaire dont on a observé qu'elle a touché tout le système lymphatique.

Mais il convient dès à présent de s'interroger sur la pertinence absolue des essais chez l'animal (qui avaient eu lieu) dans le cadre des anticorps tant ceux-ci font référence à des spécifiques d'espèce avec des réactions (ou des non réactions) très différentes de chez l'homme. Ceci pourrait aller jusqu'à remettre en cause au moins partiellement l'utilité des informations que nous apportent ces tests en laboratoire sur des tissus et sur des animaux. Le passage à l'homme est donc à un moment incontournable avec un niveau d'incertitude beaucoup plus important que pour des molécules plus traditionnelles.

Des questions ont été soulevées quant au fait que des souris transgéniques (qui partageraient des gènes avec l'homme) auraient pu être utilisées préalablement en plus grand nombre pour simuler les premiers tests sur l'homme. Ce point devra être éclairé.

Quoi qu'il en soit ces questions soulignent un point essentiel qui est celui de la nécessaire qualité des pré-requis scientifiques qui figurent comme une règle éthique internationale des essais sur l'homme, règle reprise dans la réglementation européenne et appliquée en France.

Par ailleurs d'autres questions ont été posées. Celle qui revient le plus souvent est de savoir pourquoi n'a-t-on pas limité le risque en recourant à un seul sujet, au lieu de huit simultanément? Cette question de la simultanéité des sujets soumis à l'étude apparaît légitime et souligne l'importance de la gestion non pas synchronisée mais étalée dans le temps de tel protocole. Dans l'immédiat, suite à cet accident en Angleterre, les autorités sanitaires allemandes ont réagi concrètement au drame du TGN 1412 en décidant que les essais de "médicaments à haut risque biologique" seraient dorénavant pratiqués sur un sujet humain à la fois, et non plus sur plusieurs en même temps.

De nouvelles règles en France depuis 2004

En juillet 2004, la nouvelle loi de santé publique a été adoptée par le Parlement. La loi Huriet-Sérusclat de 1988, déjà adaptée en 1994, et qui encadre la recherche biomédicale est au cœur de cette réforme, qui rentre progressivement depuis 2005 en application.

Les modifications de la loi Huriet s'avéraient nécessaires pour contrebalancer les insuffisances de la transposition en droit français de la directive européenne de 2001 sur les essais cliniques.

Un des points de la réforme, est tout d'abord que les CCPPRB (comités

consultatifs de protection des personnes dans la recherche biomédicale) deviennent les CPP, comités de protection des personnes. Les comités ne sont donc plus des instances consultatives, mais des instances dotées d'une véritable autorité, et leurs demandes et leurs recommandations doivent être suivies d'effet, avec possibilité de suivi tout au long de protocoles dès lors que ceci serait jugé nécessaire.

L'évolution notable réside par ailleurs dans l'abandon de la classification française des protocoles en deux catégories qui prévalaient jusqu'en 2004 : les protocoles avec bénéfices individuels directs (ABID) et ceux sans bénéfice individuels direct (SBID) qui nécessitaient une protection renforcée et des règles spécifiques. Désormais, tous les protocoles seront évalués sur la balance bénéfice risque c'est à dire sur « le caractère satisfaisant de l'évaluation des bénéfices et des risques attendus ».

De plus pour faciliter la transparence et la visibilité des essais auprès du public, est créée une base de données des recherches biomédicales au niveau national et européen. Mais dans certains cas, pour respecter l'exigence du secret industriel, seuls des éléments pertinents du protocole figureront sachant que le promoteur d'une recherche peut pour des raisons légitimes (après acceptation par l'autorité compétente du Ministère) s'opposer à la communication dans cette base de tout ou partie du protocole. Ce point fait l'objet de contestation de certaines associations de patients.

Comme autre nouveauté, la loi a entériné le fait qu'il faille préciser clairement aux patients leurs modalités de prise en charge pendant la recherche, mais également au décours de celle-ci. La question de la sortie de protocole et de l'après protocole (lien entre recherche et clinique) est un premier élément central de réflexion à ce niveau.

Dans ce même cadre de l'information sur le devenir des données de la recherche à l'issue du protocole, il est désormais reconnu aux patients le fait d'avoir communication des résultats globaux de la recherche. La question de la communication des résultats individuels restent en débat et n'a pas été tranchée par la nouvelle loi.

Place et rôle de l'assurance

Nous avons vu que le préjudice peut faire partie par nature de la participation à une recherche. L'assurance est donc fondamentale dans un souci de respect des personnes. Elle a un intérêt majeur pour les médecins, c'est de leur permettre d'annoncer à tout participant qu'une victime sera prise en charge indépendamment de la notion de faute médicale. A travers l'obligation d'assurance du promoteur d'une recherche la loi tout en reconnaissant la possible transgression visant à porter atteinte à l'intégrité d'autrui pour un bénéfice incertain (dépenalisation de l'acte de recherche), rappelle l'obligation que la société se donne de prendre en charge sans condition les victimes d'accident. Le promoteur a donc obligation de souscrire une assurance en cas d'accident ou faute entraînant un préjudice lors du protocole (contrat d'assurance garantissant les conséquences pécuniaires de la responsabilité

civile du promoteur).

Place et rôle du fichier national des participants : maîtriser les risques

Le but de ce fichier est de permettre une protection accrue des personnes par un contrôle du nombre de participations individuelles à des protocoles et par un contrôle des indemnisations perçues (éviter les dérives et l'exploitation marchande des personnes).

Les informations contenues dans le fichier ont pour objet d'assurer :

1^o le respect de la période d'exclusion au cours de laquelle la personne ne peut se prêter à aucune autre recherche biomédicale

2^o le contrôle du montant total des indemnités perçues par cette personne.

Le fichier sera alimenté, consulté, interrogé et mis à jour par les investigateurs des recherches biomédicales. Son accès est subordonné à l'utilisation de codes d'accès confidentiels.

Les personnes susceptibles d'être inscrites dans le fichier seront informées par l'investigateur de l'existence du fichier de celui-ci et des données qui y sont contenues

L'interrogation du fichier permet à l'investigateur de s'assurer que la personne n'est pas empêchée de participer à la recherche pour les raisons suivantes :

1^o en raison d'une exclusion du fait de sa participation à une autre recherche;

2^o Lorsque l'intéressé a déjà perçu au cours des douze mois précédents une indemnité excédant le maximum annuel fixé par le ministre chargé de la santé.

L'esprit de ces mesures est d'assurer une protection des personnes qui accepteraient une prise de risque trop importante soit par méconnaissance soit par attrait financier.

Rappelons qu'à ce propos le cas de l'accident survenu en banlieue de Londres a donné lieu à interrogations quant à la mesure de la somme versée à chaque participant, afin qu'ils participent au test clinique de la nouvelle molécule, le TGN 1412, dans les locaux de l'hôpital Northwick Park.

A propos du lien entre argent et participation à une recherche, rappelons que dans l'esprit du respect des droits de l'homme, nul ne peut commercialiser son corps et que l'argent versé doit rester une indemnisation avec plafonnement et ne doit pas devenir une rémunération. Par ailleurs la notion de consentement n'apparaît valide que si le caractère libre de la personne est certain, en particulier libre de se libérer de la contrainte financière.

Événements indésirables : importance d'un système de vigilance

On entend par événement indésirable « toute manifestation nocive survenant chez une personne qui se prête à une recherche biomédicale que cette manifestation soit liée ou non à la recherche ou au produit sur lequel porte cette recherche ».

Face à une telle situation, tout investigateur est tenu en premier lieu par une

obligation de soin et un devoir d'assistance, la démarche thérapeutique devant passer avant toute démarche de recherche. Rappelons également que l'investigateur médecin a le devoir d'arrêter un protocole dès lors que le ou les risques, même consentis par le patient, apparaissent trop sérieux. Ce devoir perdure, même contre l'avis du patient, c'est à dire même si le patient demande que l'essai soit continué.

Dans ce cadre, pour les protocoles identifiés comme à risque, les promoteurs et investigateurs reçoivent mission d'assurer une obligation de moyens en terme de sécurité (personnels sur place, réanimateur, lit de réanimation gardé libre à proximité, non concomitance d'un nombre trop important de patients inclus dans l'essai...etc).

En cas d'effet ou d'événement indésirables inattendus l'investigateur notifie immédiatement au promoteur tous les événements et effets indésirables graves. Cette notification est suivie de rapports complémentaires écrits détaillés dans lesquels l'investigateur notifie au promoteur les événements indésirables et les résultats d'analyse anormaux définis dans le protocole comme déterminants pour l'évaluation de la sécurité des personnes.

Le promoteur quant à lui tient des registres détaillés de tous les événements et effets indésirables qui lui sont notifiés par le ou les investigateurs. Pour toutes les recherches biomédicales, il transmet aux autres investigateurs toute information susceptible d'affecter la sécurité des personnes qui lui a été notifié par un investigateur. Par ailleurs, le promoteur déclare tout effet indésirable grave inattendu au ministre chargé de la santé et au CPP concerné, sans délai à compter du jour où il en a eu connaissance (pour certains essais il doit transmettre aussi les effets survenus hors du territoire nationale). Dans le cas d'effet indésirable grave inattendu ayant entraîné la mort ou mis la vie en danger, la notification est faite sans délai.

Conclusion

Depuis 1988, la Loi Huriet–Sérusclat et le travail entre médecins/chercheurs et CPP (anciennement CPPRB) ont permis, même si des améliorations sont à apporter de part et d'autres, de placer la France en bon rang de la qualité éthique de la recherche biomédicale. L'ensemble des principes et règles qui guident la protection des personnes dans la recherche biomédicale est le fruit d'une évolution citoyenne du concept de recherche sur l'homme. Même si l'adhésion de certains professionnels à ces principes reste à parfaire, ces derniers sont majoritairement aujourd'hui convaincus de leur bien fondé en terme humain, mais également de rigueur intellectuelle et scientifique. Il conviendra de regarder avec attention comment à l'avenir les cliniciens/chercheurs, les membres des CPP, les patients et leurs représentants adopteront ces évolutions et les feront vivre au sein des institutions de soins et de recherche.

Pour en savoir plus :

- Rubrique éthique de la recherche sur www.ethique.inserm.fr, version 2006
- France, loi n° 2002–302 du 4 mars 2002, relative aux droits des malades et à la qualité du système de santé, JO de la République Française du 5 mars 2002, www.legifrance.gouv.fr
- France. Loi n°2004–806 du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique (modifiant notamment la loi Huriet relative à la recherche biomédicale, intégrée pour cette partie au Code de la santé publique, articles L. 1121–1 et suivants), JO République Française du 11 août 2004, www.legifrance.gouv.fr
- de Montgolfier S, Moutel G, Duchange N, Sharara L, Beaumont C, Feingold J, Herve C. Evaluation of biobank constitution and use: multicentre analysis in France and propositions for formalising the activities of research ethics committees. *Eur J Med Genet*, sous presse. Disponible en ligne.
- Fauriel I, Moutel G, Callies I, Herve C. [Study over 10 years of 622 protocols receiving unfavourable reports from 19 research ethics committees]. *Therapie* 2005 Mar–Apr ; 60 (2) : 159–65. French.
- Evaluation of decision–making by CCPPRBs. Fauriel I, Moutel G, Duchange N, Francois I, Herve C. *Therapie* 2004 Jul–Aug ; 59 (4) : 389–94.
- Study of the involvement of research ethics committees in the constitution and use of biobanks in France. G Moutel, S de Montgolfier, N Duchange, L Sharara, C Beaumont, C Herve, *Pharmacogenetics* 2004, 14 : 195–8
- The protection of persons and biomedical research in France. A multicentre study of 10 committees. Fauriel I, Moutel G, Francois I, Montuclard L, Herve C. *Presse Med* 2003 Dec 20 ; 32 (40) : 1887–91
- Communication of the results to those participating in biomedical research. Callies I, Moutel G, *Presse Med* 2003, 32 (20) : 517–8.
- Les éléments du corps humain, la personne et la médecine. E Grand, Hervé C, Moutel G ; Ed L'Harmattan, 2005–10–03
- Place de la bioéthique en recherche et dans les services cliniques, B Knoppers, C Herve, P Molinari, G. Moutel Ed Dalloz, 2004.
- Le consentement dans les pratiques de soins et de recherche : entre idéalismes et réalités cliniques. G. MOUTEL, Ed L'Harmattan, 2003
- Moutel G, Duchange N, Raffi F, Sharara L, Théodorou I, Noël V, de Montgolfier S, Callies I, Bricaire F, Hervé C, Leport C and the APROCO–COPILOTE study group. Communication of pharmacogenetic research results to HIV infected treated patients: professionals versus patients' standpoints. *European Journal of Human Genetics* 2005, 13 (9) : 1055–62.

En bref

Des chercheurs américains obtiennent des lignées de cellules souches embryonnaires humaines sans destruction d'embryon
Des chercheurs de l'Advanced Cell Technology Inc. ont obtenu, à partir d'embryons surnuméraires issus de fécondation in vitro et ne faisant plus l'objet d'un projet parental, deux lignées de cellules souches embryonnaires humaines. Comme pour le diagnostic préimplantatoire (DPI), ils ont prélevé sur chacun une seule cellule, qu'ils ont ensuite mise en culture. Après le prélèvement, les embryons utilisés étaient encore viables. Cette méthode cherche à surmonter les objections éthiques opposées jusqu'à présent à l'utilisation d'embryons pour la production de cellules souches. Les résultats ont été publiés dans la revue Nature du 23 août 2006.

Source : communiqués de presse de ACT Inc. et du comité consultatif d'éthique de cette société

NOTE

Pour une recherche clinique innovante et de grande qualité

Christian Bréchet
Directeur Général de l'Inserm



RENCONTRE

Karine Clément
Du gène à l'Homme

PAROLE DE CHERCHEUR

François Le Naour

Rôle des complexes membranaires à tétraspanines dans la formation de métastases

ACTUALITÉ SCIENTIFIQUE

Mode d'action du paracétamol

le mystère se dissipe

TFG bêta 1

et maladies auto-immunes

Diabète de type 2

inflammation de l'îlot de Langerhans

Toutes les actualités...

ÉTHIQUE

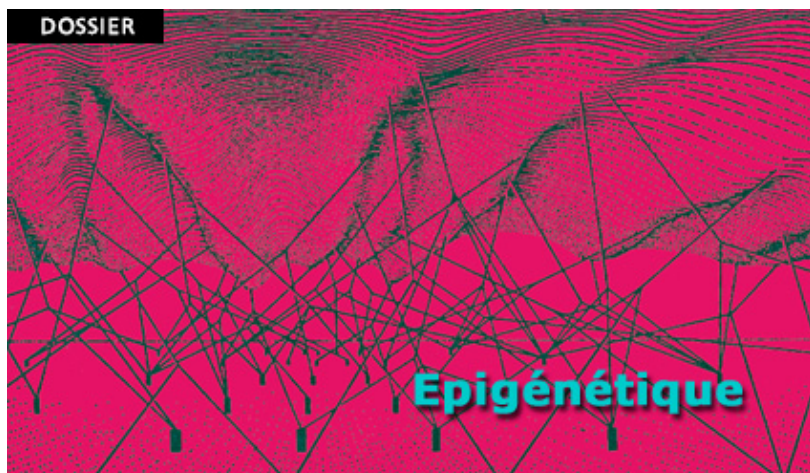
Régulation de la recherche médicale et gestion des risques

Analyse des enjeux de protection des personnes suite à l'accident londonien de mars 2006

N°201

SEPTEMBRE 2006

DOSSIER



DÉBAT

Le vivant au-delà de ses gènes ?