

Obtention de souris bimaternelles et bipaternelles à partir de cellules souches embryonnaires haploïdes, hypométhylées et délétées pour certaines régions contrôlant l’empreinte parentale

Jacqueline Mandelbaum

En bref !

Zhi-Kun Li et al. utilisent des cellules souches embryonnaires haploïdes (hESC) pour dépasser les obstacles à la reproduction uniparentale chez la souris. Les hESC parthénogénétiques et androgénétiques subissent en culture un effacement de la méthylation de l’ADN spécifique du sexe de l’embryon dont elles sont issues et adoptent ainsi un profil de méthylation similaire à celui des cellules germinales primordiales. Cette vitesse de déméthylation est cependant plus lente dans les ESC androgénétiques ce qui fait envisager une dynamique différente suivant l’allèle parental concerné. En combinant gamète femelle (ovocyte mature) et hESC parthénogénétiques déméthylées et délétées pour trois régions d’empreinte parentale, les auteurs ont été capables d’obtenir des souris bimaternelles au développement normal. En combinant gamète mâle (spermatozoïde) et ESC androgénétiques délétés pour sept régions d’empreinte, ils ont obtenu des souris bipaternelles vivantes à la naissance.

La reproduction uniparentale par parthénogenèse ou gynogenèse¹ est largement répandue chez certains vertébrés comme les reptiles, les poissons et les amphibiens mais n’est pas possible chez les mammifères, dont le mode de reproduction est obligatoirement sexué [1]. Pourquoi cette impossibilité à la parthénogenèse ? Depuis les expériences de transplantation des pronuclei, réalisées chez la souris dans les années 1980, on sait que le développement de l’embryon des mammifères nécessite la contribution des chromosomes paternels et maternels, génétiquement asymétriques [2, 3]. Des embryons reconstitués avec deux pronuclei mâles

(androgénotes) ou deux pronuclei femelles (gynogénotes) ne sont pas capables d’un développement normal. Cette asymétrie chromosomique a d’abord été étudiée en répertoriant, dans la descendance de souris hétérozygotes pour des translocations robertsoniennes ou équilibrées, les disomies uniparentales responsables de létalité ou de sévères malformations embryonnaires. Bruce Cattanach *et al.* [4] ont ainsi établi une carte complète des onze segments proximaux ou distaux, répartis sur sept chromosomes (2, 6, 7, 11, 12, 17 et 18), qui ne sont pas équivalents selon qu’ils sont hérités du père ou de la mère, et qui affectent la

croissance embryonnaire, la viabilité ou le comportement des souris. Dix ans après les premières expériences de transplantation des pronuclei, la signature moléculaire de cette asymétrie chromosomique, indispensable au développement normal de l’embryon, est découverte. Il s’agit d’une modification épigénétique de l’ADN (le plus souvent une méthylation), acquise durant la gamétogenèse, qui altère l’expression de certains gènes selon que le gamète est maternel ou paternel. À ce jour, environ une centaine de gènes soumis à cette empreinte parentale² ont été décrits chez les mammifères [5].

¹ La parthénogenèse est un mode de reproduction uniparental (ou monoparental), sans fécondation, où l’ovocyte est activé spontanément in vivo ou par des stimuli physicochimiques externes, aboutissant au développement d’un embryon d’origine exclusivement maternelle. La gynogenèse est une forme de parthénogenèse au cours de laquelle l’ovocyte est activé par le gamète mâle qui ne participe cependant pas à la constitution génétique de l’embryon.

² L’empreinte parentale est un mécanisme épigénétique de contrôle de la transcription des gènes. Si la plupart des gènes des mammifères sont exprimés de façon biallélique, certaines régions chromosomiques portent des gènes essentiels pour le développement qui ne sont exprimés que par un seul chromosome, paternel ou maternel (expression monoallélique), car ils sont soumis à une empreinte parentale. Cette empreinte détermine leur expression différentielle au cours du développement embryonnaire mais aussi pendant la vie adulte. La « marque » de l’empreinte est le plus souvent caractérisée par une méthylation des dinucléotides cytosine-phosphate-guanine (CpG) de l’ADN, mais d’autres mécanismes existent, comme les modifications post-traductionnelles des histones. La plupart des gènes soumis à empreinte sont regroupés en grandes régions chromosomiques ou domaines (*clusters*) qui peuvent couvrir jusqu’à 4 Mb et comportent des gènes exprimés tant par l’allèle paternel que maternel. La plupart des régions soumises à empreinte sont contrôlées au niveau de séquences particulières, différenciellement méthylées, les DMR (pour *differentially methylated regions*), considérées comme des centres d’empreinte (IC, pour *imprinting center*, ou ICR, pour *imprinting control region* ou encore ICE, pour *imprinting control element*) dont la méthylation a lieu précocement, dans les gamètes. Les IC sont des éléments régulateurs capables de contrôler en *cis* l’expression monoallélique de l’ensemble des gènes d’un domaine. S’ils sont méthylés, ils répriment l’expression du ou des gènes sous leur contrôle. D’autres régulations existent en *trans* : MBD (pour *methyl CpG binding proteins*), associées aux méthyltransférases de l’ADN et aux protéines de modifications des histones, protéines isolantes (insulateur) constituant des barrières au sein d’une unité transcriptionnelle, comme le CTCF (voir note 5), ou encore ARN non codants, produits par certains gènes soumis à empreinte et qui peuvent intervenir par un mécanisme antisens, pour modifier l’expression de gènes qui leur sont adjacents. Ainsi, le gène *H19* produit un ARN non codant dont l’inactivation entraîne la surexpression du gène *Igf2* voisin [23].

Certains auteurs ont théorisé cette asymétrie entre génomes parentaux en proposant le concept de « conflit génétique » [6, 7]. Ainsi, les gènes soumis à empreinte portés par l'allèle paternel seraient ceux qui confèrent à l'embryon un avantage d'acquisition de ressources à partir de la mère et donc une meilleure croissance durant la gestation. Au contraire, les gènes d'empreinte portés par l'allèle maternel contrebalanceraient les effets des gènes d'empreinte hérités du père afin de ne pas épuiser prématurément les ressources apportées par la mère, mais plutôt de faire en sorte qu'elles soient distribuées équitablement à tous les descendants. L'empreinte génomique fait partie de ces différences entre chromosomes parentaux qui expliquent l'impossibilité de la reproduction uniparentale asexuée chez les mammifères. Ils en tirent des avantages indiscutables comme l'échange d'informations génétiques et la propagation des mutations bénéfiques pour l'évolution. En 2004, une équipe japonaise et coréenne [8] obtient la première souris bimaternelle normale et vivant jusqu'à l'âge adulte, en utilisant des ovocytes immatures (dont les marques d'empreinte ne sont pas encore réapposées) et porteurs d'une délétion de 13 kilobases (kb) au niveau de la région d'empreinte du gène *H19*. La délétion mime ainsi la répression due à la méthylation de cette région sur le chromosome

paternel. Tomohiro Kono reconstitue 457 ovocytes porteurs de deux lots haploïdes de chromosomes ovocytaires : l'un issu de la souris invalidée, l'autre d'un ovocyte normal en métaphase 2. Après activation par le chlorure de strontium (SrCl₂), il obtient des embryons qui sont transférés chez des femelles pseudo-gestantes. Si 72 % des embryons s'implantent, seuls dix-huit petits sont encore vivants à la naissance, et une seule souris survit à l'âge adulte. L'efficacité est donc très faible (0,6 % des embryons transférés), mais la barrière à la parthénogenèse a incontestablement été franchie chez un mammifère et le rôle de l'empreinte parentale dans ce blocage est authentifié. Zhi-Kun Li *et al.* rapportent, dans le présent article, les travaux qui leur ont permis, en utilisant une technologie différente, de préciser quelles délétions permettent d'obtenir des souris bimaternelles normales, avec une bien meilleure efficacité et, pour la première fois, de réussir la reproduction bipaternelle chez les mammifères, décrite uniquement à ce jour chez le poisson zébrafish [9].

Résultats

Un nouvel outil : les cellules souches embryonnaires haploïdes, dont l'hypométhylation reproduit le profil de reprogrammation des cellules germinales primordiales

L'utilisation par Kono d'ovocytes immatures est techniquement

difficile et peu propice à d'autres applications. Li va employer, comme gamètes expérimentaux mâles ou femelles, des cellules souches embryonnaires que son groupe, comme d'autres [10, 11], ont dérivées à partir d'embryons de souris haploïdes parthénogénétiques ou androgénétiques, obtenant ainsi des cellules souches embryonnaires haploïdes (hESC) parthénogénétiques (phESC) et androgénétiques (ahESC)³. Ces cellules sont triées régulièrement par cytofluorométrie (FACS, pour *fluorescence activated cell sorting*) afin d'éliminer les cellules avec diploïdisation spontanée et de maintenir le statut haploïde de la lignée.

Les hESC cultivées *in vitro* montrent, après plusieurs passages, une déméthylation globale du génome et une hypométhylation spécifique des zones d'empreinte qui ressemblent à ce que l'on obtient dans les cellules germinales primordiales âgées respectivement de 10,5 et de 13,5 jours. Cette déméthylation, étudiée par séquençage de l'ADN après traitement au bisulfite, est plus rapide dans les phESC que dans les ahESC. Par ailleurs, ces cellules en forme de dôme sont pluripotentes, comme le montre l'expression des marqueurs spécifiques de pluripotence, leur capacité à former des tératomes contenant les trois feuillettes embryonnaires après injection sous-cutanée chez des souris immunodéprimées et à générer des souris chimériques après injection dans des blastocystes.

Production de souris bimaternelles à partir de phESC hypométhylées

Les phESC dérivées d'ovocytes en M2 perdant l'empreinte maternelle des DMR (pour *differentially methylated regions*)⁴ durant la culture, Li *et al.* [12] vont d'abord générer des embryons bimaternels en injectant des phESC, au-delà du vingtième passage, hypométhylées

³ **Production des cellules souches embryonnaires haploïdes. ESC haploïdes parthénogénétiques (phESC).** La première étape consiste à former des embryons haploïdes parthénogénétiques en activant, par le chlorure de strontium, un ovocyte en métaphase 2, porteur du transgène de la *green fluorescent protein* (GFP). On obtient des zygotes à un seul pronucleus qui sont cultivés *in vitro* jusqu'à l'obtention de morulae et blastocystes dont seront dérivées les lignées de cellules souches embryonnaires haploïdes. **ESC haploïdes androgénétiques (ahCSE).** Les embryons haploïdes androgénétiques sont obtenus en micro-injectant un spermatozoïde dans un ovocyte en métaphase 2 (GFP⁺). En retirant la pipette de micro-injection on extrait, dans le même geste, le fuseau de métaphase et ses chromosomes maternels. L'ovocyte est activé comme précédemment et donne les embryons androgénétiques haploïdes dont seront dérivées les ahCSE. **ESC diploïdes androgénétiques (adCSE).** Après micro-injection d'un spermatozoïde, marqué par la RFP, dans un ovocyte en M2 et retrait du fuseau, l'ovocyte est activé. Une heure plus tard, il est injecté à nouveau mais avec cette fois une ahESC marquée par la GFP et porteuse de six ou sept délétions de gènes d'empreinte. Après nouvelle activation et culture *in vitro*, on obtient des blastocystes diploïdes bipaternels dont seront dérivés des CSE diploïdes androgénétiques (adESC) fluorescentes dans le rouge et le vert.

mais non invalidées pour des gènes d’empreinte, dans des ovocytes en métaphase 2. Après activation par le chlorure de strontium, les embryons bimaternels ainsi produits sont cultivés *in vitro* puis transférés dans l’oviducte de femelles pseudogestantes. Les pHESC étant dérivées à partir de blastocystes parthénogénétiques porteurs du gène de la protéine fluorescent dans le vert (*Gfp*, pour *green fluorescent protein*), les embryons qui en sont issus sont aisément repérables. L’équipe espère que ces embryons auront une durée de vie supérieure à celle des embryons parthénogénétiques, qui meurent avant 9,5 jours de gestation. C’est effectivement le cas, puisque les embryons issus des pHESC peuvent dépasser 10,5 jours – mais jamais 13,5 jours, ce qui est bien inférieur à la durée de gestation normale chez la souris qui est de vingt jours environ.

Trois centres d’empreinte (*H19*-, *IG*- et *Rasgrf1*-DMR), normalement méthylés sur l’allèle paternel chez la souris, sont très hypométhylés dans ce modèle. Il en résulte, dans l’embryon reconstitué, une expression aberrante des gènes d’empreinte sous contrôle de ces trois DMR, sans doute à l’origine des troubles du développement puisque le profil global d’expression génique n’est par ailleurs pas très différent de celui des souris témoins WT⁵. L’hypométhylation, naturellement obtenue dans les pHESC, après culture prolongée, ne suffit donc pas à dépasser la barrière de l’empreinte parentale.

⁴Voir note 2.

⁵ **Embryons et souris sauvages (WT, pour *wild-type*)** : des souris femelles de lignée B6D2F1 (C57BL/6 x DBA/2) sont utilisées comme donneuses d’ovocytes et des souris CD-1 pseudogestantes en tant que « mères porteuses » des embryons obtenus après micro-injection. Les souris témoins, lors des expériences de micro-injection et pour le suivi du développement embryonnaire et postnatal jusqu’à l’âge adulte, sont issues de la micro-injection de spermatozoïdes dans des ovocytes de souris B6D2F1 en métaphase 2 et sont désignées par les auteurs comme embryons et souris WT.

Pour améliorer le développement de ces embryons bimaternels, les auteurs vont alors réaliser, dans des pHESC, différents types de délétions de ces DMR, modifiant le statut d’empreinte des gènes sous leur contrôle afin de « mimer » le statut existant sur l’allèle paternel. Ils utilisent pour cela la technique des « ciseaux moléculaires » CRISPR-Cas9 (pour *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein9*) qui permet de cibler une séquence précise d’ADN grâce à un ARN guide et de la couper grâce à l’endonucléase Cas9 associée. Cet outil simplifie et renforce l’efficacité de l’inactivation (*knock-out* [KO]) génétique classique induite par recombinaison homologue, que les auteurs ont utilisée dans leurs premières expérimentations.

Souris bimaternelles 1KO

Ainsi, une délétion de 15 kb du domaine *H19-Igf2*, contenant le centre d’empreinte du locus (*H19*-DMR) et entraînant la perte d’expression du gène *H19*, permet un développement au-delà de 13,5 jours – mais jamais jusqu’au terme de la gestation. En revanche, une inactivation de 4 kb, couvrant l’*IG*-DMR (pour *intergenic*-DMR) du locus *Dlk1-Gtl2*, qui éteint l’expression du gène *Gtl2*, permet d’obtenir quelques souriceaux vivants à terme (13/568, 2,3 %), mais décédant dans les heures suivant la naissance. Ils présentent, en outre, un retard de croissance de 46 % par rapport à des souriceaux WT car l’absence d’invalidation de la DMR du locus *H19-Igf2* ne permet pas de réactiver l’expression du gène *Igf2*⁶ [12].

Souris bimaternelles 2KO

Li *et al.* vont donc combiner, dans des pHESC, les deux précédentes délétions ($\Delta H19/\Delta IG$) pour générer,

selon la même méthodologie et après transfert des embryons dans l’oviducte de femelles WT, 9 % de souris appelées souris 2KO-bimaternelles (*2KO-bimaternal mice*). Ce pourcentage demeure cependant inférieur aux 14,5 % de jeunes naissant après transfert d’embryons contrôle WT. Les souris 2KO naissent vivantes à terme avec le même poids corporel que les animaux WT, puisque l’invalidation de *H19*-DMR permet la restauration de l’expression d’*Igf2*, mais à partir de la première semaine, ce poids sera toujours inférieur de 20 % à celui des témoins [Li, 2016]. Les souris 2KO se développent jusqu’à l’âge adulte mais présentent des troubles du comportement, tels une moindre vélocité et une plus grande anxiété, qui amènent les chercheurs à réaliser le transcriptome de leur tissu cérébral. Trois gènes présentent une expression significativement différente de celle des souris WT, pouvant expliquer ces troubles. Ce sont les gènes *Th*, dont la mutation est responsable d’une hypoactivité, *Xlr3b*, dont les modifications d’expression entraînent des troubles cognitifs, et *Rasgrf1*, impliqué dans l’apprentissage olfactif et la mémoire. Étonnamment, les souris 2KO ont une durée de vie supérieure à celle des souris témoins qui semble corrélée à la diminution de facteurs liés au métabolisme et influant négativement sur la longévité, tels que l’expression d’*Igf1* et le taux de cholestérol sérique. *Il y aurait peut-être ainsi des barrières post-natales à la reproduction bimaternelle.*

Souris bimaternelles 3KO

Puisque la région d’empreinte du gène *Rasgrf1* est anormalement hypométhylée dans les 2KO-pHESC, les embryons et le tissu cérébral adulte des souris bimaternelles 2KO, Li *et al.* décident d’ajouter la

⁶ **Locus *H19-Igf2***. Dans la partie distale du chromosome 7, chez la souris, se trouvent le locus *H19-Igf2* et son centre d’empreinte *H19*-DMR. La protéine CTCF (pour *CCCTC-binding factor*) se fixe sur la *H19*-DMR non méthylée de l’allèle maternel et joue un rôle d’isolant, bloquant l’activation d’expression du gène *Igf2* très actif sur la croissance et le développement foetal.

délétion du centre d’empreinte du gène *Rasgrf1* aux deux précédentes. Ils réalisent des phESC délétées au niveau de trois DMR : *H19*-, *IG*- et *Rasgrf1*-DMR. Ces 3KO-phESC, après micro-injection dans des ovocytes en M2 activés avant et après l’injection, permettent d’obtenir, après transfert, des embryons bimaternels 3KO et 14 % de jeunes vivants (29/210), soit un taux de succès identique aux contrôles WT. Tout se normalise par rapport aux souris 2KO : les poids de naissance corporel et placentaire, le niveau d’expression du gène *Rasgrf1* et même, de façon inattendue, le profil d’expression de tous les gènes soumis à empreinte et par conséquent la courbe de croissance postnatale, le taux sérique du cholestérol, l’expression d’*Igf1* et les troubles du comportement. Pour explorer leur fertilité, les femelles 3KO sont accouplées avec des mâles WT et donnent naissance à vingt-deux nouveau-nés en six portées dont la taille est comparable à celle des femelles WT ($6,7 \pm 0,84$ versus $7,1 \pm 0,40$). Neuf nouveau-nés porteurs de la délétion *H19* ou *IG* meurent peu après la naissance tandis que les treize autres jeunes se développent jusqu’à l’âge adulte. Les auteurs estiment donc que leur méthodologie (phESC-3KO) a permis de dépasser toutes les barrières à la reproduction bimaternelle chez les mammifères.

Production de souris bipaternelles vivantes 6KO

Les expériences de transfert de pronuclei ont montré que le retard de croissance apparaissait plus tôt pour les embryons à deux pronuclei mâles que pour ceux à deux pronuclei femelles [13]. Pour dépasser

les barrières, sans doute plus insurmontables encore à la reproduction bipaternelle, Li *et al.* vont employer la méthodologie précédemment décrite mais à partir d’ahESC androgénétiques (ahESC)⁷, dérivées de blastocystes exprimant la GFP. Ces ahESC sont utilisées au-delà du trentième passage, lorsqu’elles ont atteint un statut d’effacement de l’empreinte parentale voisin de celui des cellules germinales primordiales mâles.

Les auteurs choisissent, dans un premier temps, d’invalider six régions d’empreinte qui sont connues pour avoir des implications majeures dans la létalité embryonnaire, la croissance fœtale ou placentaire et les anomalies liées aux disomies uniparentales. Ce sont les régions : *Nes* (régulant l’expression de *Nes* et *Nespas*), *Grb10* (régulant les gènes *Cobl* et *Grb10*), *Igf2r* (régulant *Airn* et *Igf2r*), *Snrpn* (régulant *Snurfet* et *Snrpn*), *Kcnq1* (régulant *Cdkn1c* et *Kcnq1*) et *Peg3* (régulant *Usp29* et *Peg3*). La co-injection d’une 6KO-ahESC et d’un spermatozoïde WT (souris mâle 129S2/SvPasCrl) dans un ovocyte en M2 énucléé (dont on a retiré la métaphase) permet d’obtenir 1 144 embryons bipaternels qui, après transfert, ne survivent pas au-delà de 8,5 jours de gestation. Une stratégie alternative est alors développée. Au lieu d’utiliser des ahESC, le groupe va dériver des ESC androgénétiques diploïdes (adESC)⁸ ayant subi les six délétions précitées (6KO-adESC) et porteuses de la fluorescence verte GFP et de la fluorescence rouge RFP (pour *red fluorescent protein*) apportée par le spermatozoïde ayant servi à la création des blastocystes

diploïdes androgénétiques à l’origine de ces lignées. La technique de complémentation d’embryons tétraploïdes⁹ est alors utilisée et dix à quinze 6KO-adESC sont injectées dans 1 023 blastocystes tétraploïdes qui sont transférés chez des femelles CD1 pseudo-gestantes. Les auteurs s’étonnent eux-mêmes d’obtenir douze nouveau-nés à terme, avec cependant une très faible efficacité (1,2 %) et une survie de quelques heures seulement. Ils décèdent dans un tableau de détresse respiratoire et présentent de nombreuses anomalies : macrosomie sévère avec œdème et poids de naissance deux fois supérieur à celui des souris témoins WT ($2,45 \pm 0,09$ g versus $1,12 \pm 0,03$ g), macroglossie, paupières non closes et syndrome de l’intestin perméable.

Amélioration des anomalies présentées par les souris bipaternelles grâce à la délétion de la région d’empreinte Gnas : les souris 7KO bipaternelles

Les souris 6KO présentent une hypométhylation de la région d’empreinte *Gnas* et, en conséquence, une expression réduite du gène *Gnas*, que cette ICR contrôle [14], par rapport aux souris WT. Li *et al.* décident donc de déléter une région supplémentaire, l’exon1A de la région d’empreinte *Gnas*, dans des 6KO-ahESC et, suivant la même procédure, obtiennent des 7KO-adESC. L’injection de 7KO-adESC dans 477 blastocystes tétraploïdes, suivie de leur transfert dans des femelles porteuses, aboutit à la naissance de douze souriceaux bipaternels viables à terme (2,5 %) dont deux survivent plus de 48 h mais n’atteignent pas l’âge adulte. Surtout, les défauts phénoty-

⁷Voir note 3.

⁸Voir note 3.

⁹**Complémentation d’embryons tétraploïdes.** Des embryons tétraploïdes sont créés par électrofusion d’un embryon diploïde (2n) au stade 2 cellules. La fusion des blastomères entraîne la formation d’un embryon tétraploïde (4n) qui est cultivé jusqu’au stade blastocyste. La tétraploïdie compromettant le développement des tissus intra-embryonnaires issus de la masse cellulaire interne, les cellules 4n qui se divisent ne sont capables de produire que des cellules extraembryonnaires formant le placenta et les annexes. Dix à quinze adESC sont injectées dans chaque blastocyste tétraploïde avant son transfert dans une femelle pseudo-gestante. L’embryon issu de cette reconstruction complexe sera entièrement issu des cellules adESC diploïdes injectées dans le blastocyste tétraploïde.

priques observés chez les sujets 6K0-adESC, sont nettement améliorés : réduction des poids corporel et placentaire ainsi que des autres anomalies phénotypiques – lesquelles ne sont cependant pas totalement corrigées, en particulier l'hépatomégalie. Si la méthylation globale du génome des souris 7KO-bipaternelles, analysée par RRBS (pour *reduced presentation bisulfite sequencing*), est voisine de celle des souris WT, beaucoup des régions d'empreinte sont hypométhylées, traduisant l'absence d'empreinte héritée de la mère. Dans le tissu cérébral, si la plupart des gènes soumis à empreinte sont correctement exprimés, y compris *Gnas*, comme le montrent les analyses transcriptomiques, certains gènes le sont anormalement, comme *Cdkn1*, *Sgce*, *Plagl1*, *Zim1*, *Calcr* et *Asb4*.

Les auteurs concluent de cette dernière expérience qu'il est donc également possible de dépasser la barrière à la reproduction bipaternelle chez les mammifères. On ne peut partager que partiellement leur enthousiasme. La démonstration est, en effet, moins concluante que pour les souris bipaternelles, puisque l'efficacité est faible, que les individus obtenus sont porteurs d'anomalies et qu'aucun d'entre eux n'a pu se développer jusqu'à l'âge adulte. Tous les mécanismes d'empreinte qui s'opposent à la reproduction bipaternelle n'ont donc pas encore été élucidés.

Discussion et conclusion

Le groupe de Zhi-Kun Li a donc bien réussi à franchir, chez la souris, la barrière à la reproduction uniparentale des mammifères, grâce à deux artifices modifiant l'empreinte parentale : d'une part l'utilisation d'hESC hypométhylées, comme le sont les cellules germinales primordiales après l'effacement des empreintes maternelles ou paternelles, d'autre part en réalisant des délétions ciblées de certains centres d'empreinte

grâce à la technique CRISPR/Cas9. Cependant, ces succès sont souvent obtenus par la méthode essai-erreur, et les auteurs eux-mêmes reconnaissent que beaucoup des obstacles à la reproduction uniparentale, ainsi que la connaissance de ses mécanismes moléculaires, restent à découvrir.

Ainsi, dans l'embryon bimaternel et ses vingt paires de chromosomes, les allèles issus de l'ovocyte en métaphase 2 portent bien toutes les empreintes maternelles, et, si certaines régions d'empreinte sont délétées sur l'autre allèle provenant des pHESC, toutes ne le sont pas. Or, on sait que les disomies uniparentales de sept chromosomes ou de onze segments entraînent létalité ou anomalies embryonnaires majeures [4, 15]. C'est d'ailleurs ce que l'on observe chez les souris 2KO bimaternelles. Pourtant, une seule délétion supplémentaire, dans les souris 3KO, va permettre le succès. Pourquoi ? Les auteurs émettent l'hypothèse que c'est l'effacement de l'empreinte obtenue dans les pHESC qui empêche la survenue des anomalies, à condition que les centres d'empreinte les plus importants pour le contrôle du développement embryonnaire aient été inactivés. Le même mécanisme est sans doute à l'œuvre dans les embryons bipaternels qui ont été reconstitués à partir d'un spermatozoïde porteur des empreintes paternelles intactes et de cellules souches embryonnaires haploïdes androgénétiques hypométhylées.

Pour étayer leur hypothèse, ils s'appuient sur l'analyse du travail de l'équipe de Kono [8], qui a été la première à réussir la reproduction bipaternelle chez la souris *H19KO*, mais avec une très faible efficacité. L'absence de délétion du centre d'empreinte du locus *Dlk1-Gtl2* (IG-DMR), normalement méthylé sur le génome paternel et indispensable au développement embryonnaire, en est certainement

la cause. Comment expliquer alors qu'il y ait eu une souris vivante ? Zhi-Kun Li suggère que certains ovocytes immatures, ayant servi à la reconstitution des zygotes bimaternels conformément à la procédure de ce groupe, devaient avoir maintenu ou réapposé l'empreinte de l'IG-DMR. Cette explication permet à Li de plaider fortement pour leur propre technologie basée sur l'emploi des pHESC dont l'empreinte est effacée dès le vingtième passage (*early-passage ESC*), ce qui en fait un outil plus homogène et plus fiable que l'ovocyte immature pour l'étude du rôle de l'empreinte parentale dans le développement. La complexité des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'empreinte parentale ne fait aucun doute et le présent travail même s'il n'apporte pas toutes les réponses aura contribué à étayer certaines hypothèses, comme celle envisagée à propos de la régulation du gène *Rasgrf1*. D'après Yoon *et al.* [16], cette régulation devait s'apparenter à celle du gène *H19* [17, 18] et passer par l'action de la protéine isolante CTCF¹⁰ (pour *CCCTC-binding factor*), qui, fixée sur la DMR non méthylée de l'allèle maternel, empêche l'expression du gène *Rasgrf1*. La délétion de cette DMR permettrait à nouveau une expression normale. C'est effectivement ce que l'on observe *in vivo* dans les souris 3KO.

Li *et al.* demeurent cependant prudents et rappellent que de nouveaux mécanismes de régulation de l'empreinte, indépendants d'une méthylation de l'ADN, sont actuellement décrits, en particulier dans le placenta [19, 20]. Ainsi l'histone-méthyl transférase H3K27me3 [*H3 lysine 27 triméthylation*] pourrait réguler l'empreinte, chez la souris, en éteignant les promoteurs de gènes d'empreinte sur l'ADN hypométhylé. Présente dans l'embryon préimplantatoire, elle se diluerait

¹⁰Voir note 5.

dans le bouton embryonnaire, serait effacée de l'épiblaste dès 6,5 jours mais serait maintenue jusqu'à 9,5 jours pour certains gènes placentaires. Les auteurs rapprochent ce mécanisme de la nécessité, pour obtenir le développement de souris bipaternelles, de passer par la complémentation tétraploïde, c'est-à-dire le support d'un placenta hôte fonctionnel. Cette constatation semble bien valider le rôle crucial que joue la régulation de l'empreinte placentaire par H3K27me3 dans le développement embryonnaire [20].

Enfin, le travail réalisé par Li *et al.* apporte par ailleurs des arguments à la théorie du « conflit parental pour les ressources », développée par Wilkins et Haig [7], puisque l'observation des phénotypes des souris uniparentales confirme que la taille de l'individu et de ses organes augmente en présence de deux génomes paternels et diminue en présence de deux génomes maternels.

Les auteurs concluent leur article en rappelant que des hESC ont été générées avec succès chez d'autres espèces, y compris le singe [21] et l'homme [22], ce qui n'a pas manqué et ne manquera pas de susciter

des débats éthiques sur la finalité et l'utilisation de ces travaux. Sur le plan scientifique, malgré l'absence d'une complète maîtrise technique, surtout pour l'obtention de souris bipaternelles normales et viables, l'équipe de Li offre la possibilité, en le transgressant avec un relatif succès, de progresser dans la compréhension de cet ingénieux mécanisme de l'empreinte parentale qui oblige les mammifères à la reproduction sexuée.

Liens d'intérêt

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Li ZK, Wang LY, Wang LB *et al.* Generation of bimaternal and bipaternal mice from hypomethylated haploid ESC with imprinting region deletions. *Cell Stem Cell* 2018; 23: 1-12.

1. Neaves WB and Baumann P. *Trends Genet* 2011; 27: 81-8.
2. Surani MAH *et al.* *Nature* 1984; 308: 548-50.
3. McGrath J and Solter D. *Cell* 1984; 37: 179-83.
4. Cattanach BM and Kirk M. *Nature* 1985; 315:496-8.
5. Bartolomei MS and Ferguson-Smith AC. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(7). pii a002592

6. Constancia M *et al.* *Nature* 2004; 432: 53-7.
7. Wilkins JF and Haig D. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 359-68.
8. Kono T *et al.* *Nature* 2004; 428: 860-4.
9. Corley-Smith GE *et al.* *Genetics* 1996; 142: 1265-76.
10. Leeb M and Wutz A. *Nature* 2011; 479: 131-4.
11. Li W *et al.* *Nature* 2012; 490: 407-11.
12. Li Z *et al.* *Cell Res* 2016; 26: 135-8.
13. Barton SC *et al.* *Nature* 1984; 311: 374-6.
14. Weinstein *et al.* *Endocrinology* 2004; 145: 5459-64.
15. Searle AG and Beechey. *Cytogenet Cell Genet* 1978; 20: 282-303.
16. Yoon B *et al.* *Mol Cell Biol* 2005; 25: 11184-90.
17. Hark AT *et al.* *Nature* 2000; 405: 486-9.
18. Kurukuti S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 10684-9.
19. Lewis A *et al.* *Nat Genet* 2004; 36: 1291-5.
20. Inoue A *et al.* *Nature* 2017; 547: 419-24.
21. Yang H *et al.* *Cell Res* 2013; 23: 1187-200.
22. Sagi I *et al.* *Nature* 2016; 532: 107-11.
23. Gabori A and Dandolo L. *Medecine/Sciences* 2005; 21: 390-5.

Glossaire

Gène *Dlk1* : *Delta-like homolog 1*
 Gène *Gtl2* : *Gene-trap locus2*
 Gène *Rasgrf1* : *Ras protein-specific guanine nucleotidic-releasing factor 1*
 Gène *Igf2* : *Insulin-like growth factor-2*
 Gène *Igf1* : *Insulin-like growth factor 1*
 Gène *Th* : *Thyrosine-hydroxylase*
 Gène *Xlr3b* : *X-linked lymphocyte-regulated 3b*
 Gène *Nespas* : *Neuroendocrine secretory protein antisense*
 Gène *Grb10* : *Growth factor receptor bound protein 10*
 Gène *Cobl* : *Cordon-bleu WH2 repeat protein*
 Gène *Igf2r* : *Insulin-like growth factor 2 receptor*
 Gène *Airn* : *Antisense Igf2r RNA*
 Gène *Snrpn* : *Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*

Gène *Snurf* : *Snrpn upstream reading frame*
 Gène *Kcnq1* : *Potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1*
 Gène *Cdkn1c* : *Cyclin dependent kinase inhibitor 1C*
 Gène *Peg3* : *Paternally expressed 3*
 Gène *USP29* : *Ubiquitine-specific peptidase 29*
 Gène *Gnas* : *Gnas [guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating] complex locus sarcoglycan epsilon*
 Gène *Sgce* : *Plag1 [pleiomorphic adenoma gene-like 1] like zinc finger 1*
 Gène *Plag1* : *Plag1 [pleiomorphic adenoma gene-like 1] like zinc finger 1*
 Gène *Zim-1* : *Zinc finger in meiosis*
 Gène *Calcr* : *Calcitonin receptor*
 Gène *ASb4* : *Ankyrin repeat and SOCS [suppressor of cytokine signaling] box containing 4*