

Etablissement de l’empreinte parentale dans la lignée germinale. Conséquences pour la prise en charge en AMP

A. KERJEAN^{1,2}; M. JEANPIERRE³; P. JOUANNET², A. PÀLDI⁴

¹INSERM GDPM, Département de Génétique et de Pathologie Moléculaire, Institut Cochin de Génétique Moléculaire (ICGM), Centre Hospitalier Universitaire-Cochin

²Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Université Paris V - Hôpital Cochin-Port-Royal, Pavillon Cassini

³Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, Hôpital Cochin-Port-Royal, Pavillon Cassini.

⁴ Institut Jacques Monod, Paris

RÉSUMÉ

L’empreinte parentale est un marquage épigénétique des allèles parentaux et se manifeste par une expression monoallélique de certains gènes dits gènes soumis à empreinte. Le marquage épigénétique des allèles d’un gène soumis à l’empreinte diffère en fonction de l’origine parentale de l’allèle. Ces modifications épigénétiques parents-spécifiques sont nécessaires au développement normal de l’embryon. Elles surviennent dans la lignée germinale et sont transmises par les gamètes. Pour que l’empreinte soit établie selon le sexe de l’individu, le marquage gamétique-spécifique (épigénotype gamétique) doit être réversible et effaçable. L’effacement des modifications épigénétiques survient dans les cellules germinales primordiales (PGCs). Après cette étape d’effacement, une nouvelle empreinte parentale sexe-spécifique est établie dans les lignées germinales mâles et femelles.

Aussi, parmi les nombreuses questions posées par l’utilisation de gamètes immatures lors de tentatives d’assistance médicale à la procréation (AMP), la question de l’utilisation de gamètes “épigénétiquement immatures” est primordiale. En particulier, les conséquences épigénétiques à long terme pour le fœtus de l’utilisation de gamètes épigénétiquement immatures ne sont pas connues.

Mots clés : Empreinte parentale, gamétogénèse, AMP.

I. INTRODUCTION

L’empreinte parentale est la conséquence d’un marquage épigénétique* des allèles* parentaux et se manifeste par une expression monoallélique* de certains gènes dits gènes soumis à empreinte. Il y a plus de 45 gènes soumis à empreinte identifiés à ce jour (Tableau 1) [23, 91]. L’une des caractéristiques des gènes soumis à l’empreinte est leur expression monoallélique qui est dépendante de l’origine parentale des allèles. La transmission d’allèles actifs ou réprimés implique des modifications épigénétiques parents-spécifiques qui sont nécessaires au développement normal de l’embryon. Par définition, ces manifestations épigénétiques modifient le phénotype sans modifier le génotype. Elles surviennent dans la lignée germinale et sont transmises par les gamètes [81]. Pour que l’empreinte soit établie selon le sexe de l’individu, le marquage gamétique-spécifique (épigénotype gamétique) doit être réversible et effaçable. L’effacement des modifications épigénétiques survient dans les cellules germinales primordiales (PGCs). Après cette étape d’effacement, une nouvelle empreinte parentale sexe-spécifique est établie dans les lignées germinales mâles et femelles.

Correspondance :

Antoine Kerjean. INSERM GDPM, Département de Génétique et de Pathologie Moléculaire, Institut Cochin de Génétique Moléculaire (ICGM), Centre Hospitalier Universitaire-Cochin, 24 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris

Communication au XVIII^e Congrès de la Société d’Andrologie de Langue Française, Montpellier, 13-15 décembre 2001. Les termes marqués par un * sont expliqués dans le Glossaire en fin d’article.

Tableau 1 : Listes des principaux gènes soumis à empreinte chez l'homme et la souris

Gènes	Homme Localisation	Allèle exprimé	Gènes	Localisation	Souris Allèle exprimé
NOEY2	1p31	Paternel			
p73	1p36	Maternel			
U2AFBPL	5q22-q31	Biallélique			
MAS1	6q25.3-q26	Biallélique/ Mono-allélique sein	U2afbp-rs	11 Proximal	Paternel
M6P/ IGF2R	6q26-q27	Biallélique/ Maternel	Mas M6p/Igf2r Igf2r-AS	17 Proximal 17 Proximal 17 Proximal	Paternel Maternel Paternel
GRB10	7p11.2-12	NC	Meg1/Grb10	11 Proximal	Maternel
PEG1/MEST	7q32	Paternel	Peg1/Mest	6 Proximal	Paternel
WT1	11p13	Biallélique/ Maternel*	Wt1	2	NC
WT1-AS	11p13	Maternel	Mash2	7 Distal	Maternel
ASCL2/ HASH2	11p15.5	Maternel	H19	7 Distal	Maternel
H19	11p15.5	Maternel	Igf2	7 Distal	Paternel
IGF2	11p15.5	Paternel	Igf2-AS	7 Distal	Paternel
IMPT1/ ORCTL2/ TSSC5	11p15.5	Maternel	Impt1	7 Distal	Maternel
INS	11p15.5	Paternel	Ins2	7 Distal	Paternel
IPL/TSSC3/B WR1C	11p15.5	Maternel	Ipl	7 Distal	Maternel
ITM	11p15.5	NC	Itm	7 Distal	Maternel
KvLQT1	11p15.5	Maternel	Kvlqt1	7 Distal	Maternel
p57 KIP2 /CDKN1C	11p15.5	Maternel	p57 KIP2	7 Distal	Maternel
TAPA1	11p15.5	Biallélique	Tapal	7 Distal	Maternel?
HTR2A	13q14	Biallélique/ Maternel	Htr2	14, Bande D3	Maternel
FNZ127	15q11-q13	Paternel			
GABRA5	15q11-q13	Paternel?	Gabra5	7 Central	Biallélique
GABRB3	15q11-q13	Paternel?	Gabrb3	7 Central	Biallélique
GABRG3	15q11-q13	Paternel?	Gabrg3	7 Central	Biallélique
IPW	15q11-q13	Paternel	Ipw	7 Central	Paternel
NDN (necdin)	15q11-q13	Paternel	Ndn	7 Central	Paternel
PAR1	15q11-q13	Paternel			
PAR5	15q11-q13	Paternel			
PAR-SN	15q11-q13	Paternel			
SNRPN	15q11-q13	Paternel	Snrpn	7 Central	Paternel
UBE3A	15q11-q13	Maternel	Ube3a	7 Central	Maternel
ZNF127	15q11-q13	Paternel	Zfp127	7 Central	Paternel
PEG3	19q13.4	Paternel	Peg3/Apoc2	7 Proximal	Paternel
Neuronatin	20q11.2-q12	NC	Peg5/Nnat	2 Distal	Paternel
GNAS1	20q13	Paternel	Gnas1	2 Distal	Maternel/ Paternel
XIST	Xq13.2	Paternel?	Xist Grf1/Cdc25 Mm Impact Ins1	Xic 9 Distal 18 Proximal 19 Distal	Paternel Paternel Paternel Paternel

Les mécanismes à l'origine de ce marquage épigénétique sont mal connus. La méthylation* des cytosines de dinucléotides CpGs est une des hypothèses vraisemblable [9]. La méthylation de l'ADN est conservée de façon stable au cours de la réplication mitotique et réversible dans la lignée germinale. Des régions de méthylation allèle-spécifiques* (DMRs, differential methylation regions) sont retrouvées dans les gènes soumis à empreinte. La méthylation allèle-spécifique pourrait participer à l'établissement et au maintien de l'état actif ou réprimé d'un gène [31]. L'allèle méthylé est silencieux pour la plupart des gènes. Cependant, dans d'autres gènes, c'est la situation inverse qui est observée. Ceci suggère l'existence d'autres mécanismes intervenant dans l'expression de ces gènes. Par exemple, des éléments transactivateurs et agissant en *cis** (*cis*-acting genetic element) sont impliqués dans la régulation des gènes soumis à empreinte dans de larges domaines chromatinien [71]. Certains de ces éléments jouent un rôle critique dans l'établissement et la propagation de l'empreinte dans la lignée germinale.

II. IDENTIFICATION D'ÉLÉMENTS CONTRÔLANT L'EMPREINTE

La complexité des mécanismes régulant les gènes soumis à empreinte est en particulier liée au fait que beaucoup de gènes soumis à empreinte sont regroupés en domaines chromosomiques. Ces régions chromosomiques impliquent des interactions en *cis* voire en *trans** entre les gènes et leurs séquences contrôles [25, 64]. Les gènes soumis à empreintes utilisent les mécanismes de transcription classiques, mais certains de ces mécanismes sont contrôlés par des modifications épigénétiques différentielles des chromosomes parentaux. Différents types de régulation sont décrits et impliquent des modifications épigénétiques au niveau de séquences promotrices, de répresseurs transcriptionnels*, d'insulateurs chromatinien* et de transcrits anti-sens (Figure 1).

La complexité de ces mécanismes de régulation renforce l'idée que différents éléments interagissent pour réguler l'expression de gènes soumis à empreinte dans des régions chromosomiques elles-mêmes soumises à l'empreinte. L'existence de centres d'empreinte (IC, Imprinting Center) a été proposée à partir d'analyses moléculaires de maladies génétiques impliquant des gènes soumis à empreinte, ainsi que d'expériences de KO* chez la souris [14, 46, 68, 101]. Dans la région soumise à l'empreinte du chromosome 15 humain, de petites délétions ont été décrites chez des patients présentant un syndrome de Prader-Willi (PWS). Ces délétions intéressent la région promotrice de *SNRPN* (Small Nuclear Ribonucleoprotein-associated Polypeptide N). A quelques kilobases, des délétions ont été décrites chez les patients présentant le syndrome d'Angelman (AS)

(Figure 1.c). PWS requiert une transmission paternelle de la délétion, alors que AS requiert une transmission maternelle. Les délétions altèrent l'expression et la méthylation de nombreux gènes soumis à empreinte de la région, bien que ces gènes soient séparés de plusieurs mégabases [14]. Ceci définit l'extension de l'épigénotype. La transmission paternelle d'une délétion responsable de PWS est associée à la répression transcriptionnelle et à la méthylation des gènes soumis à une empreinte paternelle normalement exprimés de la région. A l'inverse, la transmission maternelle d'une délétion responsable de AS, est associée à la réexpression et à la déméthylation de gènes soumis à une empreinte maternelle normalement réprimée. Ceci est aussi vrai dans un modèle de souris KO pour la délétion PWS. Un modèle a été proposé pour expliquer comment la délétion de l'IC abolit le changement régional de l'épigénotype dans la lignée germinale [14]. Ainsi, dans la lignée germinale mâle, le chromosome délété qui est hérité de la grand-mère ne peut être déméthylé, et reste dans un épigénotype maternel. Cependant, aucune preuve directe n'a montré qu'un chromosome délété ne puisse changer son épigénotype (d'un statut méthylé à un statut non méthylé). Après la fécondation, Bielinska et al. (2000) ont proposé que cet IC soit important pour le maintien de l'épigénotype [11]. L'étude de la méthylation des cellules germinales de parents de patients PWS et AS, et l'étude des modèles de souris appropriés, sont nécessaires afin de répondre à cette question importante.

III. MODIFICATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES DU SIGNAL D'EMPREINTE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT CHEZ LES MAMMIFÈRES

L'empreinte parentale subit des modifications épigénétiques caractéristiques au cours de la vie d'un organisme (Figure 2). L'empreinte est transmise par les gamètes mâles et femelles. Après la fécondation, l'empreinte est maintenue au cours des divisions cellulaires et du développement de l'organisme. Dans les cellules germinales du nouvel organisme, l'empreinte doit être effacée à un stade précoce afin que chaque allèle puisse porter le marquage correspondant au sexe de l'individu (marquage maternel dans les ovocytes; marquage paternel dans les spermatozoïdes). Cette étape d'effacement est suivie par le rétablissement de l'empreinte à un stade plus tardif du développement des cellules germinales, venant ainsi compléter le cycle de l'empreinte. Ces modifications s'intègrent dans des remaniements plus globaux de la chromatine des génomes parentaux. En effet, la reprogrammation du génome qui survient au cours de la différenciation des cellules germinales primordiales en gamètes matures, établit une configuration chromatiniennne différente entre le sperme et l'ovocyte. Au cours de la spermatogénèse, la chromatine est remodelée de

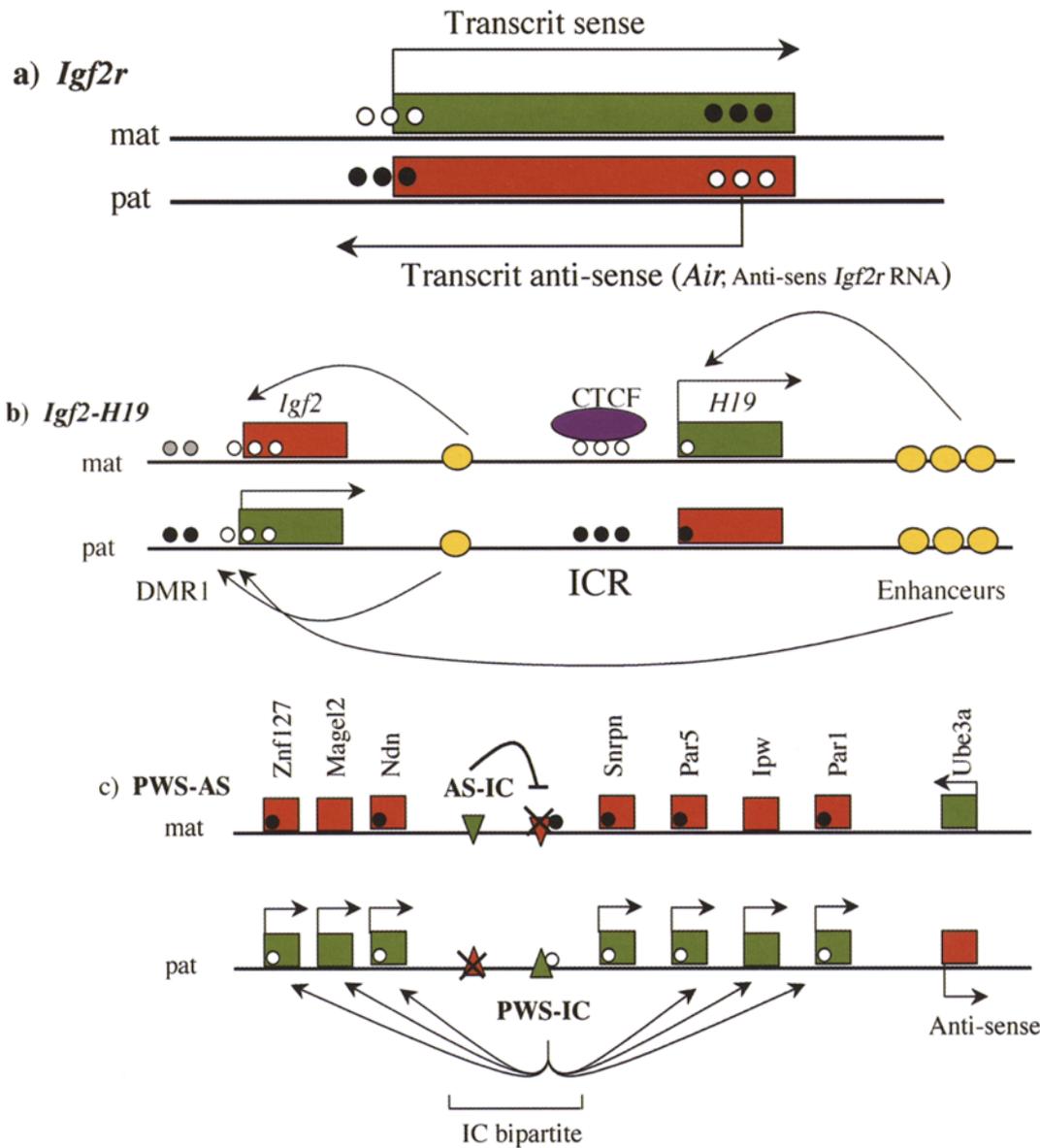


Figure 1 : Représentation schématique de régulation épigénétique de trois loci soumis à empreinte. (D'après Ferguson-Smith et Surani, 2001) [25] a) Le locus *Igf2r* contient un seul gène soumis à empreinte régulé par un transcrit anti-sens (*Air*). *Air* est lui-même régulé par une méthylation différentielle acquise dans la lignée germinale et située dans un intron. b) Le locus *Igf2-H19* contient deux gènes soumis à une empreinte opposée et dont la régulation est coordonnée par l'ICR (Imprinting Control Region) intergénique. Lorsque l'ICR fixe le CTCF (CCCTC-binding factor) sur l'allèle non méthylé, elle se comporte comme un insulateur chromatinien* et empêche l'action d'un enhanceur* endodermique commun sur le promoteur fœtal de *Igf2*. Dans les tissus mésodermiques, des silenceurs* tissus spécifiques tels que la DMR1 (Differential Methylated Region) de *Igf2* jouent un rôle dans la régulation de *Igf2*. Les enhanceurs mésodermiques ne sont pas encore caractérisés. Des enhanceurs tissus-spécifiques en 3' de l'insulateur, régulent la transcription biallélique* de *Igf2* dans une partie du cerveau. c) Deux maladies génétiques PWS-AS cliniquement distinctes, sont associées à une région soumise à l'empreinte en 15q11-q13. Ces deux syndromes associent des anomalies du développement sexuel, de la croissance, des troubles du comportement ainsi qu'un retard mental. Pour le PWS, les différences diagnostiques majeures portent sur l'existence d'une hypotonie, une hyperphagie, une obésité, un hypogonadisme et un retard de développement. Les patients AS se différencient par une ataxie, des mouvements anormaux, des anomalies du sommeil et une hyperactivité. Les individus AS sont le plus souvent gais avec des accès de rire et ont un retard mental sévère accompagné d'une absence de parole. Trois types d'anomalies conduisent à l'absence d'expression des gènes impliqués dans le PWS (Prader Willi Syndrome) et AS (Angelman Syndrome): les microdélétions cytogénétiques (70% des cas), les disomies uniparentales maternelles pour PWS (28%) ou paternelles pour AS (5%), des mutations du centre d'empreinte (< 2%). Des anomalies de l'empreinte issues de microdélétion du gène *SNRPN* ont été identifiées chez un petit pourcentage de patients PWS. Ces délétions altèrent la méthylation du promoteur de *SNRPN* et empêchent l'expression de son allèle paternel. Ceci résulte dans la répression transcriptionnelle d'autres gènes soumis à empreinte exprimés par l'allèle paternel dans la région chromosomique. Ces microdélétions touchent manifestement un centre d'empreinte (IC, Imprinting Center) impliqué dans l'établissement de l'épigénotype au cours de la gamétogénèse. Les enfants qui héritent de la microdélétion de leur mère ne montrent apparemment pas de phénotype, seule, une transmission paternelle résulte en PWS. De même, un petit pourcentage de patients AS ont des microdélétions similaires dans le gène *SNRPN* (dans une région différente) qui empêchent l'effacement de l'épigénotype. Dans ce cas, l'enfant qui hérite de la microdélétion de son père, n'est pas atteint, mais il l'est lorsqu'il l'hérite de sa mère. Les régions minimales de délétion responsable du PWS et AS sont distinctes, ce qui suggère l'existence d'un centre d'empreinte avec une structure bipartite.

mat: allèle maternel, pat: allèle paternel, (●) ilôt CpG méthylé, (○) ilôt CpG non méthylé,

■ allèle non exprimé, □ allèle exprimé.

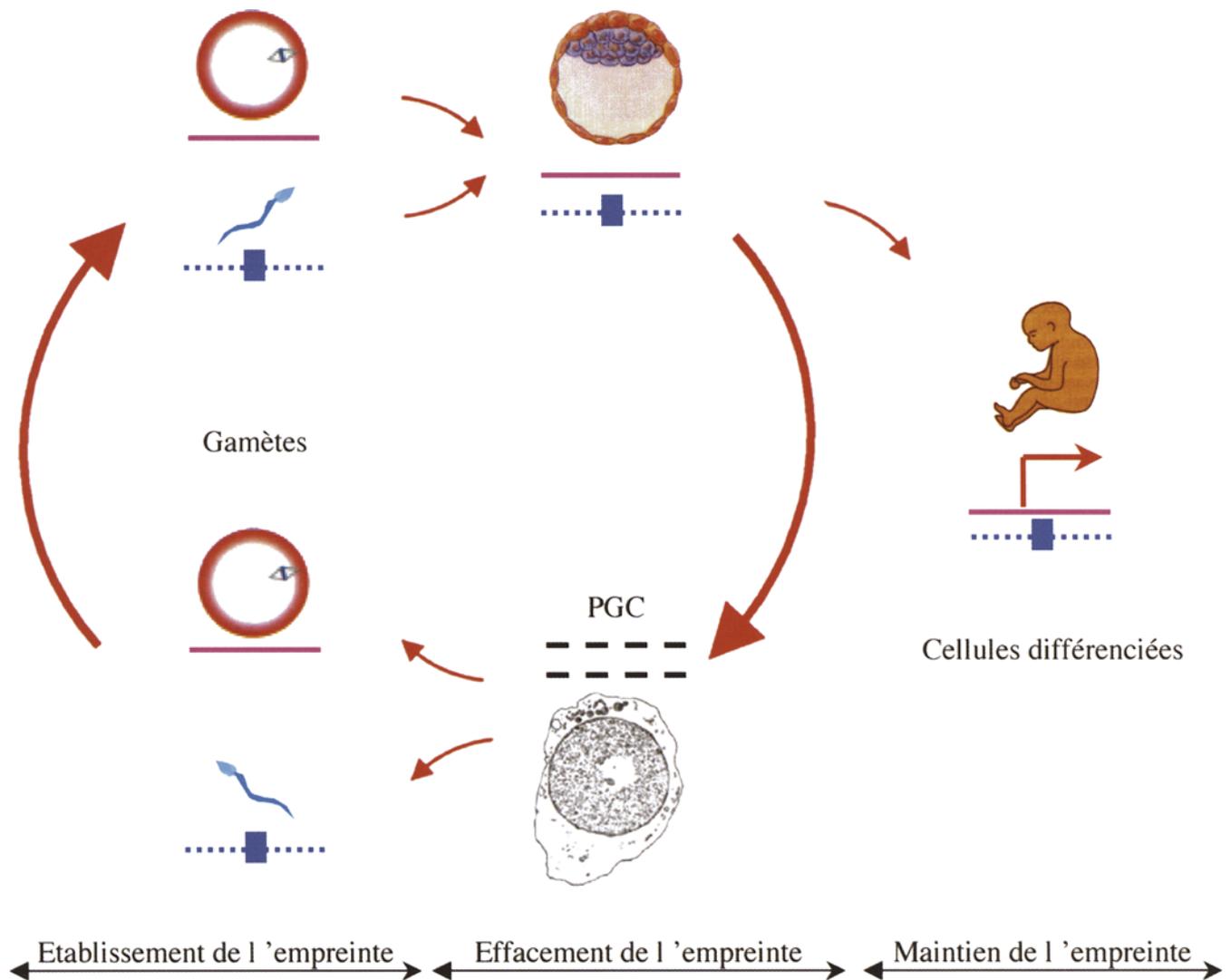


Figure 2 : Modifications de l'épigénotype et du marquage allélique au cours du cycle de la vie L'une des caractéristiques des gènes soumis à l'empreinte est leur expression monoallélique qui est dépendante de l'origine parentale des allèles. La transmission d'allèles actifs ou réprimés implique des modifications épigénétiques parents-spécifiques qui sont nécessaires au développement normal de l'embryon. Elles surviennent dans la lignée germinale et sont transmises par les gamètes . Pour que l'empreinte soit établie selon le sexe de l'individu, le marquage gamétique-spécifique (épigénotype gamétique) doit être réversible et effaçable. L'effacement des modifications épigénétiques survient dans les cellules germinales primordiales (PGCs). Après cette étape d'effacement, une nouvelle empreinte parentale sexe-spécifique est établie dans les lignées germinales mâles et femelles.

façon séquentielle et finalement compactée par les protamines [80], processus essentiel pour la fécondation normale. Ce processus n'est pas strictement requis pour le développement, car des grossesses normales peuvent être obtenues par microinjection intra-cytoplasmique de spermatides rondes et de spermatocytes secondaires [42, 43]. Au contraire, le génome des ovocytes a une structure chromatinienne plus comparable à celle de cellule somatique. La chromatine ovocytaire contient une histone H100 spécifique des ovocytes [84]. Après la fécondation, le pronucleus femelle est transcriptionnellement plus inactif que le pronucleus mâle [4, 29, 98]. Globalement le pronucleus femelle est dans un état de répression transcriptionnelle. Il est riche en histones H4 déacétylées [1] et est globalement déficient en facteurs de transcriptions tel que Sp1 [67]. Cette structu-

re chromatinienne spécifique doit le protéger contre les modifications épigénétiques extensives imposées au génome paternel après la fécondation.

On peut cependant noter, comme le montrent les embryons uniparentaux, que la configuration chromatinienne acquise au cours de la gamétogénèse n'est pas indispensable pour le développement pré-implantatoire, mais pour le développement post-implantatoire. Les embryons uniparentaux parthénogénétiques ou androgénétiques ont un développement pré-implantatoire normal, malgré de profondes différences épigénétiques dans leur organisation chromatinienne [51].

1. Effacement de l'empreinte parentale

La lignée germinale a le rôle d'établir l'empreinte parenta-

le selon le sexe de l'individu de telle sorte que les gamètes matures transmettent l'épigénotype parental. Les données actuelles suggèrent que l'établissement de l'empreinte gamétique est précédé d'un effacement initial de l'empreinte sur les deux allèles parentaux. L'effacement de l'empreinte surviendrait dans les cellules germinales des deux sexes au moment de la déméthylation globale du génome à J12-J13 chez la souris [13, 82]. Lorsqu'elles sont fusionnées avec les cellules somatiques, les cellules germinales en culture ont une activité de déméthylation dominante sur ces dernières [82]. Les modifications du potentiel de développement et des profils d'expression des gènes soumis à empreinte sont en faveur de la déméthylation du génome [36, 44, 58]. En effet, l'expression de gènes soumis à empreinte dans les embryons reconstruits par transfert de noyaux de cellules germinales à J13,5 reflète l'effet d'une perte de méthylation des gènes. En particulier, *H19* est exprimé et *Igf2* ne l'est pas. Il est intéressant de noter que la perte de la réplication asynchrone de l'ADN coïncide avec cette vague de déméthylation dans la lignée femelle, alors qu'elle survient plus tardivement dans la lignée germinale mâle après la puberté [76].

2. Etablissement de l'empreinte parentale

Après effacement, l'empreinte gamétique est spécifiquement rétablie dans les deux lignées germinales, à un stade plus tardif après la naissance [13, 33, 69, 70]. Dans les ovocytes, le rétablissement de l'empreinte survient au cours de la croissance de l'ovocyte bloqué en prophase de métaphase I [8, 58]. Des expériences de transfert nucléaire à partir d'ovocytes, indiquent que l'acquisition d'une empreinte fonctionnelle coïncide avec la vague de méthylation à la fois des gènes autosomiques et des gènes du chromosome X soumis à l'empreinte [58, 83]. Durant la spermatogénèse, la méthylation gamétique survient avant la reprise de la méiose [16, 17, 94] chez la souris et chez l'homme [37]. L'enzyme responsable de la méthylation *de novo* dans les cellules germinales n'est pas connue. L'ADN méthyl-transférase 3L (Dnmt3L) est actuellement le candidat pour l'établissement de l'empreinte au cours de l'ovogénèse [12]. Dnmt1 qui possède des transcrits spécifiques dans les deux lignées germinales est aussi un bon candidat [52]. Il est cependant possible que les Dnmt3a et Dnmt3b, qui sont requis pour la méthylation *de novo* dans les embryons post-implantatoires [63], puissent jouer un rôle dans les cellules germinales. La méthylation spécifique de l'empreinte gamétique survient dans les DMRs généralement riches en CpG et souvent considérées comme des îlots CpG. Cependant, les îlots CpG des gènes autosomiques non soumis à l'empreinte ne subissent pas la méthylation *de novo* au cours de la gamétogénèse. Il est donc possible que les DMRs aient des caractéristiques génétiques et/ou épigénétiques qui permettent à la méthylation *de novo* de survenir.

Le mécanisme à l'origine de la méthylation *de novo* différentielle des DMRs entre les deux lignées germinales n'est pas connu [38, 69, 81]. Une première hypothèse serait que les Dnmt ciblent spécifiquement les DMR aboutissant à une méthylation *de novo* dans l'une des lignées germinales. En faveur de cette hypothèse, Bourc'his et al. (2001) ont récemment impliqué la Dnmt3L comme la méthyl-transférase impliquée dans le complexe d'initiation de l'empreinte maternelle au cours de l'ovogénèse chez la souris adulte [12]. Des séquences répétées ainsi que des éléments LINE-1 qui flanquent fréquemment les DMRs [22, 57], pourraient créer une hétérochromatinisation de région chromatiniennne qui favorisent le ciblage des Dnmt [20]. En effet, des hétérochromatinisations locales peuvent provoquer la méthylation de CpG de DMR à proximité. Par ailleurs, une des caractéristiques de ces régions soumises à l'empreinte est leur asynchronie de réplication de l'ADN en phase S. Dans la lignée germinale mâle, la perte de cette propriété précède l'acquisition de la méthylation *de novo* [76]. Il est donc possible que ces modifications de réplication favorisent l'accessibilité de l'ADN à la machinerie de méthylation. Une autre hypothèse serait qu'il y ait une méthylation *de novo* globale du génome dans les deux lignées germinales et que les DMRs soient spécifiquement protégées de cette méthylation dans l'une mais pas dans l'autre des lignées germinales. Des facteurs qui reconnaissent les DMRs pourraient être impliqués et seraient spécifiques des lignées germinales. L'existence de tels facteurs est suspectée par l'observation que les déficits en Dnmt1 entraînent des pertes de l'empreinte post-zygotique et que l'empreinte ne peut être restaurée par les Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b ou Dnmt3L en dehors du contexte de la gamétogénèse [92]. Enfin, des études récentes suggèrent que l'empreinte n'est que partiellement établie dans la lignée germinale et qu'elle n'est complètement acquise qu'au moment la fécondation ou après [11, 21, 48].

IV. IMPLICATIONS DE L'EMPREINTE PARENTALE EN ASSISTANCE MÉDICALE À LA PROCRÉATION (AMP)

Les gènes soumis à l'empreinte sont impliqués dans le développement fœtal, placentaire, la prolifération cellulaire et le comportement adulte [91]. En conséquence, le développement des techniques d'AMP pourrait favoriser la transmission d'anomalies épigénétiques responsables de désordres développementaux à court ou long terme comme illustrés par les exemples ci-dessous.

Exemple 1 : utilisation de gamètes "épigénétiquement immatures"?

Les gamètes subissent des modifications épigénétiques au cours de la spermatogénèse [81, 93]. Aussi, l'utilisation de gamètes immatures lors de tentatives d'AMP pose de nom-

breuses questions. En particulier, les conséquences épigénétiques à long terme pour le fœtus de l'utilisation de gamètes immatures ne sont pas connues.

Chez l'animal, des naissances ont été obtenues par microinjection intracytoplasmique ovocytaire (ICSI) de gamètes mâles immatures haploïdes au stade spermatides rondes ou allongées [43, 61]. Par ailleurs, bien qu'avec une fréquence moindre, l'ICSI de noyaux de spermatoocytes I ou II chez le rongeur donne des naissances [41, 42, 73]. De même, chez l'homme, des grossesses et des naissances ont été obtenues après ICSI avec des spermatides rondes ou allongées isolées à partir de tissu testiculaire [2, 5, 15, 26, 34, 85, 88-90]. Cependant, les taux de fécondation, les taux d'implantation et les taux de grossesse sont diminués et le développement de blastocyste est retardé [2, 7, 27, 28, 34, 47, 66, 74, 96, 97]. De même, les embryons sont morphologiquement de moins bonne qualité. De nombreux facteurs ont été proposés pour expliquer ces mauvais résultats. On peut citer par exemple les problèmes d'activation ovocytaire [86, 100, 102], l'immaturation nucléaire [3], ainsi que des anomalies liées au facteur étiologique de l'infertilité de ces gamètes [32, 87, 96]. Cependant, la participation de l'immaturation épigénétique comme cause ou conséquence à l'infertilité reste posée.

Chez la souris, les rares études menées actuellement sont rassurantes et suggèrent que l'empreinte est acquise à un stade précoce au cours de la gamétogénèse [16, 17]. Les travaux réalisés chez la souris sur l'utilisation de gamètes immatures par l'équipe de Yanagimachi suggèrent que l'empreinte est établie dans les spermatides, spermatoocytes II, spermatoocytes I. Des grossesses ont été obtenues dans toutes ces situations sans augmentation notable des taux d'avortement précoce, d'accouchement avant terme, de retard de croissance intra-utérin ou d'augmentation de la mortalité périnatale [42, 43, 59, 60, 62, 72, 73]. Une étude de l'expression des gènes soumis à empreinte après microinjection de spermatides dans des ovocytes de souris a confirmé l'absence d'anomalie de l'empreinte dans les embryons résultants [75]. Les résultats que nous avons obtenus chez l'homme confirment que l'empreinte est établie à un stade précoce de la gamétogénèse [37].

Cependant, toutes ces données ont été obtenues chez des souris ou chez des hommes normaux. Qu'en est-il en cas d'infertilité chez l'homme? Peut-on transposer ces études en cas de déficit de la spermatogénèse? La réponse est clairement non.

Il faut aussi noter que les spermatides rondes contiennent une activité méthyl-transférase résiduelle et que le statut de méthylation de certains gènes peut apparemment être modifié dans l'épididyme [6].

Afin d'étudier les conséquences d'anomalies globales de la

méthylation globale de l'ADN sur la gamétogénèse et leur retentissement sur le développement embryonnaire, Doerksen et al. (1996) ont testé l'effet de l'administration paternelle de 5-azacytidine sur la fonction des cellules germinales et le développement [19]. La 5-azacytidine est une drogue qui s'incorpore à l'ADN et bloque la méthylation de l'ADN. L'effet de la 5-azacytidine a été comparé à la 6-azacytidine, drogue contrôle qui ne bloque pas la méthylation. A faible dose, après accouplement avec des femelles non traitées, une augmentation de la perte pré-implantatoire des embryons a été notée avec la 5-azacytidine mais pas avec la 6-azacytidine. A plus forte dose, des réductions du poids des testicules, des épидидymes et du nombre de spermatozoïdes étaient observées.

La question de l'utilisation de gamètes "épigénétiquement immatures" lors des procédures d'AMP reste donc largement ouverte. En particulier, des anomalies de l'empreinte peuvent exister dans les gamètes d'homme ayant recours à des traitements de la stérilité par ICSI soit comme cause, soit comme conséquence de l'infertilité.

Exemple 2 : les anomalies induites de l'empreinte parentales? L'exemple des cultures embryonnaires.

Un grand nombre de procédures médicales, scientifiques et biotechnologiques reposent sur la culture d'embryon pré-implantatoire. Ces procédures *in-vitro* induisent des anomalies de la croissance fœtale et du développement chez les mammifères. Parmi les hypothèses avancées pour expliquer les conséquences phénotypiques des cultures *in-vitro*, une hypothèse moléculaire est que la culture des cellules ou des embryons pré-implantatoires soit à l'origine d'anomalies épigénétiques de gènes [18, 39, 55, 56, 104]. Les anomalies acquises dans l'embryon cultivé *in vitro*, sont ensuite maintenues somatiquement et affectent l'expression de gènes à des stades plus tardifs du développement [18, 56].

Cette hypothèse moléculaire suppose qu'une "mémoire" soit transmise jusqu'aux stades où les anomalies phénotypiques apparaissent. L'exemple le mieux connu d'anomalies épigénétiques héréditaires qui régulent l'expression des gènes est la méthylation. Au cours du développement embryonnaire précoce, des changements extensifs de la méthylation globale du génome surviennent [30, 54, 103]. Contrairement aux gènes non soumis à empreinte qui acquièrent leur profil de méthylation au moment de la gastrulation ou après [30, 54, 103], la méthylation des DMRs des gènes soumis à empreinte est déjà établie dans les cellules au cours du développement pré et post-implantatoire [24]. Cette spécificité des gènes soumis à empreinte les expose particulièrement à des changements de méthylation pouvant survenir au cours des cultures *in vitro* au stade pré-implantatoire. Ainsi toute anomalie de méthylation peut potentiellement avoir un retentissement à des stades de développement ultérieurs [18].

Lors des cultures, les mécanismes à l'origine des anomalies épigénétiques dans les gènes ne sont pas connus. Une possibilité est que des anomalies de la cinétique de croissance surviennent à un stade précoce dans les cultures d'embryons ou de cellules. Ces dérégulations précoces pourraient alors interférer avec le maintien de l'empreinte par la méthylation [24, 39]. Par ailleurs, un rôle néfaste du sérum a été observé dans différentes espèces. Les embryons cultivés en présence de sérum ont des cycles de divisions différents de ceux cultivés sans sérum [39, 65, 95]. Khosla et al. (2001) ont proposé que les cultures, en particulier en présence de sérum, interfèrent avec des composants du cycle cellulaire dans les cellules indifférenciées [40]. Les conséquences de ces asynchronies se manifesteraient par des anomalies dans l'acquisitoire ou le maintien des marques d'empreinte. Ainsi plusieurs des enzymes méthyl-transférases connues [10] et des protéines régulatrices de la chromatine [31, 99] sont régulées par le cycle cellulaire et montrent des altérations majeures dans leur expression au cours du développement pré-implantatoire. De telles dérégulations du cycle cellulaire associées à des anomalies épigénétiques des gènes soumis à empreinte, ne sont pas sans rappeler celles impliquées dans un grand nombre de tumeurs [79]. Les recherches futures devront élucider les mécanismes moléculaires ainsi que les composants de la chromatine qui sont impliqués dans le cycle cellulaire et dans le maintien des marques épigénétiques. Elles devront par ailleurs répondre à la question de savoir comment les dérégulations du cycle cellulaire peuvent conduire à des anomalies épigénétiques hérissables et qui altèrent l'expression des gènes.

Exemple 3 : les conséquences à long terme d'anomalies épigénétiques transmises? L'exemple du rôle de l'empreinte parentale dans le cerveau et le comportement.

Des dérégulations acquises de l'empreinte parentale peuvent avoir des conséquences à long terme.

Le gène *MEST/PEG1* exprimé par l'allèle paternel est localisé en 7q32 chez l'homme, une région où une UPD (disomie uniparentale) maternelle a été décrite comme étant associée à un retard de croissance intra-utérin et post-natal [35, 78]. Récemment, une délétion a été introduite dans la séquence codante du gène *Mest/Peg1* de souris pour déterminer sa fonction [45]. Lorsque la délétion est héritée du père, les souris *Mest/Peg1 +/-* sont viables et fertiles, cependant, elles présentent un retard de croissance et une augmentation de la létalité. Les animaux *Mest/Peg1 -/+* (délétion héritée de la mère) n'ont pas d'anomalies phénotypiques, ce qui indique que les conséquences phénotypiques des mutations ne sont détectées qu'à partir d'une transmission paternelle. Par ailleurs, la fonction de reproduction des femelles qui héritent de la mutation de leur père est réduite [45]. Ces effets ne sont pas dus aux génotypes des souriceaux mais plutôt dus à des anomalies du comportement de

la mère mutée. Les anomalies du comportement consistent en une absence de placentophagie (normalement présente chez la souris), une négligence vis-à-vis de la nichée et des nouveaux-nés. Lorsque les nouveaux-nés sont pris en charge par des mères sauvages non mutées, aucune anomalie phénotypique n'est constatée. Les résultats de cette étude démontrent que le gène *Mest/Peg1* paternellement exprimé, est un régulateur positif de la croissance embryonnaire et qu'il est impliqué dans le comportement au moment de la parturition.

De même, il y a maintenant des évidences pour un rôle de l'empreinte dans les effets cognitifs chez des individus montrant une intelligence normale. Ainsi, un locus du chromosome X soumis à l'empreinte est potentiellement responsable de différence dans les fonctions cognitives de femmes présentant un syndrome de Turner [77]. Bien que les femmes normales héritent un chromosome X de leur père et mère, seul un X est actif. Le syndrome de Turner est un désordre sporadique qui survient lorsque tout ou partie d'un chromosome X est délété chez une femme. Ces femmes montrent une intelligence normale, mais une augmentation des difficultés d'adaptation sociale [49, 50]. Le syndrome de Turner chez une femme qui hérite d'un chromosome X de sa mère (45, X_m) se manifeste généralement par plus de difficulté comportementale que lorsque le chromosome X est hérité du père (45, X_p) [77]. Les analyses cytogénétiques de ces patientes ont montré des délétions partielles du bras court du chromosome X dérivées du père. Cela suggère qu'un locus soumis à empreinte situé en Xp11.23-Xqter, échappe à l'inactivation du X. Miller et Willerd [53] ont récemment identifié une région de 5,5 mégabases sur le locus Xp11.21-p11.22 qui contient 8 séquences exprimées qui échappent à l'inactivation du X. Cependant, un gène soumis à empreinte dans cette région reste encore à identifier.

V. CONCLUSION

La lignée germinale est l'acteur essentiel de l'établissement de l'empreinte parentale. Le statut d'empreinte acquis permet ensuite de moduler l'expression monoallélique temporelle et tissu-spécifique des gènes durant le développement. Cette empreinte permet aussi de réguler l'interaction entre des gènes dans de larges domaines chromosomiques comme illustré sur le chromosome 15 chez l'homme. L'amélioration des connaissances sur les mécanismes à l'origine de l'établissement et du maintien de l'empreinte parentale est fondamentale. Dans le cadre de l'assistance médicale à la procréation, elle permettrait, en particulier, de mieux comprendre les conséquences développementales ou neurogénétiques d'anomalies de l'empreinte transmises.

La place de l'empreinte parentale en AMP et plus largement, les risques pour l'enfant à naître liés aux ano-

malies épigénétiques restent à être évalués. Des réponses seront probablement apportées par des travaux à la fois épidémiocliniques et de recherche en génétique moléculaire.

RÉFÉRENCES

- ADENOT, P. G., MERCIER, Y., RENARD, J. P., THOMPSON, E. M. : Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development*, 1997, 124 : 4615-4625.
- AL-HASANI, S., LUDWIG, M., PALERMO, I., KUPKER, W., SANDMANN, J., JOHANNISSON, R., FORNARA, P., STURM, R., BALS-PRATSCH, M., BAUER, O., DIEDRICH, K. : Intracytoplasmic injection of round and elongated spermatids from azoospermic patients: results and review. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 (Suppl 1) : 97-107.
- ANTINORI, S., VERSACI, C., DANI, G., ANTINORI, M., POZZA, D., SELMAN, H. A. : Fertilization with human testicular spermatids: four successful pregnancies. *Hum Reprod*, 1997, 12 : 286-91.
- AOKI, F., WORRAD, D. M., SCHULTZ, R. M. : Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.*, 1997, 181 : 296-307.
- ARAKI, Y., MOTOYAMA, M., YOSHIDA, A., KIM, S. Y., SUNG, H., ARAKI, S. : Intracytoplasmic injection with late spermatids: a successful procedure in achieving childbirth for couples in which the male partner suffers from azoospermia due to deficient spermatogenesis. *Fertil. Steril.*, 1997, 67 : 559-61.
- ARIEL, M., CEDAR, H., MCCARREY, J. : Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nat. Genet.*, 1994, 7 : 59-63.
- BALABAN, B., URMAN, B., ISIKLAR, A., ALATAS, C., AKSOY, S., MERCAN, R., NUHOGLU, A. : Progression to the blastocyst stage of embryos derived from testicular round spermatids. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 1377-82.
- BAO, S., OBATA, Y., CARROLL, J., DOMEKI, I., KONO, T. : Epigenetic modifications necessary for normal development are established during oocyte growth in mice. *Biol. Reprod.*, 2000, 62 : 616-21.
- BARLOW, D. P. : Gametic imprinting in mammals. *Science*, 1995, 270 : 1610-3.
- BESTOR, T. H. : The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.*, 2000, 9 : 2395-402.
- BIELINSKA, B., BLAYDES, S. M., BUTTING, K., YANG, T., KRAJEWSKA-WALASEK, M., HORSTHEMKE, B., BRANNAN, C. I. : De novo deletions of *SNRPN* exon1 in early human and mouse embryos result in a paternal to maternal imprint switch. *Nat. Genet.*, 2000, 25 : 74-78.
- BOURC'HIS, D., XU, G. L., LIN, C. S., BOLLMAN, B., BESTOR, T. H. : Dnmt3L and the Establishment of Maternal Genomic Imprints. *Science*, 2001, 22 : 22.
- BRANDEIS, M., KAFRI, T., ARIEL, M., CHAILLET, J. R., MCCARREY, J., RAZIN, A., CEDAR, H. : The ontogeny of allele-specific methylation associated with imprinted genes in the mouse. *Embo J.*, 1993, 12 : 3669-3677.
- BUTTING, K., DITTRICH, B., GROSS, S., et al. : Sporadic imprinting defects in Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome : implications for imprint-switch models, genetic counseling, and prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.*, 1998, 63 : 170-80.
- CHOAVARATANA, R., SUPPINYOPONG, S., CHAIMAHAPHRUKSA, P. : ROSI from TESE the first case in Thailand : a case report. *J. Med. Assoc. Thai.*, 1999, 82 : 938-41.
- DAVIS, T. L., TRASLER, J. M., MOSS, S. B., YANG, G. J., BARTOLOMEI, M. S. : Acquisition of the *H19* methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics*, 1999, 58 : 18-28.
- DAVIS, T. L., YANG, G. J., MCCARREY, J. R., BARTOLOMEI, M. S. : The *H19* methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum. Mol. Genet.*, 2000, 9 : 2885-94.
- DEAN, W., BOWDEN, L., AITCHISON, A., KLOSE, J., MOORE, T., MENESES, J. J., REIK, W., FEIL, R. : Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. *Development*, 1998, 125 : 2273-82.
- DOERKSEN, T., TRASLER, J. M. : Developmental exposure of male germ cells to 5-azacytidine results in abnormal preimplantation development in rats. *Biol. Reprod.*, 1996, 55 : p1155-62.
- DORER, D. R., HENIKOFF, S. : Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell*, 1994, 77 : 993-1002.
- EL-MAARRI, O., BUTTING, K., PEERY, E. G., KROISEL, P. M., BALABAN, B., WAGNER, K., URMAN, B., HEYD, J., LICH, C., BRANNAN, C. I., WALTER, J., HORSTHEMKE, B. : Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization. *Nat. Genet.*, 2001, 27 : 341-4.
- ENGEMANN, S., STRODICKE, M., PAULSEN, M., FRANCK, O., REINHARDT, R., LANE, N., REIK, W., WALTER, J. : Sequence and functional comparison in the Beckwith-Wiedemann region: implications for a novel imprinting centre and extended imprinting. *Hum. Mol. Genet.*, 2000, 9 : 2691-706.
- FALLS, J. G., PULFORD, D. J., WYLIE, A. A., JIRTLE, R. L. : Genomic imprinting: implications for human disease. *Am. J. Pathol.*, 1999, 154 : 635-47.
- FEIL, R., KHOSLA, S. : Genomic imprinting in mammals: an interplay between chromatin and DNA methylation? *Trends Genet.*, 1999, 15 : 431-5.
- FERGUSON-SMITH, A. C., SURANI, M. A. : Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science*, 2001, 293 : 1086-1088.
- FISHEL, S., ASLAM, I., TESARIK, J. : Spermatid conception: a stage too early, or a time too soon? *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 1371-5.
- FISHEL, S., GREEN, S., HUNTER, A., LISI, F., RINALDI, L., LISI, R., MCDERMOTT, H. : Human fertilization with round and elongated spermatids. *Hum. Reprod.*, 1997, 12 : 336-40.
- GHAZZAWI, I. M., ALHASANI, S., TAHER, M., SOUSO, S. : Reproductive capacity of round spermatids compared with mature spermatozoa in a population of azoospermic men. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 736-40.

29. HENERY, C. C., MIRANDA, M., WIEKOWSKI, M., WILMUT, I., DEPAMPHILIS, M. L. : Repression of gene expression at the beginning of mouse development. *Dev. Biol.*, 1995, 169 : 448-60.
30. HOWLETT, S. K., REIK, W. : Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. *Development*, 1991, 113 : 119-27.
31. JONES, P. L., VEENSTRA, G. L., WADE, P. A., VERMAAK, D., KASS, S. U., LANDSBERGER, N., STROUBOULIS, J., WOLFFE, A. P. : Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.*, 1998, 19 : 187-191.
32. JURISICOVA, A., LOPES, S., MERIANO, J., OPPEDISANO, L., CASPER, R. F., VARMUZA, S. : DNA damage in round spermatids of mice with a targeted disruption of the Pp1c γ gene and in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia. *Mol. Hum. Reprod.*, 1999, 5 : 323-30.
33. KAFRI, T., GAO, X., RAZIN, A. : Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev*, 1993, 6 : 187-191.
34. KAHRAMAN, S., POLAT, G., SAMLI, M., SOZEN, E., OZGUN, O. D., DIRICAN, K., OZBICER, T. : Multiple pregnancies obtained by testicular spermatid injection in combination with intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 1998, 13 : 104-10.
35. KANEKO-ISHINO, T., KUROIWA, Y., MIYOSHI, N., KOHDA, T., SUZUKI, R., YOKOYAMA, M., VIVILLE, S., BARTON, S. C., ISHINO, F., SURANI, M. A. : *Peg1/Mest* imprinted gene on chromosome 6 identified by cDNA subtraction hybridization. *Nat. Genet.*, 1995, 11 : p52-9.
36. KATO, Y., RIDEOUT, W. M., 3RD, HILTON, K., BARTON, S. C., TSUNODA, Y., SURANI, M. A. : Developmental potential of mouse primordial germ cells. *Development*, 1999, 126 : 1823-32.
37. KERJEAN, A., DUPONT, J. M., VASSEUR, C., LE TESSIER, D., CUISSET, L., PALDI, A., JOUANNET, P., JEANPIERRE, M. : Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum. Mol. Genet.*, 2000, 9 : 2183-7.
38. KERJEAN, A., JOUVENOT, Y., VALENZA-SCHAERLY, P., GUENATRI, M., JOUANNET, P., JEANPIERRE, M., PÄLDI, A. : Imprinting in the germ line. *Ref. Gynecol. Obstet.*, 2001, 8 : 1-6.
39. KHOSLA, S., DEAN, W., BROWN, D., REIK, W., FEIL, R. : Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol. Reprod.*, 2001, 64 : 918-26.
40. KHOSLA, S., DEAN, W., REIK, W., FEIL, R. : Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Hum. Reprod. Update*, 2001, 7 : 419-27.
41. KIMURA, Y., TATENO, H., HANDEL, M. A., YANAGIMACHI, R. : Factors affecting meiotic and developmental competence of primary spermatocyte nuclei injected into mouse oocytes. *Biol. Reprod.*, 1998, 59 : 871-7.
42. KIMURA, Y., YANAGIMACHI, R. : Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biol. Reprod.*, 1995, 53 : 855-62.
43. KIMURA, Y., YANAGIMACHI, R. : Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development*, 1995, 121 : 2397-405.
44. LABOSKY, P. A., BARLOW, D. P., HOGAN, B. L. : Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development*, 1994, 120 : 3197-204.
45. LEFEBVRE, L., VIVILLE, S., BARTON, S. C., ISHINO, F., KEVERNE, E. B., SURANI, M. A. : Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene *Mest*. *Nat. Genet.*, 1998, 20 : p163-9.
46. LEIGHTON, P. A., INGRAM, R. S., EGGENSCHWILER, J., EFSTRATIADIS, A., TILGHMAN, S. M. : Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice. *Nature*, 1995, 375 : 34-9.
47. LEVRAN, D., NAHUM, H., FARHI, J., WEISSMAN, A. : Poor outcome with round spermatid injection in azoospermic patients with maturation arrest. *Fertil. Steril.*, 2000, 74 : 443-9.
48. MANN, M. R., BARTOLOMEI, M. S. : Maintaining imprinting. *Nat Genet*, 2000, 25 : 4-5.
49. MCCAULEY, E., ITO, J., KAY, T. : Psychosocial functioning in girls with Turner's syndrome and short stature: social skills, behavior problems, and self-concept. *J. Am. Acad. Child Psychiatry*, 1986, 25 : 105-12.
50. MCCAULEY, E., KAY, T., ITO, J., TREDER, R. : The Turner syndrome: cognitive deficits, affective discrimination, and behavior problems. *Child. Dev.*, 1987, 58 : 464-73.
51. MCGRATH, J., SOLTER, D. : Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 1984, 37 : 179-183.
52. MERTINEIT, C., YODER, J. A., TAKETO, T., LAIRD, D. W., TRASLER, J. M., BESTOR, T. H. : Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development*, 1998, 125 : 889-97.
53. MILLER, A. P., WILLARD, H. F. : Chromosomal basis of X chromosome inactivation: identification of a multigene domain in Xp11.21-p11.22 that escapes X inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1998, 95 : 8709-14.
54. MONK, M., BOUBELIK, M., LEHNERT, S. : Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extra-embryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development*, 1987, 99 : 371-382.
55. MOORE, T., REIK, W. : Genetic conflict in early development: parental imprinting in normal and abnormal growth. *Rev. Reprod.*, 1996, 1 : 73-7.
56. NAGY, A., ROSSANT, J., NAGY, R., ABRAMOW-NEWERLY, W., RODER, J. C. : Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1993, 90 : 8424-8.
57. NEUMANN, B., KUBICKA, P., BARLOW, D. P. : Characteristics of imprinted genes. *Nat. Genet.*, 1995, 9 : 12-3.
58. OBATA, Y., KANEKO, I. T., KOIDE, T., TAKAI, Y., UEDA, T., DOMEKI, I., SHIROISHI, T., ISHINO, F., KONO, T. : Disruption of primary imprinting during oocyte growth leads to the modified expression of imprinted genes during embryogenesis. *Development*, 1998, 125 : 1553-60.
59. OGURA, A., MATSUDA, J., YANAGIMACHI, R. : Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1994, 91 : 7460-2.

60. OGURA, A., YANAGIMACHI, R. : Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes from pronuclei and participate in syngamy. *Biol Reprod.* 1993, 48 : 219-25.
61. OGURA, A., YANAGIMACHI, R. : Spermatids as male gametes. *Reprod Fertil Dev.* 1995, 7 : 155-8.
62. OGURA, A., YANAGIMACHI, R., USUI, N. : Behaviour of hamster and mouse round spermatid nuclei incorporated into mature oocytes by electrofusion. *Zygote*, 1993, 1 : 1-8.
63. OKANO, M., BELL, D. W., HABER, D. A., LI, E. : DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 1999, 99 : 247-257.
64. PALDI, A., JOUVENOT, Y. : Allelic trans-sensing and imprinting. *Results Probl. Cell Differ.*, 1999, 25 : 271-82.
65. PINYOPUMMINTR, T., BAVISTER, B. D. : In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol. Reprod.*, 1991, 45 : 736-42.
66. PRAPAS, Y., CHATZIPARASIDOU, A., VANDERZWALMEN, P., NIJS, M., PRAPAS, N., LEJEUNE, B., VLASSIS, G., SCHOYSMAN, R. : Spermatid injection: reconsidering spermatid injection. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 2186-8.
67. RAZIN, A., SHEMER, R. : DNA methylation in early development. *Hum Mol Genet.* 1995, 4 : 1751-5.
68. REIK, W., BROWN, K. W., SCHNEID, H., LE BOUC, Y., BICKMORE, W., MAHER, E. R. : Imprinting mutations in the Beckwith-Wiedemann syndrome suggested by altered imprinting pattern in the IGF2-H19 domain. *Hum Mol Genet.* 1995, 4 : 2379-85.
69. REIK, W., DEAN, W., WALTER, J. : Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 2001, 293 : 1089-1092.
70. REIK, W., WALTER, J. : Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Genet. Reviews*, 2001, 2 : 21-32.
71. REIK, W., WALTER, J. : Imprinting mechanisms in mammals. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1998, 8 : 154-164.
72. SASAGAWA, I., ICHIYANAGI, O., YAZAWA, H., NAKADA, T., SAITO, H., HIROI, M., YANAGIMACHI, R. : Round spermatid transfer and embryo development. *Arch. Androl.*, 1998, 41 : 151-7.
73. SASAGAWA, I., KURETAKE, S., EPPIG, J. J., YANAGIMACHI, R. : Mouse primary spermatocytes can complete two meiotic divisions within the oocyte cytoplasm. *Biol. Reprod.*, 1998, 58 : 248-54.
74. SCHOYSMAN, R., VANDERZWALMEN, P., BERTIN, G., NIJS, M., VAN DAMME, B. : Oocyte insemination with spermatozoa precursors. *Curr. Opin. Urol.*, 1999, 9 : 541-5.
75. SHAMANSKI, F. L., KIMURA, Y., LAVOIR, M. C., PEDERSEN, R. A., YANAGIMACHI, R. : Status of genomic imprinting in mouse spermatids. *Hum. Reprod.*, 1999, 14 : 1050-1056.
76. SIMON, I., TENZEN, T., REUBINOFF, B. E., HILLMAN, D., MCCARREY, J. R., CEDAR, H. : Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. *Nature*, 1999, 401 : 929-932.
77. SKUSE, D. H., JAMES, R. S., BISHOP, D. V., et al : Evidence from Turner's syndrome of an imprinted X-linked locus affecting cognitive function. *Nature*, 1997, 387 : 705-708.
78. SPOTILA, L. D., SEREDA, L., PROCKOP, D. J. : Partial isodisomy for maternal chromosome 7 and short stature in an individual with a mutation at the COL1A2 locus. *Am. J. Hum. Genet.*, 1992, 51 : 1396-405.
79. SQUIRE, J., WEKSEBERG, R. : Genomic imprinting in tumours. *Semin. Cancer Biol.*, 1996, 7 : 41-7.
80. STEGER, K. : Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat. Embryol.*, 1999, 199 : 471-87.
81. SURANI, M. A. : Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. *Cell*, 1998, 93 : 309-12.
82. TADA, M., TADA, T., LEFEBVRE, L., BARTON, S. C., SURANI, M. A. : Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *Embo J.* 1997, 16 : 6510-20.
83. TADA, T., OBATA, Y., TADA, M., GOTO, Y., NAKATSUJI, N., TAN, S., KONO, T., TAKAGI, N. : Imprint switching for non-random X-chromosome inactivation during mouse oocyte growth. *Development*, 2000, 127 : 3101-5.
84. TANAKA, M., HENNEBOLD, J. D., MACFARLANE, J., ADASHI, E. Y. : A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development*, 2001, 128 : 655-64.
85. TESARIK, J. : Fertilization of oocytes by injecting spermatozoa, spermatids and spermatocytes. *Rev. Reprod.* 1996, 1 : 149-52.
86. TESARIK, J. : Oocyte activation after intracytoplasmic injection of mature and immature sperm cells. *Hum. Reprod.*, 1998, 1 : 117-27.
87. TESARIK, J., GRECO, E., COHEN-BACRIE, P., MENDOZA, C. : Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol. Hum. Reprod.*, 1998, 4 : 757-62.
88. TESARIK, J., MENDOZA, C. : Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development. *Hum. Reprod.*, 1996, 11 : 772-9.
89. TESARIK, J., MENDOZA, C., TESTART, J. : Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N. Engl. J. Med.*, 1995, 333 : 525.
90. TESARIK, J., ROLET, F., BRAMI, C., SEDBON, E., THOREL, J., TIBI, C., THEBAULT, A. : Spermatid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 1996, 11 : 780-3.
91. TILGHMAN, S. M. : The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell*, 1999, 96 : 185-193.
92. TUCKER, K. L., BEARD, C., DAUSMAN, J., JACKSON-GRUSBY, L., LAIRD, P. W., LEI, H., LI, E., JAENISCH, R. : Germ line passage is required for establishment of methylation and expression patterns of imprinted but not of nonimprinted genes. *Genes Dev.*, 1996, 10 : 1008-1020.
93. TYCKO, B., TRASLER, J., BESTOR, T. : Genomic imprinting: gametic mechanisms and somatic consequences. *J. Androl.*, 1997, 18 : 480-6.
94. UEDA, T., ABE, K., MIURA, A., et al: The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. *Genes Cells*, 2000, 5 : 649-59.
95. VAN LANGENDONCKT, A., DONNAY, I., SCHUURBIERS, N., AUQUIER, P., CAROLAN, C., MASSIP, A., DESSY, F. : Effects of supplementation with fetal calf serum on development

- of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *J. Reprod. Fertil.*, 1997, 109 : 87-93.
96. VANDERZ WALMEN, P., NIJS, M., STECHER, A., ZECH, H., BERTIN, G., LEJEUNE, B., VANDAMME, B., CHATZIPARASIDOU, A., PRAPAS, Y., SCHOYSMAN, R. : Is there a future for spermatid injections? *Hum. Reprod.*, 1998, 4 : 71-84.
 97. VANDERZ WALMEN, P., ZECH, H., BIRKENFELD, A., YEMINI, M., BERTIN, G., LEJEUNE, B., NIJS, M., SEGAL, L., STECHER, A., VANDAMME, B., VAN ROOSENDAAAL, E., SCHOYSMAN, R. : Intracytoplasmic injection of spermatids retrieved from testicular tissue: influence of testicular pathology, type of selected spermatids and oocyte activation. *Hum. Reprod.*, 1997, 12 : 1203-13.
 98. WIEKOWSKI, M., MIRANDA, M., DEPAMPHILIS, M. L. : Requirements for promoter activity in mouse oocytes and embryos distinguish paternal pronuclei from maternal and zygotic nuclei. *Dev. Biol.*, 1993, 159 : 366-78.
 99. WOLFFE, A. P. : Transcriptional control: imprinting insulation. *Curr. Biol.*, 2000, 10 : R463-5.
 100. YANAGIDA, K., YAZAWA, H., KATAYOSE, H., KIMURA, Y., HAYASHI, S., SATO, A. : Oocyte activation induced by spermatids and the spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 2000, 23 : 63-5.
 101. YANG, T., ADAMSON, T. E., RESNICK, J. L., LEFF, S., WEVRICK, R., FRANCKE, U., JENKINS, N. A., COPELAND, N. G., BRANNAN, C. I. : A mouse model for Prader-Willi syndrome imprinting-centre mutations. *Nat. Genet.*, 1998, 19 : 25-31.
 102. YAZAWA, H., YANAGIDA, K., KATAYOSE, H., HAYASHI, S., SATO, A. : Comparison of oocyte activation and Ca²⁺ oscillation-inducing abilities of round/elongated spermatids of mouse, hamster, rat, rabbit and human assessed by mouse oocyte activation assay. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 : 2582-90.
 103. YODER, J. A., SOMAN, N. S., VERDINE, G. L., BESTOR, T. H. : DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J. Mol. Biol.*, 1997, 270 : 385-395.
 104. YOUNG, L. E., FAIRBURN, H. R. : Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. *Theriogenology*, 2000, 53 : 627-48.

ABSTRACT

Imprinting in the germ line. Consequences for assisted reproduction.

A. KERJEAN, M. JEANPIERRE, P. JOUANNET,
A. PÁLDI

Genomic imprinting is an epigenetic phenomenon in eutherian mammals that results in the differential expression of the paternally and maternally inherited alleles of a gene. Imprinted genes are necessary for normal mammalian development. Parental specific

epigenetic modifications are imprinted on a subset of genes in the mammalian genome during germ cell maturation. Imprinting involves both cytosine methylation within CpG islands and changes in chromatin structure. All such epigenetic modifications are potentially reversible and can be erased. After the erasure step, new parental imprints are initiated, resulting in reintroduction of sex-specific imprints in the male and female germ line.

Although the function of genomic imprinting is not clear, it has been proposed that it evolved in mammals to regulate intrauterine growth and mammalian development. If the epigenotype of individual gametes is directly correlated with their later developmental capacities, genomic imprinting would have important practical implications in reproductive medicine for the use of embryos derived from assisted reproduction.

Key-words: *imprinting, gametogenesis, assisted reproduction*

GLOSSAIRE

Allèle: différentes versions d'un même gène

Cis: interaction sur un même allèle

Enhanceur: séquences activatrices

Epigénétique: facteur modifiant le phénotype sans changer le génotype

Expression biallélique: expression d'un gène par deux allèles

Expression monoallélique: expression d'un gène par un seul allèle

Insulateur chromatinien: séquence d'ADN qui peut isoler un gène de l'influence de son environnement génomique. Lorsqu'un insulateur est placé entre un promoteur et des séquences activatrices, il inhibe l'activation de l'expression du gène.

KO: inactivation spécifique d'un gène par production d'une mutation nulle d'un gène.

Méthylation des dinucléotides CpGs: liaison d'un groupe méthyl à une cytosine dans des doublets CpG

Méthylation allèle-spécifique: méthylation spécifique d'un allèle

Répresseur transcriptionnel: facteur réprimant la transcription

Silenceur: séquences inactivatrices

Trans: interaction entre deux allèles