

## Le marquage et l'expression différentiels des génomes paternel et maternel

### Deux conditions nécessaires pour le développement à terme de l'embryon de souris

Les génomes maternel et paternel sont tous deux indispensables au développement normal de l'embryon. Certains gènes ont un fonctionnement différent selon qu'ils sont issus de l'un ou l'autre des gamètes ; la nature réelle de cette empreinte parentale sur le génome n'est pas connue mais il semble que le phénomène soit, en tout cas, associé à des différences de méthylation. Dans un modèle de souris, des interactions particulières peuvent être démontrées entre le cytoplasme des oocytes d'un certain génotype et le pronoyau paternel d'un autre génotype.

Charles Babinet  
Jacqueline Barra  
Jean-Paul Renard

**D**es travaux récents utilisant une technique de transfert nucléaire appliquée à l'œuf de souris [1] ont permis d'éclaircir des observations embryologiques et génétiques déjà anciennes [2] et de proposer l'hypothèse que les génomes maternel et paternel ne jouent pas un rôle identique dans le développement de l'embryon. Le but de cet article est de montrer comment on en est arrivé à considérer qu'il existe dès le début de l'embryogenèse une différence fonctionnelle entre les deux génomes parentaux qui serait due à l'apposition, sur ces génomes, pendant la gamétogenèse, d'une empreinte moléculaire différente chez le mâle et chez la femelle.

### Complémentarité obligatoire des génomes paternel et maternel

• Il faut à la fois un génome d'origine mâle et un génome d'origine femelle pour permettre le développement à terme de l'embryon de souris.

— Mise en évidence par une approche génétique. L'approche génétique consiste à tirer avantage de l'existence de lignées de souris porteuses de certains types de translocations chromosomiques qui entraînent la formation de gamètes inhabituels : certains possèdent un chromosome ou une partie de chromosome en double exemplaire alors que dans d'autres ces mêmes régions sont totalement absentes à la suite de non-disjonction méiotique. En croisant entre elles de telles souris, on obtient parfois des embryons qui proviennent de la fusion d'un gamète dans lequel un chromosome est dupliqué avec un gamète dans lequel ce même chromosome est absent. L'ensemble chromosomique de ces embryons est donc bien complet, mais une partie provient d'un seul des deux parents. L'origine paternelle ou maternelle des chromosomes peut être repérée grâce à des marqueurs génétiques. En utilisant différents types de translocations, Cattana *et al.* [18] ont fait l'observation qu'au cours du développement, certaines régions du génome ne sont pas équivalentes

#### ADRESSE

C. Babinet : Directeur de recherche au Cnrs.  
J. Barra : Chargée de recherche à l'Institut Pasteur.  
J.-P. Renard : Directeur de recherche à l'Inra. Unité de génétique des mammifères, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex, France.

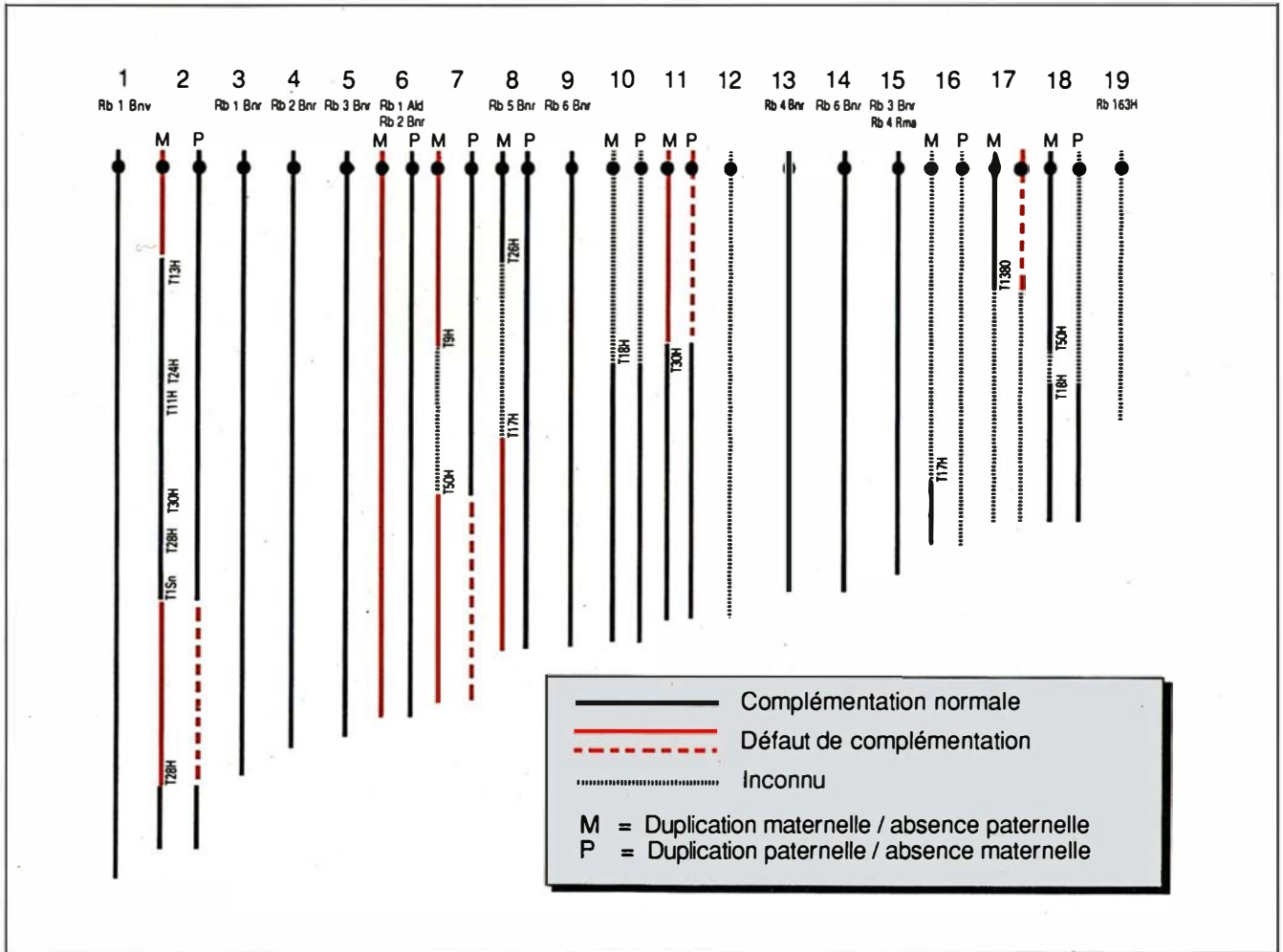


Figure 1. **Régions chromosomiques intéressées par un phénomène d’empreinte parentale.** Cette carte des autosomes de la souris montre les régions chromosomiques porteuses de gènes qui ont une activité différente au cours du développement de l’embryon selon qu’ils ont été transmis par le mâle ou par la femelle. Les translocations robertsoniennes (voir glossaire) utilisées pour établir cette carte sont indiquées au-dessus des chromosomes, tandis que les translocations réciproques sont placées près de leur point de cassure. Les chromosomes qui ne montrent aucun effet parental sont représentés à un seul exemplaire. Les chromosomes marqués (M) et (P) indiquent ceux pour lesquels un effet a été observé dans le cas d’une duplication maternelle/absence paternelle (M) ou dans le cas réciproque d’une duplication paternelle/absence maternelle (P). Exemple : Dans le cas du chromosome 6, la duplication du chromosome maternel et l’absence de chromosome paternel sont létales ; tandis que dans le cas du chromosome 17, la duplication de la partie proximale du chromosome paternel et l’absence de la même région du chromosome maternel sont également létales [18]. En haut de la figure, horizontalement, sont indiquées les translocations robertsoniennes ; entre les chromosomes, verticalement, sont indiquées les translocations réciproques. (D’après [18]).

selon qu’elles ont été héritées du père ou de la mère (figure 1). C’est ainsi que, pour plusieurs chromosomes, une duplication maternelle couplée à une déficience paternelle est létale, alors que la combinaison réciproque est viable. Dans d’autres cas, c’est la configuration inverse qui est létale. Ces observations suggèrent que certaines régions du génome, essentielles pour le développement, ne

peuvent être actives que si elles sont apportées, selon les cas, par le parent mâle ou par le parent femelle.

— *Mise en évidence par reconstruction d’embryons.* La mise au point, à la fin de l’année 1983, par McGrath et Solter, d’une technique d’énucleation qui permet d’obtenir des noyaux intacts à l’intérieur de petites vésicules entourées de membrane

plasmique (caryoplastes) a été une étape décisive pour l’étude de la contribution respective des génomes mâle et femelle de l’embryon de souris. La figure 2 résume trois des principales expériences qui, au cours des trois dernières années, ont permis d’établir de manière définitive que l’embryon doit avoir hérité un génome maternel et un génome paternel pour que son développe-

## RÉFÉRENCES

1. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 1983 ; 220 : 1300-2.
2. Searle AG, Beechey CV. Complementation studies with mouse translocations. *Cytogenet Cell Genet* 1978 ; 20 : 222-303.
3. Surani MAH, Barton SC, Norris ML. Nuclear transplantation in the mouse : heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. *Cell* 1986 ; 45 : 127-36.
4. Surani MAH. Evidences and consequences of differences between maternal and paternal genomes during embryogenesis in the mouse. In : Rossant J, Pedersen RA, eds. *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development*. Cambridge : University Press, 1986 ; 401-34.
5. Surani MAH, Barton SC, Howlett SK, Norris M. Influence of chromosomal determinants on development of androgenetic and parthenogenetic cells. *Development* 1988 ; 103 : 171-8.
6. Nagy A, Paldi A, Dezso L, Varga L, Magyar A. Prenatal fate of parthenogenetic cells in mouse aggregation chimaeras. *Development* 1987 ; 101 : 67-71.
7. Aronson J, Solter D. Developmental potency of gametic and embryonic genomes revealed by nuclear transfer. In : Moscona AA, Monroy A, eds. *Current Topics in Developmental Biology. Recent Advances in Mammalian Development*. London : Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, 1987 ; 23 : 55-71.
8. Sanford JP, Clark HJ, Chapman VM, Rossant J. Differences in DNA methylation during oogenesis and sperm gametogenesis and their persistence during early embryogenesis. *Genes Dev* 1987 ; 1 : 1039-46.
9. Babinet C, Morello D. Animaux transgéniques : une voie nouvelle pour l'étude du développement. *médecine/sciences* 1986 ; 2 : 253-9.
10. Sapienza C, Peterson AC, Rossant J, Balling R. Degree of methylation of transgenes is dependent on gamete origin. *Nature* 1987 ; 328 : 251-4.
11. Reik W, Collick A, Norris ML, Barton SC, Surani MA. Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice. *Nature* 1987 ; 328 : 248-51.

ment se déroule normalement jusqu'à terme.

### • Les génomes parentaux ont des rôles complémentaires au cours du développement.

Une fois établie la nécessité de la présence d'un génome d'origine mâle et d'un génome d'origine femelle pour le développement normal de l'embryon, différents types d'expériences ont été entreprises pour tenter de préciser leurs rôles respectifs. Tout d'abord l'examen des capacités de développement d'embryons uniparentaux a permis de faire une observation saisissante : les *conceptus* dotés d'un génome d'origine uniquement maternelle présentent un développement à peu près normal de l'embryon, alors que les annexes sont à l'état rudimentaire. La situation inverse est observée pour des *conceptus* dotés d'un génome d'origine uniquement paternelle (embryon rudimentaire, annexes développées) [3, 4]. Ces observations suggèrent un rôle en partie symétrique des génomes mâle et femelle. Plus récemment, la création de chimères constituées d'embryons normaux associés soit avec des embryons parthénotes (*voir glossaire*), soit avec des embryons androgénotes (*voir glossaire*) et de chimères constituées des deux types d'embryons uniparentaux a permis de préciser le comportement des deux groupes cellulaires mâle ou femelle. De cet ensemble d'expériences, il ressort que si des cellules parthénotes associées à des cellules d'embryons normaux peuvent participer à la formation d'une chimère viable et se différencier en tous les tissus, en revanche, des chimères androgénotes/parthénotes ne se développent pas à terme. Ces résultats montrent qu'au moins certaines cellules doivent contenir les deux génomes. De plus, si l'on suit, grâce à des marqueurs génétiques, le devenir des cellules de chacune des deux origines, on observe que les cellules issues de parthénotes sont localisées presque exclusivement dans l'embryon, tandis que les cellules provenant d'androgénotes se retrouvent uniquement dans les annexes trophoblastiques [5, 6]. Ces expériences viennent renforcer l'idée que le génome maternel (ou certaines de ses

parties) est indispensable au développement de l'embryon, tandis que le génome paternel (ou certaines de ses parties) est indispensable au développement des annexes embryonnaires.

### Un marquage différentiel

#### • Une empreinte différentielle est imposée aux génomes paternel et maternel.

L'ensemble des expériences décrites ci-dessus permet de conclure à des différences de fonctionnement des génomes parentaux au cours du développement de l'embryon. Ces génomes, bien que pratiquement identiques d'un point de vue génétique, diffèrent d'un point de vue informatif [7]. Pour expliquer cela, on avance aujourd'hui l'hypothèse de l'existence d'un marquage moléculaire différent des génomes mâle et femelle (*imprinting*). Ce marquage doit répondre à un certain nombre de conditions : (1) les mécanismes qui permettent d'imposer une empreinte aux génomes doivent être réversibles puisque cette empreinte doit changer d'un sexe à l'autre au cours des générations successives ; (2) ils doivent permettre de maintenir l'empreinte à travers plusieurs, voire un grand

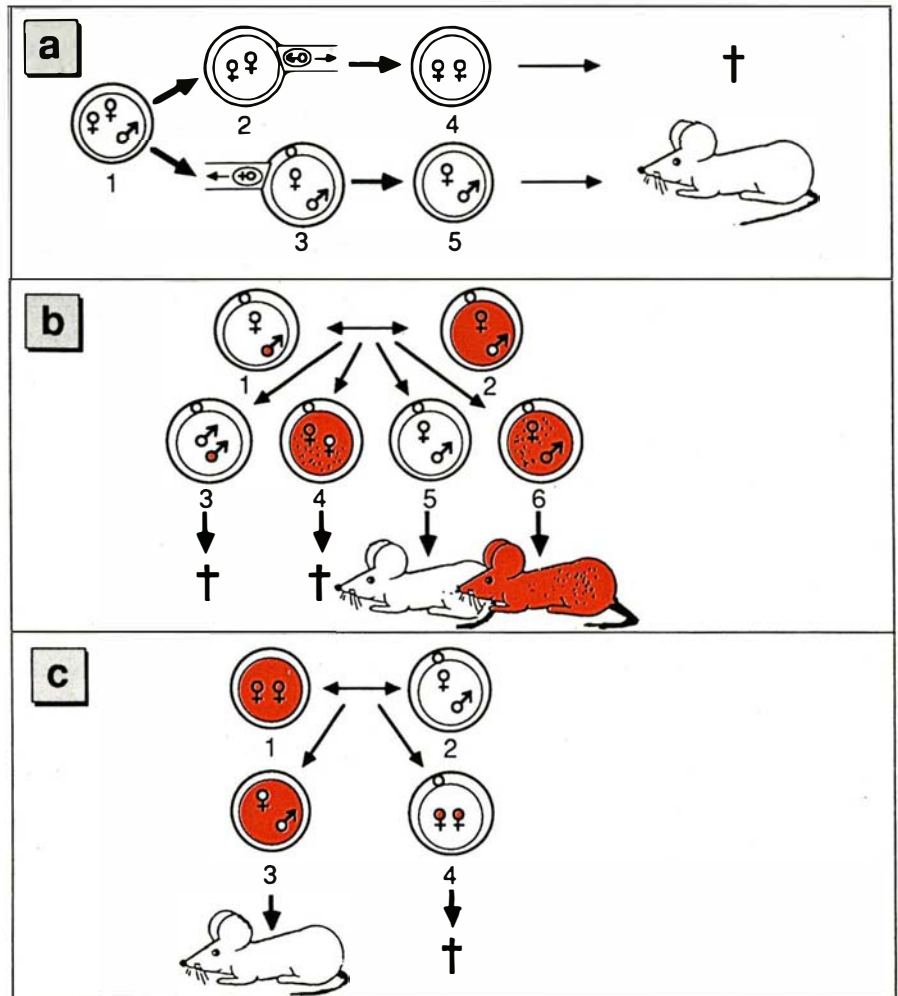
#### \*GLOSSAIRE\*

**Parthénotes** : embryons provenant de l'activation spontanée ou artificielle d'ovocytes, sans participation d'un gamète mâle. Ils renferment donc un génome d'origine uniquement femelle.

**Androgénotes** : embryons obtenus par retrait, après la fécondation, du pronoyau femelle. Ces embryons possèdent donc uniquement un génome d'origine paternelle.

**Translocation robertsienne (Rb)** : remaniement chromosomique caractérisé par la fusion de deux chromosomes acrocentriques en une structure unique métacentrique. Encore appelé fusion centrique, ce remaniement ne s'accompagne d'aucune perte de matériel génétique ; en revanche, un centromère disparaît.

**Figure 2. Démonstration expérimentale de la complémentarité des génomes mâle et femelle.** Cette figure présente trois des expériences de transfert nucléaire qui ont permis de démontrer que, pour se développer jusqu'à terme, un embryon de souris doit provenir d'un œuf qui possède un pronoyau d'origine mâle et un pronoyau d'origine femelle. **a.** Des embryons triploïdes, obtenus par empêchement de l'émission du second globule polaire après la fécondation, possèdent deux pronoyaux d'origine femelle et un pronoyau d'origine mâle (1). En enlevant soit le pronoyau mâle (2), soit le pronoyau femelle (3), on obtient des embryons diploïdes qui possèdent deux pronoyaux femelles (4) ou un pronoyau mâle et un pronoyau femelle (5). Seuls ces derniers donnent naissance à des petits viables lorsqu'ils sont réimplantés dans des souris pseudogestantes [19]. **b.** L'échange du pronoyau femelle d'un œuf fécondé (1) avec le pronoyau mâle d'un autre œuf fécondé (2) permet d'obtenir des embryons diploïdes uniparentaux mâles (3) et femelles (4). En revanche, si l'on échange entre eux les deux pronoyaux mâles, les embryons ainsi obtenus conservent un génome biparental (5) et (6). Seuls ces embryons donnent des nouveau-nés. Les embryons de départ sont des hybrides C57/B6-BALB/c. La contribution BALB/c est représentée en blanc, tandis que la contribution C57/B6 est en rouge [20]. Ces expériences ont permis de rejeter les deux hypothèses qui prévalaient jusque-là pour expliquer la mort des embryons parthénotes : la première invoquait la présence de gènes récessifs létaux à l'état homozygote dans les embryons uniparentaux, or dans l'expérience décrite en **b**, ce sont les embryons biparentaux, viables qui sont homozygotes (5) et (6), tandis que les embryons uniparentaux sont hétérozygotes (3) et (4); la seconde hypothèse attribuait à l'absence de facteurs extragéniques apportés par le spermatozoïde la mort des parthénotes. Dans l'expé-



rience décrite en **a** les embryons tant uniparentaux que biparentaux proviennent d'œufs fécondés, donc qui ont reçu la même contribution du spermatozoïde. Cette fois encore, seuls les embryons biparentaux sont viables. **c.** Cette expérience démontre directement que la mort des parthénotes est liée à leur constitution nucléaire. Elle consiste à échanger les noyaux entre des

embryons diploïdes parthénotes (1) et des embryons diploïdes normaux (2). Seuls les embryons qui sont issus d'un œuf avec un pronoyau mâle et un pronoyau femelle, même transférés dans le cytoplasme d'un œuf qui n'a pas été fécondé (3) se développent à terme, tandis que deux pronoyaux femelles dans un cytoplasme d'œuf fécondé (4) ne donnent pas un embryon viable [21].

nombre de répliquations ; (3) ils doivent être tels qu'ils affectent l'expression des gènes qui y sont soumis. Compte tenu de ces propriétés, plusieurs équipes ont proposé l'hypothèse d'une méthylation différentielle des génomes mâle et femelle au cours de la gamétogenèse. En effet, non seulement on sait actuellement

que différentes régions de l'ADN peuvent être méthylées différemment, mais encore il existe un grand nombre de données indiquant une corrélation entre l'état de méthylation d'un gène et son activité. Deux approches ont été utilisées pour tester cette hypothèse. D'une part, une approche globale, qui a consisté à

rechercher des différences de méthylation (au niveau du génome total, ou de certaines régions du génome), entre les lignées germinales mâle et femelle et entre certains tissus de l'embryon. L'état de méthylation de toutes les séquences examinées, mis à part l'ADN satellite, est différent entre la lignée germinale mâle et la

RÉFÉRENCES

12. Swain JL, Stewart TA, Leder P. Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: a molecular mechanism for parental imprinting. *Cell* 1987; 50: 719-27.

13. Hadchouel M, Farza H, Simon D, Tiollais P, Pourcel C. Maternal inhibition of hepatitis B surface antigen gene expression in transgenic mice correlates with *de novo* methylation. *Nature* 1987; 329: 454-6.

14. Kuhn DT, Packert G. Paternal imprinting of inversion Uab<sup>1</sup> causes homeotic transformation in *Drosophila*. *Genetics* 1988; 118: 103-7.

15. Barra J, Renard J-P. Diploid mouse embryos constructed at the late 2-cell stage from haploid parthenotes and androgenotes can develop to term. *Development* 1988; 102: 773-9.

16. Buehr M, McLaren A, Warner A. Reduced gap junctional communications is associated with the lethal condition characteristic of DDK mouse eggs fertilized by foreign sperm. *Development* 1987; 101: 449-59.

17. Renard J-P, Babinet C. Identification of a paternal developmental effect on the cytoplasm of one-cell-stage mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6883-6.

18. Beechey CV, Cattanach BM, Searle AC. Genetic imprinting map. *Mouse News Lett* 1988; 81: 48-9.

19. Surani MAH, Barton SC. Development of gynogenetic eggs in the mouse: implication for parthenogenetic embryos. *Science* 1984; 222: 1034-6.

20. McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 1984a; 37: 179-83.

21. Mann JR, Lovell-Badge RH. Inviability of parthenogenomes is determined by pronuclei, not egg cytoplasm. *Nature* 1984; 310: 66-7.

22. Wakasugi N. Studies on fertility of DDK and C57BL/6J strains and experimental transplantation of the ovary. *J Reprod Fert* 1972; 33: 283-91.

23. Wakasugi N. A genetically determined incompatibility system between spermatozoa and eggs leading to embryonic death in mice. *J Reprod Fert* 1974; 41: 85-94.

lignée germinale femelle. Ces différences semblent maintenues dans l'embryon au tout début du développement, pour disparaître à 7,5 jours, moment à partir duquel ces mêmes séquences apparaissent hautement méthylées. L'importance du nombre des différences observées rend improbable qu'elles soient liées à une régulation différentielle des gènes au début du développement [8]. Une deuxième approche a consisté à tirer avantage de la possibilité de créer des souris dites transgéniques. Ces souris ont intégré, dans leur génome, une nouvelle séquence d'ADN (ou « transgène ») introduite expérimentalement durant l'embryogenèse précoce [9]. Il est donc possible de suivre spécifiquement le devenir du gène étranger selon qu'il est transmis par le père ou par la mère. Récemment, plusieurs équipes ont étudié la méthylation de différents transgènes après leur passage par la lignée germinale mâle ou femelle

(Tableau 1 et [10-13]). Le résultat le plus frappant de ces études est que, chez 7 des 27 lignées transgéniques étudiées, le degré de méthylation du transgène est différent selon que celui-ci est transmis par un mâle ou par une femelle. Il ne dépend pas du sexe de l'animal dans lequel il est regardé, mais uniquement du sexe du parent qui a transmis ce transgène (figure 3). Cet effet parental ne semble pas dépendre de la nature du transgène mais plutôt de son site d'intégration dans le génome, puisqu'on ne l'observe que pour une partie des lignées transgéniques pour un transgène donné. Il serait donc très intéressant de déterminer le statut des séquences flanquantes quant à leur état de méthylation. Lorsque l'expression du transgène a pu être observée (Tableau 1), elle était liée à l'hypométhylation du gène. La méthylation différentielle des transgènes, selon le sexe du parent transmetteur semble donc obéir aux

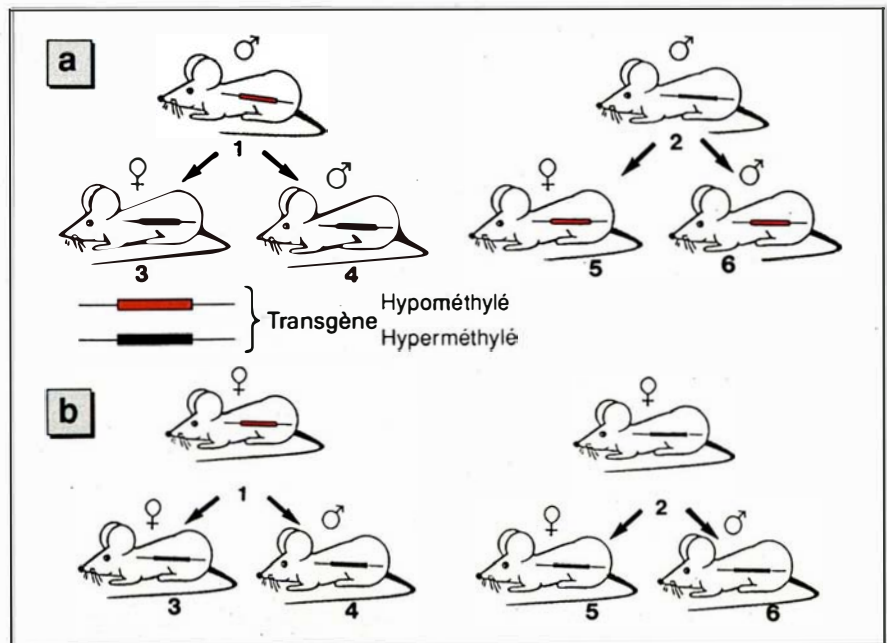


Figure 3. Le degré de méthylation de certains transgènes dépend du parent qui l'a transmis. a. Dans sept des huit cas décrits dans le Tableau 1, les femelles (3) et (5) comme les mâles (4) et (6) qui descendent d'un père porteur d'un transgène hypométhylé (1) ou hyperméthylé (2) ont un transgène hypométhylé. b. Tandis que, lorsque ce même transgène a été transmis par la mère (1) et (2), les descendants mâles (4) et (6) comme les descendants femelles (3) et (5) ont un transgène hyperméthylé.

Tableau I  
MÉTHYLATION DE TRANSGÈNES EN FONCTION DE L'ORIGINE PARENTALE

Nombre de lignées à effet parental/ nombre de lignées étudiées	Nature du transgène	État de méthylation du transgène transmis par		Réversible	Expression du transgène transmis par		Références
		Mâle	Femelle		Mâle	Femelle	
1/3	HSP-LacZ	-	+	?	nd	nd	[10]
4/5	TN1	-	+	oui	nd	nd	[10]
	TN1	-	+	oui	nd	nd	[10]
	TN1	-	+	oui	nd	nd	[10]
	TN1	-	+	oui	nd	nd	[10]
	TN1	+	-	oui	nd	nd	[10]
1/7	Igh-E-CAT	-	+	oui	nd	nd	[11]
1/10	RSV-Ig-c-myc	-	+	oui	+	-	[12]
		(tous tissus)	(tous tissus)		dans le cœur		[12]
1/2	2,8 kb de HBV	-	+	non	dans le foie	-	[13]

*HSP-LacZ* : gène de fusion entre un promoteur d'un gène de protéine du choc thermique et les séquences codantes du gène de la  $\beta$ -galactosidase. *Igh-E-CAT* : gène de fusion entre promoteur-enhancer du gène de chaîne lourde d'immunoglobuline et les séquences codantes du gène de la chloramphénicol acétyltransférase. *RSV-Ig-c-myc* : gène de fusion entre les séquences LTR du virus du sarcome de Rous et une séquence chimérique comportant l'oncogène *c-myc* transloqué dans le locus des immunoglobulines. *TN1* : troponine 1 (gène de la troponine); nd = non déterminé.

critères définis plus haut pour caractériser une empreinte génomique différentielle. Néanmoins, on ne peut non plus exclure que la méthylation soit un phénomène secondaire à l'*imprinting* du génome. En effet, très récemment, le marquage différentiel du génome paternel a été décrit pour un gène du complexe bithorax chez la drosophile, chez qui il est généralement admis que l'on n'observe pas de méthylation (des cytosines) contrairement aux autres eucaryotes [14]. De plus, rien ne permet, dans l'état actuel des expériences, de dire que la situation observée avec les transgènes reflète celle de gènes endogènes environnants.

Actuellement, nos connaissances ne nous permettent pas de dire ce qui constitue le premier signal de l'*imprinting*, quand il s'effectue au cours de la gamétogenèse, ni pour combien de temps les modifications persistent au cours du développement.

En ce qui concerne ce dernier point, on a pu montrer que la capacité d'un génome haploïde mâle ou femelle à compléter le génome haploïde de sexe opposé était conservée après

plusieurs cycles de réplication [3]. Donc, l'empreinte génomique qui différencie un génome haploïde mâle d'un génome haploïde femelle est bien fidèlement transmise lors des réplifications successives de l'ADN.

• **Les interactions entre les génomes parentaux au début du développement.**

Un autre aspect important de l'étude de l'*imprinting* concerne l'expression différentielle des génomes après la fécondation. C'est à cet aspect que notre laboratoire s'est intéressé. Pour ce faire, nous avons essayé de mettre en évidence le premier stade où le génome mâle est requis, et donc le premier stade au cours duquel ce génome apporte une information non seulement différente du génome femelle, mais nécessaire pour assurer le développement complet de l'embryon. Les expériences consistent à reconstruire des embryons diploïdes à partir d'embryons haploïdes androgénotes et d'embryons haploïdes parthénotes à des stades de plus en plus tardifs. Les premiers résultats ont montré que des embryons reconstruits à partir d'embryons haploïdes

au stade 2-cellules tardif (c'est-à-dire après que chaque génome parental ait, indépendamment l'un de l'autre, effectué un cycle mitotique et se soit mis en activité) peuvent donner des nouveau-nés viables [15]. Ces résultats confirment que les noyaux ont gardé leur identité et suggèrent que jusqu'à ce moment l'œuf peut se dispenser de toute contribution d'origine mâle.

• **Une interaction spécifique entre le cytoplasme de l'œuf et le génome mâle.**

Une autre approche des relations entre les génomes mâle et femelle consiste à tirer avantage de l'existence d'une lignée de souris, la lignée DDK, qui présente une propriété remarquable du point de vue du développement embryonnaire : les femelles de cette lignée accouplées avec des mâles étrangers ont une fertilité diminuée voire complètement abolie, alors qu'avec les croisements réciproques (mâles DDK, femelles étrangères à la lignée) ou avec les croisements à l'intérieur de la lignée, la fertilité est normale. L'arrêt du développement des embryons hybrides (femelles DDK,

Figure 4. **Caractéristiques de la lignée DDK.** Les caractéristiques de la lignée DDK ont été décrites il y a une quinzaine d'années par Wakasugi [22, 23] qui, à partir d'une approche génétique, a émis l'hypothèse qu'il existait une incompatibilité entre un produit du cytoplasme de l'ovocyte DDK et un produit apporté par le spermatozoïde des autres lignées. Les croisements intralignée (1) ou entre une femelle étrangère et un mâle DDK (4) donnent naissance à des petits viables. Les portées ont la même taille que celles obtenues avec d'autres lignées comme la lignée BALB/c (2). Au contraire, les croisements entre une femelle DDK et un mâle étranger ont une fertilité réduite, voire presque nulle dans le cas des mâles BALB/c (3). Des études *in vitro* ont montré que, dans ce dernier cas, la mort des embryons a lieu entre le stade morula et le stade blastocyste.

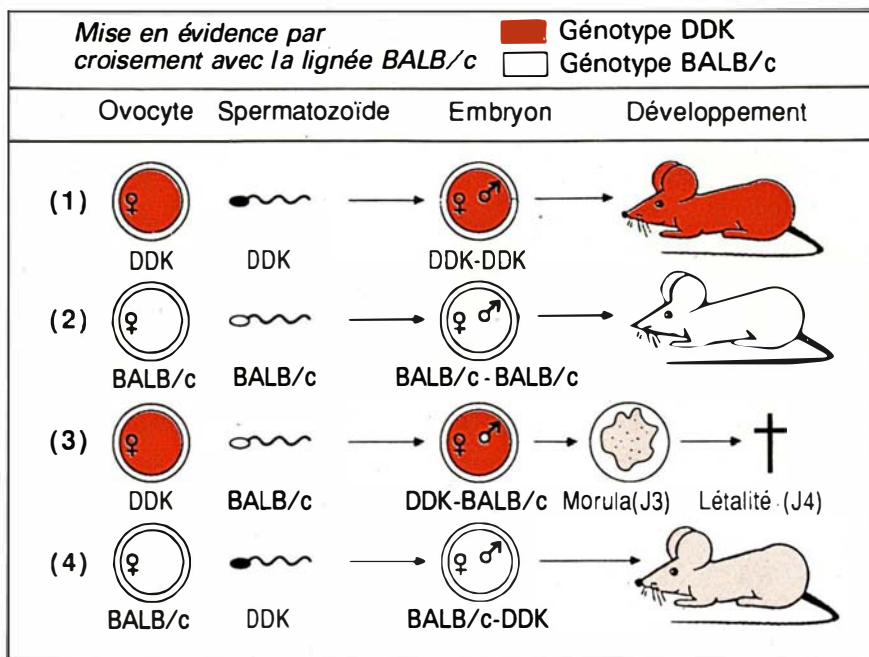
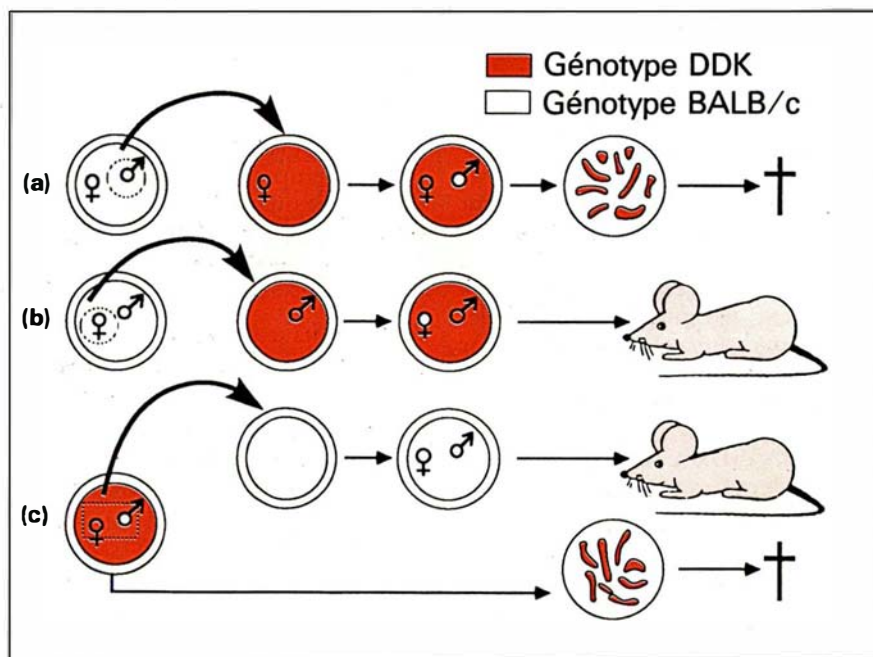


Figure 5. **Mise en évidence, par échange de pronoyaux entre les embryons des lignées DDK et BALB/c, de la non-équivalence des génomes parentaux.** Si, après avoir retiré le pronoyau mâle d'un œuf DDK, on le remplace par un pronoyau mâle d'un œuf BALB/c, l'embryon ainsi reconstitué, de constitution génomique DDK-BALB/c, commence à se diviser apparemment normalement, mais dégénère brutalement trois jours plus tard, au cours de la formation de la cavité du blastocyste (a). L'intervention réciproque (remplacement du pronoyau femelle DDK par un pronoyau femelle BALB/c) aboutit à un développement normal (b). Le noyau diploïde DDK-BALB/c n'est pas directement responsable de l'apparition du syndrome car si on place les deux pronoyaux dont il est issu dans un environnement cytoplasmique de type BALB/c, le développement est normal (c).



mâles d'une autre lignée) se produit au cours de la formation du blastocyste; il est suivi d'une dégénérescence très rapide des cellules, liée apparemment à un défaut de fonctionnement des *gaps junctions*\* qui unissent les blastomères à partir du stade 8-cellules [16]. Le taux de mor-

talité est particulièrement élevé quand on utilise des mâles de la lignée BALB/c: en les croisant avec des femelles DDK, on n'obtient quasiment jamais de naissances, alors

\* Voir *m/s* n° 9, vol. 3, p. 550.

qu'à l'inverse les mâles de la lignée DDK croisés avec des femelles BALB/c donnent en moyenne plus de six petits vivants par portée (figure 4). En utilisant ces deux souches, nous avons pu démontrer que la létalité résulte spécifiquement des interactions qui s'établissent, après la fécon-

dition, entre le cytoplasme DDK et le génome paternel BALB/c. Pour cela nous avons employé la technique de transfert nucléaire décrite précédemment qui permet de dissocier les génomes parentaux de leur environnement cytoplasmique : le phénomène de mortalité embryonnaire n'apparaît que lorsque le noyau paternel BALB/c et le cytoplasme DDK sont mis en présence l'un de l'autre [17].

Ainsi, le « syndrome DDK » apparaît quand on place, au stade 1-cellule, un pronoyau paternel BALB/c dans un œuf DDK dont on a, au préalable, retiré le pronoyau mâle. En revanche, si dans l'œuf DDK on remplace le noyau femelle DDK par un noyau femelle BALB/c, le développement est normal (figure 5). Ces données montrent que, par rapport au cytoplasme DDK, les deux génomes parentaux BALB/c ne sont pas équivalents ; la constitution génomique du noyau diploïde de l'hybride n'est, par elle-même, pas directement en cause, car si on place un pronoyau maternel DDK avec un pronoyau paternel BALB/c, dans un environnement cytoplasmique de type BALB/c, on obtient un développement embryonnaire normal.

De plus, la mortalité est observée lorsqu'on introduit du cytoplasme DDK dans un œuf BALB/c, aussi bien au stade 1- qu'au stade 2-cellules. Le cytoplasme DDK peut donc interagir spécifiquement avec le pronoyau mâle ou la composante paternelle BALB/c d'un génome embryonnaire (diploïde) déjà formé. On ne connaît pas aujourd'hui la nature des événements moléculaires qui provoquent cette létalité. Le fait que l'introduction de cytoplasme d'ovocytes DDK non fécondés dans des œufs BALB/c suffise à provoquer l'apparition du syndrome, alors que ce n'est pas le cas dans l'expérience contraire, traduit l'existence, chez la souche DDK, d'une activité génique pré-méiotique impliquée dans la réalisation du syndrome. Nous venons de mettre en évidence l'existence dans le cytoplasme DDK d'une protéine dont la synthèse est contrôlée au cours du développement : cette protéine apparaît dans l'ovocyte au cours de la maturation, quelques heures après la rupture de la vésicule germinale. Sa synthèse

subsiste tout au long du stade 1-cellule, et cesse dans les quelques heures qui suivent le passage au stade 2-cellules. Cette protéine n'est synthétisée ni dans les embryons BALB/c de même stade ni dans les embryons DDK après le stade 2-cellules ou dans les tissus de l'adulte. Il sera intéressant de rechercher si une telle molécule intervient dans le développement du syndrome.

## Conclusion

Des études soit de génétique, soit d'embryologie expérimentale ont donc permis, ces dernières années, de mettre au jour une caractéristique fondamentale du développement des mammifères : une empreinte est donnée au génome des cellules germinales, qui est différente chez le mâle et chez la femelle. Une conséquence remarquable de l'existence de cette empreinte est qu'elle rend absolument nécessaire, pour le développement à terme de l'organisme né de l'œuf fécondé, la contribution des deux génomes parentaux. Ainsi cette empreinte surajoute un autre type d'information à celle déjà contenue dans les séquences génomiques portées par les chromosomes. Il est hautement probable, compte tenu de la contribution nécessaire des deux génomes, que l'information liée à l'empreinte joue aussi un rôle dans la régulation spatiale et temporelle de l'expression génétique.

Quelle est la nature de cette empreinte ? A quel moment et comment est-elle établie et effacée ? Comment l'empreinte génomique entraîne-t-elle l'expression différentielle des gènes portés par les chromosomes de l'une ou l'autre origine parentale ? A quel moment du développement cette expression différentielle du génome se manifeste-t-elle ? Il est possible que les réponses à de telles questions révèlent de nouveaux modes de régulation des gènes au cours du développement. Il est clair en tout cas qu'elles ne seront obtenues que dans la mesure où des gènes dont l'expression dépend de l'origine parentale pourront être caractérisés. Ces gènes devraient se trouver en principe dans les régions du génome dont la transmission par l'un ou l'autre parent n'est pas indifférente pour le succès du développement ■

## Summary

Genetical as well as experimental embryology methods have permitted, in the recent years, to uncover a very important feature of mammalian embryonic development : it has been shown that female and male genomic complements are differentially imprinted in such a way that contribution of both a maternally and a paternally derived genome are absolutely necessary for the embryo to complete its normal development. Differential genomic imprinting seems therefore to impose some new and essential kind of information to the one already contained in the genomic sequences. The differential imprinting should be imposed on the genetic material during gametogenesis and persist throughout somatic development after fertilization. It should then be erased in the germ cell line and be established again in sperm and egg genomes. Its establishment and erasure as well as the way in which it is acting to permit normal development are completely new questions which, at the moment, remain unanswered.

TIRÉS A PART

C. Babinet.