

> L'émergence de cellules souches germinales est une décision cellulaire fondamentale pour la perpétuation de l'espèce. Les processus de spécification et de différenciation de la lignée germinale restent cependant mal caractérisés chez les mammifères en raison du nombre très limité des cellules fondatrices et de leur apparition précoce au cours du développement embryonnaire. Leur accès est de plus restreint dans l'espèce humaine pour des raisons éthiques évidentes. Le développement d'un système de dérivation *in vitro* de cellules souches germinales à partir de cellules ES est une priorité pour l'analyse fondamentale des mécanismes sous-jacents à la spécification et à la mise en place de l'identité épigénétique de ces cellules. La disponibilité de ce modèle cellulaire permettrait de plus l'évaluation *in vitro* des effets génotoxiques de certains agents environnementaux et médicamenteux sur le développement gamétique. Cet outil promet enfin des avancées importantes en médecine reproductive, avec la perspective de recoloniser les gonades d'hommes stériles ou de produire *in vitro* des ovocytes compétents pour la fécondation ou le transfert nucléaire. La dérivation de cellules souches germinales mâles à partir de cellules ES et leur différenciation *in vitro* ont récemment été réalisées chez la souris. Les défauts d'identité cellulaire et épigénétiques que présentent ces gamètes synthétiques mettent en évidence les contraintes spatiales et temporelles requises pour la spécification germinale et devraient permettre aux spécialistes de développer des protocoles plus adaptés. <

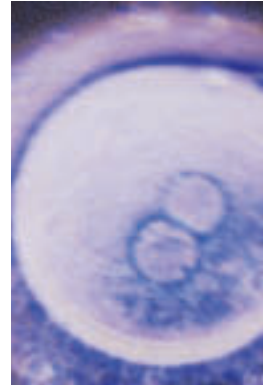
Des cellules souches embryonnaires aux cellules souches germinales, *in vivo* et *in vitro*

L'ovocyte fécondé est à l'origine du développement d'un organisme entier et représente à cet égard la cellule totipotente par excellence. Après quelques divisions cellulaires, au stade blastocyste, les cellules souches

Sperme express

Est-il possible de produire des gamètes mâles *in vitro* en trois jours ?

Mounia Guenatri, Déborah Bourc'his



Inserm U741, Université Paris 7,
2 place Jussieu,
75251 Paris Cedex 05, France.
bourchis@ijm.jussieu.fr

embryonnaires (ESC) de la masse cellulaire interne ont la capacité de donner naissance à tous les types cellulaires spécialisés, à l'exception des tissus extra-embryonnaires. Elles sont dites pluripotentes. Une sous-population de ces ESC donne naissance aux cellules germinales primordiales (PGC), qui sont des cellules souches germinales (GSC) seulement présentes pendant la vie fœtale. Chez les mâles, une deuxième population de GSC réside dans les gonades après la naissance, ce sont les cellules souches spermatogoniales (SSC) qui alimentent la voie de la spermatogenèse chez l'adulte. Les GSC ne sont pas totipotentes *per se*, mais perpétuent la totipotence de génération en génération : elles sont à l'origine de la production de gamètes qui, après fécondation, permettent la différenciation de tous les tissus sans exception dans l'individu en développement. Les dérivés *in vitro* des ESC, des PGC et des SSC sont respectivement les cellules ES, les cellules EG et les cellules GS (Figure 1). Ces modèles cellulaires conservent leur pluripotence, comme l'indique leur capacité à former les trois feuilletts embryonnaires [1-3]. L'efficacité de dérivation des EG et des GS est cependant limitée par la rareté et les difficultés d'identification et d'accès de leurs précurseurs biologiques. De plus, leur différenciation *in vitro* en gamètes matures et la manipulation de leur matériel génétique ne sont pas encore réalisées en routine [4]. Le développement d'un protocole de dérivation et de différenciation *in vitro* de cellules germinales à partir de cellules ES est une priorité. Les ESC peuvent se spécialiser en PGC au cours du développement [5,6]. Les cellules ES dérivées *in vitro* sont

aussi capables de coloniser la lignée germinale *in vivo* après injection dans un blastocyste. Plusieurs laboratoires ont récemment réussi à imposer un destin germinal à des cellules ES dans une boîte de culture [7-11]. Ces GSC dérivées de cellules ES peuvent être différenciées après culture en spermatozoïdes ou en ovocytes, suivant la composition chromosomique XY ou XX des cellules ES d'origine. Cependant, ces modèles cellulaires de différenciation germinale ne reproduisent pas les caractéristiques spatiales et temporelles du développement gamétique *in vivo*, et se pose légitimement la question de l'intégrité génétique et épigénétique des cellules germinales dérivées des cellules ES et de leur utilisation potentielle en médecine reproductive. Les contraintes d'environnement et de cinétique sont notamment cruciales pour la reprogrammation des profils de méthylation de l'ADN qui accompagnent la différenciation germinale mâle [12].

Mise au point d'un protocole de dérivation *in vitro* de GSC mâles à partir de cellules ES

Spécification des cellules germinales primordiales

La dissection des mécanismes de spécification des cellules germinales primordiales au cours du développement a été décisive pour l'élaboration des protocoles de dérivation de GSC à partir de cellules ES [5, 6]. Chez la souris, les PGC se développent au sein de l'épiblaste proximal à 6 jours (Figure 1), sous l'impulsion de facteurs de croissance produits

par l'ectoderme extra-embryonnaire avoisinant tels que Bmp4 (*bone morphogenic protein*). Les PGC sont identifiables pour la première fois à 7,25 jours de développement à la base de l'allantoïde par leur propriété à exprimer la phosphatase alcaline et divers autres marqueurs de pluripotence. Les PGC entrent alors en phase de prolifération et de migration de 8,5 à 9,5 jours et colonisent les ébauches gonadiques entre 10,5 et 11,5 jours. Les gonades acquièrent des signes distinctifs mâles ou femelles à 12,5 jours, respectivement déterminés par la présence ou l'absence du gène Sry (chromosome Y). Le sexe génétique des gonades influence à 13,5 jours la décision des PGC d'entrer en méiose ou en mitose [13]. Les PGC femelles colonisant les ébauches ovariennes s'engagent en prophase de méiose I. Il s'agit d'un processus par défaut puisque les PGC mâles positionnées en dehors des gonades mâles (par migration illégitime ou par transplantation artificielle) adoptent aussi un destin méiotique mais dégèrent rapidement. Les PGC mâles intégrées dans les gonades mâles répondent à des déterminants sécrétés par les cellules de Sertoli environnantes et conservent leur activité mitotique jusqu'à 14,5 jours. Elles entrent alors en phase de quiescence G0/G1 et prennent le nom de prospermatogonies.

Cet arrêt mitotique est levé à la naissance et les prospermatogonies se différencient en cellules spermatogoniales souches (SSC), dont les divisions asymétriques produisent des cellules à capacité d'auto-renouvellement qui maintiennent la réserve de cellules précurseurs, et des cellules s'engageant dans le processus de différenciation spermatogénétique pour produire les spermatozoïdes [14].

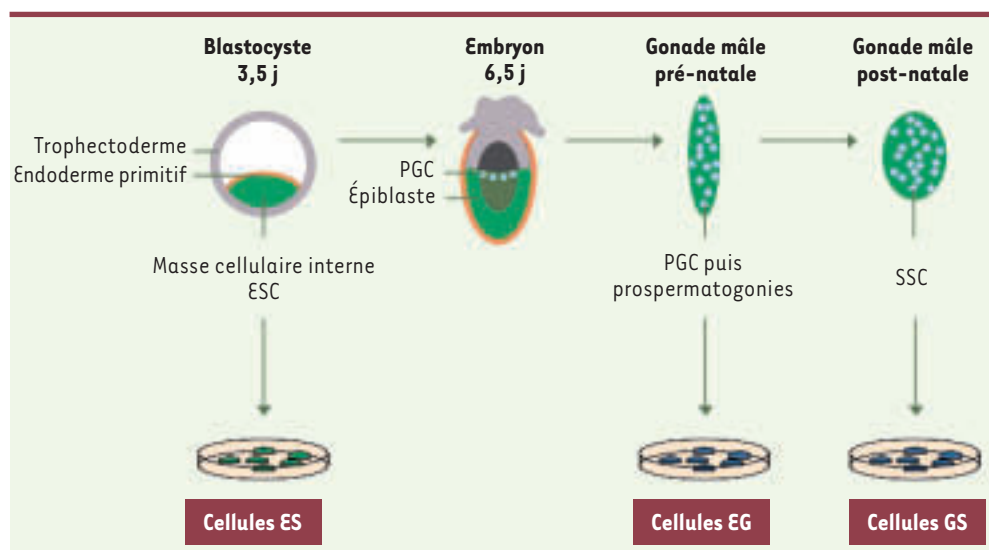


Figure 1. Ontogénie des différents types de cellules souches embryonnaires et germinales *in vivo* et leurs dérivés *in vitro*. Au cours du développement embryonnaire, la masse cellulaire interne (ICM) (vert) du blastocyste est composée de cellules souches embryonnaires (ESC). Ces cellules peuvent être dérivées *in vitro* et sont appelées cellules ES. Au jour 6 de développement, les cellules germinales primordiales (PGC) (bleu) se développent au sein de l'épiblaste proximal dérivant de l'ICM. Après une phase de prolifération et de migration, les PGC colonisent les ébauches gonadiques vers J11,5. Chez les mâles, les PGC prolifèrent jusqu'à J15,5 où elles entrent en phase de quiescence (stade prospermatogonies). Les dérivés *in vitro* des PGC et des prospermatogonies présentes pendant la vie prénatale sont les cellules EG. Enfin, un autre type de cellules souches germinales réside dans les gonades après la naissance, ce sont les cellules souches spermatogoniales (SSC) qui alimentent la voie spermatogénétique chez l'adulte et à partir desquelles sont dérivées les cellules GS.

Différenciation de cellules ES en GSC de type PGC

L'identification de voies génétiques communes et distinctes entre les cellules souches embryonnaires et germinales a constitué la seconde grande avancée dans la quête du protocole de dérivation de

GSC à partir de cellules ES (Figure 2) [15]. Les cellules ES et les GSC partagent les mêmes marqueurs moléculaires de pluripotence tels que Oct4, SSEA1, Stella, Nanog et la phosphatase alcaline. Les GSC fœtales et adultes expriment en plus des facteurs liés à la lignée germinale comme Mvh (*mouse vasa homolog*) et GCNA1 (*germ cell nuclear antigen 1*). Il est à noter que les PGC expriment spécifiquement le marqueur c-kit, alors que les SSC expriment spécifiquement Stra8 (*stimulated by retinoic acid 8*). Enfin, la prolifération des GSC est stimulée *in vitro* par l'acide rétinoïque alors que ce même agent induit la différenciation et la perte de pluripotence des cellules ES [16].

Grâce à ces connaissances, comment a-t-il été possible d'imposer un destin germinal à des cellules ES dans une boîte de culture ? Les groupes de T. Noce et G.Q. Daley ont eu recours à des stratégies expérimentales similaires, fondées sur la reconnaissance d'une population émergente de cellules germinales dans des corps embryoides, qui sont des structures cellulaires tridimensionnelles issues de la différenciation d'agrégats de cellules ES en réponse à un traitement par l'acide rétinoïque (RA) (Figure 3A) [7, 9]. Ce protocole a également été appliqué avec succès à des cellules ES humaines [10]. Trois à 7 jours de différenciation sont suffisants pour voir apparaître spontanément et fréquemment des GSC, reconnaissables par l'expression conjointe de marqueurs de pluripotence et de « germinalité » (respectivement SSEA1/Oct4 et Mvh).

L'adjonction de déterminants moléculaires de spécification des PGC comme Bmp4 améliore le rendement de cette méthode. Les corps embryoides reproduisent une organisation tissulaire remarquablement similaire aux ébauches gonadiques fœtales. L'expression du récepteur de l'hormone lutéinisante et du facteur anti-müllerien dans ces corps embryoides révèle la présence respective de cellules de Leydig et de cellules de Sertoli. Ces cellules constituent le compartiment somatique des gonades et assurent la fonction endocrine et la différenciation sexuelle mâle de cet organe, et en conséquence l'orientation vers un destin mitotique des PGC mâles. Dans ces structures, les cellules germinales émergentes sont localisées à proximité de cellules hématopoïétiques, comme au cours du développement embryonnaire normal. Les corps embryoides constitueraient donc un microenvironnement favorable au développement *in vitro* d'une niche germinale de type PGC. Ces cellules peuvent être isolées par cytométrie de flux et maintenues en culture à l'état pluripotent, puis leur différenciation induite soit en spermatozoïdes après transplantation dans un testicule donneur [7], ou *in vitro* en spermatozoïdes après 10 jours de culture [9]. Les gènes requis pour les étapes-clés de la spermatogenèse liées à la méiose et à la maturation spermatidique sont bien exprimés au cours de la différenciation *in vitro*. Enfin, le pouvoir fécondant des spermatozoïdes *in vitro* a été démontré par l'obtention de blastocystes après injection intracytoplasmique dans des ovocytes (ICSI), mais il n'existe pas de données quant à leur capacité à promouvoir le développement embryonnaire au-delà de l'implantation.

Différenciation de cellules ES en GSC de type SSC

Plus récemment, le groupe de W. Engel a développé une technique permettant d'obtenir des GSC toujours par traitement de cellules ES par l'acide rétinoïque mais dans un système en deux dimensions [11].

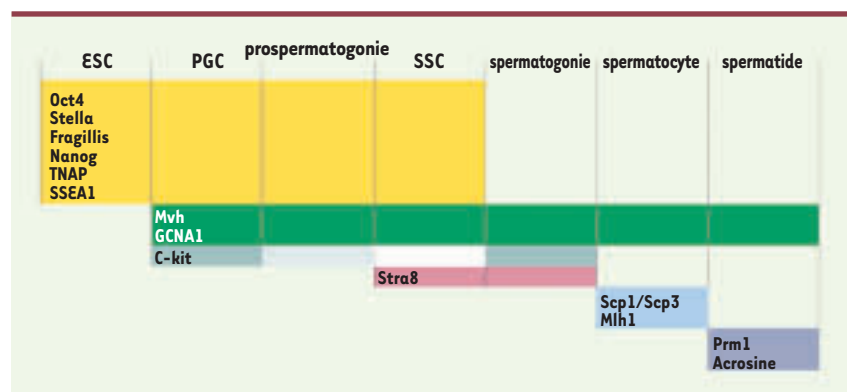


Figure 2. Déterminants moléculaires associés aux cellules ES, aux GSC mâles et aux différentes phases de la spermatogenèse. Les marqueurs de pluripotence (jaune) sont communs aux cellules ES, PGC, prospermatogonies et SSC. Les marqueurs liés à la lignée germinale (vert) sont exprimés à partir des PGC et tout au long de la spermatogenèse. Des déterminants spécifiques sont exprimés à des stades clés au cours de la différenciation gamétique mâle : c-kit (gris) dans les PGC et dans une moindre mesure dans les prospermatogonies. C-kit n'est pas exprimé dans les SSC mais réapparaît dans les spermatogonies en phase de multiplication [15] ; Stra8 (rose) est exprimé au cours de la vie post-natale dans les SSC et se maintient dans les spermatogonies. Enfin, divers marqueurs associés à la différenciation terminale (bleu) sont exprimés dans les spermatocytes et spermatozoïdes.

Contrairement aux groupes précédents qui avaient isolé des GSC de type PGC, les auteurs ont ici dérivé des GSC de type SSC, définies par l'utilisation du marqueur spécifique Stra8 dans leur stratégie de sélection et confirmées par l'absence d'expression de c-kit (Figures 2 et 3B) [15]. L'effervescence médiatique suscitée par ce travail est liée au fait que les auteurs ont pu ensuite différencier *in vitro* des spermatozoïdes en 3 jours (contre 10 jours précédemment) et que la fonctionnalité de ces gamètes *in vitro* a été démontrée au-delà du développement préimplantatoire par la naissance d'animaux viables après ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*). Cette prouesse technique s'accompagne cependant de nombreuses questions quant à la validité d'une telle méthode car peu d'animaux dérivés de ces gamètes synthétiques se développent jusqu'à la naissance, et les quelques animaux nés présentent

des anomalies de croissance et meurent prématurément. Plusieurs arguments développés ci-dessous laissent penser que les spermatozoïdes dérivés de cellules ES ont des anomalies d'identité cellulaire, ce qui a des répercussions sur leur intégrité génétique et épigénétique. Le choix d'une méthode accélérée de dérivation *in vitro* bidimensionnelle et la stratégie de sélection de cellules souches germinales de type SSC plutôt que PGC accentueraient de plus ces anomalies.

Cinétique perturbée : effet sur l'identité cellulaire et l'intégrité génétique

Le cycle spermatogénétique (de la SSC au spermatozoïde) requiert 35 jours chez la souris (Figure 4) [17]. La spermatogenèse implique une étape de multiplication des spermatogonies, une phase d'échange de matériel génétique et de réduction chromosomique dans les spermatocytes en méiose I et II, et une phase de maturation finale aboutissant à la formation des spermatozoïdes et enfin des spermatozoïdes. La progression de ces phases est-elle respectée en 10 jours ou 3 jours ? La phase de multiplication des spermatogonies consiste en un enchaînement de 6 divisions mitotiques (spermatogonies A1, A2, A3, A4, intermédiaires et B), aboutissant à une production de 64 cellules à partir d'une cellule SSC [14]. Aucune donnée n'est disponible quant au rendement des procédures de différenciation *in vitro* et il est donc difficile d'estimer si cette phase d'amplification est respectée. Le marqueur de prolifération des spermatogonies, c-kit, est bien exprimé après l'induction de la différenciation attestant de l'entrée des cellules dans le cycle spermatogénétique (Figure 2), mais cette expression

coexiste avec l'expression de marqueurs spécifiques des phases suivantes de la spermatogenèse, méiotique et post-méiotique. Deux interprétations sont possibles : (1) la différenciation *in vitro* produit dès 3 jours une population hétérogène de cellules à différents stades de différenciation malgré une induction simultanée, ou (2) chacune de ces cellules exprime simultanément des marqueurs pré-méiotiques, méiotiques et post-méiotiques, traduisant un programme anarchique de différenciation sans respect de l'enchaînement séquentiel des différentes phases de la spermatogenèse.

La méiose pourrait être particulièrement sensible à cette compaction du temps de spermatogenèse, en raison de sa durée (10 jours), mais également des contrôles de qualité du matériel génétique qui opèrent pendant cette période. Un point de contrôle (*check-point*) très strict existe au stade pachytène de prophase de méiose I, contrôlant l'appariement de tous les autosomes homologues et induisant une réponse apoptotique en cas de non-conformité afin de prévenir la production de cellules avec un nombre aberrant de chromosomes [18]. Les spermatozoïdes dérivés de cellules ES ont bien un contenu d'ADN égal à 1n déterminé par cytométrie de flux, suggérant que la réduction méiotique a bien eu lieu. On ne peut cependant pas exclure des pertes ou des gains de 1 ou 2 chromosomes, attendus en cas d'un défaut d'activation du *check-point*. Les forts taux d'échec d'implantation des embryons dérivés des spermatozoïdes synthétiques et de mortalité prénatale pourraient refléter des aberrations de nombre des chromosomes portés par ces spermatozoïdes et transmises à la descendance.

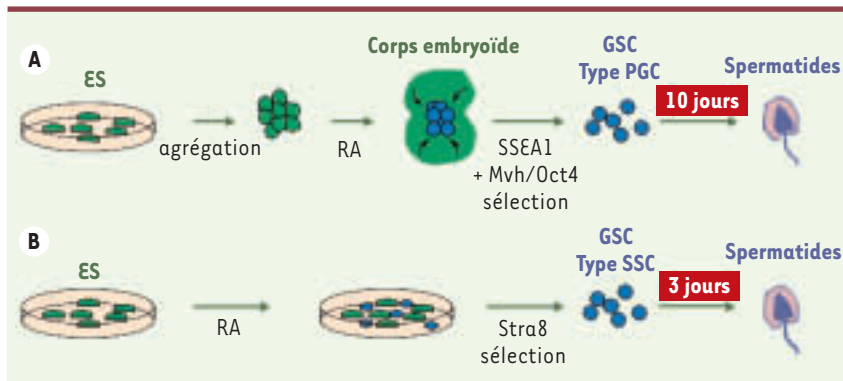


Figure 3. Deux stratégies expérimentales différentes pour l'obtention *in vitro* de GSC à partir de cellules ES et leur différenciation en spermatozoïdes. **A.** Selon les groupes de T. Noce et G.Q. Daley, la différenciation d'agrégats de cellules ES (vert) par l'acide rétinolique (RA) permet l'obtention d'une population de cellules germinales GSC (bleu) au sein des corps embryonnaires. La sélection de ces cellules par les marqueurs SSEA1/Mvh et leur stimulation par Bmp4 indique une identité de type PGC. Les corps embryonnaires abritent de plus des cellules somatiques gonadiques qui synthétisent des déterminants (flèches) requis pour la spécification sexuelle des PGC *in vivo*. La différenciation *in vitro* de ces GSC en spermatozoïdes se fait après 10 jours de culture. **B.** Le groupe de W. Engel utilise une méthode en deux dimensions sur boîte de Pétri pour dériver des GSC après induction de cellules ES par l'acide rétinolique (RA). Le recours à Stra8 comme marqueur oriente vers une sélection de GSC type SSC (voir Figure 2). La différenciation en spermatozoïdes est achevée en 3 jours.

PGC ou SSC : effet sur l'identité épigénétique parentale

La gamétogenèse n'est pas seulement responsable de la création d'un état de totipotence et de la mise en place de l'héritage génétique. Elle permet également l'acquisition de marques de distinction parentale reconnues sous le terme d'empreinte génomique et qui déterminent le profil d'expression parent-spécifique d'une centaine de gènes avec des effets prépondérants sur le développement embryonnaire et post-natal [12, 19]. La mise en place de l'empreinte correspond à un marquage par méthylation de l'ADN des gènes soumis à empreinte paternelle et maternelle, respectivement dans les

gamètes mâles et femelles. Cette fonction fait intervenir l'ADN méthyltransférase *de novo* DNMT3A, dont l'activité est stimulée par l'homologue d'ADN méthyltransférase DNMT3L [20]. DNMT3L est catalytiquement inactive mais orchestre la mise en place des profils de méthylation dans la lignée germinale [21-23].

En ce qui concerne l'empreinte paternelle, les marques de méthylation sont acquises dans les prospermatogonies, cellules intermédiaires entre les PGC et les SSC, présentes dans les gonades mâles de 14,5 jours de développement à quelques jours après la naissance (Figure 4) [24]. Cette fenêtre précise coïncide avec l'expression spécifique de Dnmt3L au cours de la spermatogenèse, alors que Dnmt3A a un profil d'expression plus large [22, 25]. Les marques d'empreinte sont

ensuite maintenues au cours des stades suivants de la spermatogenèse et après fécondation dans l'individu en développement. Les PGC pré-migratoires et en phase de migration ont une empreinte biparentale de type somatique, comme toutes les cellules de l'embryon. Ces marques doivent être effacées, afin de permettre le rétablissement de l'empreinte en fonction du sexe de l'individu [26, 27]. L'entrée dans les gonades déclenche aux alentours de 11,5 jours un effacement des marques de méthylation somatiques. L'environnement gonadique mâle détermine ensuite non seulement l'engagement des PGC vers un destin mitotique mâle, mais aussi l'acquisition subséquente de marques d'empreinte paternelle [28].

Dériver des GSC mâles matures à partir de cellules ES implique qu'il faille : (1) effacer les marques d'empreinte somatique des cellules ES, comme cela se produit *in vivo* dans les PGC qui colonisent les gonades, puis (2) établir un profil d'empreinte paternelle dans ces cellules au cours de leur différenciation *in vitro*.

Les corps embryoides utilisés par les groupes de Daley et Noce reproduisent un environnement gonadique propice à la formation de GSC de type PGC [7, 9] et qui pourrait également stimuler la reprogrammation de l'empreinte dans ces cellules. Les profils de méthylation biparentaux sont effectivement effacés, à condition cependant que les cellules soient maintenues pendant une semaine à l'état indifférencié [9]. On ne sait pas si ces cellules acquièrent ensuite des marques de méthylation paternelles au cours de leur différenciation. Le groupe de Engel utilise une méthode de culture bidimensionnelle qui ne reproduit pas une architecture tissulaire analogue à des ébauches gonadiques et sélectionne de plus des GSC de type SSC [11]. Cela implique que les types cellulaires correspondant aux phases d'effacement (PGC) et d'acquisition (prospermatogonies) des marques de méthylation paternelles ont été court-circuités lors de cette dérivation. Les GSC de type SSC et les spermatozoïdes issus de leur différenciation montrent effectivement des aberrations de méthylation des gènes soumis à empreinte paternelle tels que *H19*, et soumis à empreinte maternelle tels que *Snrpn* et *Igf2R*. Les anomalies de méthylation semblent complètement aléatoires et ne permettent pas de discerner des défauts d'effacement des marques d'empreinte somatiques, d'établissement de l'empreinte paternelle

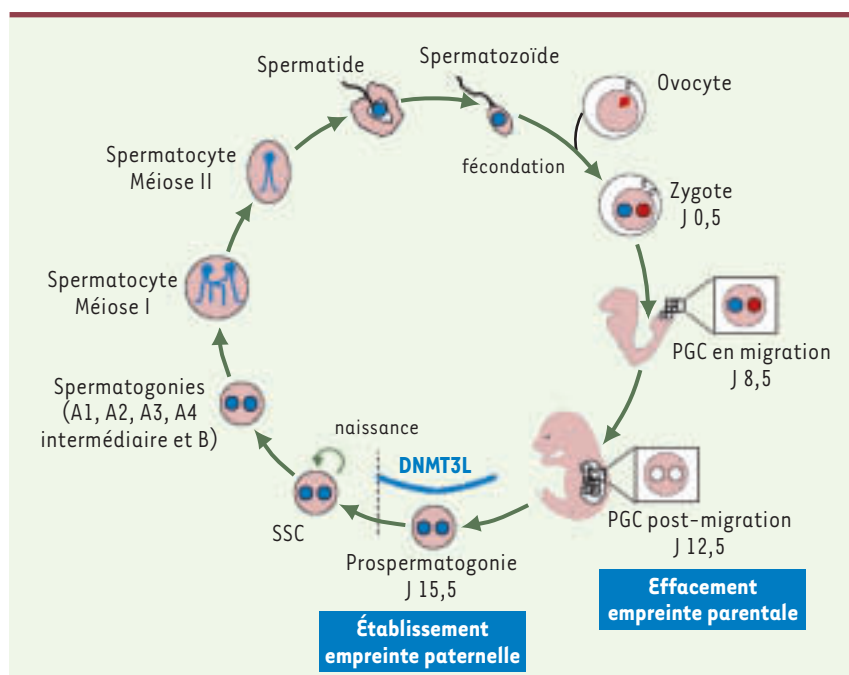


Figure 4. Cycle de l'empreinte parentale au cours de la gamétogenèse mâle chez la souris. L'empreinte parentale est établie au cours de la gamétogenèse. Au moment de la fécondation, les spermatozoïdes sont porteurs d'une empreinte paternelle (bleu) et les ovocytes d'une empreinte maternelle (rouge). Les cellules germinales primordiales (PGC) émergent à J6,5 et sont retrouvées à la base de l'allantoïde à J8,5. À ce stade l'empreinte parentale est toujours de type biparentale somatique (bleu + rouge). Entre J8,5 et 11,5, les PGC migrent pour rejoindre les ébauches gonadiques. L'effacement de l'empreinte parentale s'effectue dans ces PGC post-migration à J12,5. Les PGC intégrés dans les ébauches gonadiques mâles prolifèrent jusqu'à J15,5 où elles entrent en phase de quiescence (stade prospermatogonies). À ce stade, l'empreinte paternelle (bleu) est établie par méthylation de l'ADN sous l'action de l'homologue d'ADN-méthyltransférase DNMT3L. A la naissance les prospermatogonies se différencient en SSC mitotiquement actives. Les SSC ont une capacité d'auto-renouvellement alimentant le pool de cellules souches, et de différenciation passant par divers intermédiaires (spermatogonies, spermatocytes et spermatozoïdes) pour produire des gamètes haploïdes mâles matures (spermatozoïdes) porteurs d'une empreinte paternelle.

GLOSSAIRE

ESC : *embryonic stem cells* ou cellules souches embryonnaires de la masse cellulaire interne du blastocyste. Elles ont la capacité de former tous les feuilletés embryonnaires, y compris la lignée germinale.

GSC : *germ stem cells* ou cellules souches germinales.

PGC : *primordial germ cells* ou cellules germinales primordiales. Elles constituent la réserve de cellules souches germinales pendant la vie fœtale.

SSC : *spermatogonial stem cells* ou cellules souches spermatogoniales. Population de cellules souches germinales présentes après la naissance dans les gonades mâles.

ES : *embryonic stem cells*. Cellules dérivées *in vitro* à partir des ESC.

EG : *embryonic germ cells*. Cellules dérivées *in vitro* à partir de GSC issues de gonades prénatales (PGC et prospermatogonies chez les mâles).

GS : *germ line stem cells*. Cellules dérivées *in vitro* à partir des SSC.

Bmp4 : *bone morphogenic protein*. Facteur de croissance sécrété au cours du développement embryonnaire par l'ectoderme extra-embryonnaire et induisant la spécification des PGC.

Mvh : *mouse vasa homologue*. ARN hélicase ATP-dépendante, essentielle pour la spécification et le maintien des cellules germinales.

GCNA1 : *germ cell nuclear antigen 1*. Marqueur de la lignée germinale mâle et femelle. De fonction encore inconnue, cet antigène est détecté depuis les PGC post-migratoires jusqu'aux spermatozoïdes.

SSEA1 : *stage specific embryonic antigen-1*. Marqueur de cellules pluripotentes, c'est un oligosaccharide de surface impliqué dans la compaction cellulaire au cours du développement.

OCT4 : *octamer binding transcription factor 4*. Facteur de transcription déterminant de pluripotence. Il contrôle l'équilibre entre auto-renouvellement et différenciation des cellules souches.

Stra8 : *stimulated by retinoic acid 8*. Stimulé par l'acide rétinoïque, ce facteur semble requis pour l'entrée en méiose des PGC femelles pendant la vie fœtale. Chez les mâles, il est exprimé dans les cellules souches spermatogoniales après la naissance.

RA : *retinoic acid* ou acide rétinoïque. Dérivé actif de la vitamine A, qui, en se liant à ses récepteurs nucléaires, induit l'expression de gènes cibles impliqués dans le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire.

ICSI : *intracytoplasmic sperm injection*. Technique de fécondation *in vitro* par injection de têtes de spermatozoïdes dans le cytoplasme d'un ovocyte.

DNMT : ADN méthyltransférases, enzymes responsables de la méthylation de l'ADN. L'enzyme DNMT3A en association avec son homologue inactif DNMT3L sont notamment impliquées dans la mise en place au cours de la gamétogenèse des marques de méthylation spécifiques du sexe, liées aux gènes soumis à empreinte génomique.

ou d'acquisition illégitime d'empreinte maternelle dans les gamètes mâles dérivés *in vitro*. La dérivation de cellules type SSC plutôt que PGC n'est donc pas adéquate pour la reprogrammation de l'empreinte, et la différenciation *in vitro* n'est pas non plus suffisante pour stimuler des mécanismes de correction d'empreinte défectueuse. Une analyse du profil d'expression de DNMT3A et DNMT3L dans chacun des modèles permettrait de révéler si la machinerie d'acquisition de l'empreinte est bien présente et dans quel type cellulaire. Cette étude serait par-

ticulièrement informative pour DNMT3L, dont le profil d'expression spatial et temporel coïncide parfaitement avec la cinétique d'acquisition de l'empreinte dans la lignée germinale mâle et femelle [21, 22].

Des anomalies de méthylation des gènes soumis à empreinte sont retrouvées chez les animaux nés de l'injection ovocytaire intracytoplasmique de ces spermatozoïdes dérivés de cellules ES. Le phénotype de croissance et de létalité précoce des quelques animaux nés de cette procédure montre des similarités flagrantes avec les animaux issus de clonage par transfert de noyau somatique où des aberrations de méthylation et de régulation des gènes soumis à empreinte sont également documentées [29]. Le débat quant à l'utilisation potentielle de la technique de clonage à des fins thérapeutiques, et stimulé par ces anomalies d'empreinte [30], est finalement transférable à l'utilisation potentielle en médecine reproductive de gamètes issus de méthodes de dérivation et différenciation *in vitro*. ♦

SUMMARY

In vitro methods of male germ cell specification and differentiation

Germ line specification is an early cell fate decision essential for the transmission of totipotency over generations. Two types of germ line stem cells populate the male gonads in mammals. Primordial germ cells (PGCs) are the germ line founders only present during prenatal life. Spermatogonial stem cells (SSCs) appear a few days after birth and divide asymmetrically to give rise to one stem cell and one spermatogonia that initiates differentiation to produce spermatozoa. Germ cell specification and differentiation involve specific environmental stimuli and a sequential order of maturing phases required for gamete function. Spatio-temporal controls similarly dictate the erasure of somatic methylation marks and the subsequent acquisition of sex-specific marks at imprinted genes in gametes. We review here the recent advancements in male germ cell derivation from ES cells and discuss the limits of these *in vitro* methods in providing a kinetics and a microenvironment suitable for the programming of a proper gametic and parental identity. ♦

RÉFÉRENCES

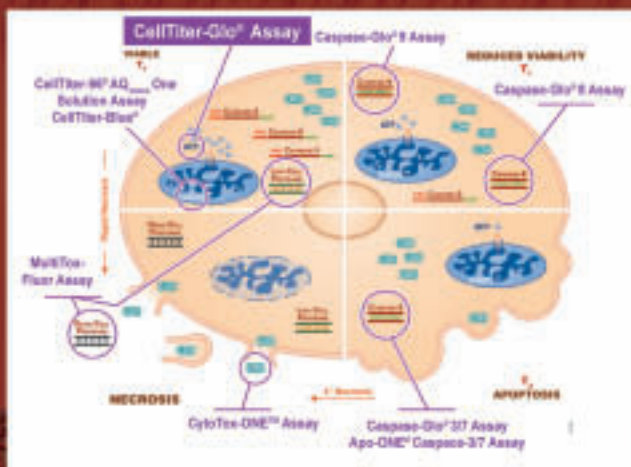
1. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992 ; 70 : 841-7.
2. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004 ; 119 : 1001-12.
3. Guan K, Nayernia K, Maier LS, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 2006 ; 440 : 1199-203.
4. Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, et al. Efficient generation of transgenic rats through the male germline using lentiviral transduction and transplantation of spermatogonial stem cells. *J Androl* 2007 ; 28 : 353-60.

5. Machev N, Fuhrmann G, Viville S. Ontogenèse des cellules germinales primordiales. *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 1091-5.
6. Saitou M, Payer B, Lange UC, et al. Specification of germ cell fate in mice. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003 ; 358 : 1363-70.
7. Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, et al. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 11457-62.
8. Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003 ; 300 : 1251-6.
9. Geijsen N, Horoschak M, Kim K, et al. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 2004 ; 427 : 148-54.
10. Clark AT, Bodnar MS, Fox M, et al. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro*. *Hum Mol Genet* 2004 ; 13 : 727-39.
11. Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, et al. *In vitro*-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell* 2006 ; 11 : 125-3.
12. Trasler JM. Gamete imprinting: setting epigenetic patterns for the next generation. *Reprod Fertil Dev* 2006 ; 18 : 63-9.
13. McLaren A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol* 2000 ; 163 : 3-9.
14. De Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 2001 ; 121 : 347-54.
15. Matzuk MM. Germ-line immortality. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 16395-6.
16. Koshimizu U, Watanabe M, Nakatsuji N. Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells *in vitro*. *Dev Biol* 1995 ; 2 : 683-5.
17. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972 ; 52 : 198-236.
18. Odoriso T, Rodriguez TA, Evans EP, et al. The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nat Genet* 1998 ; 18 : 257-61.
19. Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001 ; 2 : 21-32.
20. Chen ZX, Mann JR, Hsieh CL, et al. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *J Cell Biochem* 2005 ; 1 : 902-17.
21. Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, et al. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 2001 ; 294 : 2536-9.
22. Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 2004 ; 431 : 96-9.
23. Kaneda M, Okano M, Hata K, et al. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 2004 ; 429 : 900-3.
24. Li JY, Lees-Murdock DJ, Xu GL, et al. Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics* 2004 ; 84 : 952-60.
25. La Salle S, Trasler JM. Dynamic expression of DNMT3a and DNMT3b isoforms during male germ cell development in the mouse. *Dev Biol* 2006 ; 296 : 71-82.
26. Lee J, Inoue K, Ono R, et al. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* 2002 ; 129 : 1807-17.
27. Hajkova P, Erhardt S, Lane N, et al. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 2002 ; 117 : 15-23.
28. Durcova-Hills G, Hajkova P, Sullivan S, et al. Influence of sex chromosome constitution on the genomic imprinting of germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 25 : 11184-8.
29. Mann MR, Chung YG, Nolen LD, et al. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod* 2003 ; 69 : 902-14.
30. Beaujean N, Martin C, Debey P, et al. Reprogrammation et épigénèse. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 412-21.

TIRÉS À PART

M. Guenatri

VIABILITÉ CELLULAIRE ET APOPTOSE



www.promega.com/paguide ou au 0 800 433 000

Ils ont choisi. Et vous ?

Le plus efficace pour mesurer l'ATP cellulaire :

CellTiter-Glo[®]

- ▶ **Signal stable !**
Lecture du signal lumineux pendant plusieurs heures.
- ▶ **Ultra sensible et rapide !**
Détection à partir de 10 cellules en 10 minutes.
- ▶ **Une seule étape !**
Directement sur cellules en culture.

Promega