

La mémoire et l'oubli des êtres créés par clonage reproductif

Le clonage de mammifères, par transfert dans l'ovocyte de noyaux isolés à partir de cellules somatiques, embryonnaires ou adultes, offre de nouveaux moyens d'investigation en biologie cellulaire. Il soulève aussi de nombreuses interrogations, en particulier sur la capacité qu'ont les cellules adultes de retrouver la totalité du potentiel des cellules souches.

Le vieillissement des télomères

L'observation d'un raccourcissement des télomères chez Dolly, la première brebis clonée à partir de cellules somatiques adultes, posait le problème d'un « âge génétique » avec la perspective d'un vieillissement prématuré des animaux clonés. On sait en effet que la longueur des télomères diminue avec le vieillissement et au fur et à mesure des divisions cellulaires [1]. Par la suite, l'analyse des télomères de veaux clonés à partir de cellules fœtales montrait au contraire une augmentation de leur longueur par rapport aux veaux témoins [2]. Récemment, une étude sur des veaux clonés à partir de fibroblastes provenant d'une vache laitière âgée de 13 ans, montrait cette fois des télomères identiques à ceux des veaux témoins [3].

D'autres études sont certes nécessaires, qui doivent tenir compte de l'espèce, de la nature des cellules somatiques et du nombre de repiquages en culture avant le transfert nucléaire, ainsi que de l'origine de l'ADN génomique utilisé pour produire les fragments de restriction terminaux (TFR) choisis pour les mesures de longueur télomérique. Dès maintenant, néanmoins, on peut estimer que le raccourcissement des

télomères n'est pas un phénomène général dans le clonage reproductif. Du reste, des cellules de souris clonées à partir de cellules adultes, réutilisées pour en cloner de nouvelles, six fois de suite, n'ont produit aucune modification de la taille des télomères chez ces clones consécutifs [4]. Il est vrai que le clonage désormais possible du plus « compliant » des animaux de laboratoire, la souris, ouvre bien d'autres possibilités d'exploration dans des domaines divers comme, par exemple, les mécanismes d'inactivation et de réactivation des chromosomes X dans les cellules femelles. Une étude fort intéressante vient d'en fournir la preuve [5]. Toutefois, pour bien la comprendre, quelques rappels théoriques et techniques s'imposent.

Méthodes d'exploration du statut des X

Depuis l'hypothèse de Mary Lyon (1961), le statut des X au cours des

premiers stades de développement du zygote a été élucidé. On sait que l'inactivation d'un des deux X dans les cellules femelles se fait au hasard : X paternel (Xp) ou X maternel (Xm), mais qu'une empreinte parentale entraîne une inactivation sélective de l'Xp dans le trophoctoderme extra-embryonnaire (*m/s 1992, n° 8, p. 972 et 1998, n° 8-9, p. 976*). Pour pouvoir distinguer l'X actif (Xa) de l'X inactif (Xi), on peut introduire un transgène exprimant la protéine fluorescente verte (GFP) dans l'un des deux X (*m/s 1998, n° 2, p. 240*). Dans une population cellulaire femelle normale, dans laquelle l'inactivation s'effectue au hasard, environ 50 % des cellules présentent un Xa^{GFP} et sont fluorescentes. Si, par ailleurs, les cellules possèdent sur l'autre X un gène *Hprt* (hypoxanthine phosphoribosyl transférase) non fonctionnel, il est possible, en culture de fibroblastes embryonnaires de souris,

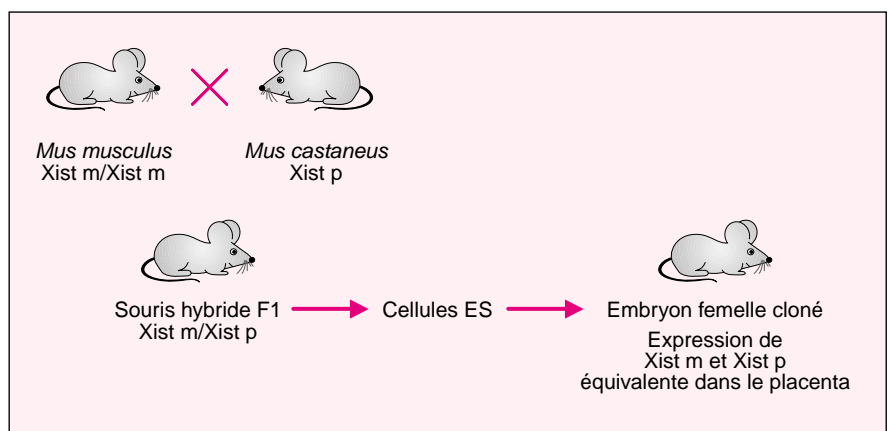


Figure 1. Étude du statut des X en fonction de leur origine parentale après établissement de lignées de cellules ES provenant d'hybrides de première génération (F1) d'un croisement entre M mus et M cast permettant l'identification des allèles de Xist.

de faire des sélections de populations cellulaires pour le statut des X, soit par le milieu 6GT qui sélectionne les cellules avec Xa^{Hprt} , soit par le milieu HAT (hypoxanthine, aminoptérine, thymidine) qui empêche les cellules Xa^{Hprt} de pousser et sélectionne donc les cellules Xi^{Hprt} (figure 1A). Cette technique permet en outre de quantifier le pourcentage de cellules porteuses de l'un ou l'autre des X, avant ou après sélection, grâce à un compteur de cellules calculant la proportion de cellules fluorescentes (qui possèdent un Xa^{GFP}) par rapport à la population totale des cellules en culture.

Clonage de souris à partir de cellules ES

Dans les cellules souches embryonnaires de souris (ES), on sait que les deux X sont actifs et que l'inactivation survient après l'induction de la différenciation, sans qu'il existe d'empreinte parentale, Xp et Xm pouvant également être inactivés [6]. Le problème était donc d'abord de savoir si, chez les animaux clonés à partir de noyaux de cellules ES, l'inactivation se faisait au hasard, non seulement dans les tissus embryonnaires, mais aussi dans le trophoblaste extra embryonnaire où, habituellement, l' Xp est sélectivement inactivé. Pour y parvenir, les clonages ont été réalisés à partir d'une lignée de cellules ES provenant d'une souris femelle F1, produit d'un croisement entre *Mus musculus* (*M mus*) et *Mus castaneus* (*M cast*). Chez ces hybrides F1, il est possible, en effet, de distinguer le gène *Xist** de chacun des deux lignages *M mus* et *M cast*.

Après transfert en des ovocytes énucléés, deux embryons furent obtenus. L'analyse des deux allèles de *Xist* à 13,5 jours embryonnaires montre une inactivation au hasard dans les tissus de l'embryon ainsi que dans le trophoblaste extra embryonnaire. Il n'existe donc pas de marquage épigénétique de l'un ou l'autre des X (figure 2).

Clonage de souris à partir de cellules adultes

Il restait à analyser le comportement des X des cellules somatiques adultes. Les clonages ont été effectués à partir de cellules somatiques provenant de l'extrémité de la queue de souris femelles X/X^{GFP} . Le suivi des

embryons donne les résultats suivants : aucune fluorescence au cours des premières divisions, à 2, 4, et 8 cellules. Puis, apparition de la fluorescence au stade morula et blastocyste. Il y a donc eu réactivation après le transfert nucléaire, à moins que les cellules donneuses aient été Xa^{GFP} . Pour être vraiment sûr d'une réactivation après

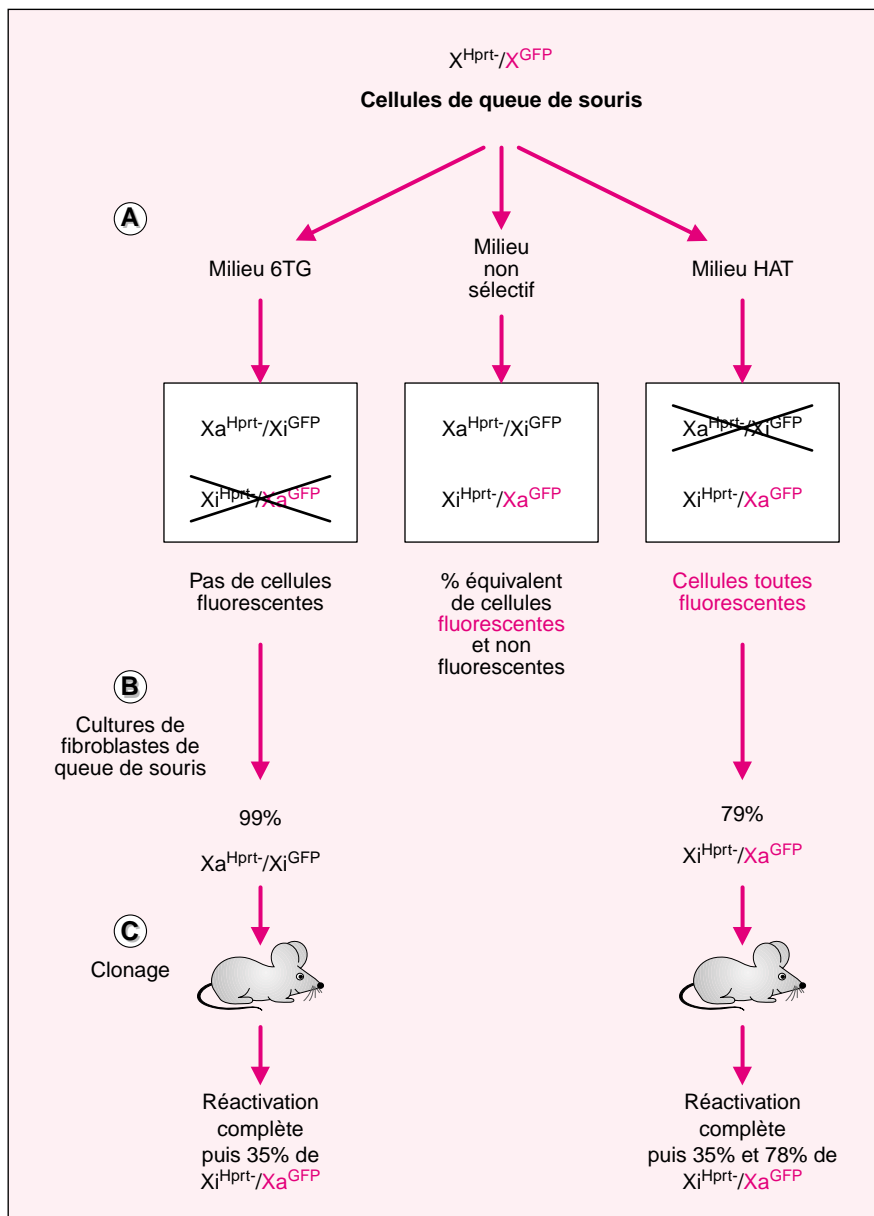


Figure 2. **Analyse des allèles de *Xist* après clonage de souris.** A. Sélection en culture de fibroblastes embryonnaires avec deux X différents : X^{Hprt} et X^{GFP} dont on peut éventuellement connaître l'origine parentale. B. Résultats observés par les auteurs en culture de fibroblastes embryonnaires de queue de souris, après passage en milieux sélectifs. C. Étude de la réactivation dans les embryons de souris obtenus par clonage de cellules sélectionnées après passages en milieu 6GT et HAT (d'après [5]).

* Le gène *Xist*, exprimé uniquement dans l' Xi , intervient dans l'inactivation (m/s 1996, n° 3, p. 409).

transfert, il fallait sélectionner les cellules Xi^{GFP} et, pour ce faire, cultiver en milieux sélectifs des cellules de souris femelles X^{Hprt}/X^{GFP} (figure 1A).

Après culture en milieu 6TG de fibroblastes de l'extrémité de la queue des souris X^{Hprt}/X^{GFP} , 99 % des cellules sont Xi^{GFP} . Dans les embryons clonés à partir de ces cellules, on obtient une réactivation complète avec 100 % de cellules fluorescentes, puis une inactivation se produit avec 35 % de cellules fluorescentes (figure 1B, C).

Après culture en milieu HAT, 79 % seulement des fibroblastes expriment la GFP, au lieu des 100 % attendus. Ceci pourrait être dû à une sélection incomplète des Xa^{GFP} , ou à l'extinction de certains gènes portés par l' Xa . La deuxième hypothèse semble la plus probable puisque ces cellules ne peuvent survivre lorsqu'elles sont remises en milieu 6TG, ce qui prouve que l' Xa avait un gène *Hprt* fonction-

nel et que les cellules étaient Xi^{Hprt}/Xa^{GFP} . Deux embryons furent obtenus après clonage des cellules sélectionnées en milieu HAT. Après mise en culture des tissus embryonnaires, 35 % de cellules expriment la GFP pour l'un et 78 % pour l'autre (de telles variations, entre 35 % et 78 %, peuvent aussi être observées chez des témoins, l'inactivation au hasard atteignant rarement l'équilibre de 50 %) (figure 1B, C).

Ce travail, très complet, démontre donc que les X perdent leur statut d'inactivation dans l'embryon, et que l'inactivation qui réapparaît chez l'embryon cloné est apposé sur n'importe lequel des deux X. Les résultats de cette étude laissent supposer que les marquages survenant dans les lignages somatiques, ou au cours de la spermatogenèse, sont équivalents puisqu'ils sont tous deux capables de déterminer une inactivation dans le trophoblaste extra embryonnaire.

1. Marcand S, Brun B, Ancelin K, Gilson E. Les télomères : du normal au pathologique. *Med/Sci* 1997 ; 13 : 1250-8.
2. Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, et al. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 2000 ; 288 : 665-9.
3. Tian XG, Xu J, Yang X. Normal telomere length found in cloned cattle. *Nat Genet* 2000 ; 26 : 272-3.
4. Wakayama T, Shinkai Y, Tamashiro HN, et al. Cloning of mice to six generations. *Nature* 2000 ; 407 : 318-9.
5. Eggar K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout W, Yanagimachi R, Jaenisch R. X-chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science* 2000 ; 299 : 1578-81.
6. Wutz A, Jaenisch R. A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation. *Mol Cell* 2000 ; 4 : 695-705.

Simone Gilgenkrantz

9, rue Basse, 54330 Clérey-sur-Brenon, France.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **La phosphatase SHIP2 contrôle la sensibilité à l'insuline.** L'inositol 5-phosphatase de type II contenant un domaine SH2 (SHIP2) est membre de la famille des inositol polyphosphate 5-phosphatases [1, 2]. Ces enzymes sont responsables de la dégradation des inositol phosphates, seconds messagers de nombreux facteurs de croissance. SHIP2 hydrolyse le phosphatidylinositol 3, 4, 5 triphosphate, produit de la phosphatidylinositol 3-kinase et médiateur clé de l'action de l'insuline sur le métabolisme de glucose. Des souris invalidées pour le gène codant pour SHIP2 ont été obtenues récemment [3]. Si leur phénotype à la naissance est normal, les souris *SHIP2*^{-/-} meurent rapidement d'hypoglycémie, sans glucosurie ni hypersécrétion d'insuline. La cause en serait qu'elles présentent, en fait, une augmentation de sensibilité à l'insuline. En effet, des injections répétées de glucose, de même que l'administration d'anticorps anti-insuline, permet-

tent une survie temporaire. Renforçant encore cette possibilité, une diminution de l'expression hépatique de plusieurs enzymes de la néoglucogenèse caractérise les homozygotes. La répression de cette voie métabolique par l'insuline compromet la production de glucose par le foie, nécessaire à la survie en période néonatale, ce qui contribue à aggraver l'hypoglycémie des nouveau-nés *SHIP2*^{-/-}. Les tests de tolérance au glucose et à l'insuline révèlent que l'absence d'un seul allèle du gène suffit à augmenter la sensibilité à l'insuline. Cette augmentation est mise en évidence dans les muscles squelettiques isolés des souris *SHIP2*^{-/-}, où la synthèse de glycogène est stimulée de façon accrue par des concentrations physiologiques d'insuline. Ces résultats révèlent que SHIP2 est un acteur moléculaire participant au contrôle de l'action de l'insuline. Diminuer l'activité de cette enzyme par des moyens pharmacologiques pourrait permettre d'amé-

liorer les états de résistance à l'insuline. Finalement, cette étude permet d'ajouter le gène de la SHIP2 à la longue liste des gènes de prédisposition au diabète de type II.

- [1. Pesesse X, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 ; 239 : 697-700.]
- [2. Ishihara H, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 ; 260 : 265-72.]
- [3. Clément S, et al. *Nature* 2001 ; 409 : 92-7.]

JOURNÉES INTERNATIONALES D'ENDOCRINOLOGIE CLINIQUE HENRI-PIERRE-KLOTZ

Société Française d'Endocrinologie
17-18 mai 2001

Les 44^{es} Journées Internationales d'Endocrinologie Clinique auront lieu à Paris les 17 et 18 mai 2001 et seront consacrées à : « Obésité : le retour vers l'endocrinologie »

Renseignements :
Dr G. Copinschi
Laboratoire de Médecine Expérimentale
Université Libre de Bruxelles - CP 618
808, route de Lennik
B-1070 Bruxelles - Belgique