

Université de Montréal

Effets de la reprogrammation sur le gène empreinté H19 chez les équins

Par MIKHAEL POIRIER

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de
l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires option reproduction

Août 2014

©Mikhael Poirier, 2014

Résumé

Lors de la fécondation, le génome subit des transformations épigénétiques qui vont guider le développement et le phénotype de l'embryon. L'avènement des techniques de reprogrammation cellulaire, permettant la dédifférenciation d'une cellule somatique adulte, ouvre la porte à de nouvelles thérapies régénératives. Par exemple, les procédures de transfert nucléaire de cellules somatique (SCNT) ainsi que la pluripotence par induction (IP) visent à reprogrammer une cellule somatique adulte différenciée à un état pluripotent similaire à celui trouvé durant la fécondation chez l'embryon sans en impacter l'expression génique vitale au fonctionnement cellulaire. Cependant, la reprogrammation partielle est souvent associée à une mauvaise méthylation de séquences géniques responsables de la régulation des empreintes géniques. Ces gènes, étudiés chez la souris, le bovin et l'humain, sont exprimés de manière monoallélique, parent spécifique et sont vitaux pour le développement embryonnaire. Ainsi, nous avons voulu définir le statut épigénétique du gène empreinté H19 chez l'équin, autant chez les gamètes que les embryons dérivés de manière *in vivo*, SCNT ainsi que les cellules pluripotentes induites (iPSC). Une région contrôle empreinté (ICR) riche en îlots CpG a été observée en amont du promoteur. Couplé avec une analyse de transcrite parent spécifique du gène H19, nous avons confirmé que l'empreinte du gène H19 suit le modèle insulaire décrit chez les autres mammifères étudiés et résiste à la reprogrammation induite par SCNT ou IP. La déméthylation partielle de l'ICR observée chez certains échantillons reprogrammés n'était pas suffisante pour induire une expression biallélique, suggérant un contrôle des empreintes chez les équins durant la reprogrammation.

Mots clés : Épigénétique; Reprogrammation; SCNT; iPSC; H19; Équin; ICR

Abstract

After fertilization, the animal genome undergoes a complex epigenetic remodeling that dictates the growth and phenotypic signature of the animal. The development of reprogramming methods using adult differentiated cells as the primordial genetic source has opened the door to new regenerative therapies for animals. Somatic cell nuclear transfer (SCNT) and induced pluripotency are two techniques which aim to reprogram a cell from its adult differentiated state to an embryonic-like pluripotency level, without impairing the expression of genes vital for the cellular function. Albeit promising, the mechanisms involved in these techniques remain only moderately understood. Partial reprogramming is frequently associated with irregular methylation of DNA sequences responsible for imprint regulation. These imprinted genes, mostly studied in rodents, cattle and humans, are expressed in a monoallelic parent-specific fashion and are vital for embryo growth. Hence, we aim to define the equine H19 imprinting control region (ICR) in gametes, *in vivo* and in SCNT derived embryos, as well as in induced pluripotent stem cells (iPSC). A CpG rich ICR was characterized upstream of the promotor using bisulfite treated DNA sequencing. Coupled with parent-specific gene expression analysis, we confirmed that the imprinted gene H19 is resistant to cellular reprogramming, and that partial demethylation of its ICR does not result in biallelic expression, suggesting that equine species have rigorous imprint maintenance during cellular reprogramming.

Keywords: Epigenetics; Reprogramming; SCNT; iPSC; H19; Equine; ICR

Tables des Matières

Résumé.....	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles et abréviations	ix
Remerciements	xi
1.Introduction	1
2.Chapitre 1 : Recension de la littérature.....	3
2.1 Introduction.....	3
2.2 Modifications Épigenétiques.....	4
2.3 Empreinte Génomique.....	7
2.4 La grappe H19-IGF2.....	9
2.4.1 Rôle de H19.....	11
2.5 Technologies de reprogrammation génomique.....	13
2.5.1 Transfert Nucléaire de cellule somatique (SCNT).....	13
2.5.1.1 Maturation oocytaire <i>in vitro</i> (IVM).....	14
2.5.1.2 Reconstruction Ovocytaire.....	15
2.5.2 Cellules Souches.....	16

2.5.2.1	Cellules souches adultes.....	17
2.5.2.1.1	Cellules souches des tissus adipeux (AT-MSCs).....	18
2.5.2.1.2	Cellules souches de la moelle osseuse (BM-MSCs)	19
2.5.2.2	Cellules souches extra-embryonnaires.....	19
2.5.2.3	Cellules souches embryonnaires.....	20
2.5.2.4	Cellules souches à pluripotence induite (iPSC).....	22
3.	Chapitre 2 : Hypothèse et objectifs.....	27
3.1	Hypothèse.....	27
3.2	Objectifs.....	27
3.2.1	Objectif général.....	27
3.2.2	Objectifs spécifiques.....	27
3.3	Conception expérimentale.....	27
4.	Chapitre 3 : Article.....	30
ABSTRACT	31
INTRODUCTION	32
MATERIAL AND METHODS	34
RESULTS	40
DISCUSSION	45
REFERENCES	50
FIGURE LEGENDS	54
TABLES	55
FIGURES	57

5.Chapitre 4 : Discussion.....	61
5.1 Caractérisation de H19 chez l'adulte	61
5.2 Expression de H19 chez la mule fœtale in vivo.....	62
5.3 Impact du SCNT sur H19.....	63
5.4 La résistance de H19 chez les IPSc.....	63
5.5 Perspectives de recherche.....	64
6.Conclusion.....	68
7.Bibliographie.....	69

Liste des tableaux

Chapitre 3

Table I. PCR primers for bisulfite treatment, allelic expression and relative overall expression..55

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1 : Progrès des marques épigénétiques chez les gamètes de la souris.....6

Figure 2 : **(A)** Développement de la méthylation chez la lignée germinale murine. **(B)** Reprogrammation de la méthylation chez l'embryon pré-implantaire.....8

Figure 3 : Modèle insulaire simplifié de la grappe empreinte H19-IGF211

Figure 4 : Comparaison schématique des techniques de reprogrammation.....25

Chapitre 2

Figure 1 : Plan schématique du design expérimental.....28

Chapitre 3

Figure 1 : Characterization and identification of SNPs in the ICR of the equine H19 imprinted gene and transcript. **(A)** Establishment of the allele segregation within the mule for genomic methylation and cDNA quantification. **(B)** Conservation of the CTCF binding motif throughout bovine, human, rat, mouse, and equine. **(C)** Methylation levels of equine gametes and adult fibroblasts of both paternal (♂) and maternal(♀) alleles.....57

Figure 2: Methylation and expression of H19 in day 50 *in vivo* mule embryo. **(A)** Methylation patterns of embryonic (EM) and extra-embryonic (EX) tissues of both paternal (♂) and maternal(♀) alleles. **(B)** Methylation of H19 ICR of paternal and maternal allele in both embryonic (EM) and extra-embryonic (EX) tissues. **(C)** Maternal monoallelic expression of H19 in EM and EX tissues.....58

Figure 3: Methylation and expression of H19 in cloned mule embryos. **(A)** Methylation patterns of embryonic (EM) and extra-embryonic (EX) tissues of both paternal (♂) and maternal(♀) alleles. **(B)** Methylation of H19 ICR CTCF-A of paternal and maternal allele in both

embryonic (EM) and extra-embryonic (EX) tissues. **(C)** Maternal monoallelic expression of H19 in EM and EX tissues.59

Figure 4: Pluripotency, methylation and expression of H19 in hybrid equine IPS cells. **(A)** Expression levels of pluripotency markers OCT4 and Nanog in embryonic fibroblasts(EF) and heIPS. **(B)** Methylation patterns of equine fibroblasts (EF), hybrid equid IPS cells at passage 0260

(heIPS P02) and 10 (heIPS10) respectively of both paternal (♂) and maternal(♀) alleles **(C)** Methylation of H19 ICR CTCF-A of paternal and maternal allele in both EF and heIPS of passage 02 and 10. **(D)** Maternal monoallelic expression of H19 in EF, heIPS P02 and P09.....50

Chapitre 4

Figure 1 : Schéma synoptique du processus de méthylation durant la réplication cellulaire.....66

Liste des sigles et abréviations

AID	Activation-induite déaminase
AT-MSC	<i>Adipose tissue mesenchymal stem cell</i>
BM-MSC	<i>Bone marrow mesenchymal stem cell</i>
BWS	<i>Beckwith-Wiedemann syndrome</i>
CTCF	Facteur de répression CCCTC
CpG/CG	<i>Cytosine phosphate guanine site</i>
DMR/DMD	<i>Differentially Methylated Region / Domain</i> Région / Domaine Différentiel Méthylé
DNMTs	<i>Mammalian DNA methyltransferase</i> ADN Méthyltransférase Mammifère
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> Acide désoxyribonucléique
EM	<i>Embryonic tissues</i>
EX	<i>Extra-embryonic tissues</i>
ICM	<i>Inner cell mass</i>
ICR	<i>Imprinting Control Region</i> Région Contrôle Empreinte
IP	<i>Induced Pluripotency</i>
iPSC	<i>induced pluripotent stem cell</i> Cellule souche pluripotente induite
IVM	<i>In vitro maturation</i>

Klf4	<i>Krupple-like factor 4</i> Facteur Krupple-like 4
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
MKOS	Facteurs de reprogrammation Yamanaka (c-Myc, Klf4, Oct4 et Sox2)
c-Myc	Facteur de transcription c-myc
NT-ESc	<i>Nuclear transfer embryonic stem cells</i>
Oct 4	Facteur de transcription liant l'octamere 4
PGC	<i>Primordial germ cell</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> Acide ribonucléique
SCNT	<i>Somatic cell nuclear transfer</i> Transfert nucléaire de cellule somatique
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
Sox2	<i>(sex determining region Y)-box 2</i> Facteur de transcription de la région de détermination Y, boîte2
SRS	<i>Silver Russell syndrome</i>
SSEA-1	<i>Stage-specific embryonic antigen 1</i>
TET 1	<i>Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1</i> 10-11 translocation méthylcytosine dioxygénase 1

Remerciements

Ces travaux de recherche ont pu être réalisés grâce à l'aide de plusieurs personnes à travers leur support.

En premier lieu, je tiens à remercier le personnel du laboratoire du Dr. Smith, qui m'a épauler tout au long de cette maîtrise. Remerciements spéciaux à Jacinthe et France, qui m'ont initié aux joies des mini-preps et des sondes Sybr Green.

Au Dr. Smith, qui m'a donner les outils et le support nécessaire à accomplir ce mémoire et qui m'a aider à parfaire mon raisonnement scientifique.

Finalement, je tiens à remercier ma famille, mes amis, minha cara metade et toute personne de proche ou de loin qui m'a supporté et accompagné dans ce périple.

1.Introduction

Les marques épigénétiques gouvernent l'expression génique des cellules et des tissus en étant dynamique tout au long de la vie. Étudier ces marques nous donne des informations sur ce qu'il faut pour avoir une cellule différenciée, dans différents tissus et à différents stades du développement. Ces modifications étant réversibles, la reprogrammation visant l'activation des gènes de pluripotence en remodelant les marques épigénétiques comme la méthylation de l'ADN ou les modifications d'histones devient un domaine de recherche grandissant.

Certaines méthodes de reproduction emploient la reprogrammation des cellules pour conserver un phénotype précieux en industrie. En 2000, des chercheurs de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal ont créé le premier veau issu d'un clonage post-mortem de Hanoverhil Starbuck, un taureau dont la semence aura généré plus de 25 million de dollars tout au long de sa vie (CIAQ, 2014). D'autres méthodes reprogramment des cellules afin de dériver du matériel pour de potentielles thérapies régénératives. En 2006, un groupe de chercheurs japonais mené par Yamanaka ont réussi à reprogrammer des cellules somatiques pleinement différenciées en cellules souches pluripotentes induites (iPSC) [Takahashi and Yamanaka, 2006]. Cependant, l'impact épigénétique de ces techniques reste encore partiellement obscur. Ainsi, certains gènes, tels les gènes empreintes, doivent d'être maintenus durant le développement embryonnaire et peuvent être affectés par ces méthodes de reprogrammation.

Les gènes empreintés, s'exprimant de manière monoallélique et parent-spécifique, possèdent des patrons épigénétiques acquis durant la gamétogénèse et maintenu tout au long

de la vie de l'animal, dans tout les tissus. Une des empreintes les plus connues, celle du gène H19, joue un rôle crucial dans le développement embryonnaire. Nombreuses maladies génétiques sont associés avec une activation anormale de H19 provoquant des anomalies de croissance.

Ce mémoire relate de manière exhaustive comment l'épigénétique des gènes empreintés est régulée et de quelle manière certains protocoles de reprogrammation cellulaire sont prônes à modifier ces mécanismes rigoureusement maintenus. Subséquemment, il rapporte les études faites sur la caractérisation du gène H19 chez l'équin et sa sensibilité à deux techniques de reprogrammation, soit le clonage par transfert nucléaire (SCNT) et la reprogrammation par induction (iPSC).

2. Recension de la littérature

2.1 Introduction

Le concept de l'hérédité a été popularisé par Gregor Mendel à travers ses travaux sur la transmission générationnelle phénotypique chez les pois [Henig, 2000]. Depuis, cette théorie s'est vue grandement raffinée, allant au delà des traits dominants et récessifs. Le domaine grandissant de l'épigénomique vise à dresser un portrait qui démontre non seulement les mécanismes complexes qui permettent la transmission de traits entre les générations, mais aussi l'expression génique dynamique durant la vie d'un organisme vivant. À travers le code génétique se trouve des épimutations qui donnent lieu à la différenciation cellulaire, un processus cellulaire et tissulaire rigoureusement contrôlé. Plusieurs protocoles et techniques, dont le succès est très mitigé, visent à recréer les différents stades et états d'expression géniques présents durant le développement de l'organisme. Ces techniques, permettant de dériver des cellules ayant un profil d'expression différent de leur état original, ont un futur prometteur dans le domaine de la médecine régénérative [Papp et al., 2011]. Certains animaux ayant une valeur sentimentale et monétaire irremplaçable, notamment les chevaux, pourrait bénéficier de la production de cellules autologues, prévenant le rejet immunologique lors de traitements cellulaires. Il devient intéressant de mesurer l'impact de ces techniques de reprogrammation et différenciation cellulaire sur l'intégrité épigénétique du matériel pour s'assurer de la pérennité des cellules employées dans les thérapies régénératives. Ainsi, voici un bref résumé discutant de l'effet de l'épigénétique sur l'expression génique et comment certains protocoles changent l'expression génétique en altérant la signature épigénétique d'une cellule.

2.2 Modifications épigénétiques

L'épigénétique est définie comme l'ensemble des mécanismes moléculaires influençant l'expression génique sans l'altération du code génétique. Waddington reconfirmera ce concept en soulignant dans ses travaux l'impact de la variation d'expression génique sur la manifestation de phénotypes différents [Gilbert et al., 2000]. Le rôle des modifications épigénétiques est de coordonner l'arrangement spatial, l'expression des gènes ainsi que la différenciation cellulaire tout au long de la vie de la cellule [Zadi et al., 2010]. Les cellules d'un organisme ayant le même génotype, ces modifications permettent d'altérer la transcription des gènes à l'intérieur de certaines cellules, donnant place à une différenciation en tissus spécifiques [Jablonka et al., 2009]. Afin de posséder ces modifications épigénétiques, l'ADN en chromatine doit subir plusieurs changements, notamment les modifications d'histones et la méthylation de l'ADN. Les modifications post-traductionnelles des histones, comme la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation sont définies comme étant plus dynamiques que la méthylation de l'ADN, dues à la grande quantité d'enzymes impliquées dans leur élaboration [Filion et al., 2010].

Les modifications d'histones agissent en changeant la structure de la chromatine ainsi qu'en recrutant des facteurs de liaison à la chromatine [Clapier, Cairns, 2009], tandis que la méthylation de l'ADN agit majoritairement comme un répresseur de gènes. La méthylation de l'ADN a lieu sur des îlots CpG chez les mammifères, consistant de la méthylation de la cytosine sur le carbone 5 d'un dimère CG. La plus grande densité de ces îlots méthylés sont associés avec l'hétérochromatine, résultant d'un repliement et de l'inactivation de la séquence d'ADN

[Doerfler, 2008]. La méthylation de l'ADN est possible grâce à deux familles d'ADN methyltransferases (DNMTs); DNMT3s pour la méthylation *de novo* durant le développement embryonnaire [Okano et al., 1998] et les DNMT1s pour la méthylation d'entretien [Chen-Blumenthal, 2008]. Durant la phase S du cycle cellulaire, la structure de la chromatine est remaniée et plusieurs modifications épigénétiques sont perdues. Afin de les rétablir, la DNMT1 interagi avec le brin d'ADN hémi-méthylé afin de donner au CpG du brin complémentaire un groupe méthyle [Hermann et al., 2004]. Parce que ce processus est très rigoureux et stable, la méthylation de l'ADN est considéré comme étant un excellent outil indicateur de l'expression génique à travers la division cellulaire [Feng et al., 2006]. Inversement, le processus de déméthylation serait déclenché par le manque d'activité passive des DNMT lors de la division cellulaire [Popp et al., 2010].

Les DNMTs pour la méthylation *de novo* sont les principaux acteurs de l'établissement des marques épigénétiques et fournissent ces marques à deux moments, soit la création de cellules primordiales germinales et la reprogrammation embryonnaire lors de la pré-implantation. Cette programmation prépare les cellules à l'état toti- et pluripotent et prévient la transmission de marques épigénétiques entre les générations [Feng et al., 2010]. Cette progression a été grandement étudiée chez la souris, partant du développement cellulaire germinale jusqu'au stade zygotique. La formation de cellules germinales a lieu au jour embryonnaire 7 (E7) [Sasaki et al., 2008] grâce à la déméthylation tout au long de la migration des PGCs jusqu'aux gonades avant que la méiose ait lieu [Seki et al., 2005]. À ce moment, le génome est méthylé à moins de 10%, comparativement à des niveaux entre 70%-80% chez les

cellules embryonnaires et somatiques [Popp et al., 2010]. Les PGCs subissent ensuite la différenciation sexuelle et acquièrent le portrait épigénétique propre au sexe des gamètes. Ces dernières sont l'objet d'une reprogrammation additionnelle durant la fécondation. La reprogrammation de l'oocyte fécondé va permettre la différenciation cellulaire des lignées embryonnaire et extra embryonnaire [Reik et al., 2001]. Ce cycle englobe les deux moments où les cellules subissent une reprogrammation exhaustive. Cependant, certains gènes sont capables de maintenir leurs marques épigénétiques tout au long de la fécondation et du développement embryonnaire.

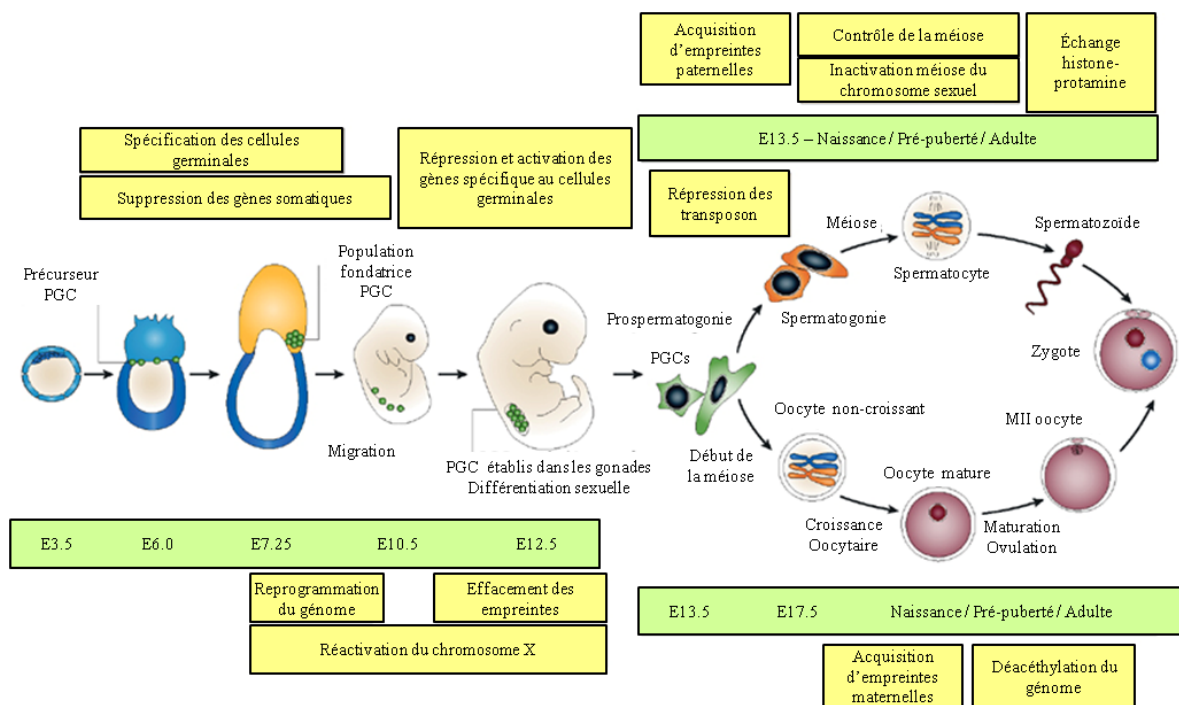


Figure 1 - Progrès des marques épigénétiques chez les gamètes de la souris. Les PGCs dérivées de la fécondation subissent une déméthylation exhaustive du génome (~E7.5) et une fois migrées

dans les gonades perdent leur empreintes géniques (~E12.5) puis la différenciation sexuelle a lieu, laissant place à des gamètes possédant des profils épigénétiques distincts. L'acquisition des empreintes paternelles (~E13.5) est plus hâtive que celles maternelles (~E17.5). La perturbation de cette acquisition épigénétique donne lieu à des troubles de croissance et de fécondation.

2.3 Empreinte Génomique

L'empreinte génomique est un statut épigénétique par lequel seulement une allèle d'un gène est exprimée selon son origine parentale. Ces gènes empreints sont exprimés de manière mono-allélique. Ils sont organisés en grappes et régulés par une région différentielle méthylée (DMR), aussi appelée région d'empreinte contrôle (ICR). Ces ICRs sont des éléments d'ADN intergénique qui, à travers leur état de méthylation, régulent l'expression génique. Chez la lignée germinale femelle, le DMR est dans une région promotrice [Kacem and Feil, 2009] duquel la méthylation résulte invariablement en la répression du gène [Hajkova et al., 2002]. L'acquisition des ces empreintes génique a lieu durant la gamétogénèse et est acquise de manière spécifique au sexe. Ces marques sont maintenues tout le long de la fécondation et du développement embryonnaire (Fig.2). Les empreintes sont effacées uniquement lors de la création de PGCs de la nouvelle génération et réacquis selon le sexe des gamètes. La DNMT3a permet la méthylation des ICRs chez les cellules germinales mâles commençant au jour E15 (prospérmato-genèse), tandis que cette méthylation est plus lente chez les cellules germinales femelles [Kaneda et al., 2010].

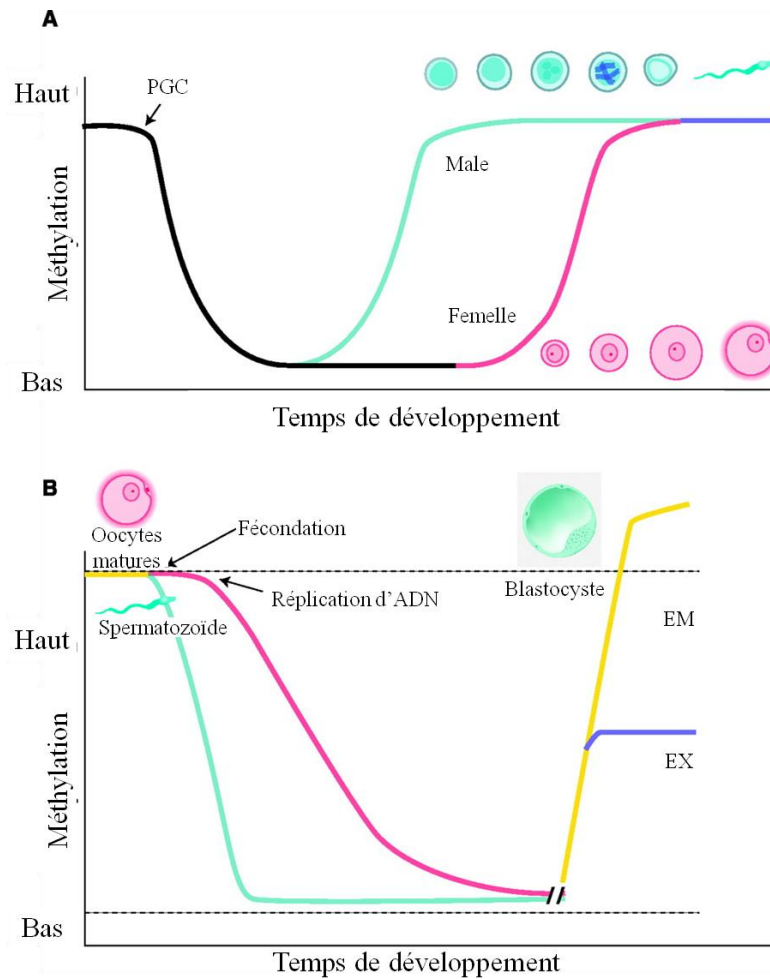


Figure 2 - (A) Développement de la méthylation chez la lignée germinale murine. Les PGCs sont déméthylés entre E7.5 et E13.5. La reméthylation chez la cellule germinale mâle prend place durant la prospermatogonie et le développement folliculaire post-natal chez la femelle. **(B) Reprogrammation de la méthylation chez l'embryon préimplantatoire.** Le génome paternel (bleu) est activement déméthylé après la fécondation. Le génome maternel (rouge) est déméthylé sur une plus longue période de temps. La reméthylation a lieu autour de l'implantation à différentes étapes afin de créer les tissus embryonnaires et extra-embryonnaires (EM et EX). Les gènes empreintés (ligne pointillée) sont imperméables à ce procédé et maintiennent leur état méthylé [Reik et al., 2001].

Cependant, la DNMT1 est nécessaire pour maintenir ces empreintes, et des expériences ont démontré qu'une perte de DNMT1 mène à une dégradation lente des empreintes, tel H19 [Reik

and Dean, 2005], ce qui donne lieu à une variation phénotypique chez les progénitures. Ainsi, durant les événements de reprogrammation de la fécondation, les empreintes géniques résistent la déméthylation active du génome paternel tout en protégeant l'allèle maternel de la méthylation *de novo*, maintenant leur expression allèle spécifique.

2.4 La grappe H19-IGF2

L'étude des empreintes nous permet de mieux comprendre les mécanismes d'activation des gènes durant le développement embryonnaire et leur impact sur le phénotype des progénitures. Une des empreintes les plus étudiée est la grappe H19 – Insulin Growth Factor 2 (IGF2). Bien que la plupart des expériences faites sur cette grappe sont chez la souris, il a été démontré que les mécanismes responsables de la régulation de ces gènes sont conservés à travers les espèces comme l'humain et le bovin [Bartolomei and Tilghman, 1997; Suzuki et al., 2011]. H19 encode un ARN non codant (ncRNA) de 2.3 kb qui était présumé être un suppresseur tumoral [Reik and Walter, 2001]. Cependant, de récentes études démontrent que H19 aurait des propriétés oncogéniques [Chen et al., 2000]. IGF2 encode une protéine qui promeut le développement et la croissance embryonnaire et placentaire [DeChiara et al., 1990]. De plus, ces deux gènes encodent aussi des microARNs possédant des fonctions qui demeurent encore inconnues [Cai and Cullen, 2007]. Comme la plupart des empreintes géniques, cette grappe est régulée par un ICR qui est positionné entre les deux gènes. Cette région varie en grandeur à travers les espèces et elle agit en tant que région isolatrice en régulant l'interaction des promoteurs H19 et IGF2 avec leur séquence activatrice, située en amont du gène H19 (Fig. 3). La

délétion de cet ICR cause la perte d'empreinte et provoque la surexpression de IGF2 [Thorvaldsen et al., 1998].

L'empreinte conventionnelle de H19-IGF2 consiste de la méthylation de l'ICR chez l'allèle paternelle et inversement, la déméthylation de l'allèle maternelle. L'hypométhylation de l'ICR chez les deux allèles provoque l'expression biallélique de H19 et une répression de IGF2 [Engel et al., 2004]. Cet ICR est composé de séquences répétées étant conservées à travers plusieurs espèces, suggérant que le tandem d'empreintes H19-IGF2 est maintenu chez les mammifères [Stadnick et al., 1999]. Une fois déméthylées, ces séquences permettent la liaison de la protéine insulaire facteur de liaison CCCTC (CTCF) sur le ICR (Fig.3) [Bell and Felsenfeld et al., 2000]. Le dernier modèle d'empreinte suggère que la liaison du CTCF sur le ICR déméthylé protège ce dernier de la méthylation *de novo*, prévenant les activateurs en aval d'interagir avec IGF2 et ultimement permet la transcription de H19. Chez l'allèle paternel, le CTCF est incapable de se lier au ICR méthylé, ainsi IGF2 est exprimé et H19 inactivé (Fig. 3). Des expériences montrent que la mutation de ce site de liaison CTCF nuit au maintien de cette empreinte, mais pas l'acquisition de celle-ci [Schoenherr et al., 2003]. Même si le mécanisme d'empreinte de type insulaire est largement accepté, plusieurs trouvailles révèlent l'implication d'autres molécules dans le maintien de la grappe H19-IGF2. De récentes recherches suggèrent que les cohésines, des complexes protéiques connectant les chromatides sœurs, sont colocalisées avec le facteur CTCF de manière allèle spécifique, mais son implication dans l'activation du CTCF ou inversement, le recrutement des cohésines par le facteur CTCF, demeure inexplicé [Stedman et al., 2008].

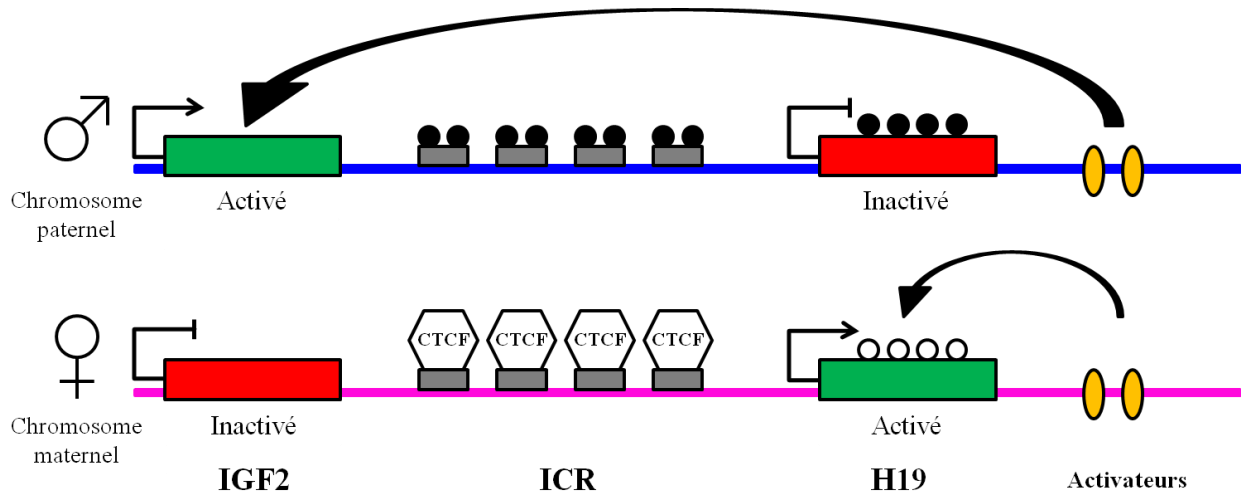


Figure 3 - Modèle insulaire simplifié de la grappe empreinte H19-IGF2. Chez l'allèle maternelle, le ICR déméthylé permet l'arrimage du CTCF et possiblement le recrutement d'autres éléments distaux. Les activateurs ne peuvent accéder au locus IGF2, et ainsi ils activent l'expression de H19. Inversement, la méthylation de l'ICR sur l'allèle paternelle empêche la liaison du CTCF et les activateurs ont accès au locus IGF2, ce qui permet sa transcription. Cette grappe est un bon exemple d'une régulation insulaire d'expression génique parent spécifique.

L'ensemble des connaissances sur la grappe empreinte H19-IGF2 étant incomplet, particulièrement chez des espèces autre que la souris et l'humains, des recherches additionnelles sont requises afin de comprendre les effets de la variance de cette grappe.

2.4.1 Rôle de H19

Le gène H19 fut décrit par le laboratoire Tilghman en 1984, qui initialement dépistait des gènes activés par une protéine fœtale du foie chez la souris. Ce gène a été identifié étant le 19ème clone de la rangée H lors du test, d'où vient son nom [Pachnis et al., 1984]. H19 a été subséquemment associé avec des gènes impliqués dans la différenciation de cellules souches embryonnaires [Poirier et al., 1991]. L'étude de mutants de H19 a révélée la présence d'un ICR, en plus d'activateurs endodermique et mésodermique. Ainsi, H19 est fortement exprimé lors du

développement embryonnaire, principalement dans les tissus du mésoderme et l'endoderme. Ce gène est inactivé à la naissance, à l'exception des cellules du muscle cardiaque et squelettique, suggérant un rôle dans la différenciation musculaire [Pachnis et al., 1988]. H19 produit un ARN non codant (ncRNA), duquel aucune protéine a été associée, qui est majoritairement localisé dans le cytoplasme, bien qu'il est présent aussi dans le nucleus [Seidl et al., 2006]. H19 et IGF2 démontrent des patrons d'expressions semblables dans les tissus au cours des différents stade de développement de l'embryogénèse [Zemel et al., 1992], où ils sont chacun exprimés de manière monoallélique. Ainsi, bien que le rôle de la protéine codé par le gène H19 demeure ambigu, son impact modulateur de l'expression de IGF2 au niveau de l'ADN du ICR fait de lui un gène d'étude important.

Pour ce qui est de l'acquisition de l'empreinte de H19, il est intéressant de souligner que si les empreintes maternelles de H19 sont acquises lors de la gamétogénèse, l'empreinte complémentaire paternelle de IGF2 quant à elle est établie post fécondation, suggérant un ordre d'acquisition des empreintes [Lopes et al., 2003]. Si cette empreinte est mal acquise, des problèmes de croissance peuvent avoir lieu. Par exemple, des souris n'exprimant pas H19 ont démontré une augmentation de poids sans aucun autre phénotype observé. Ceci est expliqué par une empreinte fautive de IGF2, causant le syndrome du gros veau. La perte d'empreinte et l'expression aberrante de H19-IGF2 résulte dans la surcroissance de tissus somatiques associée à plus de vingt types de cancer [Kaneda et al., 2005]. Des défauts d'empreinte de H19-IGF2 sont responsable pour les syndromes de Beckwith-Weidemann (BWS) et Silver-Russell (SRS), deux maladies caractérisées par une méthylation fautive de l'ICR, soit respectivement

l'hyperméthylation et l'hypométhylation [Reik et al., 1995]. Le phénotype du BWS est l'hypertrophie des membres, de la langue et des glandes surrénales, tandis que le SRS est caractérisé par un nanisme primordial. Ces empreintes fautes ont été observées dans plusieurs méthodes de reprogrammation chez le bovin, la souris et l'humain [Suzuki et al., 2009; Ogawa et al., 2003; Pick et al., 2009;], qui tendent à recréer la reprogrammation épigénétique ayant lieu dans l'embryon pré-implantatoire (Fig.2).

2.5 Technologies de reprogrammation génomiques

H19 est donc un gène empreinte qui s'exprimerait selon le modèle insulaire suggéré chez les mammifères. Lorsque son intégrité est compromise, de nombreux problèmes liés à la croissance apparaissent, comme le BWS et le SRS. Les technologies de reprogrammation offrant un large éventail de thérapies régénératives, il est donc important de s'assurer que celle-ci n'impacte pas le gène H19 pour assurer une croissance normale des tissus et cellules dérivés par ces techniques.

2.5.1 Transfert nucléaire de cellule somatique (SCNT)

Le transfert nucléaire a été effectué en premier chez les amphibiens afin d'adresser le concept d'équivalence nucléaire durant la différenciation cellulaire. La capacité d'une cellule différenciée à se transdifférencier en tissus d'autres lignées suggérait aucune perte de matériel génétique durant la différenciation. Des décennies plus tard, le clonage des mammifères à l'aide de cellule somatique est un outil pour la conservation de phénotype précieux dans l'industrie de la reproduction animale [Wilmut et al., 1997]. Un oocyte mûré *in vitro* est énucléé, puis une

cellule donneuse y est injecté et électro fusionné avec son hôte. La fusion consiste à placer le couplet cellule-oocyte entre 2 électrodes, puis d'y faire passer un courant, créant une variation de potentiel électrique rendant la membrane de la cellule et la membrane cytoplasmique de l'oocyte perméables, permettant la fusion de la cellule donneuse. Ce couplet fusionné est ensuite activé puis mis en culture pour favoriser son développement et si il y a formation de blastocyste, implanté dans un animal hôte [Wilmut et al., 1997]. Malgré le raffinement progressif de cette procédure sur plusieurs animaux différents tels que le mouton, la vache et le cheval, le SCNT demeure hautement inefficace [Dean et al., 2001]. Des taux élevés d'avortement, le surpoids des nouveau nés, ainsi que la mort périnatale ont été observés chez les progénitures issues du SCNT [Cibelli et al., 1998]. Des études sur les bovins démontrent que les clones morts possédaient une expression biallélique d'une série d'empreintes génique, notamment H19 [Xue et al., 2002], tandis que les clones survivants démontrait une expression normal de ces gènes. Ceci suggère que le SCNT pourrait influencer l'intégrité épigénétique du génome chez l'embryon préimplantatoire. Plusieurs étapes du SCNT pourraient provoquer une empreinte fautive dans le génome, chacune pouvant potentiellement influencer la grappe H19-IGF2 et subséquemment produire des cellules démontrant une croissance anormale

2.5.1.1 Maturation oocytaire In Vitro (IVM)

La maturation d'oocytes *in vitro* est utilisé pour augmenter le nombre d'oocytes disponible pour le transfert nucléaire. Suite à la collection d'oocytes immature, la maturation est faite en conditions *in vitro* spécifiques, en milieu anaérobique, température contrôlée et en utilisant plusieurs hormones (Voir section 2.2). Un oocyte mal muri pourrait ne pas avoir la

machinerie protéique nécessaire au maintien et l'acquisition d'empreintes sur la cellule donneuse. De la méthylation anormale a été observée chez des oocytes murins mûris *in vitro* [Kerjean et al., 2003]. De plus, des zygotes issus d'oocytes porcins mis à maturité *in vitro* ont montré une plasticité épigénétique réduite du pronucléus male [Gioia et al., 2005]. De plus, le syndrome de gros veau a été observé chez des progénitures conçues par IVF à l'aide d'oocytes IVM chez les ovins et le bovins, suggérant une composition inadéquate de la machinerie protéique nécessaire au maintien des empreintes [Young et al., 1998].

2.5.1.2 Reconstruction ovocytaire

Afin de réussir une procédure de clonage, le patron épigénétique de la cellule somatique donneuse doit être effacé, puis reprogrammé à un état de préimplantation embryonnaire. Dans le développement naturel des embryons, ce procédé prend place lentement durant la gamétogénèse et la fécondation [Morgan et al., 2005]. En contraste, le remodelage épigénétique dans l'embryon chez le SCNT doit se produire durant une période plus courte avant l'activation du génome zygotique [Zuccotti et al., 2000]. Lors du SCNT, toutes les conditions du système reproducteur femelle, normalement retrouvées en milieu *in vivo*, sont modifiées, ce qui peut provoquer des erreurs d'empreinte. Des animaux issus du SCNT possédant un phénotype anormal ont pu donner naissance à une progéniture phénotypiquement normale, ceci suggérant des modifications épigénétiques plutôt que génomiques [Tamashiro et al., 2002]. D'autres recherches avancent que le placenta est aussi sensible au remodelage épigénétique. Plusieurs gènes empreintés ont été trouvés en quantité anormalement basse chez des souris issues du SCNT, tandis que les niveaux d'expression des tissus embryonnaires ont été maintenus [Inoue et

al., 2006]. Ainsi, au-delà de la reprogrammation ayant lieu lors du transfert nucléaire chez l'oocyte, les risques inhérents de la culture in vitro du blastocyste avant son transfert dans le milieu utérin pourrait jouer un rôle dans l'expression de gènes embryonnaires et extra-embryonnaires chez le clone.

Bien que la procédure de transfert nucléaire de cellule somatique est une technique intéressante pour dériver du matériel génétique autologue pour d'applications cliniques dans la médecine régénérative, elle peut poser des problèmes de nature éthique quant au sacrifice d'embryons qui y est rattaché. Puisqu'il est possible d'étudier ce phénomène chez les animaux, il est possible de penser que les avancées futures chez le clonage auront de la difficulté à se transposer rapidement chez l'humain. Heureusement, d'autres techniques existent pour dériver du matériel autologue avec de futures applications cliniques, notamment l'emploi de cellules pluripotentes souches naturelles ou induites.

2.5.2 Cellules souches

Ce qui rend les cellules souches très attrayantes dans le domaine clinique, c'est que non seulement on peut les trouver dans l'animal qui est en besoin de traitement, mais que celle ci ont l'habileté d'auto-renouvellement ainsi que de différenciation en au moins un des 3 lignes cellulaire germinales[Vidal, 2007]. Bien que la médecine régénérative fait de grand pas chez l'humain et la souris, la vitesse à laquelle des traitements sont offerts chez d'autres animaux est lente, quoique croissante [Smith, 2008]. De plus, certains types de cellules souches trouvées chez l'animal ne requiert pas nécessairement de reprogrammation, mais simplement la différenciation dans le tissu requis. Cependant, la qualité et la capacité de ces cellules varient

grandement dépendamment de l'âge de l'animal et du type de cellules souches recueillies, ce qui peut changer leur capacité de plasticité, soit la capacité de différenciation en multiples souche germinales. On regroupe trois niveaux de plasticité chez les cellules souches, soit les cellules souches totipotentes, pluripotentes et multipotentes. On définit les cellules totipotentes comme les cellules capables de former toute les cellules ou tissus lors de la formation d'un organisme, tel l'ovule fécondé ou le zygote. Les cellules pluripotentes ont le pouvoir de se différencier en une grande portion des lignées cellulaires d'un organisme, comme les cellules souches embryonnaires. Quant aux cellules de type multipotentes, on les décrit comme capable de se différencier en cellules restreintes à une lignee germinales, comme les cellules souches hématopoïétique ou menseschymales. Avec ces différentes plasticités, on juge la qualité d'un traitement de cellules souches selon les critères suivant: la quantité de cellules fournie par la source, le degré de plasticité des cellules, la capacité de s'intégrer au tissu blessé et sa capacité à maintenir une organisation cellulaire. Tous ces critères auront un impact sur le succès d'un traitement chez un animal.

2.5.2.1 Cellules souches adultes

Les cellules souches adultes, aussi appelées cellules souches mesenchymales ou cellules multipotentes stromales, possèdent moins d'habiletés que les cellules souches embryonnaires. Elles sont utilisées pour un grand nombre de thérapies mais sont présentes en petite quantité et les récupérer n'est pas sans risque pour l'animal (Reed, Johnson, 2008). Leur cueillette pouvant se faire à même l'animal blessé, elle offre une source de traitement autologue, diminuant les risque de rejet immunologique [Reed, 2008]. Chez le cheval, les deux sources de MSC adultes qui

possède le moins de complication post-collecte sont celle provenant des tissus adipeux ainsi que ceux de la moelle osseuse, ayant chacun leur application propres [Chrisoula, Yellowley, 2010]

2.5.2.1.1 Cellules souches des tissus adipeux (AT-MSCs)

Les tissus adipeux adultes consistent de cellules adipocytes ainsi qu'un stroma composé de cellules précurseurs de type fibroblaste appelés préadipocytes [Del Blue, Grolli, 2008]. De récents travaux suggérerait que ces précurseurs seraient capables de se différencier en plusieurs type de lignées cellulaires [Zuk, Hendrick, 2002]. Ces AT-MSCs sont isolé du tissu adipeux par digestion avec de la collagénase de type I [Del Blue, Grolli, 2007], puis cultivé *in vitro* puis inoculé *in vivo* dans le tissu endommagé.

L'emploi de ces cellules est intéressant parce qu'il est possible de recueillir de grandes quantités avec moins de complications cliniques que les cellules de la moelle osseuse [Durando, Reef, 2006]. Chez l'humain, le rendement des At-MSC est plus grand que celui de la moelle osseuse [Gimble, Guilak, 2003]. De plus, il a été démontré chez les chevaux que pour la même quantité de tissu, la quantité de AT-MSCs obtenus après 21 jours de culture était considérablement plus grande que celle issu des cellules de la moelle osseuse.

Cependant, leur cueillette est souvent faite en milieu non stérile et elles sont difficile à collecter chez les animaux en forme (chevaux de course) [Chrisoula, Yellowley, 2010]. Bien que l'utilisation de AT-MSCs autologue réduit les risques de rejet immunologique, le temps d'attente causé par la cueillette, l'isolation, la culture ainsi que la caractérisation peut devenir

problématique pour l'animal. Il est possible de dériver des AT-MSCs allogéniques, ce qui évite une anesthésie chez l'animal blessé mais augmente le risque de rejetion [Del Blue, 2008].

2.5.2.1.2 Cellules souches de la moelle osseuse (BM-MSCs)

Chez l'humain, les MSCs de la moelle épinière représentent 0,001 à 0,1% des cellules de la moelle osseuse, une proportion possiblement similaire chez le cheval [Pittencer, Marshak, 1999]. Chez le cheval, les BM-MSCs sont prélevées du sternum, séparé par gradient de densité Percoll [Bourzac, Laverty, 2010], cultivé *in vitro* puis caractérisé par différenciation adipogénique, ostéogénique et chondrogénique *in vitro* [Arnhold, Litzke, 2007], puis greffé chez l'animal. Le temps de préparation de ces cellules avoisine les 2 à 4 semaines, donc la fenêtre de traitement ne devrait pas dépasser 2 mois. Les BM-MSCs sont les plus utilisées grâce à leur facilité de cueillette ainsi que leur bon rendement. Comme les AT-MSCs, le risque de rejection chez l'animal est très bas, mais elles ont par contre un potentiel ostéogénique supérieur [Chrisoula, Yellowley, 2010]. Malheureusement, elles ont une plasticité basse et sont difficiles à différencier. Malgré leur production coûteuse, lente et risqué pour le cheval, les BM-MSCs demeurent les cellules souches les plus utilisées lors de traitement cliniques pour les os, ligaments, tendons et cartilages.

2.5.2.2 Cellules souches extra-embryonnaires

Une autre source autologue disponible est le prélèvement du matériel extra-embryonnaire lors de la mise bas suivi de l'entreposage pour utilisation ultérieure. Les sources extra-embryonnaires de cellules souches sont les cellules issues du sang du cordon ombilical, de

la matrice du cordon ombilical ainsi que celle du fluide amniotique. Lorsqu'effectuée par des professionnels expérimentés, ces cellules peuvent être récupérées à la naissance sans complication. Les cellules du cordon ombilical expriment des marqueurs de pluripotence connus comme Oct4 et SSEA-1 [Reed, 2008] et sont capables, dans les conditions de culture appropriées, de différenciation chondrogénique, adipogénique, ostéogénique ainsi qu'en cellules de type hépatocytes et d'origine endoderme [Chrisoula, 2010]. Les cellules du cordon ombilical sont plus prolifératives et présentent moins de sénescence que les cellules souches dérivées de matériel adulte [Koch, 2007]. Cependant, la collecte des cellules du cordon ombilical se faisant souvent dans des milieux non-stérile, l'isolation et la culture de ces cellules souches nécessite l'ajout d'antibiotiques afin de réduire les risques de contamination. En ce qui concerne les cellules souche issues du fluide amniotique, des expériences ont démontré que chez le cheval, ces cellules possédaient certains marqueurs de pluripotence et un potentiel de différenciation ostéogénique. Cependant, plusieurs expériences clinique et immunologie reste à faire pour assurer le future clinique de ces cellules [Lange, 2009].

2.5.2.3 Cellules souches embryonnaires

Une autre source de cellules souches est l'embryon lui-même. Avant l'implantation, l'embryon atteint le stage blastocyste et est composé d'une couche externe cellulaire appelée le trophoctoderme, d'un espace rempli de fluide appelé blastocole et la masse cellulaire interne (ICM). Tandis que le trophoctoderme formera le chorion, le ICM consiste de cellules capables de différenciation en n'importe quel type de cellule (cellules pluripotentes) [Cowan, 2004].

Lorsqu'en culture avec un facteur d'inhibition de la leucémie (LIF), ces cellules possèdent l'habileté de se répliquer infiniment tout en conservant son état de dédifférenciation, suggérant une source illimitée de cellules souches. Elles ont également la capacité de se différencier en cellules des trois lignées germinales, soit ectoderme, mésoderme et endoderme [Smith, 1991]. (Il a été démontré chez la souris que) Contrairement aux cellules souches adultes et extra-embryonnaires, qui vieillissent à travers les passages dépendamment de l'âge du donneur et le type de cellules utilisée, les cellules issus de l'embryon sont capables de rester pluripotente indéfiniment, offrant un très grand potentiel pour usage clinique. Afin de d'obtenir des cellules embryonnaires autologues, il est possible chez l'équin d'avoir recours au transfert nucléaire de cellule somatique pour reconstruire un blastocyste qui aura l'expression génique d'un embryon, tout en ayant la signature génétique de l'animal initial blessé, puis d'isoler des cellules du blastocystes (ntES) [Munsie, 2000] (Fig.4). Une fois induite dans le type cellulaire désiré, ces cellules pourrait être injecté chez l'animal avec de risque de rejet très bas car elles serait identiques génétiquement, à l'exception de l'ADN mitochondrial provenant de l'oocyte. Ayant une très grande plasticité, ces cellules offriraient un grand potentiel de réparation des tissus endomagés.

Malgré ce potentiel d'auto-renouvellement et de maintien à l'état pluripotent infini, il est difficile de récolter un nombre suffisant d'oocyte pour faire cette reconstruction par SCNT. Les chevaux étant des espèces saisonnières et mono-ovulatoires, la cueillette d'oocytes sans avoir recours à des abattoirs de région devient très ardue [Galli, 2008]. Ce plus, la plasticité très haute de ces cellules augmente le risque de formations de tératome dans les sites de traitements chez

l'animal. Certains laboratoires ont tenté la création de cellules souches embryonnaires chez l'équin, avec des résultats mitigés. Les premières cellules ES-like démontraient des marqueurs trouvés chez l'humain et la souris et étaient capables de différenciation hématoïétique *in vitro* [Saito, 2002], ainsi que la différenciation en trois lignées germinales [Li, 2009]. Cependant, aucune de ces études n'a pu démontrer la formation de tératomes *in vitro*, un test qui assure la complète pluripotence des cellules. Il est possible que cette absence de tératome soit bénéfique pour le traitement, évitant des différenciations cellulaires non désirables chez l'animal traité.

2.5.2.4 Cellules souches pluripotentes induites

Ainsi, la procédure de SCNT vise à reprogrammer une cellule somatique à un état pluripotent par exposition avec la machinerie protéique et multiples autres facteurs présents dans un oocyte mature énucléé. Cette pluripotence permet au zygote de produire des cellules issues des trois lignées cellulaires germinales [Keenen and Serna, 2009]. Il est possible d'obtenir des cellules souche embryonnaires (ES) dérivées par SCNT, néanmoins d'autres techniques ont été mises au point pour éviter les étapes fastidieuses reliées au SCNT. Une de ces techniques est la pluripotence par induction, qui est présentement en pleine effervescence.

En 2006, l'équipe de recherche de Yamanaka a ciblé un ensemble de 4 facteurs pouvant reprogrammer des cellules somatiques à un état pluripotent. c-Myc, Sox2, Oct4 et KLF4 sont les facteurs qui jouent un rôle dans le maintien du statut pluripotent et d'auto-renouvellement des cellules souches [Takahashi and Yamanaka, 2006]. Ainsi, ces gènes ont été transfectés chez l'équin par la méthode de livraison du transposon de type *Piggy-Bac* dans des cellules somatiques fœtales et adultes et initient la reprogrammation cellulaire. On explique ce processus de

reprogrammation en deux étapes. D'abord, la phase d'initiation, où ces 4 transposons, lorsqu'insérés dans la cellule, fournissent une expression transitoire des gènes (murin) qui active l'expression endogène des gènes de pluripotence équins. Les cellules transfectées démontrent une prolifération augmentée, un remodelage des histones et une réparation de l'ADN. [Samavarchi-Tehrani et al., 2010 ; Golipour et al., 2012]. Les cellules entrent ensuite dans la phase de maturation et de stabilisation, qui est provoqué par l'activation du gène Sox2 et qui permet la création d'une lignée IPS stable [Buganim et al., 2013]. La transcription des transposons dépend de la présence de doxycycline, ainsi le retrait de cet agent des conditions de culture va arrêter l'expression des 4 facteurs exogènes, laissant place aux endogènes. Une cellule ayant réussi le processus de reprogrammation se multipliera en agrégat, formant ainsi une colonie IPS (IPSc). La formation d'une colonie étant une manière adéquate d'identifier les cellules reprogrammées, d'autres méthodes de caractérisation sont disponibles, notamment l'expression de gènes et protéines de pluripotence et la création de tératomes, de corps embryonniques et de chimères [Boquest et al., 2006]. Ainsi, certains gènes possèdent des régions promotrices possédant une méthylation grandement similaire aux cellules souches embryonnaires, soit les gènes Oct4 et Nanog [Mikkelsen et al., 2008]. Malgré les limites incontrôlables de cette technique, notamment la colonisation limitée par la transfection et la variabilité des profils d'expression génique dans chaque colonie formée, ces IPSc sont considérées similaires aux cellules ES dans leur potentiel de pluripotence [Wernig et al., 2007].

De plus, la réactivation des gènes implique une déméthylation de leur promoteur, un mécanisme encore obscur auprès de la communauté scientifique. Deux théories sont en place

pouvant expliquer ce phénomène, soit la déméthylation passive et active. La déméthylation passive se passe durant la division cellulaire, où la séquence fille à méthyler serait obstruée par différents facteurs, empêchant la DNMT1 de rétablir les marques épigénétiques [Lin et al., 2000]. Cependant, son action semble trop stochastique pour expliquer le maintien de facteurs spéciaux à la transmission de la méthylation [Bourc`his et al., 2006]. Inversement, la déméthylation active solliciterait l'action de déméthylase afin de donner accès aux facteurs de pluripotence. Cependant, l'existence de déméthylases reste un sujet très débattu dans la communauté scientifique [Metivier et al., 2010; Chen et al., 2013]. Quoi qu'il en soit, les mécanismes de déméthylation des marques épigénétiques durant la reprogrammation restent flous. Bien que peu d'information existe sur le maintien des empreintes chez les IPSc, il est possible d'avancer que leur croissance en condition *in vitro* ainsi que la nature invasive du protocole affecte l'intégrité de ces empreintes. Des IPSc ont été dérivées à partir de cellules somatiques humaines, desquelles une lignée démontrait une expression biallellique de H19 causée par une déméthylation extensive de l'ADN [Pick and Benvenisty, 2009]. Cette anomalie étant présente sur une seule des colonies produites, il est nécessaire de faire des études approfondies afin de confirmer une reprogrammation anormale de H19 chez les IPSc équins.

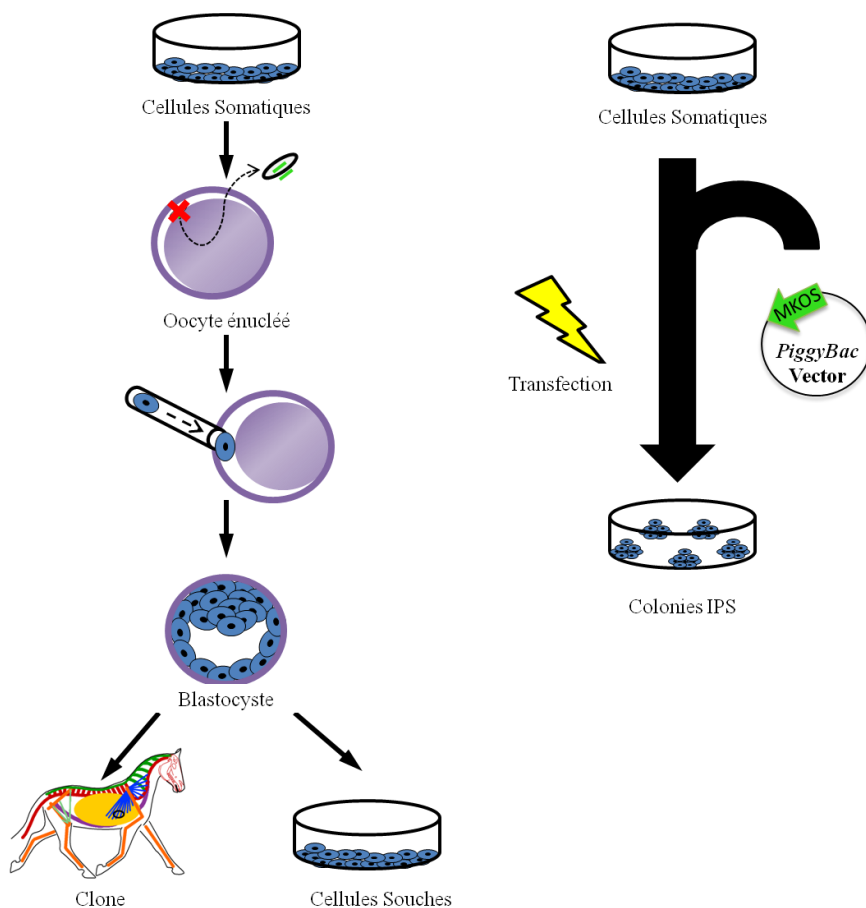


Figure 4 - Comparaison schématique des techniques de reprogrammation.(A) Protocole de production de cellules souche embryonnaire par transfert nucléaire. L'activation de la cellule donneuse et de l'oocyte hôte ainsi que les conditions de culture sont importantes pour favoriser la reprogrammation des patrons géniques afin d'obtenir des cellules ou un animal issu du clonage. **(B)** Protocole de pluripotence par induction. La transfection de 4 gènes propre à la pluripotence pourrait reprogrammer les empreintes de manière anormale, ce qui dérangerait la croissance et différenciation normale des cellules.

En somme, le gène imprinté H19 est crucial au bon développement d'un animal. Chez la majorité des mammifères étudiés, le gène suit le modèle d'expression de type insulaire, modulé par la méthylation de sa région contrôle imprinté. Ce gène doit être exprimé tout au long du développement de l'animal. Certaines techniques de reprogrammation cellulaire, possédant un potentiel attrayant dans le domaine grandissant de la médecine régénérative équine, visent à

changer le patron d'expression génique de cellules différenciés jusqu'à un état pluripotent. Plusieurs études démontrent une perturbation du gène H19 de certains mammifères suite à ces méthodes de reprogrammation cellulaire. Si ces cellules équine sont pour être utilisés dans le domaine clinique, il devient important de s'assurer que H19 se comporte de manière conventionnelle chez les équins et qu'il n'est pas sujet aux perturbations causé par les méthodes de reprogrammation cellulaire employées dans le domaine de la médecine régénérative.

3. Hypothèse et objectifs

3.1 Hypothèse

L'empreinte équine de H19 suit le modèle insulaire décrit chez d'autres mammifères et est déméthylé par la reprogrammation cellulaire et cause une expression biallelique.

3.2 Objectifs

3.2.1 Objectif Général

Caractériser l'empreinte H19 chez un modèle hybride équin ainsi que mesurer les impacts de la reprogrammation cellulaire.

3.2.2 Objectifs spécifiques

3.1.2.1 Localiser la région de contrôle empreinte (ICR) de H19 chez l'équin et vérifier son modèle insulaire dans des gamètes équine ainsi que de hybrides conçus naturellement.

3.2.2.2 Comparer le degré de reprogrammation de l'ICR précédemment caractérisé chez des hybrides équins issus du SCNT.

3.2.2.3 Comparer le degré de reprogrammation de l'ICR précédemment caractérisé chez des cellules souches pluripotentes induites d'hybride équin.

3.3 Conception Expérimentale

Ce projet consiste à étudier l'expression allélique parent spécifique du gène H19. Ainsi, il est nécessaire de pouvoir ségréger les empreintes et le matériel de provenance maternelle de celui paternelle (méthylation du génome, nature parentale du transcrit). L'emploi d'un animal inter espèce nous donne assez de variation génétique pour identifier la nature parentale de l'allèle et du transcrit observé. La mule, étant un hybride, nous permettra d'étudier l'apport épigénétique de chaque parent, un aspect crucial lors de la caractérisation d'empreintes géniques. L'étude de gamètes d'équin adulte nous permettra de vérifier l'acquisition des empreintes présente durant la fécondation de la progéniture(Fig.1A). Subséquemment, l'étude des tissus extra-embryonnaires et embryonnaires nous permettront de vérifier si la nature de la

ligné germinale a un impact sur la résistance de l'empreinte H19 au SCNT(Fig. 1B). Lorsque l'état des empreintes chez le fœtus issu SCNT sera décrite, une reprogrammation additionnelle de pluripotence induite sera appliqué pour essayer de dériver des cellules souches pluripotentes induites (Fig.1C). Dépendamment de l'état initiale des cellules, nous observeront soit aucun changement, soit une amplification possible de l'expression biallélique. La reprogrammation de cellules adultes en IPS étant ardu, l'utilisation de cellules embryonnaires rsique d'augmenter nos chances de reprogrammation, celles-ci étant plus malléables.

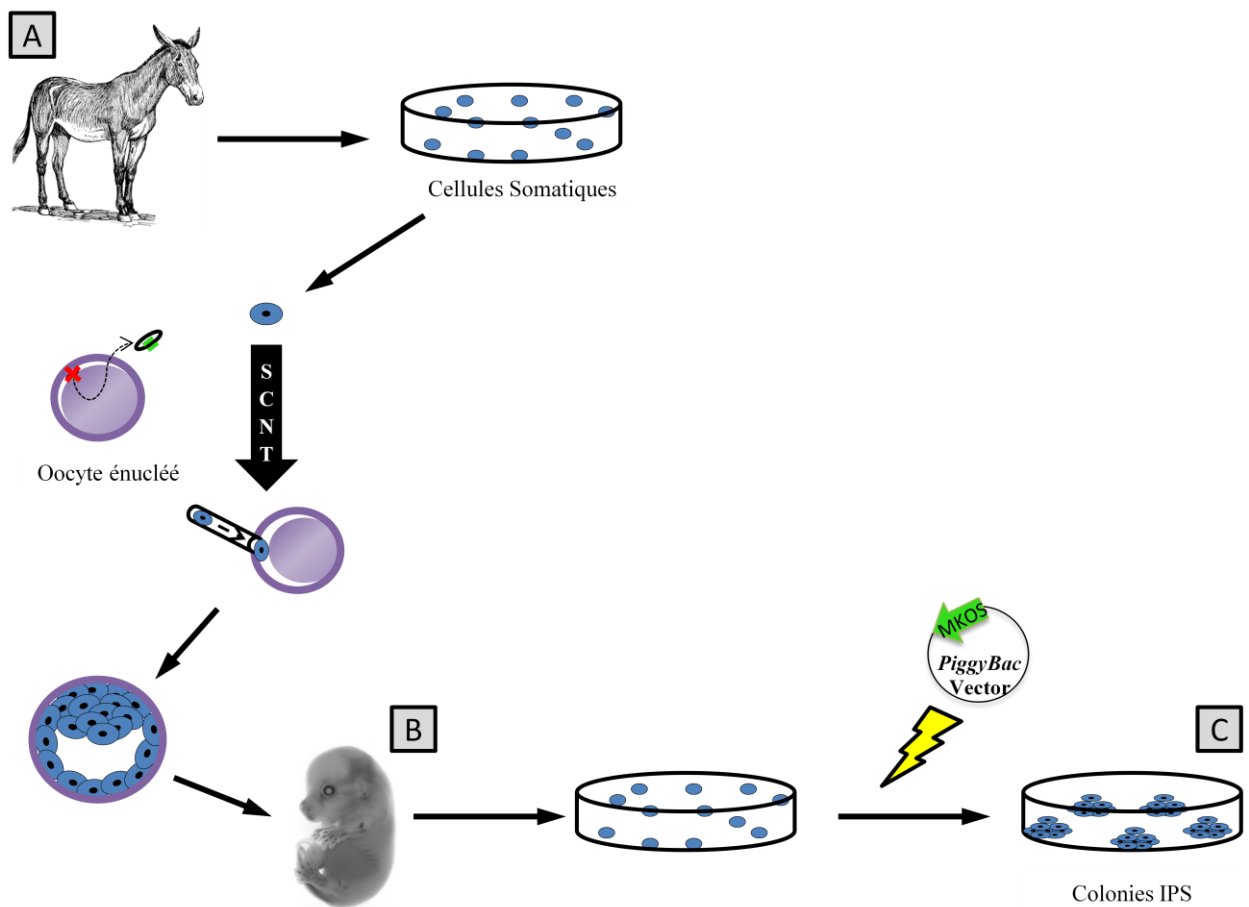


Fig. 1 - Plan schématique du design expérimental. (A) Étude de la mule adulte. Les gamètes parentales (âne, jument) sont étudiées pour confirmer la méthylation du site de liaison CTCF dans le promoteur H19 chez le sperme de l'âne, et inversement la déméthylation chez l'oocyte de la jument. Ensuite, la présence de SNPs chez la mule nous permet de segreger l'apport

génétiq ue parental dans nos études. **(B) Étude de foetus issu du SCNT.** La procédure de SCNT pourrait perturber la méthylation du ICR de H19. **(C) Colonies IPS dérivées de cellules clonées fœtales.** Il est possible que nous observons une amplification de la déméthylation de H19, donnant une expression biallélique encore plus prononcée.

4. Article - En Preparation

Imprinted Gene H19 is resilient to reprogramming in equine clones and induced pluripotent stem cells

Poirier M., Eilers Smith O., Filion F., Therrien J., Smith LC.

Centre de Recherche en Reproduction Animale, Réseau de Reproduction Québécois, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

ABSTRACT

Cellular reprogramming is an invasive process of which not all mechanisms are known. The aim of this procedure is to reactivate transcription of target genes, while maintaining putative expression of housekeeping genes. Reprogramming failure is often associated with aberrant DNA methylation responsible for imprinted regulation. Imprinted genes, most of which have been characterized in mice and humans, are expressed in a monoallelic parent specific fashion and are vital for embryo growth and tumor suppression. In light of this, we aimed to define the equine imprinted gene H19 in the gametes, as well as its methylation profile in *in vivo* derived embryos, somatic cell nuclear transfer derived embryos and induced pluritpotent stem cells. A CpG rich imprinting control region was outlined upstream of the promoter and observed with bisulfite sequencing. Coupled with parent-specific gene expression analysis, we confirmed that the imprinted gene H19 is resistant to cellular reprogramming in cloned embryos. Partial demethylation of the H19 DMR in IPS cells does not result in biallelic expression, suggesting that equine species have rigorous imprint maintenance during cellular reprogramming.

INTRODUCTION

Although cellular reprogramming technologies such as somatic cell nuclear transfer (SCNT) and induced pluripotent stem cells (iPSC) have been widely applied for clinical and agricultural applications in animals and humans, efficiencies remain low due our poor understanding of the biological processes involved and, consequently, of how to optimize the outcomes. A major obstacle behind reprogramming of differentiated somatic cell chromatin is to achievement of appropriate remodelling without disturbing the epigenetic signature of imprinted genes. Genomic imprinting consists of sex-specific epigenetic modifications that confer parental-specific monoallelic expression to a set of genes that play vital roles in foetal and placental growth. Imprinted genes are usually clustered and regulated through differentially methylated regions (DMR) [Hajkova et al., 2002]. Contrary to most of the genome, the methylation marks of the DMR are erased in migrating primordial germ cells and *de novo* methylated during gametogenesis in a sex-specific fashion [Reik et al., 2001]. Upon fertilization, the DMR retains its imprinted state throughout genome wide demethylation as well as tissue-specific methylation found in somatic cell differentiation [Morgan et al., 2005].

Many studies have linked cellular reprogramming with loss of imprinting (LOI), resulting in genetic diseases and rare congenital disorders [Horsthemke, 2011]. For instance, hypermethylation of the maternally imprinted DMR H19 gene in humans leads to the overexpression of Igf2, which promotes growth and results in the Beckwith-Wiedemann syndrome [Riccio et al., 2009]. When the DMR is hypomethylated, increased H19 expression downregulates IGF2 activity, resulting in restrained growth and development found in individuals

with Russell-Silver syndrome [Eggermann, 2008]. In some species of large animals, SCNT hypermethylation of the H19 DMR is associated with metabolic abnormalities as well as a large and dysfunctional placenta, also defined as the large offspring syndrome (LOS) [Chavatte-Palmer et al, 2012]. In addition, H19 overexpression is found in many cancers, suggesting its role as an oncogene [Lottin et al 2002].

Reprogramming techniques have various impacts on a wide range of species. It has been suggested that children born from artificial reproductive technology (ART) have an increased risk of developing epigenetic-based disorders [Owen et al, 2009]. Human iPSCs show demethylation of multiple imprinted genes, including the biallelic expression of H19 [Pick et al, 2009]. Abnormal H19 imprinting has been reported in mice issued from cloning or simple *in vitro* culture, at pre- and postnatal stages and in derived iPSCs as well [Chang, 2009]. In larger mammals, alteration of gene imprinting and expression of H19 and SNRPN genes have been found in cattle derived from SCNT, implying that chromatin remodelling and demethylation of the donor cell to a totipotent state has an effect on genomic imprinting [Suzuki et al 2009; Suzuki et al 2011]. Reports in the literature have indicated that, as for cattle, equine SCNT leads to elevated embryonic mortality and some postnatal developmental anomalies in cloned offspring (Henricks et al 2005; Vanderwall et al 2006; Galli et al 2008). This suggests that improper reprogramming of equine imprinted genes results from SCNT reprogramming. Moreover, methods for deriving equine iPSC have recently been reported, enabling the use of genetically induced pluripotency to investigate the effects of cellular reprogramming on genomic imprints in this species (Nagy et al 2011; Breton et al 2013).

Herein, we aim to verify the imprint stability of the equine H19 DMR when reprogrammed by SCNT and iPSC technologies. Using an equine hybrid, the mule, successfully SNPs segregated parental-specific methylation patterns of the H19 DMR were obtained and combined with allele specific H19 gene expression analysis. We demonstrate that in equine SCNT derived embryos, H19 maintains its imprint integrity and mono-allelic expression. Moreover, although demethylation of the H19 DMR is found in certain induced pluripotent stem cell lines, abnormal methylation does not result in biallelic expression, suggesting that the H19 imprinted gene is resistant to extensive reprogramming found in SCNT and genetically induced pluripotency.

MATERIAL AND METHODS

All procedures were performed in compliance with the Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Training, approved by the Animal Experimentation Committee of the Université de Montréal (H-RECH-1591), and sanctioned by the Canadian Council on Animal Care.

Donor Cells

Adult fibroblast cell cultures were established from crossing a *Equus asinus* jack and a *Equus caballus* mare. Adult skin tissue biopsies were minced and digested with 5mg/ml Collagenase I (Sigma) solution in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) (invitogen) at 37°C for 3 hours. After dissociation, cells were washed twice and cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic-antimycotic (Invitrogen 15240-062) at

38.5°C in 5% CO₂. When cultures attained confluency, initial passages fibroblast cells were frozen in culture media with 10% dimethyl sulfoxide(DMSO) and stored in liquid nitrogen. Donor Fibroblasts were thawed and washed in DMEM/FBS 20% and DMEM/FBS 10% subsequently before use for SCNT or iPSC derivation.

Host Oocytes

Horse ovaries were retrieved from a local slaughterhouse in saline with penicillin / streptomycin solution at ~20-30°C within 2 hours of slaughter. Follicles, 2 to 10 mm in diameter were punctured with 16 gauge needle syringes and cumulus oocyte complexes (COCs) were retrieved and washed in DMEM, and matured in groups of 25 in DMEM, 10% FBS, 0.5% gentamicin, 5 mg mL⁻¹ LH, 2 mg mL⁻¹ FSH, 40 µg mL⁻¹ IGF-1, 50 µg mL⁻¹ EGF. After 20h of maturation, cumulus cells on the COCs were removed by up and down pipetting in M-199 HEPES, 10% FBS, 400 U mL⁻¹ hyaluronidase. Smooth oocytes possessing homogenous cytoplasm, intact zona pellucida and extruding first polar body were selected for nuclear transfer.

Embryo Reconstruction by Nuclear Transfer

Selected oocytes were placed in DMEM, 7.5 µg mL⁻¹ cytochalasin B, 5 µg mL⁻¹ Hoechst 33342 and enucleated by removing a small fraction of the cytoplasm surrounding the first polar body. Oocytes were exposed to ultraviolet light to confirm the removal of chromatin. Nuclear transfer was performed using confluent cells (M04 Fibroblasts) that were maintained in culture for 2–5 passages. A single nuclear donor cell was introduced into the perivitelline space of the enucleated oocyte, and the resulting couplet was placed in a 0.3 M mannitol solution containing

0.1 mM MgSO₄ and 0.05 mM CaCl₂. The couplet was exposed to an alternating current pulse (5 msec of 50V cm⁻¹) followed by two pulses of direct current (50 μsec of 1.2 KV cm⁻¹). Fused couplets were placed in DMEM, 2mg/mL BSA, 8.5μM ionomycin for 4 minutes, and then in DMEM, 30mg/mL BSA for 4 minutes, to finally be placed 3h in DMEM, FBS 10%, 2mM 6-DMAP for activation. Upon completion, the oocytes were washed in DMEM, FBS 5% and placed in culture drops. Developmental progress to the blastocyst stage was assessed on the 8th day of culture.

Day 42-50 Foetuses

Foetuses of 45-50 days of gestational age were obtained from mares that were naturally mated to a jack donkey. SCNT foetuses were obtained after transfer of Day 8 embryos to the uteri of mares at 7-9 days after standing heat. Day 8-9 SCNT blastocysts were washed with M199-Hepes, 10% FBS, and loaded in a 250μL straw and transferred into the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum. Gestation was monitored weekly and embryos were removed by flushing the uterus with PBS using a Foley Catheter. An *in vivo* D50 foetus and both D42 & D44 SCNT derived foetuses were collected and inspected to confirm they were intact and were washed three times in PBS. Each foetus was dissected into tissues, and frozen to -70°C for DNA analysis and in Trizol™ for RNA analysis.

Derivation of iPSc

Mule fetal fibroblasts were cultured in DMEM High Glucose (Invitrogen) supplemented with 2 mM GlutaMax™ (Invitrogen), 0.1 mM non-essential amino acids (Invitrogen), 0.1 mM betamercaptoethanol (Sigma), 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen), 50 U/ml penicillin/streptomycin (Invitrogen) and 15% fetal bovine serum (HyClone). Using the *PiggyBac* procedure (PB-TET-MKOS, PB-GFP, PB-CAG-rtTA and pCyL43 PBase) as previously described (Nagy et al. 2011), mule foetal fibroblasts were transfected with the Neon electroporation device (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. After transfection, cells were seeded in 6-well dishes containing mytomycin-treated mouse embryonic fibroblasts (MEF) in fibroblast medium with the addition of 1000 U/ml leukemia inhibitory factor (LIF; ESGRO, Millipore), 10 ng/ml bFGF (Peprotech), 1.5 µg/ml doxycycline (Sigma) 3 µM GSK (glycogen synthase kinase) inhibitor (StemGent), 0.5 M MEK (mitogen-activated protein kinase) inhibitor (StemGent), 2.5 µM TGF-β (transforming growth factor) inhibitor (StemGent) and thiazovivin (StemGent). Upon the appearance of iPSC-like colonies post-transfection, colonies were picked and passaged using mechanical dissociation. Subsequent passages were enzymatically dissociated with TrypLE Select (Invitrogen) and passaged at a frequency of 3-4 days with a 1:5 ratio. Upon proper cell expansion, cells were cryopreserved in FBS with 10% DMSO.

Search for the Equine H19 Differentially Methylated Region (DMR)

BLAST analysis with the bovine H19 DMR sequence onto the horse sequence permitted identification of the DMR position in the equine H19 gene. DNA was extracted from fibroblasts of an adult *Equus asinus* and *Equus caballus* using DNAeasy extraction kit (Qiagen). The H19 DMR is

approximately 2-4 kb upstream of the H19 promoter in most mammals (Gabory et al., 2010). Gene specific primers starting from exon 1 of 5' region were used to produce fragments upstream of the promoter region. Fragments were then cloned (pGEM-Teasy) and sequenced. Cloned fragment sequences matched sequence data found in *Equus caballus* (NW_001867370.1)

Bisulfite Sequencing

Up to 500 ng of total genomic DNA was used for a bisulfite treatment with the Epitect Bisulfite Kit (Qiagen). Primers specific for equine bisulfite-converted DNA were designed within the H19-DMR area resulting in a 550bp fragment, spanning from -1533 to -983 bp upstream of exon 1 (NW_001867370.1). Each PCR reaction was performed in triplicate using the primers U-H19-F1 and U-H19-R1. The PCR reaction was carried out in a final volume of 50 μ L containing 1–2 μ L of bisulfite-treated DNA, 0.2 μ M each primer, 0.3 mM mixed dNTP, 13 PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, and 2.5 units of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). The reactions were performed using an initial 2-min step at 94°C followed by 50 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 53°C, 1 min at 72°C, and a final 3-min step at 72°C. The PCR products were resolved in 1.2% agarose gels, followed by purification using the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen). Purified fragments were subcloned in pGEM-T Easy Vector (Promega), and cell transformation protocol was performed using competent *Escherichia coli* DH5 α cells (Invitrogen). 24 to 48 clones were collected from each sample and sequenced.

Gene Expression Analysis

RNA was extracted using Trizol extraction protocol with a DNase treatment. Reverse transcription was done using Reverse Transcription Kit (Qiagen) with 1 µg of total RNA and random primers (3 µg). The RT reactions were then purified with a MinElute Reaction cleanup kit (Qiagen) and resuspended in a final 50 µL volume of elution buffer. Five µL of purified cDNA was quantified by real-time PCR in duplicate using RotorGene Q instrument and software (Qiagen). Following completion of the steps of the protocol, a comparative analysis was performed using three housekeeping genes: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 60S ribosomal protein L32 (RPL32), Succinate dehydrogenase complex, subunit A (SDHA). (See Table 1 for primer and probe sequences). Reactions consisted of an initial denaturation of 5 min at 95°C and 40 subsequent cycles of 5 sec at 95°C, 10 sec at 60°C, and 1 sec at 72°C. A normalizing factor was calculated using the three housekeeping genes in order to determine the relative expression of the H19 gene.

Allelic H19 Gene Expression

Two µL of purified cDNA was mixed with 1 unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen), 0.2 µM H19F Primer, 0.2 µM H19R2 primers, 0.2 mM of mixed dNTPs, 1.5 mM MgCl₂ and 13 µL reaction buffer in a final volume of 50 µL. The PCR reactions were performed using an initial step at 94°C for 2 min, followed by 25 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 60°C, and 30 sec at 72°C, and a final extension of 5 min at 72°C. To assess allelic expression, fluorophore hydrolysis probe technique was used with the RotorGene Q instrument and software (Qiagen). 5 µL of PCR product was mixed with 0.1 µM UPL-H19F, 0.1 µM UPL-H19R, 0.15 mM MgCl₂ and 0.5 µL of UPL

Probe in a final volume of 25 μ L (See Table 1 for primers and probe sequences). The amplification program consisted of an initial denaturation of 10 min at 94°C followed by 40 cycles of 10 sec at 95°C, 5 sec at 58°C and 8 sec at 72°C, replaced by a melting program consisting of 0 sec at 98°C, 30 sec at 58°C, and 0 sec at 95°C and 0 sec at 98°C (slope 0.1°C/sec). Data were obtained through calculation of the area under the curve of the melting program.

Statistical analysis

All values are expressed as means \pm SEM. To determine significance between groups of interests, comparative Student's t-test were performed. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Characterization of the equine H19 genomic imprint

Since the H19 gene sequence is conserved among species [Stadnick et al, 2009], we utilized the H19 DMR of other mammals to search homologous regions (BLAST analysis) using the horse complete genome sequence (Equus caballus EquCab2.0, NCBI) (FIG. 1B). We identified five CpG rich regions approximately 2 KB upstream of the H19 transcription start site each containing a CTCF binding motif (FIG. 1A). An 18 CpG rich island located at 5' and containing a CTCF binding site with 4 CpGs was chosen to examine the methylation patterns after bisulfite treatment. Methylation analysis of this region using bisulfite-treated DNA from male (sperm) and female (oocytes) equine gametes showed hyper- and hypomethylation patterns,

respectively, indicating that indeed this was a differentially methylated region (DMR) and, therefore, possibly part of the H19 imprinting control region (FIG. 1C). We then sequenced this same region in *Equus asinus* and identified four single nucleotide polymorphisms that enabled the distinction between the paternal (*E. asinus*) and maternal (*E. caballus*) alleles in mule samples. Next, we extracted genomic DNA and performed bisulfite treatment to examine the methylation patterns in the skin samples from three(3) adult mules. All three mules showed allele-specific methylation patterns with obvious hypermethylation of the paternal (*E. asinus*) and hypomethylation of the maternal (*E. caballus*) genomes, indicating that this DMR may indeed be located in the equine H19 DMR. We then sequenced H19 transcript for *E. asinus* and identify SNPs in exons 2 and 3 when compared to the *E. caballus* H19 transcript. Although the average levels of H19 mRNA expression in adult skin samples were only 0.01% of those observed in foetal tissues ($P \leq 0.01$), SNP analysis of adult transcripts confirmed that transcription originated exclusively from the maternal (*E. caballus*) allele, confirming the monoallelic pattern of H19 expression.

Fertilized and cloned fetuses show normal H19 imprinting

In contrast to adult tissues, H19 expression is expressed at high levels during embryogenesis and plays a crucial role in tissue growth and differentiation in mammals (Gabory et al, 2009). Therefore, we analyzed H19 imprints in tissues of embryonic (liver, muscle, brain and heart) and extra-embryonic (allantois, amnion and yolk sac) origin from a(1) hybrid foetus (mule) obtained at day-50 after fertilization (FERT). As shown for other mammals, average methylation levels of H19 DMR and the CTCF binding site of embryonic tissues were high (94.2%

± 4.3) on the paternal (donkey) allele and low ($2.0\% \pm 1.4$) on the maternal allele (Fig. 2A). Moreover, extra-embryonic tissues also showed hypermethylation ($94.0\% \pm 1.7$) of the paternal alleles and hypomethylation ($2.0\% \pm 1.7$) of the maternal alleles (FIG. 2A). As for adult skin, none of the embryonic or extra-embryonic tissues analyzed showed paternal expression, indicating exclusive monoallelic expression from the maternal allele (Data not shown). Moreover, H19 was upregulated during embryogenesis showing overall expression levels in foetal tissues over 1000 fold higher than in adults (Data not shown). As observed in other mammals, overall H19 gene expression was significantly higher in extra-embryonic than in embryonic tissues (2.01 ± 0.53 vs. 0.58 ± 0.19 , $P \leq 0.05$) (FIG.2B). Together, these results indicate that allele-specific methylation of the DMR and the monoallelic expression patterns of the H19 gene during embryogenesis in equine hybrids are consistent with those observed in other mammals.

Aberrant H19 imprinting has been associated with developmental anomalies in various mammals derived by SCNT (Dean et al, 2001) and, since equine cloning is equally characterized by a high level of embryo mortality at initial stages of embryogenesis, we decided to analyze the H19 DMR and expression patterns in tissues of embryonic and extra-embryonic origin from two(2) cloned fetuses (day 42 and 44) derived by SCNT using skin fibroblast donor nuclei from an adult female mule. Similarly to the FERT foetus, embryonic and extra-embryonic tissues of both SCNT-derived fetuses showed hypermethylation ($94.7\% \pm 1.7$ and $93.3\% \pm 2.0$) of the paternal and hypomethylation ($3.9\% \pm 1.3$ and $4.8\% \pm 2.5$) (FIG.3A) of the maternal alleles, indicating that the methylation patterns of the H19 DMR is not disturbed in cloned equine fetuses at this stage of gestation. In contrast to adult tissues where H19 expression is practically

absent (see above), H19 transcripts were abundant in all foetal tissues analyzed. Moreover, extra-embryonic tissues showed significantly higher levels of H19 expression when compared to embryonic tissues (1.98 ± 0.34 vs. 0.87 ± 0.15 , $P \leq 0.05$) (FIG.3B). Similarly to FERT foetal tissues, H19 transcripts were exclusively of maternal (*E. caballus*) origin in SCNT-derived foetal tissues and supporting the findings showing unchanged methylation patterns of parental DMR after SCNT (see above). Together, these results suggest that in contrast to reports in other mammals the H19 imprinting does not appear to be affected by the SCNT procedure in horses.

Induced reprogramming causes limited DMR hypomethylation without affecting H19 imprinting

Previous reports have indicated that genomic imprinting can be affected by the procedure of cellular reprogramming in human induced pluripotent stem (iPS) cells (Pick et al, 2009). Since H19 imprints were unaltered after SCNT (see above), we decided to verify whether the induction of pluripotency using the expression of Yamanaka's (Takahashi, 2006) reprogramming factors would affect somatic H19 imprints in the equine model. Hybrid equine (*E. caballus* vs. *E. asinus*) iPS cell lines were derived from the reprogramming of primary embryonic fibroblasts (EF) using previous established protocols (Nagy et al, 2011). Hybrid equine iPS (heiPS) colonies with ES-like morphology were observed at 21-28 days after transfection of EF cells using a transposon-delivery system containing four murine reprogramming factors (c-Myc, Klf4, Oct4 and Sox2) under the control of doxycycline. Endogenous equine pluripotency genes OCT4 (0.328 ± 0.065 vs. 0.019 ± 0.005 , $P \leq 0.05$) and NANOG (0.047 ± 0.009 vs. 0.019 ± 0.001 , $P \leq 0.05$) (FIG. 4A) expression was significantly higher in heiPS lines compared to the original somatic EF cells, confirming that the heiPS lines were pluripotent. Moreover, methylation patterns of the

promoter and exon 1 region of the OCT4 gene were slightly hypomethylated when compared to foetal fibroblast cells (44% vs. 33%) (Data not shown). Together, these results indicate that morphological transformations of the foetal fibroblasts into iPS-like colonies were accompanied by increased expression of pluripotency-related genes and, in the case of OCT4 genes, a concurrent partial hypomethylation of the CpG region in exon 1.

Once the pluripotency characteristics of the heiPS lines verified, we assessed the epigenetic consequences of genetically induced reprogramming of somatic cells by comparing the methylation patterns of the H19 DMR in the foetal fibroblasts used for reprogramming to the eight heiPS cell lines obtained at passages 2 and 10 after morphological differentiation and clonal derivation. At passage 2, methylation levels of the H19 paternal DMR in heiPS cells were lower than those observed in the foetal fibroblast cells ($86.4\% \pm 3.8$ vs. $96.5\% \pm 1.5$, $P \leq 0.05$), indicating that the procedure of reprogramming caused a demethylation of the H19 paternal imprint. However, after removing a single outlier at passage 2 (14% Methylation), levels of methylation of the H19 maternal DMR did not vary significantly between foetal fibroblast and iPS samples ($4.3\% \pm 2.1$ vs. $3.0\% \pm 1.7$, $P \geq 0.5$) (FIG. 4B). Similarly, by removing a single outlier (17%) at passage 10, methylation levels of the paternal ($90.1\% \pm 2.7$ vs. $96.5\% \pm 1.5$, $P \geq 0.5$) and maternal ($4.3\% \pm 2.1$ vs. $4.5\% \pm 1.9$, $P \geq 0.5$) H19 DMR were not different to those found in the original foetal fibroblast cells, indicating that the methylation observed in iPS lines at passage 2 was maintained after continued culture to passage 10.

Due to the association of H19 allele-specific transcriptional silencing and DMR methylation, we next assessed the expression patterns in the heiPS cell lines to determine

potential aberrations in expression related to induced reprogramming. Although a small number of transcripts of paternal origin were identified in some heiPS lines, on average there were no significant changes in the overall maternal transcription in fibroblasts and the derived iPS lines (100% vs. 99.3%, $P \geq 0.05$), indicating that the limited loss of methylation from the paternal allele did not lead to significant biallelic expression in the resulting iPS lines. Although there was a tendency for H19 downregulation (3.25 ± 0.90 vs. 1.80 ± 0.82 , $P = 0.19$), overall expression levels were not significantly different between the foetal fibroblasts and iPS lines (FIG. 4C). Moreover, H19 monoallelic pattern and average expression levels (5.56 ± 2.41) at passage 9 were similar to levels found in foetal fibroblast. Therefore, apart from a limited hypomethylation of the DMRs on early passage paternal alleles (shown above), these results indicate that the reprogramming of equine foetal somatic cells to pluripotency does not alter the allele-specific or overall expression patterns of H19.

DISCUSSION

In this study, we characterized a section of the DMR in the H19 gene, a CpG rich region, and monitored its methylation in gametes, adult somatic cells, *in vivo* embryos, SCNT derived embryos and heIPSc through the use of bisulfite sequencing. Subsequently, studies of H19 allelic expression in these samples was performed in order to assess whether induced cellular reprogramming had an impact on imprint stability of the H19 gene.

Characterization of the H19 DMR in Equids.

Although a number of studies have been done to demonstrate the effects of cellular reprogramming in mammals [Curchoe et al., 2009, Owen et al, 2009, Pick et al, 2010], they all lack the ability to fully separate the parental signature of the methylation pattern. In equids, studies of the H19 imprint has only been performed in the *in vivo* chorionic girdle and day 33 foetuses, where H19 was found to be properly imprinted [Wang et al, 2013]. For the first time, our study compares the H19 DMR at different developmental stages and issued from different cellular reprogramming methods. We demonstrate that the H19 DMR consists of 5 CTCF binding site regions and is hypomethylated and hypermethylated in paternal and maternal gametes respectively. Study of embryonic *in vivo* tissues reveals that fertilization does not trigger disturbance of this imprint, further confirming imprint maintenance throughout embryonic development as previously described in other mammals [Kaneda, 2011]. With the observation of these unchanged methylation patterns, monoallelic expression in embryonic tissues is to be expected, as documented in mice and cattle [Gabory, 2010]. No biallelic expression was found in either adult or foetal *in vivo* mules, similar to allelic provenance observed in naturally conceived mammals. However, levels of maternal H19 found in extra-embryonic tissues were higher than those found in embryonic tissues. H19 levels regulate IGF2 expression, which plays a vital role in nutrient exchange in the foetus through growth control of proper capillary network of the placenta [Frost, 2010]. In previous research, deletion of the H19 DMR in mice resulted in the birth of overly large mice, pointing out the crucial impact of H19 in placental tissues and the overall growth of the mice [Gabory, 2010]. In equids, paternally imprinted genes have been found to be strongly expressed in the placenta[Wang et al., 2013], suggesting that our higher

levels of mule maternal H19 found in extra-embryonic tissues could ensure that the IGF2 present is uniquely paternal. These findings in equids indicate that H19 imprint is acquired during gametogenesis and maintained in fertilization, suggesting that H19 controls growth control through higher levels in extra-embryonic tissues thereby regulating the expansion of the nutrient exchange network in the placenta. Since methylation levels did not vary between extra-embryonic and embryonic tissues, additional growth control mechanisms must be active to modulate tissue specific expression of the H19 gene. Moreover, H19 transcripts were found only in minute quantities in the adult skin fibroblast, suggesting transcriptional shutdown upon birth. Adult mice show H19 gene repression in most tissues except for heart and skeletal muscle, which supports our findings of H19 absence in adult mule skin fibroblasts [Leibovitch et al, 1999]. Together, these findings demonstrate that H19 imprinting in equids is similar to other mammals, and that it exerts a modulatory control of embryonic growth through variable levels of expression between embryonic and extra-embryonic tissues.

Cellular reprogramming of H19

Although previous studies demonstrate the epigenetic effects of SCNT and induced pluripotency in genomic imprinting in some mammals, none have described the outcomes of these reprogramming techniques in the methylation of the equine H19 imprint. In cattle, epigenetic disturbance of H19 in SCNT-derived embryos revealed that improper imprinting was associated to foetal death? during preimplantation [Suzuki, 2011]. Embryos produced through in vitro procedures showed smaller vesicle and foetus size, suggesting a link with hypomethylation of the paternal allele, leading to biallelic overexpression of H19 and low implantation rates

[Suzuki,2011]. However, the mule SCNT embryos produced in this study displayed no demethylation of the paternal H19 DMR whether it was in extra-embryonic or embryonic tissues. The H19 transcripts found in the cloned samples were exclusively of maternal source with expression levels highly similar to their *in vivo* counterparts, confirming that equids display strong resilience of the H19 imprint after SCNT. Nonetheless, since a large percentage of SCNT embryos die before the day 40-50, analysis of younger embryos may give evidence of instability of H19 imprint after SCNT. It has been proposed that improper imprinting acts as a barrier for implantation at earlier stages in cattleREF, hence the equine H19 DMR may act similarly and could be subject to changes in earlier developmental stages. Subsequently, heIPS lines were not completely immune to partial demethylation, suggesting that culture condition and integration of exogenous genetic material may affect genomic imprinting. However, this partial demethylation did not cause biallelic expression nor result in the overexpression of H19 throughout several passages, which was previously observed in iPSc derived from other species [Pick et al, 2009], suggesting that other control mechanisms may play a role in the tight H19 monoallelic expression of equine induced pluripotent stem cells. Differentiation of the heIPS into the different germ layers might provide insights on the impacts of tissue differentiation on the H19 DMR and subsequently, on its allelic expression.

In summary, we have shown that the equine H19 imprinted gene is established and maintained as in other mammals by parental-specific analysis of its DMR methylation and gene expression during embryonic development and in postnatal mules. When subjected to two cell reprogramming methods, SCNT and induced pluripotency, the H19 imprint maintained its strong paternal methylation pattern and monoallelic expression, which contrasts the multiple accounts

of biallelic expression found in other mammals. The stability of this key growth control gene is reassuring for future application of these reprogramming protocols for both reproductive and therapeutic purposes. Nonetheless, analysis of other imprinting control regions is paramount to determine whether epigenetic disturbance may be caused by cellular reprogramming that could affect the developmental outcome of equine clones and of the clinical utility of equine iPSC lines.

REFERENCES

Breton A, Sharma R, Diaz AC, Parham AG, Graham A, Neil C, Whitelaw CB, Milne E, Donadeu FX. Derivation and characterization of induced pluripotent stem cells from equine fibroblasts. *Stem Cells Dev* 2013; 22 (4):611-21.

Chang G, Liu S, Wang F, Zhang Y, Kou Z, Chen D, Gao S. Differential methylation status of imprinted genes in nuclear transfer derived ES (NT-ES) cells. *Genomics* 2009; 93: 112-119.

Chavatte-Palmer P, Camous S, Jammes H, Le Cleac'h N, Guillomot M, Lee RSF. Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. *Placenta* 2012; 26: 99-104.

Curchoe CL, Zhang S, Yang L, Page R, Tian XC. Hypomethylation trends in the intergenic region of the imprinted IGF2 and H19 genes in cloned cattle. *Anim Reprod Sci* 2009; 116: 213–225.

Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13734-8.

Eggermann T, Eggermann K, Nadine S. Growth retardation versus overgrowth: Silver-Russell syndrome is genetically opposite to Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends in Genetics* 2008; 24: 195-204.

Frost J, Moore G. The Importance of Imprinting in the Human Placenta. *PLoS Genetics* 2010; 6 (7): 1-9.

Gabory A, Jammes H, Dandolo L. The H19 locus: Role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. *Bioessays* 2010; 32: 473-480.

Gabory A, Ripoché MA, Le Digarcher A, et al. 2009. H19 acts as a transregulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. *Development* 136: 3413–21.

Galli C, Lagutina I, Duchi R, Colleoni S, Lazzari G. (2008) Somatic cell nuclear transfer in horses. *Reprod Domest Anim.* 2008; 43 (2): 331-7.

Hajkova P, Erhardt S, Lane N et al: Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 2002; 117: 15–23.

Hinrichs K. Update on equine ICSI and cloning. *Theriogenology* 2005; 64 (3): 535-41.

Kaneda M. Genomic imprinting in mammals - Epigenetic parental memories. *Differentiation* 2011; 82: 51-56.

Lottin S, et al. Overexpression of an ectopic H19 gene enhances the tumorigenic properties of breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2002; 23 (11): 1885-95

Leibovitch MP, Nguyen VC, Gross MS, Solhonne B, Leibovitch SA and Bernheim A.. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1991; 180, 1241-1250.

Morgan DH, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005; 14: R47–R48.

Nagy K, Sung H-K, Zang P, Laflamme S, Vincent P, Agha-Mohammadi S, Woltjen K, Monetti C, Iacovos M, Hussain S, Smith LC, Nagy A Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts. *Stem Cell Rev* 2011; 7: 693-702 ;

Owen CM, Segars JH Jr. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Semin Reprod Med* 2009; 27 (5): 417-428.

Pick M, Stelzer Y, Bar-Nur O, Mayshar Y, Eden A, Benvenisty N. Clone- and Gene-Specific Aberrations of Parental Imprinting in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 2009; 27: 2686-2690

Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 21–32.

Riccio A, Sparago A, Verde G et al: Inherited and sporadic epimutations at the IGF2-H19 locus in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor. *Endocr Dev* 2009; 14: 1–9.

Stadnick MP, Pieracci PM, Cranston MJ et al. Role of a 461-bp G-rich repetitive element in H19 transgene imprinting. *Dev Genes Evol* 1999; 209 (4): 239-248.

Suzuki Jr J, Therrien J, Filion F, Lefbvre R, Goff AK, Perecin F, Meirelles FV. Loss of Methylation at H19 DMD is Associated with Biallelic Expression and Reduced Development in Cattle Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Biology of reproduction* 2011; 84: 947-956.

Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126 (4): 663-676.

Uribe-Lewis S, Woodfine K, Stojic L, et al. Molecular mechanisms of genomic imprinting and clinical implications for cancer. *Expert Rev Mol Med* 2011; 13: e2.

Vanderwall DK, Woods GL, Roser JF, Schlafer DH, Sellon DC, Tester DF, White KL. (2006) Equine cloning : applications and outcomes. *Reprod Fertil Dev.* 2006;18(1-2):91-8.

Wang X, Miller DC, Harman R, Antczak DF, Clark AG. Paternally expressed genes predominate in the placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110 (26): 10705-10.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Characterization and identification of SNPs in the ICR of the equine H19 imprinted gene and transcript. **(A)** Establishment of the allele segregation within the mule for genomic methylation and cDNA quantification. Schematic representation of the H19 gene and the SNPs found in both the maternal (*E. caballus*) and paternal (*E. asinus*) CTCF binding motifs of the ICR and in exon 2 and 3 of the H19 transcript, in which the starred (*) SNP is proper to all material issued from the mule 04. Primers and probes are shown for both promoter and gene regions. **(B)** Conservation of the CTCF binding motif throughout bovine, human, rat, mouse, and equine genomes. **(C)** Methylation levels of equine gametes and adult fibroblasts of both paternal (♂) and maternal(♀) alleles. Methylated CpG islands are shown with black circles, whereas unmethylated CpG islands are open circles and the CTCF-A region is underlined.

Figure 2: Methylation and expression of H19 in day 50 *in vivo* mule embryo. **(A)** Methylation patterns of embryonic (EM) and extra-embryonic (EX) tissues of both paternal (♂) and maternal(♀) alleles. **(B)** Methylation of H19 ICR of paternal and maternal allele in both embryonic (EM) and extra-embryonic (EX) tissues. **(C)** Maternal monoallelic expression of H19 in EM and EX tissues. Average values are standardized through *SDHA*, *RPL32* and *GAPDH* housekeeping gene normalizing factor (geometric mean) in relation with calibrator day 50 muscle (=1). Data are mean ± SEM. p=0.05

Figure 3: Methylation and expression of H19 in cloned mule embryos. **(A)** Methylation patterns of embryonic (EM) and extra-embryonic (EX) tissues of both paternal (♂) and maternal(♀) alleles. **(B)** Methylation of H19 ICR CTCF-A of paternal and maternal allele in both embryonic (EM) and extra-embryonic (EX) tissues. **(C)** Maternal monoallelic expression of H19 in EM and EX tissues. Average values are standardized through *SDHA*, *RPL32* and *GAPDH* housekeeping gene normalizing factor (geometric mean) in relation with calibrator day 50 muscle (=1). Data are mean ± SEM. p=0.05

Figure 4: Pluripotency, methylation and expression of H19 in hybrid equine IPS cells(heIPS). **(A)** . Expression levels of pluripotency markers OCT4 and Nanog in embryonic fibroblasts(EF) and heIPS. **(B)** Methylation patterns of equine fibroblasts (EF), hybrid equid IPS cells at passage 02 (heIPS P02) and 10 (heIPS10) respectively of both paternal (♂) and maternal(♀) alleles **(C)** Methylation of H19 ICR CTCF-A of paternal and maternal allele in both EF and heIPS of passage 02 and 10. **(D)** Maternal monoallelic expression of H19 in EF, heIPS P02 and P09. Average values are standardized through *SDHA*, *RPL32* and *GAPDH* housekeeping gene normalizing factor (geometric mean) in relation with calibrator HNN (=1). Data are mean ± SEM.

Table I. PCR primers for bisulfite treatment, allelic expression and relative overall expression

Primer	Sequence 5' -> 3'
GAPDH-F	GCACCTACTTCAGCTGGAC
Gapdh-R	AAGTGAGCCCCAGCCTTCT
Gapdh-UPL	GATGCTGG
SDHA-F	GCACCTACTTCAGCTGGAC
SDHA-R	AACTCCAAGTCCTGGCAGG
SDHA-UPL	CCAGGGCA
RPL32-F	GAAGCACATGCTGCCAGT
RPL32-R	CTTTGCGGTTCTTGGAGGAG
RPL32-UPL	TGCTGCTC
UH19-F	TGTTTATTAATTTYGGGAGTGTAT
UH19-F	AACTAACRCCCRATCTCCT
H19-F	GCAGTGATCGGTGCCTCT
H19-R	TGTCTTTCTGAGCACATCCTG
H19-UPL	CAGCCACC

H19-ALL-F	CGGTGTGACGGTGAGGATG
H19-ALL-R	AGGAGTCAACACACTACTGCTGCTC
H19-VIC	ACATCTTCGGCTG
H19-FAM	ACATCTTTGGCTG
NANOG-F	CGGGGCTCTATTCCTACCACC
NANOG-R	GAGCACCAGGTCTGACTG
NANOG-UPL	CCCAGCAG
OCT4-F	GAGAGGCAACCTGGAGAACAT
OCT4-R	ACTCGTACCACGTCCTTCTCG
OCT4-UPL	CCCAGCAG

Figure 2:

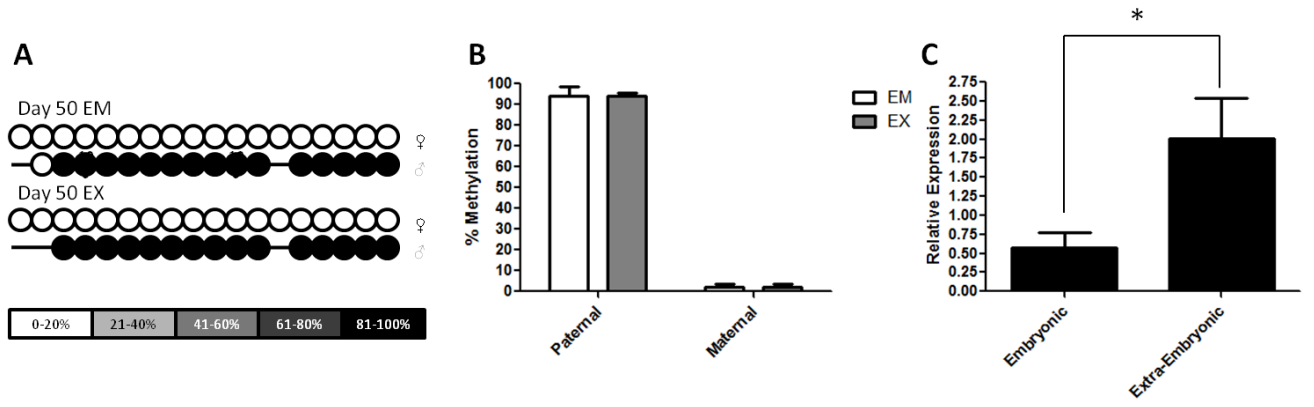


Figure 3:

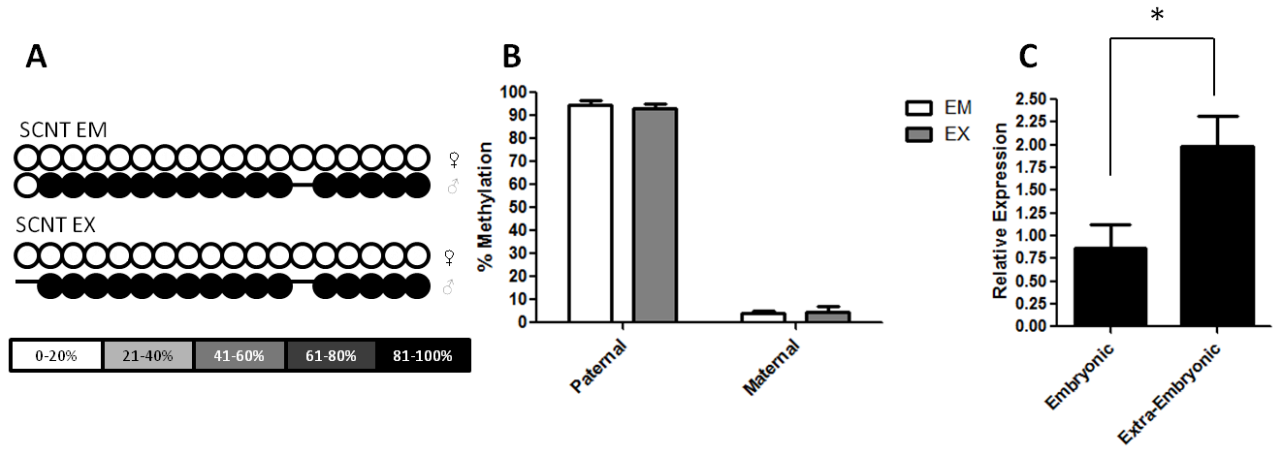
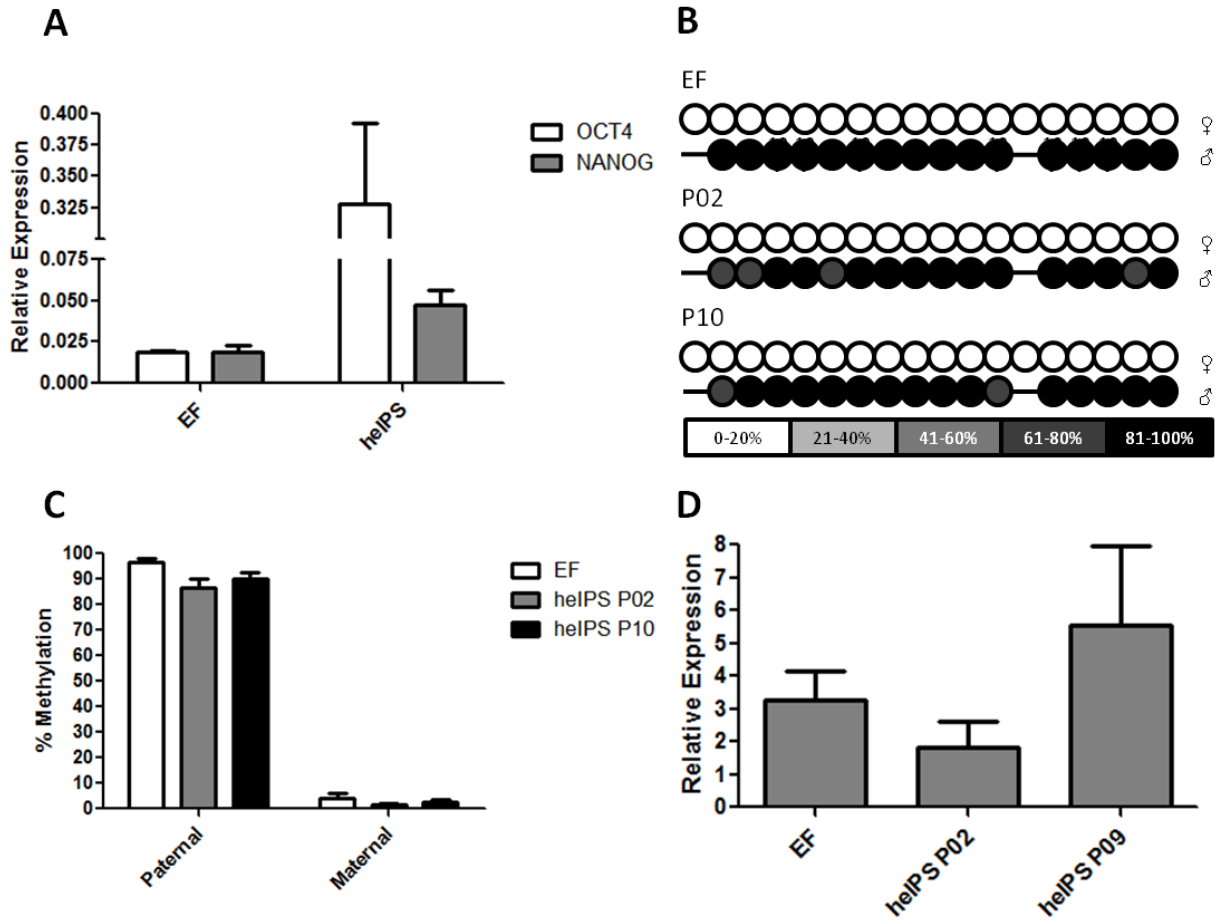


Figure 4:



5. Discussion

Les études faites dans le cadre de cette maîtrise ont permis de caractériser avec succès une partie de la région contrôle empreinte du gène H19 chez l'espèce équine. En utilisant un animal hybride, la mule, il a été possible de séparer l'apport parental des patrons de méthylation et des transcrits chez des échantillons adultes et des gamètes. Ensuite, nous avons comparé les niveaux d'expression trouvés dans les tissus extra-embryonnaire et embryonnaires d'une mule foetal au jour 50 ainsi qu'observé l'état de l'empreinte H19 durant le développement embryonnaire. Ultérieurement, nous avons créé des embryons mule issus de transfert nucléaire de cellule somatique pour étudier l'impact de cette technique sur le patron de méthylation ainsi que l'expression génique chez les tissus embryonnaires et extra-embryonnaires. Finalement, nous avons reprogrammé des cellules foetales issu du SCNT à l'aide de la pluripotence par induction, pour vérifier l'effet de cette méthode sur l'empreinte H19 dans la perspective de dériver des cellules souches pour des applications cliniques. Un bref retour sur chaque portion de ces études est nécessaire pour comprendre la portée de cette étude.

5.1 Caractérisation de H19 chez l'adulte

La caractérisation de H19 n'ayant jamais eu lieu chez un équin adulte, il était intéressant de savoir si H19 se comportait de manière conventionnelle chez l'équin. Les patrons de méthylation ont démontré que H19 était paternellement empreinté et que son expression était inactivé chez la mule adulte. Ces observations confirment que l'empreinte H19 suit le modèle insulaire démontré précédemment, cependant il est possible que les niveaux de H19 change dépendamment des tissus chez l'équin. Les souris adultes ayant des empreintes biens établis ont

démontré une répression de H19 dans leurs tissus, à l'exception des muscles cardiaques et squelettiques [Leibovitch et al, 1999], ce qui pourrait suggérer la présence de H19 dans d'autres tissus chez la mule adulte. Bien que 3 échantillons de peau adultes nous permettent de tirer des conclusions sur le comportement de H19 chez ce tissu adulte, il se peut qu'il ne représente pas un portrait de l'expression globale de H19 chez la mule adulte.

5.2 Expression de H19 chez la mule fœtale in vivo

Jusqu'à maintenant, aucune étude comparait l'expression des tissus extra-embryonnaires et ceux embryonnaires en étant capable de ségréger l'apport parental de H19 chez l'équin à ce stade de développement. Ces tissus ont démontré un maintien de l'empreinte dans tous les tissus, couplé à une expression mono-allélique maternelle de H19 significativement plus élevée chez les tissus de nature extra-embryonnaire, suggérant une méthylation de l'empreinte maintenue post-fécondation durant le développement du fœtus. Une étude qui observait le chorion de mules fœtales au jour 33 a démontré que les gènes paternellement exprimés étaient présent en plus grand nombre dans le placenta [Wang et al, 2013]. Chez l'humain, H19 régule l'expression de IGF2, qui joue un rôle dans le contrôle de la croissance du réseau capillaire du placenta [Frost, 2010]. Il est possible que des niveaux plus haut de H19 maternel sont trouvés dans les tissus extra-embryonnaires afin d'inactiver toute expression maternelle de IGF2, régulant ainsi la croissance du placenta. Cependant, l'étude de 7 tissus provenant d'une seule mule ne nous permet pas de confirmer statistiquement cette hypothèse. Il est crucial d'étudier plusieurs mules fœtales pour s'assurer du maintien de l'expression de H19 durant le développement fœtal.

5.3 Impact du SCNT sur H19

En dépit d'études précédentes démontrant les effets épigénétiques du SCNT sur les empreintes génomiques de mammifères, aucune n'a observé ces effets chez l'empreinte de H19 équine. Les ICR de tissus de fœtus clone n'ont pas montré de déméthylation chez l'allèle paternelle, indiquant un maintien de l'empreinte H19. L'expression H19 associée à ces ICR était complètement mono-allélique de source maternelle, suggérant contre toute attente que les équins seraient résistants à la reprogrammation du SCNT. Il est possible que l'âge des fœtus a eu un impact sur la signature épigénétique de ces fœtus. Chez les fœtus bovins issus du SCNT, des perturbations épigénétiques de H19 sont associées avec des troubles d'implantation. Ces embryons, démontrant une expression biallélique de H19, possédaient de petites vésicules, diminuant ainsi leur taux d'implantation [Suzuki et al., 2011]. Les fœtus mule clonés étant plus âgés que la fenêtre d'implantation chez l'équin, il est possible qu'une sélection naturelle de fœtus en bonne santé soit faite, démontrant ainsi aucune perturbation chez l'ICR de H19. L'étude d'un plus grand nombre de fœtus à un stade moins développé nous permettrait d'observer si tous les fœtus équin issus de SCNT sont résistants à la reprogrammation cellulaire.

5.4 La résistance de H19 chez les IPSc

Plusieurs études ont été écrites sur les IPS et leur impact sur l'épigénétique, mais aucune ne portait sur l'étude des gènes empreintés équin. Les cellules IPS dérivées de mule fœtale clonée ont exprimé de manière endogène les marqueurs Oct4 et NANOG, démontrant qu'une reprogrammation a eu lieu. Cette reprogrammation a induit une déméthylation partielle de l'ICR de H19 chez certaines colonies, toutefois sans induire une expression biallélique de H19. Ces

résultats semble infirmer notre hypothèse basé sur des travaux chez l'humain qui décrivait une perturbation de l'empreinte H19 chez les cellules IPS à travers les multiples passages. Cette résistance reste un avantage pour toutes cellules souches destinées à une différenciation cellulaire dans l'optique d'un traitement clinique. Cependant, avant de voir si il est possible de décliner ces cellules souches en plusieurs lignées cellulaires, il serait important de faire des essais de tératomes pour voir le degré de plasticité et de prolifération de ces cellules.

5.5 Perspectives de recherche

Ainsi, nous avons démontré que le gène empreinte H19 chez l'équin est établi et maintenu tel qu'observé chez d'autres mammifères en analysant la méthylation parent spécifique de son ICR ainsi que son expression génique durant le développement embryonnaire et chez les mules adultes. Il existe plusieurs avenues de recherche intéressantes en parallèle qui permettraient d'agrandir notre compréhension du comportement des empreintes chez l'équin, tant au niveau développemental que technique. Premièrement, étudier un des acteurs en directe relation de H19, soit IGF2. IGF2 s'exprime monoalléliquement dans la majorité des tissus, à l'exception des cellules hématopoïétique souches [Morison et al., 2000]. L'étude de souris dont le ICR de H19 était inactivé ont révélé un expression biallélique de IGF2, menant à un phénotype de surcroissance des souriceaux [Leighton et al., 1995; Ripoché et al., 1997]. Ainsi, l'observation de IGF2 chez les échantillons IPS pourrait démontrer une expression biallélique jusqu'à maintenant non observé chez l'équin et inversement, une double répression de l'expression de H19.

Une autre direction de recherche consiste à observer les acteurs responsables de la reprogrammation, notamment ceux induisant la déméthylation des promoteurs des gènes de

pluripotence endogènes. Tel que mentionné dans la revue de littérature, la déméthylation des séquences géniques de l'ADN pourrait être le résultat d'un processus passif ou actif. Les deux méthodes de reprogrammation sont intéressantes pour étudier ces deux théories car elles possèdent chacune une vitesse de reprogrammation propre. En premier lieu, dû à son bas taux d'efficacité et longue période de dérivation, les cellules IPS semblent être un bon modèle pour étudier la déméthylation passive. L'étude de l'action et de l'expression des méthyltransférases de maintien (DNMT1s) chez les cellules reprogrammées pourrait aider à élucider les étapes impliquées dans la déméthylation passive. Des études sur la méthylation d'ADN ont démontré qu'il était possible d'augmenter l'efficacité de reprogrammation en inhibant DNMT1 [Mikkelsen et al. 2008]. Ainsi, la déméthylation durant la reprogrammation serait mitose-dépendante, où les facteurs de reprogrammation antagonisent l'activité de la DNMT1 ainsi que son partenaire de liaison Urfh1, provoquant la déméthylation des empreintes à travers les divisions cellulaires (FIG. 1) [Bostick et al., 2007; Sharif et al., 2007]. Inversement, l'étude des méthyltransférases DNMT3, qui confère la méthylation *de novo*, nous aiderait à comprendre le maintien de la méthylation des empreintes tout au long du processus de déméthylation progressif qu'est la reprogrammation induite.

D'autre part, ne nécessitant pas de division cellulaire prolongée, la reprogrammation par SCNT est un bon modèle pour étudier le concept de la déméthylation active. De tous les acteurs dans la déméthylation active, les protéines Tet1 et AID sont les plus prometteuses. AID provoque la déamination d'une cytidine méthylée, la rendant sujet à la machinerie de réparation de l'ADN et la laissant ainsi déméthylée. AID est exprimé dans plusieurs types de cellules, tel que les

oocytes, les cellules souches et cellules germinales [Morgan et al., 2004]. Ainsi, il est possible que la protéine AID dans les oocytes joue un rôle dans la déméthylation lors du SCNT. Un autre acteur chez les mammifères serait Tet1 de la famille d'enzymes TET qui utilise un processus de déméthylation oxydative [Tahiliani et al., 2009] déjà observé chez les histones [Tsukada et al., 2006]. Bien que l'ensemble des TET ont une activité déméthylase, seul Tet1 joue un rôle dans la régénération des cellules ES de souris [Ito et al., 2010]. De plus, Tet1 est nécessaire au maintien de l'expression de Nanog dans ces cellules ES, où des knock-outs de Tet1 révèlent une méthylation du promoteur de Nanog résultant en une répression de son expression. Ainsi, autant dans la procédure de SCNT ou de pluripotence à induction, l'étude de Tet1 à différents stade de reprogrammation indiquerait s'il joue un rôle uniquement dans la prolifération des cellules ES ou un rôle actif dans la déméthylation prenant place durant la reprogrammation.

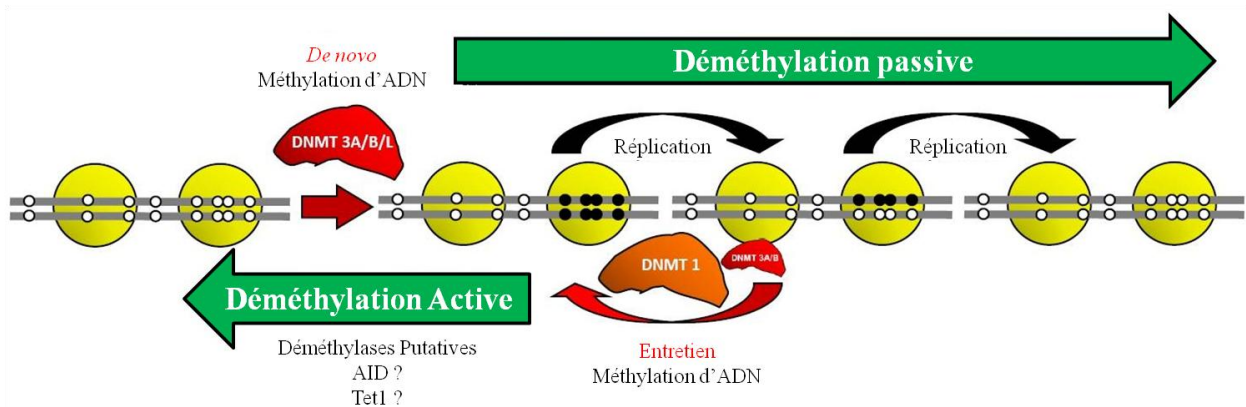


Figure 1. Schéma synoptique du processus de méthylation durant la réplication cellulaire [Carvalho et al., 2010]. Bien que la méthylation *de novo* est prise en charge par les DNMT3s, les mécanismes de la déméthylation semblent s'expliquer de deux façons - La déméthylation passive, expliqué par une inactivité de la méthylase de maintien DNMT1 et la déméthylation

active, possible grâce à certaines enzymes telles que AID et Tet1. Chaque type de déméthylation expliquerait la déméthylation observée dans deux types de reprogrammation - la reprogrammation lente de la pluripotente induite et celle rapide du SCNT.

Bien qu'il fût possible d'observer l'impact des méthodes de reprogrammation sur une partie de l'ICR chez H19, des limites de la technique d'amplification de PCR nous ont permis d'observer qu'une seule partie de l'ICR. Cependant, la séquence de l'ICR chez H19 étant hautement répétée, il est relativement prudent d'avancer que l'intégrité des empreintes est maintenue sur les autres séquences de liaison CTCF. Plusieurs nouvelles technologies de séquençage s'introduisent dans le domaine scientifique et deviennent de plus en plus accessibles. Grâce aux technologies appelées *deep sequencing*, il est possible de séquencer des milliers de fragments d'ADN ou d'ARN de manière simultanée. L'équipe de recherche de Wang ont pu étudier un éventail de gènes exprimés chez la mule à l'aide d'un transcriptome, révélant des patrons d'expression étant propre aux gènes empreintes. Ils ont pu aussi étudier le degré de méthylation de ces empreintes à l'aide du pyroséquencage, démontrant une certaine variation d'empreintes chez les tissus placentaire. L'utilisation de ces techniques chez nos échantillons clonés et IPS pourrait dévoiler une série d'autres gènes candidats comme empreintes, qui pourrait être eux affecté par le processus de reprogrammation.

Conclusion

Ces études nous ont permis de documenter l'empreinte génique H19 chez l'équin, ainsi qu'observer sa résistance au phénomène de reprogrammation. Grâce au haut degré de conservation de cette empreinte chez les mammifères, nous avons pu étudier une séquence différentiellement méthylé régulant l'expression de H19. Cette empreinte suit le modèle insulaire conventionnel chez les mammifères. De plus, l'étude de cette empreinte chez des échantillons issus du clonage et de pluripotence induite ont révélé que l'empreint H19 chez l'équin est sujette à des perturbations de son état de méthylation, mais ne provoque pas d'expression biallélique. Ces résultats sont prometteurs dans l'optique de dériver des cellules pluripotent de nature autologues dans les thérapies de médecine régénérative ainsi que créer un modèle d'étude de la reprogrammation n'ayant pas d'erreurs au niveau du maintien des empreintes.

Bibliographie

Arnhold, Stefan J., Iris Goletz, Helmut Klein, Gerald Stumpf, Lisa A. Beluche, Carsten Rohde, Klaus Addicks, and Lutz F. Litzke. Isolation and Characterization of Bone Marrow-derived Equine Mesenchymal Stem Cells. *AVMA Journals* 2007; 68 (10): 1095-105.

Bartolomei, M. S., Tilghman, S. M. Genomic Imprinting in Mammals. *Annu. Rev. Genet.* 1997; 31: 493-525.

Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 2000; 405: 482–485. Bourzac C, Smith LC, Vincent P, Beauchamp G, Lavoie JP, Laverty S. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Vet J.* 2010; 42 (6): 519-27.

Papp B, Plath K. Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell Research* 2001; 21: 486-501.

Boquest AC, A Noer and P Collas. Epigenetic programming of mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Stem Cell Rev* 2006; 2: 319–329.

Bostick, M., Kim, J.K., Esteve, P.O., Clark, A., Pradhan, S., and Jacobsen, S.E. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 2007; 317: 1760–1764.

Bourc'his, D. and Bestor, T. H. Origins of extreme sexual dimorphism in genomic imprinting. *Cytogenet. Genome Res* 2006; 113: 36-40.

Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol. Cell. Biol* 1990; 10: 28–36. Cai X, Cullen BR. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* 2007; 13: 313–316.

Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998; 280: 1256–1258.

Chen, C., Wang, K-Y., Shen, C-K J. DNA 5-Methylcytosine Demethylation Activities of the Mammalian DNA Methyltransferases. *J. Biol. Chem.* 2013; 288: 9084-9091.

Chen CL, Ip SM, Cheng D, Wong LC, Ngan HY. Loss of imprinting of the IGF-II and H19 genes in epithelial ovarian cancer. *Clin. Cancer Res* 2000; 6: 474–479.

Cheng XD, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 2008; 16: 341–350.

Chrisoula, A., A. Toupadakis, Alice Wong, Damian C. Genetos, Whitney K. Cheung, Dori L. Borjesson, Gregory L. Ferraro, Lawrence D. Galuppo, J. Leach, Sean D. Owens, and Clare E. Yellowley. Comparison of the Osteogenic Potential of Equine Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, Umbilical Cord Blood, and Umbilical Cord Tissue. *AVMA Journals* 2010; 71: 1237-1245.

Clapier CR, Cairns BR. The biology of chromatin remodeling complexes. *Ann Rev Biochem* 2009; 78: 273–304.

Cowan, C. A., I. Klimanskaya, J. McMahon, J. Atienza, J. Witmyer, J. P. Zucker, S. Wang, C. C. Morton, A. P. McMahon, D. Powers, and D. A. Melton. Derivation of Embryonic Stem-Cell Lines from Human Blastocysts. *The New England Journal of Medicine* 2004; 350 (13): 1353-356.

Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13734–13738.

De Carvalho, D., Soo You, J., Jones, P.A. DNA Methylation and Cellular Reprogramming. *Trends Cell Biol.* 2010; 20(10): 609-617.

DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 1990; 345: 78–80.

Del Bue, M., S. Ricco, et al. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. *Vet Res Commun* 2008; 32 Suppl 1: S51-55.

Del Bue M., Riccò S., Conti V., Merli E., Ramoni R., Grolli S. Platelet lysate promotes in vitro proliferation of equine mesenchymal stem cells and tenocytes. *Veterinary Research Communications* 2007; Suppl 1: 289–292.

Doerfler W. In pursuit of the first recognized epigenetic signal-DNA methylation - A 1976 to 2008 synopsis. *Epigenetics* 2008; 3: 125–133.

Durando M, Zarucco L, Schaer T, et al: Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration. *Equine Vet Educ* 2006; 18: 75–78.

Engel NI, West AE, Felsenfeld G, Bartolomei MS. Antagonism between DNA hypermethylation and enhancer-blocking activity at the H19 DMD is revealed by CpG mutations. *Nat. Genet* 2004; 36: 883– 888. Feng SH, Jacobsen SE, Reik W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 2010; 330: 622–627.

Feng Y-Q, Desprat R, Fu H, Olivier E, Lin CM, Lobell A, Gowda SN, Aladjem MI, Bouhassira EE. DNA methylation supports intrinsic epigenetic memory in mammalian cells. *PLoS Genet* 2006; 2: e65.

Filion GJ, van Bommel JG, Braunschweig U, Talhout W, Kind J, Ward LD, Brugman W, de Castro IJ, Kerkhoven RM, Bussemaker HJ et al. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in drosophila cells. *Cell* 2010; 143: 212–224.

Galli, Cesare, Irina Lagutina, Roberto Duchi, Silvia Colleoni, and Giovanna Lazzari. Somatic Cell Nuclear Transfer in Horses. *Reproduction in Domestic Animals* 2008; 43: 331-37.

Gilbert SF, Sarkar S. Embracing complexity: organicism for the 21st century. *Dev Dyn.* 2000; 219 (1): 1 – 9. Gimble, Jm, and F. Guilak. Adipose-derived Adult Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation Potential. *Cytotherapy* 2003; 5 (5): 362-69.

Gioia L, Barboni B, Turriani M, Capacchietti G, Pistilli M, Berardinelli P, Mattioli M. The capability of reprogramming the male chromatin after fertilization is dependent on the quality of oocyte maturation. *Reproduction* 2005; 130: 29–39.

Hajkova P, Erhardt S, Lane N et al: Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 2002; 117: 15–23.

Henig, Robin Marantz. *The Monk in the Garden: The Lost and Found Genius of Gregor Mendel, the Father of Genetics*. Boston: Houghton Mifflin 2000. ISBN 978-0395-97765-1.

Hermann A, Goyal R, Jeltsch A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem* 2004; 279: 48350–48359.

Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Hirose M, Noda S, Kim JM, Aoki F, Miyoshi H, Ogura A. Inefficient reprogramming of the hematopoietic stem cell genome following nuclear transfer. *J Cell Sci* 2006; 119: 1985–1991.

Ito S, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 2010; 466: 1129–1133.

Jablonka E, Raz G. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms and implications for the study of heredity and evolution. *Q Rev Biol* 2009; 84: 131–176.

Kacem S, Feil R. Chromatin mechanisms in genomic imprinting. *Mamm Genome* 2009; 20: 544–556.

Kaneda A, Feinberg AP. Loss of imprinting of IGF2: a common epigenetic modifier of intestinal tumor risk. *Cancer Res* 2005; 65: 11236–11240. Kaneda M, Hirasawa R, Chiba H, Okano M, Li E, Sasaki H. Genetic evidence for Dnmt3a-dependent imprinting during oocyte growth obtained by conditional knockout with Zp3-Cre and complete exclusion of Dnmt3b by chimera formation. *Genes Cells* 2010; 15: 169–179.

Keenen B and IL de la Serna. Chromatin remodeling in embryonic stem cells: regulating the balance between pluripotency and differentiation. *J Cell Physiol* 2009; 219: 1–7.

Kerjean A, Couvert P, Heams T, Chalas C, Poirier K, Chelly J, Jouannet P, Paldi A, Poirot C. In vitro follicular growth affects oocyte imprinting establishment in mice. *Eur J Hum Genet* 2003; 11: 493–496.

Koch, T. G., T Heerkens, P, D. Thomsen, and D. H. Betts. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Equine Umbilical Cord Blood. *BMC Biotechnology* 2007; 7 (26).

Lange Consiglio, A., B. Corradetti, D. Bizzaro B, M. Cassano, and F. Cremonesi. Horse Amnion: A Source of Mesenchymal (AMSC) and Epithelial Stem Cells. *Reproduction, Fertility and Development* 2009; 22 (1): 349-50.

Lawrence LT, Moley KH. Epigenetics and assisted reproductive technologies: Human imprinting syndromes. *Semin Reprod Med* 2008; 26: 143–152.

Leighton PA, Ingram RS, Eggenschwiler J, et al. Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice. *Nature* 1995; 375: 34–9.

Li, W., et al., Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 2009; 4 (1): 16-9.

Li T, Vu T, Ulaner G, Littmann E, Ling J-Q, Chen H-L, Hu J-F, Behr B, Giudice L, Hoffman A. IVF results in de novo DNA methylation and histone methylation at an Igf2-H19 imprinting epigenetic switch. *Hum Mol Reprod* 2005; 11: 631–640.

Lin, I.G., Tomzynski, T.J., Ou, Q., Hsieh, C.-L. Modulation of DNA Binding Protein Affinity Directly Affects Target Site Demethylation. *Molecular and Cellular Biology* 2000; 20 (7): 2343-2349.

Lopes S, Lewis A, Hajkova P, et al. Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. *Human Molecular Genetics* 2003; 12: 295–305.

Metivier, R., Gallais, R., Tiffocche, C., Le Peron, C., Jurkowska, R. Z., Carmouche, R. P., Ibberson, D., Barath, P., Demay, F., Reid, G. et al. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 2008; 452: 45-50.

Mikkelsen, T. S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B. E., Jaenisch, R., Lander, E. S. and Meissner, A. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 2008; 454: 49-55.

Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK.. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* 2004; 279: 52353–52360. Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005; 14: R47–R58.

Morison IM, Eccles MR, Reeve AE. Imprinting of insulin-like growth factor 2 is modulated during hematopoiesis. *Blood* 2000; 96: 3023–8.

Munsie, Megan J., Anna E. Michalska, Carmel M. O'Brien, Alan O. Trounson, Martin F. Pera, and Peter S. Mountford. Isolation of Pluripotent Embryonic Stem Cells from Reprogrammed Adult Mouse Somatic Cell Nuclei. *Current Biology* 2000; 10 (16): 989-92.

Ogawa, H., Ono, Y., Shimosawa, N., Sotomaru, Y., Katsuzawa, Y., Hiura, H., Ito, M., Kono, T. Disruption of imprinting in cloned mouse fetuses from embryonic stem cells. *Reproduction* 2003; 126: 549-557.

Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet.* 1998; 19 (3): 219 – 20. Pachnis V, Belayew A, Tilghman SM.

Locus unlinked to a-fetoprotein under the control of the murine raf and Rif genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984; 81: 5523–7.

Pachnis V, Brannan CI, Tilghman SM. The structure and expression of a novel gene activated in early mouse embryogenesis. *The EMBO Journal* 1988; 7: 673–81.

Parelho V, Hadjur S, Spivakov M, Leleu M, Sauer S, Gregson HC, Jarmuz A, Canzonetta C, Webster Z, Nesterova T, Cobb BS, Yokomori K, Dillon N, Aragon L, Fisher AG, Merckenschlager M. Cohesins Functionally Associate with CTCF on Mammalian Chromosome Arms. *Cell* 2008; 132: 422–433.

Pick, M., Stelzer, Y. and Benvenisty, N. Clone- and Gene-Specific Aberration of Parental Imprinting in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 2009; 27: 2686-2690.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143 – 14

Poirier F, Chan C-TJ, Timmons PM, et al. The murine H19 gene is activated during embryonic stem cell differentiation in vitro and at the time of implantation in the developing embryo. *Development* 1991; 113: 1105–14.

Popp C, Dean W, Feng SH, Cokus SJ, Andrews S, Pellegrini M, Jacobsen SE, Reik W. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 2010; 463: 1101–1126.

Reed SA, Johnson SE. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *J Cell Physiol.* 2008 ; 215 (2): 329-36.

Reik W, Brown KW, Schneid H, Le Bouc Y, Bickmore W, Maher ER. Imprinting mutations in the Beckwith-Wiedemann syndrome suggested by an altered imprinting pattern in the IGF2-H19 domain. *Hum. Molec. Genet* 1995; 4: 2379–2385.

Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293: 1089–1093.

Reik W, Murrell A. Genomic imprinting—silence across the border. *Nature* 2000; 405: 408–409.

Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 21–32.

Ripoche MA, Kress C, Poirier F, et al. Deletion of the H19 transcription unit reveals the existence of a putative imprinting control element. *Genes and Development* 1997; 11: 1596–604.

Saito, S., H. Ugai, K. Sawai, Y. Yamamoto, A. Minamihashi, K. Kurosaka, Y. Kobayashi, T. Murata, Y. Obata, and K. Yokoyama. Isolation of Embryonic Stem-like Cells from Equine Blastocysts and Their Differentiation in Vitro. *FEBS Letters* 2002; 531: 389-96.

Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 129–140.

Schoenherr CJ, Levorse JM, Tilghman SM. CTCF maintains differential methylation at the *Igf2/H19* locus. *Nat. Genet* 2003; 33: 66–69.

Seidl CI, Stricker SH, Barlow DP. The imprinted Air ncRNA is an atypical RNAPII transcript that evades splicing and escapes nuclear export. *The EMBO Journal* 2006; 25: 3565–75.

Seki Y, Hayashi K, Itoh K, Mizugaki M, Saitou M, Matsui Y. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev Biol* 2005; 278: 440–458.

Smith, A. G. Culture and Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Methods in Cell Sciences* 1991; 13 (2): 89-94.

Smith RK. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disabil Rehabil* 2008; 30: 1752–1758.

Smits G, Mungall AJ, Griffiths-Jones S, Smith P, Beury D, Matthews L, Rogers J, Pask AJ, Shaw G, Vandenberg JL, McCarrey JR, Renfree MB, Reik W, Dunham I. Conservation of the H19 noncoding RNA and H19-IGF2 imprinting mechanism in therians. *Nat. Genet* 2008; 40: 971–976. Spinelli, V., P.V. Guillot, and P. De Coppi, Induced pluripotent stem (iPS) cells from human fetal stem cells (hFSCs). *Organogenesis*, 2013; 9 (2): 101-10.

Stadnick MP, Pieracci FM, Cranston MJ, Taksel E, Thorvaldsen JL, Bartolomei MS. Role of a 461 bp G-rich repetitive element in H19 transgene imprinting. *Dev. Genes Evo* 1999; 209: 239–248.

Stedman W, Kang H, Lin S, Kissil JL, Bartolomei MS, Lieberman PM. Cohesins localize with CTCF at the KSHV latency control region and at cellular c-myc and H19/*Igf2* insulators. *Embo J* 2008; 27: 654–666. Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS. Architectural epigenetics: mitotic retention of mammalian transcriptional regulatory information. *Mol Cell Biol* 2010; 30: 4758–4766.

Surani MA: Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. *Cell* 1998; 93: 309–312.

Tahiliani M, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009; 324: 930–935. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 219 (1): 1-9.

Tamashiro KLK, Wakayama T, Akutsu H, Yamazaki Y, Lachey JL, Wortman MD, Seeley RJ, D'Alessio DA, Woods SC, Yanagimachi R, Sakai RR. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nat Med* 2002; 8, 262–267.

Thorvaldsen JL, Duran KL, Bartolomei MS. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and *Igf2*. *Genes Dev* 1998; 12:3693–3702.

Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 2006; 439: 811–816.

Vidal, M. A., G. E. Kilroy, et al. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet Surg* 2007; 36 (7): 613-622.

Youngson NA, Whitelaw E. Transgenerational epigenetic effects. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; 9: 233–257.

Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., and Yanagimachi, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394: 369–374.

Wernig M, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448: 318–324.

Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810–813.

Zaidi SK, Young DW, Montecino M, Lian JB, Xue F, Tian XC, Du F, Kubota C, Taneja M, Dinnyes A, Dai Y, Levine H, Pereira LV, Yang X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet* 2002; 31: 216–220.

Young L, Sinclair K, Wilmot I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 1998; 3: 155–163.

Zemel S, Bartolomei M, Tilghman S. Physical linkage of two mammalian imprinted genes, H19 and insulin-like growth factor 2. *Nature Genetics* 1992; 2: 61–5.

Zuccotti M, Garagna S, Redi CA. Nuclear transfer, genome reprogramming and novel opportunities in cell therapy. *J Endocrinol Invest* 2000; 23, 623–629.

Zuk, P. A., M. Zhu, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13 (12): 4279-4295.