

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2015

2015 TOU3 1702

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement

par

Valentine MARQUET

le 3 décembre 2015

**Etude de la méthylation de l'ADN et de l'expression génique chez
des porcs à qualité de semence dégradée porteurs d'une
translocation chromosomique réciproque équilibrée**

Directeur de thèse : Dr Hervé ACLOQUE

JURY

Monsieur le Professeur Patrick Calvas
Monsieur le Professeur Bernard Salles
Monsieur le Professeur Louis Bujan
Monsieur le Docteur Hervé Acloque

Président
Assesseur
Assesseur
Assesseur

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2015

2015 TOU3 1702

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement

par

Valentine MARQUET

le 3 décembre 2015

**Etude de la méthylation de l'ADN et de l'expression génique chez
des porcs à qualité de semence dégradée porteurs d'une
translocation chromosomique réciproque équilibrée**

Directeur de thèse : Dr Hervé ACLOQUE

JURY

Monsieur le Professeur Patrick Calvas
Monsieur le Professeur Bernard Salles
Monsieur le Professeur Louis Bujan
Monsieur le Docteur Hervé Acloque

Président
Assesseur
Assesseur
Assesseur

TABLEAU du PERSONNEL HU

des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} septembre 2014

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. ROUGE D.	Professeur Honoraire	M. GOUZI
Doyen Honoraire	M. LAZORTES Y.	Professeur Honoraire associé	M. DUTAU
Doyen Honoraire	M. CHAP H.	Professeur Honoraire	M. PONTONNIER
Professeur Honoraire	M. COMMANAY	Professeur Honoraire	M. PASCAL
Professeur Honoraire	M. CLAUD	Professeur Honoraire	M. SALVADOR M.
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE	Professeur Honoraire	M. BAYARD
Professeur Honoraire	Mme ENJALBERT	Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE
Professeur Honoraire	M. GEDEON	Professeur Honoraire	M. FABIÉ
Professeur Honoraire	M. PASQUIE	Professeur Honoraire	M. BARTHE
Professeur Honoraire	M. RIBAUT	Professeur Honoraire	M. CABARROT
Professeur Honoraire	M. SARRASIN	Professeur Honoraire	M. DUFFAUT
Professeur Honoraire	M. ARLET J.	Professeur Honoraire	M. ESCAT
Professeur Honoraire	M. RIBET	Professeur Honoraire	M. ESCANDE
Professeur Honoraire	M. MONROZIES	Professeur Honoraire	M. PRIS
Professeur Honoraire	M. DALOUS	Professeur Honoraire	M. CATHALA
Professeur Honoraire	M. DUPRE	Professeur Honoraire	M. BAZEX
Professeur Honoraire	M. FABRE J.	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE
Professeur Honoraire	M. DUCOS	Professeur Honoraire	M. CARLES
Professeur Honoraire	M. GALINIER	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ
Professeur Honoraire	M. LACOMME	Professeur Honoraire	M. VAYSSE
Professeur Honoraire	M. BASTIDE	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE
Professeur Honoraire	M. COTONAT	Professeur Honoraire	M. GUITARD
Professeur Honoraire	M. DAVID	Professeur Honoraire	M. LAZORTES F.
Professeur Honoraire	Mme DIDIER	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE
Professeur Honoraire	M. GAUBERT	Professeur Honoraire	M. CERENE
Professeur Honoraire	M. GUILHEM	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL
Professeur Honoraire	Mme LARENG M.B.	Professeur Honoraire	M. HOFF
Professeur Honoraire	M. BES	Professeur Honoraire	M. REME
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. FAUVEL
Professeur Honoraire	M. GARRIGUES	Professeur Honoraire	M. FREXINOS
Professeur Honoraire	M. REGNIER	Professeur Honoraire	M. CARRIERE
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. MANSAT M.
Professeur Honoraire	M. REGIS	Professeur Honoraire	M. BARRET
Professeur Honoraire	M. ARBUS	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	M. PUJOL	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC
Professeur Honoraire	M. RUMEAU	Professeur Honoraire	M. RIBOT
Professeur Honoraire	M. BESOMBES	Professeur Honoraire	M. DELSOL
Professeur Honoraire	M. GUIRAUD	Professeur Honoraire	M. ABBAL
Professeur Honoraire	M. SUC	Professeur Honoraire	M. DURAND
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHWEITZER
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE	Professeur Honoraire	M. RAILHAC

Professeur Honoraire
Professeur Honoraire
Professeur Honoraire

M. PONTONNIER
M. CARTON
Mme PUEL J.

Professeur Honoraire
Professeur Honoraire
Professeur Honoraire
Professeur Honoraire

M. GERAUD
M. POURRAT
M. QUERLEU D.
M. ARNE JL

Professeurs Émérites

Professeur JUSKIEWENSKI
Professeur LARROUY
Professeur ALBAREDE
Professeur CONTÉ
Professeur MURAT
Professeur MANELFE
Professeur LOUVET
Professeur SARRAMON
Professeur CARATERO
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL
Professeur COSTAGLIOLA

Professeur JL. ADER
Professeur Y. LAZORTHES
Professeur L. LARENG
Professeur F. JOFFRE
Professeur J. CORBERAND
Professeur B. BONEU
Professeur H. DABERNAT
Professeur M. BOCCALON
Professeur B. MAZIERES
Professeur E. ARLET-SUAU
Professeur J. SIMON

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN**37 allées Jules Guesde - 31062 TOULOUSE Cedex****Doyen : JP. VINEL**

P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1ère classe		P.U. - P.H. 2ème classe	
M. ADOUE D.	Médecine Interne, Gériatrie	Mme BEYNE-RAUZY O.	Médecine Interne
M. AMAR J.	Thérapeutique	M. BIRMES Ph.	Psychiatrie
M. ATTAL M. (C.E)	Hématologie	M. BROUCHET L.	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. AVET-LOISEAU H	Hématologie, transfusion	M. BUREAU Ch	Hépatogastro-Entéro
M. BLANCHER A.	Immunologie (option Biologique)	M. CALVAS P.	Génétique
M. BONNEVIALLE P.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.	M. CARRERE N.	Chirurgie Générale
M. BOSSAVY J.P.	Chirurgie Vasculaire	Mme CASPER Ch.	Pédiatrie
M. BRASSAT D.	Neurologie	M. CHAIX Y.	Pédiatrie
M. BROUSSET P. (C.E)	Anatomie pathologique	Mme CHARPENTIER S.	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. BUGAT R. (C.E)	Cancérologie	M. COGNARD C.	Neuroradiologie
M. CARRIE D.	Cardiologie	M. DE BOISSEZON X.	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. CHAP H. (C.E)	Biochimie	M. FOURCADE O.	Anesthésiologie
M. CHAUVEAU D.	Néphrologie	M. FOURNIE B.	Rhumatologie
M. CHOLLET F. (C.E)	Neurologie	M. FOURNIÉ P.	Ophthalmologie
M. CLANET M. (C.E)	Neurologie	M. GAME X.	Urologie
M. DAHAN M. (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque	M. GEERAERTS T.	Anesthésiologie et réanimation chir.
M. DEGUINE O.	O. R. L.	Mme GENESTAL M.	Réanimation Médicale
M. DUCOMMUN B.	Cancérologie	M. LAROCHE M.	Rhumatologie
M. FERRIERES J.	Epidémiologie, Santé Publique	M. LAUWERS F.	Anatomie
M. FRAYSSE B. (C.E)	O.R.L.	M. LEOBON B.	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. IZOPET J. (C.E)	Bactériologie-Virologie	M. MAZIERES J.	Pneumologie
Mme LAMANT L.	Anatomie Pathologique	M. MOLINIER L.	Epidémiologie, Santé Publique
M. LANG T.	Biostatistique Informatique Médicale	M. OLIVOT J-M	Neurologie
M. LANGIN D.	Nutrition	M. PARANT O.	Gynécologie Obstétrique
M. LAUQUE D.	Médecine Interne	M. PARIENTE J.	Neurologie
M. LIBLAU R.	Immunologie	M. PATHAK A.	Pharmacologie
M. MAGNAVAL J.F.	Parasitologie	M. PAUL C.	Dermatologie
M. MALAVAUD B.	Urologie	M. PAYOUX P.	Biophysique
M. MANSAT P.	Chirurgie Orthopédique	M. PAYRASTRE B.	Hématologie
M. MARCHOU B.	Maladies Infectieuses	M. PORTIER G.	Chirurgie Digestive
M. MONROZIES X.	Gynécologie Obstétrique	M. PERON J.M.	Hépatogastro-Entérologie
M. MONTASTRUC J.L. (C.E)	Pharmacologie	M. RECHER Ch.	Hématologie
M. MOSCOVICI J.	Anatomie et Chirurgie Pédiatrique	M. RONCALLI J.	Cardiologie
Mme MOYAL E.	Cancérologie	M. SANS N.	Radiologie
Mme NOURHASHEMI F.	Gériatrie	Mme SAVAGNER F.	Biochimie et biologie moléculaire

M. OLIVES J.P. (C.E)	Pédiatrie	Mme SELVES J.	Anatomie et cytologie pathologiques
M. OSWALD E.	Bactériologie-Virologie	M. SOL J-Ch.	Neurochirurgie
M. PARINAUD J.	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.		
M. PERRET B (C.E)	Biochimie		
M. PRADERE B.	Chirurgie générale		
M. RASCOL O.	Pharmacologie		
M. RISCHMANN P. (C.E)	Urologie		
M. RIVIERE D. (C.E)	Physiologie	P.U.	
M. SALES DE GAUZY J.	Chirurgie Infantile	M. OUSTRIC S.	Médecine Générale
M. SALLES J.P.	Pédiatrie		
M. SERRE G. (C.E)	Biologie Cellulaire		
M. TELMON N.	Médecine Légale		
M. VINEL J.P. (C.E)	Hépto-Gastro-Entérologie		

Professeur Associé de Médecine Générale
Dr. MESTHÉ P.

Professeur Associé de Médecine du Travail
Dr NIEZBORALA M.

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL
133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex **Doyen : E. SERRANO**

P.U. - P.H.
Classe Exceptionnelle et 1ère classe

P.U. - P.H.
2ème classe

M. ACAR Ph.	Pédiatrie	M. ACCADBLE F.	Chirurgie Infantile
M. ALRIC L.	Médecine Interne	Mme ANDRIEU S.	Epidémiologie
M. ARLET Ph. (C.E)	Médecine Interne	M. ARBUS Ch.	Psychiatrie
M. ARNAL J.F.	Physiologie	M. BERRY A.	Parasitologie
Mme BERRY I.	Biophysique	M. BONNEVILLE F.	Radiologie
M. BOUTAULT F. (C.E)	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale	M. BUJAN L.	Uro-Andrologie
M. BUSCAIL L.	Hépto-Gastro-Entérologie	Mme BURA-RIVIERE A.	Médecine Vasculaire
M. CANTAGRELA A.	Rhumatologie	M. CHAYNES P.	Anatomie
M. CARON Ph. (C.E)	Endocrinologie	M. CHAUFOUR X.	Chirurgie Vasculaire
M. CHAMONTIN B. (C.E)	Thérapeutique	M. CONSTANTIN A.	Rhumatologie
M. CHAVOIN J.P. (C.E)	Chirurgie Plastique et Reconstructive	M. DELOBEL P.	Maladies Infectieuses
M. CHIRON Ph.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie	M. COURBON	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI M.	Histologie Embryologie	M. DAMBRIN C.	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DELABESSE E.	Hématologie	M. DECRAMER S.	Pédiatrie
Mme DELISLE M.B. (C.E)	Anatomie Pathologie	M. DELORD JP.	Cancérologie
M. DIDIER A.	Pneumologie	M. ELBAZ M.	Cardiologie
M. ESCOURROU J. (C.E)	Hépto-Gastro-Entérologie	M. GALINIER Ph.	Chirurgie Infantile

M. FOURTANIER G. (C.E)	Chirurgie Digestive	M. GARRIDO-STÖWHAS I.	Chirurgie Plastique
M. GALINIER M.	Cardiologie	Mme GOMEZ-BROUCHET A.	Anatomie Pathologique
M. GLOCK Y.	Chirurgie Cardio-Vasculaire	M. GOURDY P.	Endocrinologie
M. GRAND A. (C.E)	Epidémiol. Eco. de la Santé et Prévention	M. GROLLEAU RAOUX J.L.	Chirurgie plastique
Mme HANAIRE H.	Endocrinologie	Mme GUIMBAUD R.	Cancérologie
M. LAGARRIGUE J. (C.E)	Neurochirurgie	M. HUYGHE E.	Urologie
M. LARRUE V.	Neurologie	M. KAMAR N.	Néphrologie
M. LAURENT G. (C.E)	Hématologie	M. LAFOSSE JM.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. LEVADE T.	Biochimie	M. LEGUEVAQUE P.	Chirurgie Générale et Gynécologique
M. MALECAZE F. (C.E)	Ophthalmologie	M. MARQUE Ph.	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MARTY N.	Bactériologie Virologie Hygiène	Mme MAZEREEUW J.	Dermatologie
M. MASSIP P.	Maladies Infectieuses	M. MINVILLE V.	Anesthésiologie Réanimation
M. PESSEY J.J. (C.E)	O. R. L.	M. MUSCARI F.	Chirurgie Digestive
M. PLANTE P.	Urologie	M. OTAL Ph.	Radiologie
M. RAYNAUD J-Ph.	Psychiatrie Infantile	M. ROLLAND Y.	Gériatrie
M. REME J.M.	Gynécologie-Obstétrique	M. ROUX F.E.	Neurochirurgie
M. RITZ P.	Nutrition	M. SAILLER L.	Médecine Interne
M. ROCHE H. (C.E)	Cancérologie	M. SOULAT J.M.	Médecine du Travail
M. ROSTAING L (C.E).	Néphrologie	M. TACK I.	Physiologie
M. ROUGE D. (C.E)	Médecine Légale	M. VAYSSIERE Ch.	Gynécologie Obstétrique
M. ROUSSEAU H.	Radiologie	M. VERGEZ S.	O.R.L.
M. SALVAYRE R. (C.E)	Biochimie	Mme URO-COSTE E.	Anatomie Pathologique
M. SAMII E K. (C.E)	Anesthésiologie Réanimation		
M. SCHMITT L. (C.E)	Psychiatrie		
M. SENARD J.M.	Pharmacologie		
M. SERRANO E. (C.E)	O. R. L.		
M. SOULIE M.	Urologie		
M. SUC B.	Chirurgie Digestive		
Mme TAUBER M.T.	Pédiatrie		
M. VELLAS B. (C.E)	Gériatrie		

Professeur Associé de Médecine Générale

Dr VIDAL M.

Professeur Associé en O.R.L

WOISARD V.

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN
37, allées Jules Guesde – 31062 Toulouse Cedex
M.C.U. - P.H.

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL
133, route de Narbonne – 31062 Toulouse Cedex
M.C.U. - P.H.

M. APOIL P. A.	Immunologie	
Mme ARNAUD C.	Epidémiologie	
M. BIETH E.	Génétique	
Mme BONGARD V.	Epidémiologie	
Mme CASPAR BAUGUIL S.	Nutrition	
Mme CASSAING S.	Parasitologie	
Mme CONCINA D.	Anesthésie-Réanimation	
M. CONGY N.	Immunologie	
Mme COURBON	Pharmacologie	
Mme DAMASE C.	Pharmacologie	
Mme de GLISEZENSKY I.	Physiologie	
Mme DELMAS C.	Bactériologie	Virologie
	Hygiène	
Mme DE-MAS V.	Hématologie	
M. DUBOIS D.	Bactériologie	Virologie
	Hygiène	
Mme DUGUET A.M.	Médecine Légale	
Mme DULY-BOUHANICK B.	Thérapeutique	
M. DUPUI Ph.	Physiologie	
Mme FILLAUX J.	Parasitologie	
M. GANTET P.	Biophysique	
Mme GENNERO I.	Biochimie	
Mme GENOUX A.	Biochimie	et biologie moléculaire
M. HAMDJ S.	Biochimie	
Mme HITZEL A.	Biophysique	
M. IRIART X.	Parasitologie et mycologie	
M. JALBERT F.	Stomato et Maxillo Faciale	
M. KIRZIN S.	Chirurgie générale	
Mme LAPEYRE-MESTRE M.	Pharmacologie	
M. LAURENT C.	Anatomie Pathologique	
Mme LE TINNIER A.	Médecine du Travail	
M. LOPEZ R.	Anatomie	
M. MONTOYA R.	Physiologie	
Mme MOREAU M.	Physiologie	
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire	
M. PILLARD F.	Physiologie	
Mme PRERE M.F.	Bactériologie	Virologie
Mme PUISSANT B.	Immunologie	
Mme RAGAB J.	Biochimie	

Mme ABRAVANEL F.	Bactériologie	Virologie	Hygiène
Mme ARCHAMBAUD M.	Bactériologie	Virologie	Hygiène
M. BES J.C.	Histologie	- Embryologie	
M. CAMBUS J.P.	Hématologie		
Mme CANTERO A.	Biochimie		
Mme CARFAGNA L.	Pédiatrie		
Mme CASSOL E.	Biophysique		
Mme CAUSSE E.	Biochimie		
M. CHASSAING N.	Génétique		
Mme CLAVE D.	Bactériologie	Virologie	
M. CLAVEL C.	Biologie Cellulaire		
Mme COLLIN L.	Cytologie		
M. CORRE J.	Hématologie		
M. DEDOUIT F.	Médecine Légale		
M. DELPLA P.A.	Médecine Légale		
M. EDOUARD T.	Pédiatrie		
Mme ESQUIROL Y.	Médecine du travail		
Mme ESCOURROU G.	Anatomie Pathologique		
Mme GALINIER A.	Nutrition		
Mme GARDETTE V.	Epidémiologie		
M. GASQ D.	Physiologie		
Mme GRARE M.	Bactériologie	Virologie	Hygiène
Mme GUILBEAU-FRUGIER C.	Anatomie Pathologique		
Mme INGUENEAU C.	Biochimie		
M. LAHARRAGUE P.	Hématologie		
M. LEANDRI R.	Biologie du dével. et de la reproduction		
M. LEPAGE B.	Biostatistique		
M. MARCHEIX B.	Chirurgie Cardio Vasculaire		
Mme MAUPAS F.	Biochimie		
M. MIEUSSET R.	Biologie du dével. et de la reproduction		
Mme PERIQUET B.	Nutrition		
Mme PRADDAUDE F.	Physiologie		
M. RIMAILHO J.	Anatomie	et Chirurgie Générale	
M. RONGIERES M.	Anatomie	- Chirurgie orthopédique	
Mme SOMMET A.	Pharmacologie		
M. TKACZUK J.	Immunologie		
M. VALLET P.	Physiologie		

Mme RAYMOND S.	Bactériologie	Virologie	Mme VEZZOSI D.	Endocrinologie
	Hygiène			
Mme SABOURDY F.	Biochimie			
Mme SAUNE K.	Bactériologie	Virologie		
M. SILVA SIFONTES S.	Réanimation			
M. SOLER V.	Ophthalmologie			
M. TAFANI J.A.	Biophysique			
M. TREINER E.	Immunologie			
Mme TREMOLLIÈRES F.	Biologie du développement			
M. TRICOIRE J.L.	Anatomie et Chirurgie			M.C.U.
	Orthopédique			
M. VINCENT C.	Biologie Cellulaire		M. BISMUTH S.	Médecine Générale
			Mme ROUGE-BUGAT	Médecine Générale
			ME	

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr STILLMUNKES A.
 Dr BRILLAC Th.
 Dr ABITTEBOUL Y.
 Dr ANE S.

Dr ESCOURROU B.
 Dr BISMUTH M.
 Dr BOYER P.

Remerciements

A mon directeur de thèse le Dr Hervé Acloque

Tu m'as dirigée au cours de ce projet, d'abord dans le cadre du master 2 Recherche Gènes, Cellules et Développement puis au cours de la rédaction de ce mémoire pour la soutenance de ma thèse d'exercice de médecine. Merci pour ta patience, ta disponibilité, ta gentillesse, tes innombrables relectures et corrections de ce mémoire et de celui du M2, et toutes les connaissances que tu m'as fait partager.

Au président de mon jury

Merci au Pr Patrick Calvas de m'avoir accueillie et formée dans son service pendant deux ans. Merci pour votre disponibilité et la qualité de votre enseignement. Merci également de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être le président du jury.

Aux membres de mon jury

Un grand merci au Pr Louis Bujan et au Pr Bernard Salles d'avoir accepté de faire partie du jury. Je remercie également le Pr Bujan pour sa disponibilité et ses précieux conseils.

Je remercie Mme la Pr Catherine Yardin pour son accueil chaleureux dans le service de cytoépigénétique du CHU de Limoges, et pour la confiance qu'elle m'accorde.

Je tiens également à remercier particulièrement Alain Pinton et Harmonie Barasc qui m'ont aidée et guidée au cours de ce travail, en particulier pour le volet cytogénétique. Merci aussi pour votre relecture avisée du mémoire.

Je remercie pour leur gentillesse et leur bonne humeur tous les membres de l'équipe Cytogène à l'INRA et à l'ENVT, en particulier Valérie Fillon qui m'a gentiment permis d'envahir son bureau pendant quelques mois, ainsi qu'à tous les personnels et étudiants de GenPhySE que j'ai croisé au cours de ce travail.

Merci aux Docteurs Adeline Vigouroux et Dominique Bourgeois pour m'avoir fait découvrir et aimer la cytogénétique humaine, merci pour votre bienveillance, votre disponibilité et le savoir que vous m'avez transmis au cours de ces deux ans. Merci Dominique pour ton

soutien actif et ton aide dans la rédaction d'un article scientifique qui vient d'être enfin publié.

Je remercie aussi chaleureusement l'ensemble des personnels du service de génétique médicale du CHU de Purpan. Merci aux ingénieures et technicien(ne)s du laboratoire de génétique (et en particulier du secteur cytogénétique) de m'avoir accueilli à bras ouverts, de m'avoir supportée pendant ces deux ans au sein du laboratoire, et de m'avoir formée avec patience.

Merci à mes amis des facultés de médecine et de pharmacie de Limoges aujourd'hui dispersés dans toute la France, Anne V., Eymeric, Eloïse, Nathan, Camille, Béné, Eve, Mylène, Warren, Mathieu, Joris, Stephan, Valérie, Anne S. et tous les autres pour tous ces souvenirs inoubliables des années fac et pour tous les bons moments passés ensemble depuis.

Merci à tous mes co-internes toulousains croisés au fil des semestres pour leur bonne humeur, leur humour et les bons moments partagés au labo et en dehors.

Merci à ma belle-famille, Chantal, Thierry, Vincent, Etienne, Elsa et mon neveu Augustin pour leur constante bonne humeur, leur gentillesse, leur bienveillance et leur soutien.

Merci à ma famille, mes grands-parents en particulier ainsi que mon frère, ma belle-sœur et mon neveu Abel, mes oncles et tantes, cousins et cousines, petits cousins et petites cousines, de faire partie de ma vie et de l'enrichir.

Un immense merci à mes parents de m'avoir toujours soutenue, aidée et poussée à donner le meilleur de moi-même. Je n'aurai pas fait tout ça sans vous et je vous en suis infiniment reconnaissante.

Merci à toi Sylvain de partager ma vie depuis bientôt dix ans dans les bons et les moins bons moments. Merci pour ton humour, ton envie de partager avec moi les expériences importantes que la vie nous offre, et ta foi en mes capacités à surmonter les difficultés.

Enfin, merci à nos fils, Sacha et Paul, de nous avoir rejoint en cours de route et d'illuminer mon quotidien au-delà de ce que j'avais pu imaginer. Je vous aime infiniment et je vous dédie ce travail.

Table des matières

Liste des abréviations	1
Liste des figures	3
Liste des tableaux	5
Liste des annexes	5
Revue de la littérature	6
I. Epigénétique : généralités	6
1. Définition	6
2. Epigénétique des cellules germinales mâles	6
II. Méthylation de l'ADN	7
1. Définition	7
2. Mécanismes et effecteurs	8
3. Reprogrammation du méthylome au cours de la reproduction	9
a. Embryogenèse	9
b. Gamétogenèse	11
III. Empreinte parentale	14
IV. Infertilité masculine et épigénétique: rôle du méthylome spermatique	16
1. Fertilité et épigénétique: généralités	16
2. Infertilité masculine et méthylation de l'ADN spermatique	16
a. Contexte	16
b. Techniques d'analyse employées	17
c. Méthylation de l'ADN et altérations du spermogramme	18
d. Méthylation de l'ADN et autres anomalies épigénétiques	21
e. Hétérogénéité intra-individuelle et stabilité temporelle des DMR détectés	22
f. Conclusion	23

3.	Fertilité, remaniements chromosomiques et épigénétique	24
a.	Introduction	24
b.	Translocations réciproques, épigénétique et infertilité	26
V.	Intérêt du modèle porcin pour l'étude d'anomalies de la méthylation de l'ADN en lien avec l'infertilité et les translocations chromosomiques.....	29
1.	Généralités	29
2.	Travaux de thèse d'A. Congras au sein de l'équipe GenPhySE (UMR 1388 INRA-ENVT).....	31
	Etude de la méthylation de l'ADN et de l'expression génique chez des porcs à qualité de semence dégradée en lien avec la présence d'une translocation chromosomique réciproque équilibrée	35
I.	Objectifs de l'étude.....	35
II.	Méthodologie	37
1.	Stratégie expérimentale	38
a.	Etude cellulaire par hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH).....	38
b.	MeDIP-seq.....	39
c.	RRBS	40
d.	Validation des DMR par pyroséquençage après conversion bisulfite.....	40
e.	Mesure des niveaux d'expression génique testiculaire	41
2.	Matériel et méthodes.....	42
a.	Animaux étudiés	42
b.	Tissus étudiés	42
i.	Sperme.....	42
ii.	Biopsies testiculaires	42
iii.	Spermatogonies et spermatocytes triés par FACS.....	42
c.	Comparaison du méthylome spermatique des porcs infertiles et contrôles	43
d.	Etude du transcriptome spermatique des gènes d'intérêt par qPCR	44

e.	Etude cellulaire de l'expression génique par FISH et immunomarquage	45
i.	Préparation des sondes de FISH	45
ii.	Préparation des lames	45
	RNA-FISH et immunomarquage	45
	DNA-FISH.....	46
III.	Résultats	46
1.	Mise au point d'une méthode de préparation des tissus au tri cellulaire	46
2.	Etude d'expression par FISH de la région localisée autour du point de cassure du chromosome 14 de l'animal t(1 ;14)	46
3.	Etude de la méthylation de l'ADN spermatique sur l'ensemble du génome	48
a.	Analyses des données de MeDIP-seq et de RRBS.....	49
b.	Validation des DMR par pyroséquençage	51
4.	Etude transcriptionnelle par PCR quantitative à partir d'ARN testiculaires.....	53
a.	Gènes situés sur ou à proximité des DMR	53
b.	Gènes à proximité des points de cassure des translocations chromosomiques	55
IV.	Discussion.....	57
1.	Validité de la stratégie expérimentale.....	57
2.	Méthylation de l'ADN spermatique et infertilité.....	57
3.	Translocations chromosomiques et méthylation de l'ADN dans les cellules germinales.....	58
4.	Etude transcriptionnelle par PCR quantitative.....	59
5.	Fonction des gènes étudiés.....	60
6.	Perspectives.....	60
	Conclusion.....	62
	Résumé	63
	Abstract.....	64

Références bibliographiques.....	65
Annexes.....	752

Liste des abréviations

5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine

5hmU : 5-hydroxyméthyluracyle

5mC : 5'-méthylcytosine

γ H2AX : variant d'histone H2AX phosphorylé

ADN : acide désoxyribonucléique

ANO : azoospermie non-obstructive

AO : azoospermie obstructive

ARN : acide ribonucléique

AT : asthénotératospermie

BAC : bacterial artificial chromosome ou chromosome artificiel bactérien

BER : base-excision repair ou réparation par excision de base

CpG : cytosine-phosphate-guanine

DMR : differentially methylated region ou région différenciellement méthylée

DNMT : DNA-(cytosine-5)-méthyltransférase

DSB : double-strand break ou cassure double-brin

EIC : effet interchromosomique

ENSAT : Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

FACS : fluorescence activated cell sorting ou tri cellulaire activé par la fluorescence

IAP : intracisternal A particle

ICR : imprinting control region ou région de contrôle de l'empreinte

ICSI : intracytoplasmic sperm injection ou injection intracytoplasmique du spermatozoïde

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

Mb : mégabases

OAT : oligoasthénotératospermie

pb : paires de bases

PCR : polymerase chain reaction ou réaction de polymérisation en chaîne

PGC : primordial germ cells ou cellules germinales primordiales

PMA : procréation médicalement assistée

T : tératospermie

TEI : transgenerational epigenetic inheritance ou héritage épigénétique
transgénérationnel

Tet : enzymes ten-eleven translocation

TR : translocation réciproque

Liste des figures

Figure 1 : voies de la déméthylation active de l'ADN médiée par les enzymes Tet (Piccolo and Fisher 2014)	8
Figure 2 : dynamique de reprogrammation du profil méthylation de l'ADN au cours du développement embryonnaire et fœtal (A) de la souris et (B) de l'Homme (adapté de Monk et al., 2015).	10
Figure 3 : évolution du niveau de méthylation de l'ADN au cours de la vie dans les cellules gonadiques somatiques, germinales primordiales, et les gamètes matures dans l'espèce humaine (Guo et al., 2015).....	13
Figure 4 : reprogrammation des ICR au cours du développement (adapté de Radford et al., 2011).....	14
Figure 5 : idéogramme d'une translocation réciproque entre un chromosome 12 et un chromosome 17, et diagramme représentant les modes de ségrégation méiotique possibles, à l'exclusion de la ségrégation 4 :0 non-représentée. (Braude et al., 2002).	25
Figure 6 : représentation schématique des évènements d'appariement et d'échange de matériel génétique survenant au sein des paires chromosomiques au cours de la prophase de la première division méiotique (adapté de Burgoyne et al., 2009).....	27
Figure 7 : niveau de méthylation au locus NESP55 d'un groupe contrôle de porcs fertiles et de 8 porcs infertiles à qualité de semence dégradée (adapté de Congras et al., 2014). 32	32
Figure 8 : représentation schématique du locus soumis à empreinte <i>GNAS</i> chez la souris (adapté de Peters and Williamson, 2007).	32
Figure 9 : niveau d'expression des principaux transcrits du locus <i>GNAS</i> déterminé par PCR quantitative pour un groupe contrôle fertile constitué de porcs fertiles et infertiles non-porteurs du DMR sur <i>GNAS</i> et d'un groupe constitué des 3 porcs infertiles porteurs du DMR sur <i>GNAS</i> (adapté de Congras et al., 2014).	34
Figure 10A : schéma représentant la première partie de la stratégie expérimentale du projet.	36
Figure 10B : schéma représentant la seconde partie de la stratégie expérimentale du projet.	37
Figure 11 : représentation schématique de l'appariement des chromosomes transloqués de l'animal 1948 t(1 ;14) et leur association avec la région d'inactivation transcriptionnelle	

de la chromatine non-appariée des chromosomes X et Y	38
Figure 12: analyse du statut transcriptionnel des spermatoocytes de l'animal t(1;14) par Cot-RNA FISH avec marquage de la région génomique du point de cassure du chromosome 14 par la sonde BAC PERV.....	47
Figure 13: analyse par RNA- et DNA-FISH avec la sonde BAC PERV de la région du point de cassure du chromosome 14 des spermatoocytes de l'animal t(1;14).....	48
Figure 14: profils de méthylation de 2 DMR confirmés par pyroséquençage.....	52
Figure 15: profils de méthylation de 2 DMR non-confirmés par pyroséquençage.	52
Figure 16: niveau d'expression des gènes situés sur ou à proximité des DMR et différentiellement exprimés chez les animaux 1746 et 1948.	54
Figure 17: niveau d'expression des gènes situés au niveau des points de cassures des translocations et différentiellement exprimés chez l'animal porteur de la translocation par rapport à l'ensemble des autres animaux.	56

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des animaux de l'étude	39
Tableau 2 : DMR mis en évidence par MeDIP-seq.	50
Tableau 3 : DMR mis en évidence après recoupement des données de MeDIP-seq par les données de RRBS.....	50
Tableau 4 : DMR validés par pyroséquençage.	51
Tableau 5 : Niveaux d'expression des gènes situés sur ou à proximités des DMR.....	53

Liste des annexes

Annexe 1 : gènes présentant un DMR en MeDIP-seq chez les 3 animaux du groupe DMR <i>GNAS</i> versus 3 animaux contrôles (755, 1662 et 5812).	72
Annexe 2 : DMR entre les animaux du groupe DMR <i>GNAS</i> et 2 animaux du groupe contrôle fertile (755 et 1662) sélectionnés par croisement des données de MeDIP-seq et de RRBS.....	73
Annexe 3 : gènes Ensembl situés dans une fenêtre d'1 Mb autour des points de cassure chromosomiques des animaux 1746 (translocation 13-17) et 1948 (translocation 1-14)..	73
Annexe 4 : caryotype en bandes G de l'animal 1746 porteur d'une translocation réciproque t(13;17).....	74
Annexe 5 : caryotype en bandes G de l'animal 1948 porteur d'une translocation réciproque t(1;14).....	74
Annexe 6 : exemple de résultats obtenus en RRBS.....	75

Revue de la littérature

I. Epigénétique : généralités

1. Définition

Le terme épigénétique se réfère à l'ensemble des mécanismes héréditaires mais non-codés par la séquence nucléotidique du génome, et qui permettent la régulation de l'expression génique (activation ou répression) sans modification de la séquence d'ADN. L'épigénétique regroupe différents mécanismes parmi lesquels la méthylation de l'ADN et la modification des histones qui aboutissent à un remodelage de la chromatine, et les petits ARNs non-codants (1). L'épigénétique a un rôle majeur dans le développement des organismes vivants et la différenciation cellulaire.

2. Epigénétique des cellules germinales mâles

Quatre mécanismes épigénétiques principaux jouent un rôle majeur dans la spermatogenèse et donc la fertilité masculine (2)(3):

- La méthylation de l'ADN, que nous avons étudié en particulier au cours de ce travail et qui subit d'importantes modifications dans les cellules germinales
- Les modifications d'histones, en particulier l'acétylation et la méthylation des résidus lysine des histones, qui interviennent dans un ordre et un temps précis au cours de la gamétogenèse
- Le remplacement de la majorité des histones par les protamines, qui intervient au cours de la spermiogenèse pour assurer la compaction du génome, ainsi que l'équilibre du ratio entre les deux types de protamines P1/P2
- La présence de plusieurs types d'ARN dans les spermatozoïdes, tels que certains ARN messagers (mRNA), microARN (miRNA), piwi-interacting ARN (piRNA), qui ont un rôle dans la maturation des spermatozoïdes et le développement embryonnaire.

II. Méthylation de l'ADN

1. Définition

La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique majeur correspondant à l'apposition d'un groupement méthyl d'une S-adénosyl-méthionine en position 5' d'un résidu cytosine, ce qui aboutit à la formation de 5-méthylcytosines (5mC). Les cytosines méthylées sont principalement celles qui sont localisées au niveau de dinucléotides CpG (cytosine-phosphate-guanine), qui correspondent à la succession sur un même brin d'ADN d'une cytosine et d'une guanine (4). Le génome des mammifères, notamment l'Homme et la souris, est globalement fortement méthylé, avec 60 à 80% de CpG méthylés (soit 3-5% de l'ensemble des cytosines) (3). Les éléments principalement méthylés sont les transposons et les éléments répétés tels que les satellites présents au niveau des centromères. A l'inverse les séquences uniques, les ICR (Imprinting Control Regions ou régions de contrôle de l'empreinte) des gènes soumis à empreinte et les îlots CpG (regroupements de dinucléotides CpG situés le plus souvent au niveau des promoteurs des gènes) sont majoritairement épargnés. La méthylation des CpG au niveau des promoteurs géniques a en effet pour conséquence la répression transcriptionnelle du gène concerné (1), et 70% des promoteurs sont associés à un îlot CpG (5)(6), tandis qu'au niveau du corps des gènes la méthylation a généralement un effet activateur de la transcription. La méthylation de l'ADN joue donc un rôle dans de nombreux processus importants tels que le phénomène d'empreinte parentale, la régulation de l'expression génique et la différenciation cellulaire, la compensation de dose du chromosome X, et la maintenance de la stabilité du génome et sa protection par inactivation des rétrotransposons d'origine virale et bactérienne et des séquences répétées, qui représentent un tiers du génome des mammifères (6).

Les patrons de méthylation du génome sont acquis et transmis de manière stable au cours des divisions cellulaires successives par des mécanismes de maintenance qui reproduisent ces motifs sur le brin d'ADN néosynthétisé, permettant une transmission fidèle aux cellules filles des informations d'expression génique. Cependant les marques de méthylation de l'ADN peuvent également être effacées dans des circonstances particulières comme la gamétogenèse et la fécondation, grâce à des mécanismes actifs et passifs de déméthylation (6).

2. Mécanismes et effecteurs

La méthylation de l'ADN est effectuée par les ADN méthyltransférases. Les trois DNA-(cytosine-5)-méthyltransférases catalytiquement actives chez les mammifères sont Dnmt1, Dnmt3A et Dnmt3B, tandis que Dnmt3L interagit comme cofacteur avec ces deux dernières dans les cellules germinales pour potentialiser leur action. Dnmt1 agit sur l'ADN hémiméthylé et assure donc la maintenance des patrons de méthylation de l'ADN au cours de sa réplication, c'est la méthyltransférase majeure dans les cellules somatiques. Dnmt3A et Dnmt3B sont quant à elles surtout exprimées au cours du développement embryonnaire car elles jouent un rôle clé dans la méthylation de novo de l'ADN. Le fonctionnement de ces effecteurs de la méthylation de l'ADN est indispensable au bon déroulement de la spermatogenèse (2)(3).

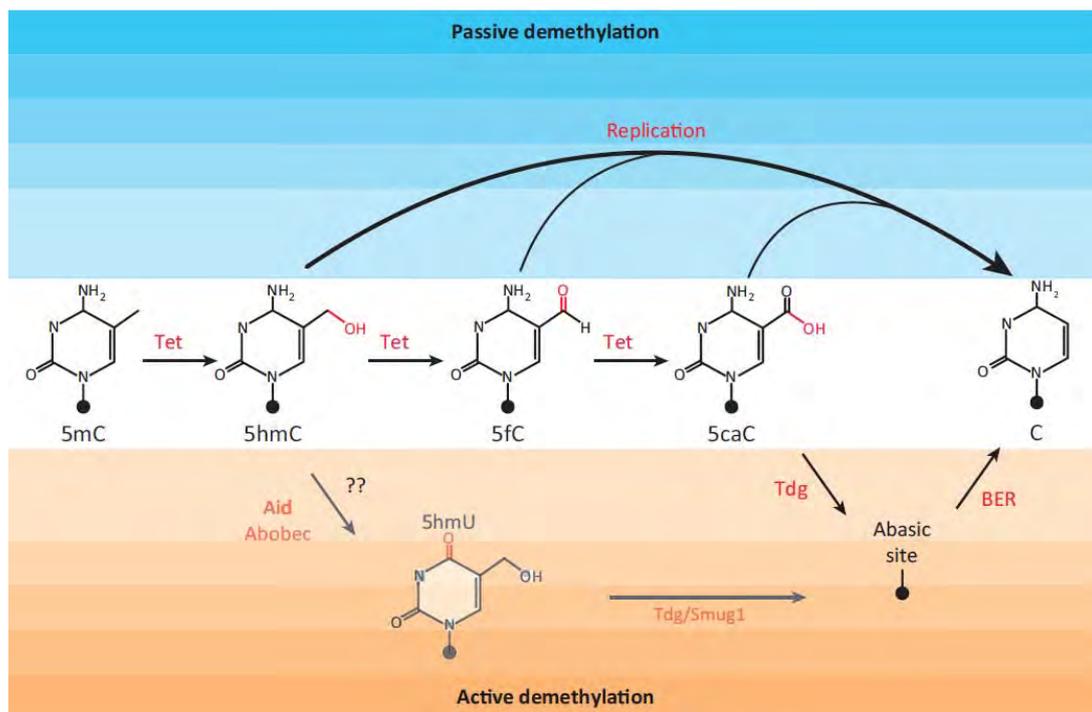


Figure 1 : voies de la déméthylation active de l'ADN médiée par les enzymes Tet (Piccolo and Fisher 2014 (4))

La déméthylation de l'ADN peut être active ou passive. La déméthylation passive progresse par dilution de la méthylation au fil des divisions cellulaires en l'absence d'activité de Dnmt1. Le mécanisme de déméthylation active (figure 1) ne fait pas encore l'objet d'un consensus mais il est largement admis qu'il débute par l'action des enzymes de la famille Tet (ten-eleven translocation) qui convertissent les 5mC en 5hmC, puis fait intervenir plusieurs voies (6)(4):

- Une voie intervenant peu dans les cellules germinales primordiales et impliquant les déaminases de l'ADN de la famille Aid/Apobec qui transformeraient les 5hmC en 5hmU (5-hydroxyméthyluracils), eux-mêmes excisés par des glycosylases de l'ADN avec réparation consécutive du site abasique par excision de base (base-excision repair ou BER)
- Une voie de déméthylation passive par non-reconnaissance des 5hmC par Dnmt1
- Une voie impliquant à nouveau les enzymes Tet qui oxydèrent les 5hmC en 5fC (5-formylcytosines) et 5caC (5-carboxylcytosine), elles-mêmes excisées par Tdg, une glycosylase de l'ADN, avec réparation consécutive du site abasique par BER

3. Reprogrammation du méthylome au cours de la reproduction

a. Embryogenèse

D'importantes modifications du profil de méthylation de l'ADN surviennent au cours du développement embryonnaire de nombreuses espèces de mammifères, et des constatations faites sur la souris ont pu être également observées chez l'Homme (figure 2) (6).

Les gamètes matures sont dans les deux sexes fortement méthylés avant la fécondation (60-80% de CpG méthylés). Après la fertilisation, alors que la méthylation du génome maternel est maintenue à un niveau élevé, le génome paternel subit très rapidement (dès quelques heures après la fusion des gamètes) une première vague de déméthylation active (7). L'étendue de cette déméthylation est variable selon les espèces : elle est plus grande chez le porc et la souris que chez l'Homme (8), et elle est absente dans certaines espèces comme le mouton et le lapin. Elle épargne cependant certains types de séquences tels les gènes soumis à empreinte parentale ainsi que les éléments transposables, de manière à préserver l'information relative à l'empreinte parentale dans

l'ensemble des cellules d'une part et à maintenir la protection contre les génomes étrangers d'autre part. La déméthylation des génomes des deux parents se poursuivrait ensuite de manière passive au cours des divisions cellulaires successives jusqu'au stade blastocyte du fait de l'exclusion de Dnmt1 du noyau (9). Cette étape est suivie d'une reméthylation globale, qui donne aux cellules de l'embryon pré-implantatoire un profil d'hyperméthylation de l'ADN (10), mais dont sont là encore protégées les régions soumises à empreinte parentale. Toutes les cellules de l'organisme hériteront de ce nouveau profil de méthylation, à l'exception des cellules germinales.

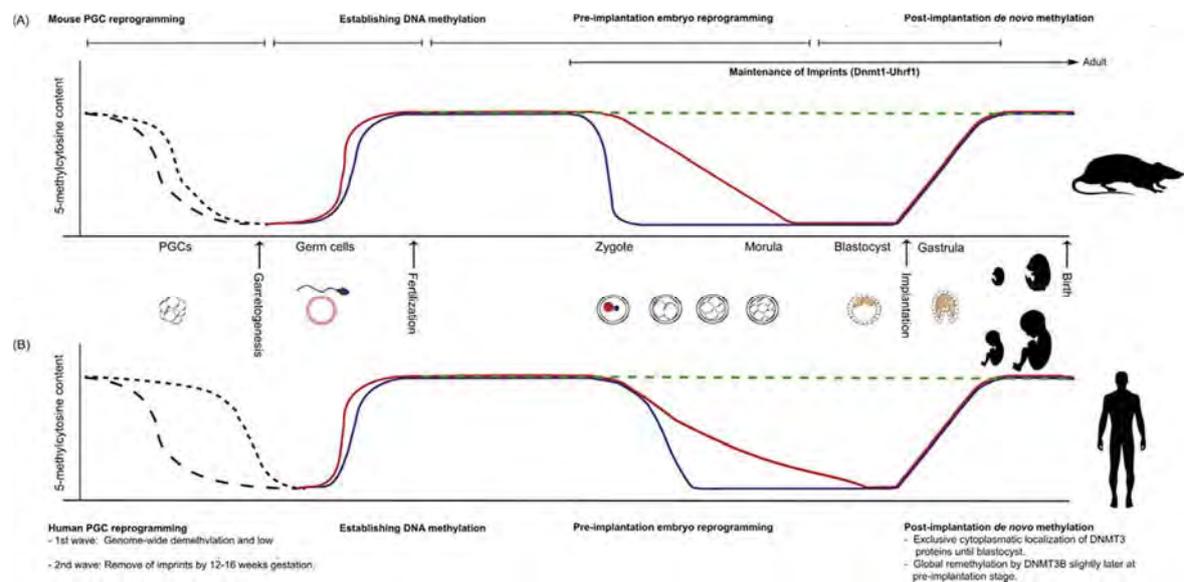


Figure 2: dynamique de reprogrammation du profil méthylation de l'ADN au cours du développement embryonnaire et fœtal (A) de la souris et (B) de l'Homme (adapté de Monk et al., 2015 (6)). La méthylation des loci soumis à empreinte parentale (pointillés verts) est établie pendant la gamétogenèse dans le sperme (ligne continue bleue) ou l'ovocyte en croissance (ligne continue rouge) après effacement de l'empreinte pré-existante dans les cellules germinales primordiales (pointillés noirs). Après fertilisation, les génomes d'origine maternelle et paternelle subissent une déméthylation passive et active respectivement, aboutissant à un blastocyte fortement déméthylé.

b. Gamétogenèse

En effet, chez de nombreux mammifères comme le porc, la souris et l'Homme, il a été montré qu'il existe une seconde vague de déméthylation puis de reméthylation de l'ADN dans les cellules germinales primordiales. Cependant ce phénomène de reprogrammation épigénétique spécifique aux PGC a été découvert et principalement étudié chez la souris, et reste mal connu dans l'espèce humaine.

Chez l'Homme, le développement des cellules de la lignée germinale, qui dérivent de l'épiblaste de la vésicule vitelline, débute avec la gastrulation (2^{ème} semaine de développement embryonnaire). Les PGC migrent ensuite dans les crêtes génitales, les futures gonades, au cours des semaines 3 à 5 de développement embryonnaire.

Cette seconde vague de déméthylation survient pendant et surtout peu après leur migration dans les crêtes génitales, permettant d'établir une hypométhylation de l'ADN des cellules germinales par rapport aux cellules somatiques (9). Elle est plus étendue que la précédente puisque contrairement à elle, cette déméthylation spécifique aux PGC concerne les gènes soumis à empreinte parentale et autres DMR, et en partie les rétrotransposons et autres séquences répétées. Quelques régions y échappent cependant, principalement certains types de rétrotransposons (comme les intracisternal A particles chez les souris) et quelques îlots CpG (9). Ces régions résistantes à la déméthylation seraient un des vecteurs de l'héritage épigénétique transgénérationnel ou TEI (transgenerational epigenetic inheritance), mécanisme par lequel des marques épigénétiques sont transmises à travers les générations successives mais dont l'existence, bien que démontrée dans certaines espèces comme la souris, n'a pas été prouvée chez l'Homme (11).

La déméthylation est suivie d'une reméthylation de l'ADN dont la dynamique diffère considérablement entre les gamètes en formation selon qu'ils soient mâles ou femelles, puisqu'elle permettra le rétablissement de l'empreinte parentale en fonction du sexe du zygote dans les gènes soumis à empreinte parentale (figure 4). Ces différences mâle-femelle ont pour rôle de déterminer l'expression mono-allélique maternelle ou paternelle de ces gènes dans l'individu issu de ces gamètes.

Cependant, la cinétique de cet événement est très variable d'une espèce à l'autre. Chez l'Homme et le porc, il semble se dérouler aux mêmes stades embryonnaires que

chez la souris mais sur une période bien plus étendue, probablement du fait du développement plus lent de l'embryon. Il présente également une cinétique variable selon le locus concerné et le sexe de l'embryon : par exemple déméthylation rapide et précoce des DMR de IGFR2 puis des DMR du cluster d'IGF2-H19, suivi d'une déméthylation plus lente et incomplète des rétrotransposons, chez le porc mâle (12)(13).

Dans l'espèce humaine, la dynamique de déméthylation puis de reméthylation des cellules de la lignée germinale a fait l'objet de peu d'études. En 2015, deux équipes ont analysé le méthylome et le transcriptome de PGC entre 4 et 19 semaines de gestation (14)(15), montrant une déméthylation progressive débutant avant la quatrième semaine et aboutissant au niveau de méthylation des CpG le plus bas observé dans des cellules humaines (inférieur à 10%), confirmant chez l'Homme que cette déméthylation est plus étendue que celle survenant dans l'ensemble des cellules embryonnaires après fécondation. L'étape de reméthylation commence après la 19^{ème} semaine, pendant la vie fœtale (14), pour s'achever à la puberté au stade pachytène de la prophase I chez les hommes (16)(3) alors qu'elle est plus tardive chez les femmes, débutant après la naissance, la méthylation étant complète au stade de follicule antral (17). Les marques de méthylation sont ensuite maintenues dans les gamètes matures au cours des divisions cellulaires successives (figure 3). Cependant, de manière intéressante, ces auteurs mettent en évidence par RNA-seq que l'expression génique dans ces PGC reste relativement constante au cours de la période étudiée malgré ces importantes modifications de la méthylation du génome, phénomène pour lequel ils n'ont pas d'explication évidente.

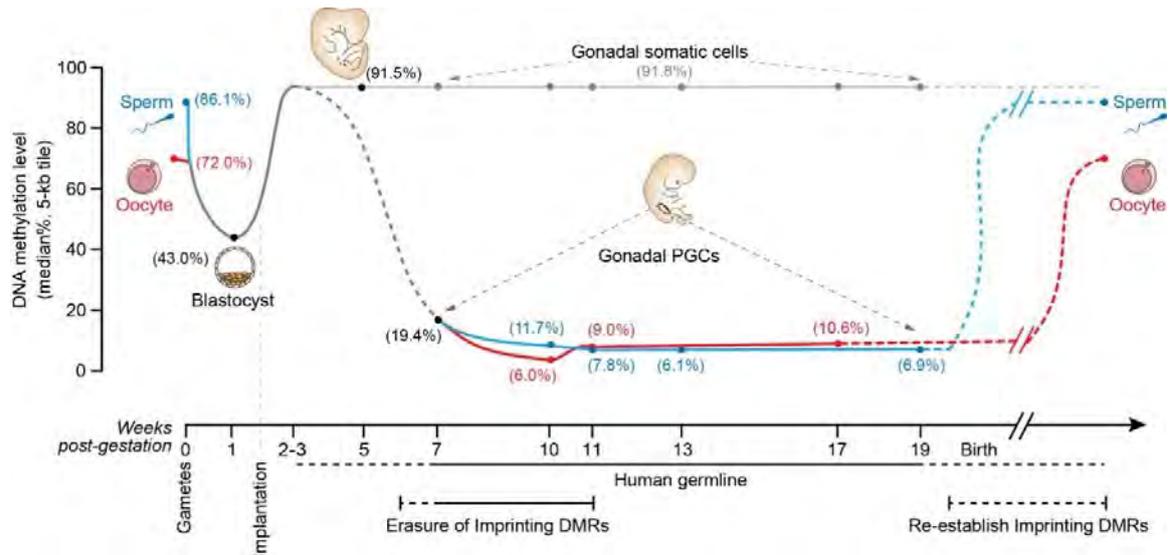


Figure 3: évolution du niveau de méthylation de l'ADN au cours de la vie dans les cellules gonadiques somatiques, germinales primordiales, et les gamètes matures dans l'espèce humaine (Guo et al., 2015 (15)).

Au final, ce phénomène de reprogrammation de la méthylation de l'ADN dans les cellules germinales en formation a plusieurs buts :

- adapter les marques de méthylation des gènes soumis à empreinte parentale au sexe de l'animal (figure 4). Des erreurs dans ce processus sont à l'origine d'une partie des cas de pathologies de l'empreinte parentale, comme décrit notamment pour le syndrome de Prader-Willi (18)
- éviter la transmission à la descendance d'épimutations. Des anomalies de ce mécanisme de protection pourraient entrer dans le cadre de l'héritage épigénétique transgénérationnel (11).
- mettre en place un pattern de méthylation de l'ADN dans les cellules germinales très différent de celui des cellules somatiques, se rapprochant de celui des cellules souches embryonnaires (2), et qui est nécessaire au bon déroulement de la méiose, de la spermiogenèse et du développement embryonnaire précoce (1).

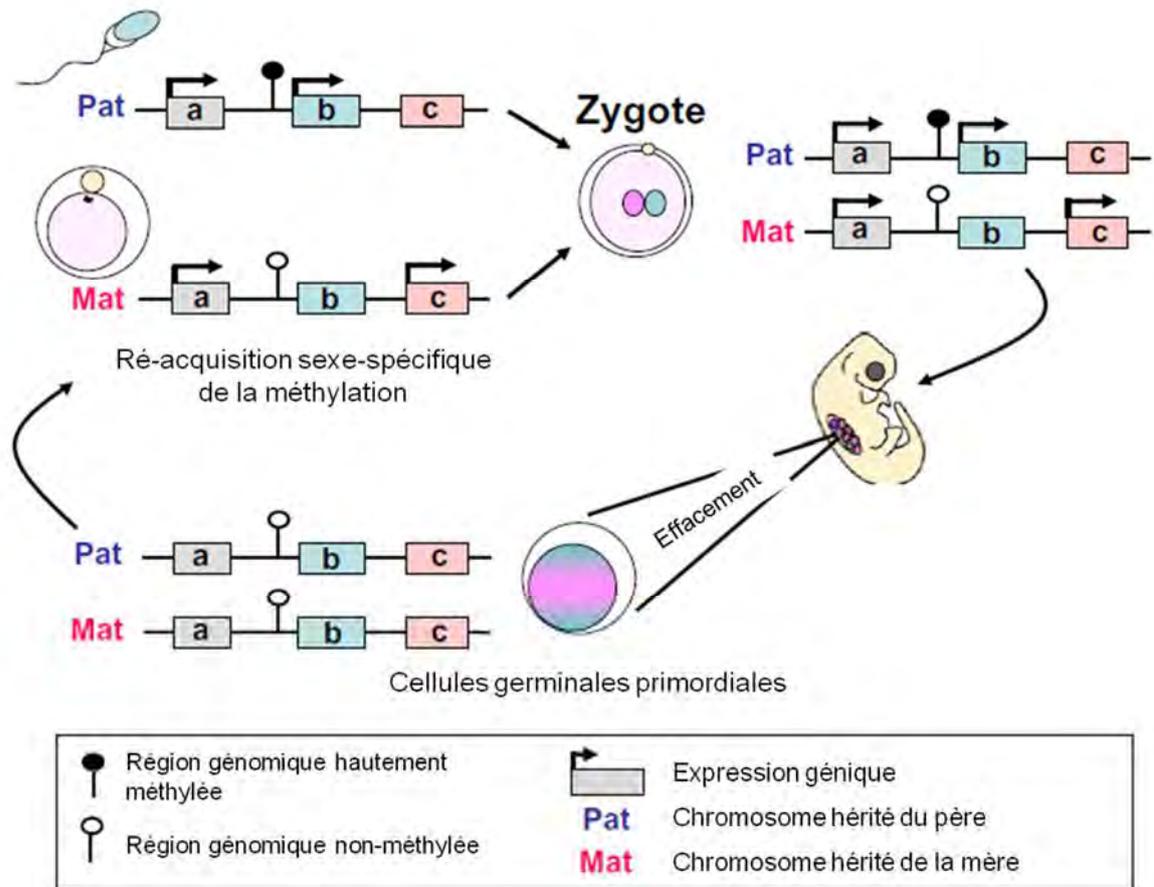


Figure 4: reprogrammation des ICR au cours du développement. L'existence d'une méthylation différentielle de régions génomiques en fonction de l'origine parentale de l'allèle nécessite un processus de reprogrammation épigénétique au cours de la gamétogenèse pour permettre l'acquisition des marques appropriées en fonction du sexe du fœtus et assurer le bon développement de la descendance (adapté de Radford et al., 2011 (19)).

III. Empreinte parentale

Dans les organismes eucaryotes diploïdes, la majorité des gènes ont une expression biallélique, c'est-à-dire qu'ils sont exprimés par les deux allèles parentaux. Cependant certains gènes ne sont exprimés que par l'un ou l'autre de leurs allèles et peuvent être divisés en 3 classes distinctes: le cas particulier de l'inactivation de l'X, l'expression monoallélique autosomale aléatoire, et l'empreinte parentale. Cette expression différentielle est aléatoire dans le cas de l'inactivation de l'X et de l'expression monoallélique autosomale aléatoire, qui intervient notamment dans l'olfaction, alors qu'elle est déterminée par l'origine parentale de l'allèle dans le cas de l'empreinte

parentale (20). Le phénomène d’empreinte parentale n’existe que chez les euthériens (mammifères placentaires) et les marsupiaux, et correspond donc à l’acquisition d’un tissu placentaire, ainsi que dans quelques espèces de plantes et d’insectes (21). Les gènes soumis à empreinte parentale ne sont exprimés que par un seul allèle, maternel ou paternel, selon le gène considéré. La mise en place de l’empreinte est déterminée par l’effacement puis l’apposition de nouvelles marques épigénétiques au cours de la gamétogenèse, en particulier la méthylation de l’ADN, au niveau de régions régulatrices appelées régions de contrôle de l’empreinte (ICR pour imprinting control region) qui correspondent à des régions différentiellement méthylées (DMR pour differentially methylated region). Une soixantaine de gènes soumis à empreinte parentale ont été identifiés chez l’Homme jusqu’à présent, contre une centaine chez la souris. La plupart de ces gènes sont regroupés en clusters chromosomiques, certains atteignant plusieurs mégabases, qui sont régulés par une seule et même ICR. Ces ICR correspondent le plus souvent à des îlots CpG différentiellement méthylés sur les deux allèles parentaux, les cellules germinales féminines étant méthylées pour une majorité de ces ICR, alors que quelques uns de ces ICR sont méthylés dans les cellules germinales masculines (seules quatre ICR sont connues comme méthylées dans les gamètes masculins chez l’Homme : H19/IGF2, DLK1/GTL2, RASGRF1 et ZDBF2). Avec la fertilisation, ces régions soumises à empreinte sont transmises de manière stable au zygote dans les cellules somatiques, induisant une expression mono-allélique des gènes concernés (22). Ainsi, les gènes méthylés dans les cellules spermatiques sont dit à empreinte maternelle et ceux qui sont méthylés dans les ovocytes sont à empreinte paternelle. Dans les paragraphes suivants traitant de la méthylation de ces ICR, le nom du gène sera utilisé pour désigner par extension l’ICR qui le contrôle.

Les gènes soumis à empreinte parentale sont impliqués dans la régulation du développement et de la croissance embryonnaire, fœtale et postnatale. Certains sont exprimés dans l’embryon, le fœtus, le nourrisson et/ou le placenta tandis que d’autres sont supposés intervenir chez la mère dans ses comportements de maternage et de soin au nourrisson. Ainsi, selon une théorie dite du « conflit », les gènes à empreinte paternelle vont dans le sens de la mise à disposition du maximum de ressources maternelles pour assurer la croissance et le bon développement de sa progéniture, alors que les gènes d’expression maternelle vont dans le sens de l’épargne des ressources et la

préservation de la mère, probablement dans le but de permettre d'autres grossesses et d'assurer la survie maternelle.

Cependant il y a de plus en plus d'arguments pour l'implication des gènes soumis à empreinte également dans la régulation de la physiologie et du métabolisme de l'adulte. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer la sélection d'un tel mécanisme malgré sa vulnérabilité aux mutations récessives : la théorie du conflit décrite précédemment, la protection contre la parthénogenèse (fécondation avec deux lots haploïdes de chromosomes issus du même parent), la défense de l'hôte contre l'ADN étranger (rétrotransposons notamment), et l'hypothèse de complémentation (21).

IV. Infertilité masculine et épigénétique: rôle du méthylome spermatique

1. Fertilité et épigénétique: généralités

L'infertilité se définit comme l'incapacité à concevoir un enfant après un an d'essai, elle touche 10 à 15% des couples. Dans environ deux tiers des cas, l'infertilité peut être expliquée au moins en partie par une cause masculine (3). La génétique de l'infertilité est un domaine complexe : en effet de nombreuses causes existent (génétiques, hormonales, traumatiques, chirurgicales, liées à l'âge, au mode de vie, à l'exposition à des toxiques...). En dehors d'une anomalie génétique évidente (15% des cas : anomalie chromosomique de structure, aneuploidie constitutionnelle, pathologie monogénique dont les mutations du gène CFTR, microdélétion du chromosome Y (23)), il est difficile de quantifier la contribution de la génétique au phénotype puisque chacune des causes d'infertilité a une composante génétique plus ou moins importante (24) et que de nombreux cas d'infertilité sont multifactoriels. 15% des infertilités restent cependant inexplicables, dont certaines ont probablement une cause génétique ou épigénétique.

2. Infertilité masculine et méthylation de l'ADN spermatique

a. Contexte

Depuis le début des années 2000, il a été rapporté une prévalence de pathologies liées à l'empreinte parentale plus élevée chez les enfants issus de la procréation médicalement assistée (PMA) (en particulier la technique ICSI ou injection

intracytoplasmique de spermatozoïde) que chez les enfants conçus naturellement (25). Par ailleurs l'évolution des connaissances dans le domaine de l'épigénétique a amené les chercheurs à évoquer son implication dans une partie des nombreux cas d'infertilité inexplicée. Des auteurs se sont dès lors intéressés à la méthylation de l'ADN dans les cellules germinales d'hommes infertiles (26)(27)(28).

Il a été émise l'hypothèse qu'un défaut de programmation épigénétique dans les cellules germinales primordiales, en particulier un défaut d'effacement du profil pré-existant de méthylation de l'ADN et/ou de rétablissement des marques de méthylation, serait à l'origine d'une spermatogenèse anormale conduisant à une fonction spermatique dégradée (10). Ceci corrobore des études chez la souris ayant montré une altération de la spermatogenèse après administration d'un agent déméthylant, la 5-aza-2'-deoxycytidine (29). C'est ce défaut qui est suspecté dans la transmission à la descendance de pathologies liées à l'empreinte (18), notamment dans le cadre de la PMA et en particulier pour la technique ICSI au cours de laquelle le recueil intra-testiculaire de spermatozoïdes immatures pourrait court-circuiter un certain nombre de mécanismes de maturation et de filtrage des gamètes (30)(31). Cependant la responsabilité des techniques de PMA elles-mêmes dans la survenue de ces anomalies de méthylation pourrait également être impliquée et la part respective des deux mécanismes reste à établir avec certitude (32)(33).

b. Techniques d'analyse employées

Les premières études sur la méthylation de l'ADN dans des cellules spermatiques d'hommes au spermogramme anormal ont été publiées au début des années 2000, et les techniques utilisées ont évolué au cours de ces quinze dernières années : l'immunomarquage des 5mC sur noyaux fixés (28), a été supplanté par des techniques de séquençage de loci sélectionnés, en particulier le pyroséquençage après conversion bisulfite de l'ADN, qui convertit les cytosines non-méthylées en uracils, eux-mêmes transformés en thymines après PCR (27), mais aussi la PCR méthylation-spécifique qui est une PCR couplée à l'utilisation d'enzymes de restriction (COmbined Bisulfite Restriction Analysis ou COBRA), après conversion bisulfite (30). L'utilisation de puces à ADN spécialement conçues pour l'étude de la méthylation (34) a par la suite rendu possible une étude étendue à des milliers de CpG répartis sur l'ensemble du génome, permettant

une analyse plus juste de la méthylation globale de l'ADN, ainsi que la mise en évidence de nombreux DMR en une seule expérience. Les nouvelles approches de séquençage haut débit développées ces dernières années (notamment le Methylated DNA ImmunoPrecipitation ou MeDIP-seq et le Reduced Representation Bisulfite Sequencing ou RRBS), qui permettent une étude de la méthylation de l'ADN étendue au génome entier et pas uniquement au niveau des CpG, sont celles que nous avons privilégiées dans notre travail expérimental. Elles apporteront certainement prochainement des informations nouvelles et un éclairage sur les associations déjà constatées et les mécanismes à l'œuvre.

c. Méthylation de l'ADN et altérations du spermogramme

Dans le cadre de l'étude du profil de méthylation de l'ADN de cellules germinales d'hommes au spermogramme altéré, les auteurs ont choisi le plus souvent d'étudier une sélection de DMR de loci soumis à empreinte parentale, du fait de leur pertinence biologique dans ce contexte. Par ailleurs l'anomalie du spermogramme la plus souvent étudiée est l'oligospermie (concentration en spermatozoïdes insuffisante dans l'éjaculat). Ces recherches ont montré que l'empreinte est fréquemment perturbée dans les cellules germinales d'hommes oligospermiques. Les deux loci soumis à empreinte les plus fréquemment étudiés dans ce cadre sont *IGF2/H19* et *MEST*, qui sont normalement respectivement hyper- et hypométhylés sur l'allèle paternel. Chez des patients oligospermiques, le gène *H19* est anormalement hypométhylé (27)(35)(36)(37) et le gène *MEST* anormalement hyperméthylé (10)(35) (36)(38), ces 2 anomalies pouvant être isolées ou associées (35). Cependant d'autres études ne retrouvent pas d'anomalie de méthylation du gène *MEST* chez des patients oligospermiques (27).

D'autres auteurs ont étudié les profils de méthylation d'un panel plus importants de gènes soumis à empreinte en lien avec l'oligospermie, confirmant une tendance à l'hypométhylation des deux loci normalement hyperméthylés sur l'allèle paternel : celui d'*H19/IGF2* et celui de *GTL2/MEG3/DLK1/DIO3* (36)(38), et l'hyperméthylation de gènes normalement hypométhylés : *PLAGL1*, *DIRAS3*, *LIT1*, *IGF2*, *PEG3*, *SNRPN* (36)(38). Ils mettent également en évidence des anomalies de méthylation sur d'autres types de séquences comme des gènes non-soumis à empreinte impliqués dans la spermatogenèse : *DAZL* (39)(40), *VASA* (41) et *CREM* (42), d'autres gènes non-soumis à empreinte parentale : *HRAS*, *NTF3*, *MT1A*, *PAX8*, *SFN*, *MT1A* et une séquence répétée :

Satellite 2 (10). De manière intéressante, le promoteur du gène *MTHFR*, impliqué dans la mise à disposition du pool de groupements méthyl notamment au cours du processus de méthylation de l'ADN, est significativement hyperméthylé chez des hommes oligospermiques, ce qui pourrait être la première étape d'un défaut de méthylation global du génome et donc d'une infertilité (43), avec une association significative avec l'hypométhylation du DMR d'H19 et de CTCF6 (44). Au contraire, la méthylation du gène *DAZ*, un gène au rôle important pour la spermatogenèse et dont la délétion cause une azoospermie, a été retrouvée normale chez des hommes infertiles (40)(45).

Des anomalies de méthylation de l'ADN germinale ont aussi été recherchées en rapport avec d'autres anomalies du spermogramme :

- azoospermie (absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat) : en présence d'azoospermie non-obstructive, Hartmann et al. (30) retrouvent une méthylation normale d'H19, alors que Marques et al. (31) constatent une hypométhylation de ce même locus sans hyperméthylation de MEST, appuyant leur hypothèse que l'hypométhylation de H19 est associée à une spermatogenèse altérée (27)(35). Minor et al. (46) retrouvent quant à eux une hypométhylation de H19 en cas d'azoospermie obstructive. Cependant Ferfour et al. (47) ont comparé sur puce le profil de méthylation de spermatozoïdes avec azoospermie obstructive (AO) et non-obstructive (ANO), et ont montré plus de 9000 CpG différentiellement méthylés entre les 2 groupes, notamment au niveau de 47 gènes ayant une fonction testiculaire, et une corrélation entre le profil de méthylation et la présence ou non de spermatozoïdes sur la biopsie testiculaire en cas d'ANO, ce qui tend à montrer le lien de causalité entre anomalie de méthylation et anomalie de la spermatogenèse et incite à utiliser le profil de méthylation de l'ADN comme marqueur pronostic de la réussite de la biopsie.

- asthénospermie (défaut de mobilité des spermatozoïdes) : chez des patients asthénospermiques, le promoteur de *DAZL*, un gène impliqué dans la spermatogenèse, est anormalement hyperméthylé (39). L'utilisation d'une puce à ADN a permis à Pacheco et al. (34) d'établir un lien entre anomalie de méthylation de centaines de CpG de gènes soumis ou non à empreinte et motilité des spermatozoïdes, et en particulier pour 92 gènes soumis à empreinte avec une distribution équilibrée entre hypo- et hyperméthylation.

- tératospermie (taux anormalement élevé de spermatozoïdes anormaux) : Chez des patients tératospermiques, IGF2 et H19 sont hypométhylés, mais seuls les hommes présentant une oligospermie associée avaient une méthylation anormale (48).

La question de l'existence d'anomalies globales de la méthylation de l'ADN à l'échelle du génome entier en cas de spermogramme altéré n'a pas été clairement résolue. Certains auteurs supportent ainsi l'hypothèse d'erreurs de méthylation spécifiques à certains types de séquences, en particulier les loci soumis à empreinte parentale. En effet la méthylation globale du génome, évaluée dans leurs travaux par l'étude du profil de méthylation d'éléments répétés comme les séquences LINE1 et ALU (35)(48)(36) ou par l'étude de plusieurs dizaine de milliers de CpG grâce à l'utilisation de puces à ADN (49), apparaît normale. Mais d'autres ont montré une hyperméthylation plus globale du génome spermatique, étendue à plusieurs types de séquences (gènes soumis à empreinte et non-soumis à empreinte et un élément répété) (10) à partir d'ADN issus de spermatozoïdes oligo-, asthénospermiques ou, à l'inverse, une hypométhylation globale avec un tiers des CpG géniques anormalement hypométhylés sur échantillons asthénospermiques analysés par puce à ADN (34) et sur des échantillons oligoasthénospermiques analysés par méthodes ELISA-like (37). Ces derniers proposent donc l'existence d'un défaut lors de l'étape d'effacement ou du rétablissement des marques de méthylation qui serait associé à la survenue d'anomalies du spermogramme, possiblement lié à des dysfonctionnements des enzymes intervenant dans ces processus (voir chapitre correspondant). Cependant cela n'explique pas l'association d'anomalies dans le sens de l'hyperméthylation et de l'hypométhylation constatées par de nombreux auteurs chez un même individu.

Enfin certaines équipes ont adopté une approche inverse en sélectionnant des patients présentant une infertilité idiopathique, quel que soit le spermogramme, pour rechercher une corrélation entre des anomalies de méthylation communes à plusieurs individus et les différentes anomalies du spermogramme. Schutte et al. (50) ont retrouvé plus de 10% des CpG différenciellement méthylés chez un sous-groupe de patients infertiles présentant une quantité de spermatozoïdes moyenne significativement plus faible que le reste des sujets étudiés, avec deux fois plus de DMR dans le sens de l'hyperméthylation que dans celui de l'hypométhylation. Il existait un enrichissement significatif de ces DMR dans des gènes impliqués dans la spermatogenèse, l'inflammation et la réponse immunitaire, mais pas au niveau des gènes soumis à empreinte. Poplinski et

al. (51) ont montré une corrélation inverse entre une anomalie de méthylation de H19 et MEST et le nombre et la motilité des spermatozoïdes, et avec leur morphologie pour MEST seulement. Houshdaran et al. (10) ont corrélé des anomalies de méthylation de 3 gènes soumis à empreinte parentale (MEST, DIRAS3 et PLAGL1), 5 gènes non-soumis à empreinte (HRAS, MT1A, NTF3, PAX8 et SFN) et un élément répété (Satellite 2) avec l'existence d'une altération du nombre et/ou de la motilité des spermatozoïdes. L'anomalie du spermogramme qui semble le plus souvent corrélée à des anomalies de méthylation de l'ADN spermatique est donc l'oligospermie.

Dans la perspective de pouvoir utiliser des anomalies de méthylation de l'ADN comme marqueurs d'infertilité, Friemel et al. (52) ont quant à eux comparé la méthylation de l'ADN dans le sang périphérique d'hommes fertiles et infertiles par puce à ADN. Conformément au mécanisme présumé d'apparition des anomalies de méthylation, qui est spécifique à la lignée germinale, ils n'ont mis en évidence qu'une vingtaine de CpG différenciellement méthylés dans le sang, contre plusieurs centaines pour les travaux sur cellules germinales.

On peut déduire de l'ensemble de ces résultats que le type d'anomalie épigénétique semblerait donc dépendre du type d'infertilité présenté (38), mais des recherches sont encore nécessaires pour confirmer ces liens et permettre l'utilisation de ces anomalies comme marqueurs pronostic du type, de l'origine et de la sévérité de l'altération de la spermatogenèse, ainsi que des chances de succès des techniques de PMA.

d. Méthylation de l'ADN et autres anomalies épigénétiques

Par ailleurs l'étude d'autres anomalies épigénétiques dans les cellules spermatiques de patients (avec ou sans anomalie du spermogramme) met en évidence un lien entre ces dernières et des anomalies de méthylation de l'ADN spermatique. Ainsi un ratio protamines/histones anormal a été associé à une hyperméthylation de LIT1, SNRPN et MEST (38), ainsi qu'à des anomalies de méthylation enrichies au niveau d'ICR de loci soumis à empreinte (H19, IGF2, KCNQ1, *GNAS*, DIRAS3, MAGEL2 et NNAT) et au niveau de gènes impliqués dans le développement et la fonction du système reproductif (49). Montjean et al. (37) ont mis en évidence une relation inverse entre le taux de méthylation globale de l'ADN spermatique et les index de fragmentation de l'ADN et de décondensation de la chromatine chez des hommes oligospermiques, avec en particulier

une relation forte entre la méthylation de l'ADN et la compaction de la chromatine, qui seraient donc deux processus étroitement liés au cours de la spermatogenèse. Or l'intégrité de la chromatine spermatique est importante pour la fonction reproductive et une fragmentation de l'ADN spermatique excessive est associée à l'infertilité (53). Cependant il reste à déterminer si la fragmentation de l'ADN est une cause ou une conséquence d'une méthylation de l'ADN et d'une compaction de la chromatine défectueuses.

e. Hétérogénéité intra-individuelle et stabilité temporelle des DMR détectés

Il est important de remarquer que la plupart de ces résultats ne représentent que des moyennes de méthylation sur l'ensemble des cellules spermatiques présentes dans chaque échantillon étudié, or la fertilisation d'un ovocyte se fait par un gamète mâle unique. Dans le cadre de l'AMP par ICSI, il serait donc intéressant de pouvoir sélectionner pour la fécondation de l'ovocyte le spermatozoïde le plus normal possible. Certains auteurs ont donc voulu rechercher une variabilité intra-individuelle, c'est-à-dire d'un spermatozoïde à l'autre, de la méthylation de l'ADN puisqu'un taux de méthylation de 80% d'un locus comprenant plusieurs CpG peut schématiquement correspondre à une méthylation de l'ensemble des CpG du locus dans 80% des cellules associée à une absence totale de méthylation des CpG dans 20% des cellules, ou à une méthylation homogène de 80% des CpG du locus pour l'ensemble des cellules étudiées.

Laurentino et al. (54) ont mis en évidence pour les loci H19, MEST, MEG3 et KCNQ1OT1 un mosaïcisme épigénétique dans les spermatozoïdes de patients aux qualités de sperme dégradées, expliquant les anomalies de méthylation de ces ICR par l'existence de sous-population de spermatozoïdes avec méthylation anormale plutôt que par des défauts de méthylation aléatoires des spermatozoïdes. Ainsi ils concluent que dans le sperme de ces patients il existe pour chacun de ces loci deux types de séquence : des séquences complètement méthylées et d'autres complètement déméthylées. Par ailleurs, pour H19 ils retrouvent toujours l'erreur de méthylation sur l'allèle d'origine maternelle, et émettent donc l'hypothèse d'anomalies à la fois de déméthylation (gène à empreinte paternelle) et de reméthylation (gènes à empreinte maternelle) dans la lignée germinale. Jenkins et al. (55) ont quant à eux mis en évidence une augmentation de la variabilité de

la méthylation de l'ADN dans la fraction des spermatozoïdes les moins mobiles chez des hommes infertiles au spermogramme normal.

f. Conclusion

L'hétérogénéité des techniques d'analyse utilisées, des populations d'hommes infertiles et des types d'échantillons (sperme, cellules germinales issues de biopsies testiculaires) étudiés, ainsi que le faible nombre d'individus inclus dans chaque étude, rendent l'interprétation et l'intégration de ces résultats difficiles. Cependant il en ressort une association significative entre infertilité idiopathique et présence d'anomalies de méthylation de l'ADN dans les gamètes. Toutefois la signification biologique de ces anomalies de méthylation de même que leur origine restent incertaines (31). Parmi les conséquences de ces anomalies, la transmission à la descendance de pathologies de l'empreinte (ex : syndrome de Silver-Russel pour le locus *H19*) a été évoquée pour celles affectant des ICR de gènes soumis à empreinte parentale. Concernant les origines de ces anomalies, des mutations ou des polymorphismes des gènes codant pour les enzymes établissant (*DNMT*) ou effaçant l'empreinte (*TET*) ont été décrites (56), cependant elles n'expliquent pas la coexistence chez un même individu d'anomalies dans le sens de l'hyperméthylation et de l'hypométhylation.

De nouveaux travaux seront encore nécessaires pour confirmer et unifier les données existantes et pour mettre en évidence les mécanismes impliqués et les liens de causalité entre ces anomalies de méthylation et les altérations de la spermatogenèse auxquelles elles s'associent.

Par ailleurs peu d'études ont recherché des anomalies de méthylation de l'ADN en relation avec différents types de pathologies connues associées à l'infertilité comme la varicocèle (57), la cryptorchidie ou encore les traitements anticancéreux par radio- et/ou chimiothérapie. Or ces études pourraient éclairer les mécanismes moléculaires délétères pour la spermatogenèse à l'œuvre dans ces pathologies, et appuyer la causalité d'anomalies de méthylation de l'ADN spermatique dans le phénotype d'infertilité.

3. Fertilité, remaniements chromosomiques et épigénétique

a. Introduction

Chez l'Homme, parmi les causes génétiques d'infertilité, hormis les anomalies géniques qui sont extensivement étudiées dans des phénotypes d'hypo- ou d'infertilité et touchent de nombreux gènes impliqués dans la spermatogenèse ou la méiose, on trouve également des anomalies chromosomiques. Elles sont divisées en anomalies de nombre (syndrome de Klinefelter 47,XXY, trisomie 21, microdélétions du chromosome Y) et anomalies de structure (translocations réciproques, translocations robertsoniennes, inversions péri- et paracentriques). Les translocations réciproques touchent un nouveau-né sur 700 et concernent 4 à 10 fois plus les hommes infertiles que les hommes fertiles avec 1% d'hommes infertiles porteurs (58) (59).

Les anomalies chromosomiques de structure sont dans la grande majorité des cas présentes à l'état équilibré (sans gain ni perte de matériel chromosomique) chez le patient infertile. Celles-ci sont responsables d'infertilités masculines avec ou sans anomalies quantitatives ou qualitatives du spermogramme, mais également de fausses couches et de malformations fœtales. Les translocations réciproques toucheraient 16% des hommes oligospermiques et 0.5% des hommes azoospermiques, bien que la majorité des porteurs soient normospermiques (59). Les investigations cytogénétiques dans ce cadre font souvent suite à des fausses couches à répétition, ou à la découverte *in utero* ou après la naissance d'un enfant d'un ou plusieurs de ces 3 éléments : malformation(s) congénitale(s), retard mental et/ou de développement, et dysmorphie crâniofaciale.

Différents mécanismes sont à l'origine de l'échec reproductif chez des porteurs d'un remaniement chromosomique à type de translocation réciproque (TR). Ils interviennent pendant un moment-clé de la méiose, la prophase de la première division méiotique, au cours de laquelle les chromosomes homologues s'accrochent fortement deux à deux. En effet la qualité de cet appariement ou synapsis a une grande importance pour le bon déroulement des étapes suivantes de la méiose. Or, dans le cas d'une TR, les deux paires chromosomiques impliquées vont s'apparier en formant une structure en croix appelée quadrivalent (figure 5). C'est ce quadrivalent qui est à l'origine des différents types d'erreurs pouvant impacter la méiose chez les porteurs de TR (24). La mieux connue et la plus extensivement étudiée est la survenue d'une malségrégation méiotique des paires

chromosomiques impliquées dans la translocation, c'est-à-dire une mauvaise répartition des chromosomes dans les cellules filles, aboutissant à la formation de gamètes avec déséquilibre du matériel chromosomique, associé ou non à une anomalie du nombre de chromosomes (figure 5). La fréquence de cette malségrégation, et donc la proportion de gamètes déséquilibrés, est très variable d'un individu à l'autre et d'une translocation à l'autre, selon les chromosomes impliqués et la localisation des points de cassure chromosomique (de 37 à 91% sur 99 translocations réciproques hétérozygotes étudiées, revues par Martin et al. (60)). La proportion de gamètes au matériel chromosomique déséquilibré serait également augmentée par un autre mécanisme chez les porteurs de TR, l'effet interchromosomique (EIC), qui se définit comme une altération de la ségrégation méiotique de chromosomes non-impliqués dans la translocation, aboutissant à la formation de gamètes disomiques ou nullisomiques pour un chromosome non-impliqué dans la translocation. 40% des hommes porteurs de TR présenteraient un EIC dans leurs cellules spermatiques (59).

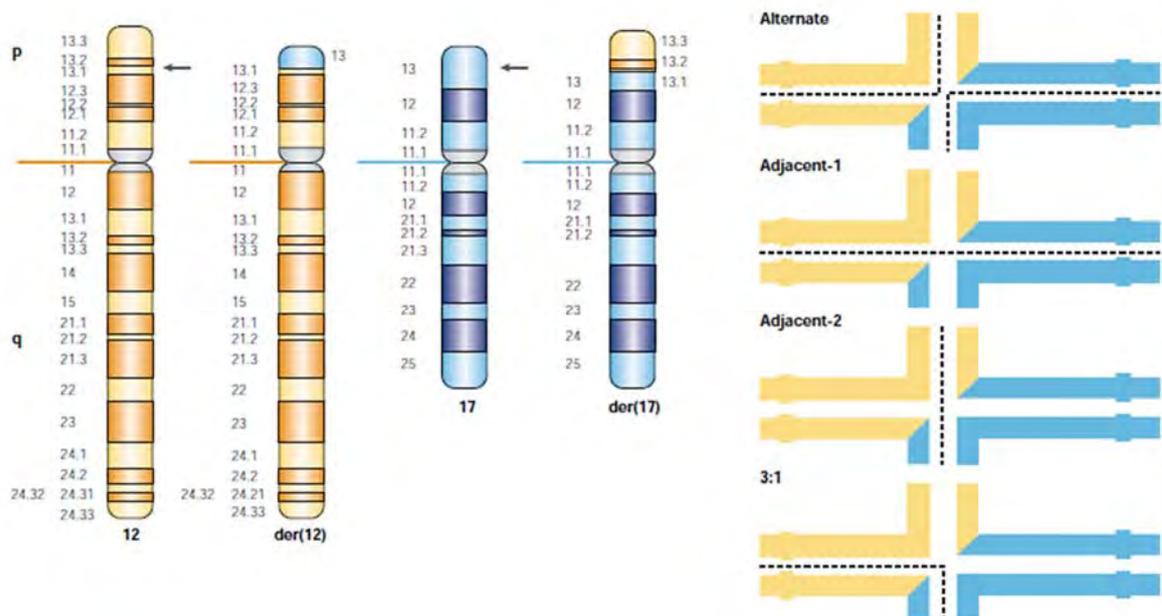


Figure 5: idéogramme d'une translocation réciproque entre un chromosome 12 et un chromosome 17, et diagramme représentant les modes de ségrégation méiotique possibles, à l'exclusion de la ségrégation 4 :0 non-représentée. Les pointillés représentent la répartition des chromosomes dans les deux cellules filles. Le seul mode de ségrégation aboutissant à la formation de gamètes équilibrés est le mode alterne (Braude et al., 2002 (61)).

Ces deux mécanismes, vecteurs de déséquilibre chromosomique dans les gamètes, sont responsables de fausses couches et de malformations par déséquilibre

chromosomique des conceptus qui en résultent mais pas d'absence de fécondation car ils n'altèrent pas la spermatogénèse.

b. Translocations réciproques, épigénétique et infertilité

Les autres mécanismes connus par lesquels des TR sont facteurs d'infertilité sont liés à des modifications épigénétiques induites du fait de l'existence de la translocation. Ils interviennent de façon délétère dans le déroulement de la méiose et aboutissent à l'altération de la spermatogénèse, responsable d'infertilité. La translocation peut avoir un effet direct en éloignant des gènes proches du point de cassure chromosomique de leurs éléments régulateurs (enhancers, ICR pour les gènes soumis à empreinte parentale) ou de leur environnement chromatinien normal (phénomène d'effet de position variégation) (62), ce qui peut modifier leur expression. Si parmi ces gènes un ou plusieurs est (sont) impliqué(s) dans la spermatogénèse, alors celle-ci peut en être affectée. La translocation peut également modifier l'organisation tridimensionnelle du noyau (la répartition non-aléatoire des chromosomes dans le noyau, dont les premières preuves expérimentales ont été apportées dès 1977 (63)), ce qui pourrait également avoir des conséquences néfastes sur l'expression génique et donc la spermatogénèse (64). Par ailleurs plusieurs études ont montré une augmentation de la fragmentation de l'ADN dans les cellules germinales chez les porteurs de translocations réciproques (59), or l'association entre augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique et infertilité est clairement établie.

Cependant le mécanisme épigénétique qui influe de manière prépondérante sur le déroulement de la méiose mâle chez les porteurs de TR est le phénomène d'inactivation méiotique de la chromatine non-appariée (MSUC ou Meiotic Silencing of Unsynapsed Chromatine) qui touche les régions d'asynapsis au cours de la méiose I.

La prophase I débute par le stade leptotène, au cours duquel de nombreuses cassures double brin (DSB pour double strand break), ainsi que le début de l'assemblage d'un axe protéique sur chaque chromosome, surviennent le long des molécules d'ADN. Au stade zygotène, les chromosomes homologues commencent à s'apparier grâce à la formation de filaments transverses au niveau de cet axe protéique, formant une structure appelée complexe synaptonémal. Le synapsis est complet au stade pachytène et les DSB des deux chromosomes s'accolent. Des chiasmata se forment ensuite le long des paires chromosomiques au niveau de ces cassures doubles brins de l'ADN, permettant leur

réparation et donnant lieu à des recombinaisons ou crossing-over entre chromosomes homologues (figure 6). Ces foci de recombinaison renforcent à leur tour l'appariement des chromosomes homologues (65). Cependant lorsqu'il existe une translocation réciproque, l'appariement entre chromosomes homologues au sein des quadrivalent est fréquemment imparfait, avec des régions d'asynapsis (ou mésappariement) où les éventuelles DSB sont incomplètement réparées.

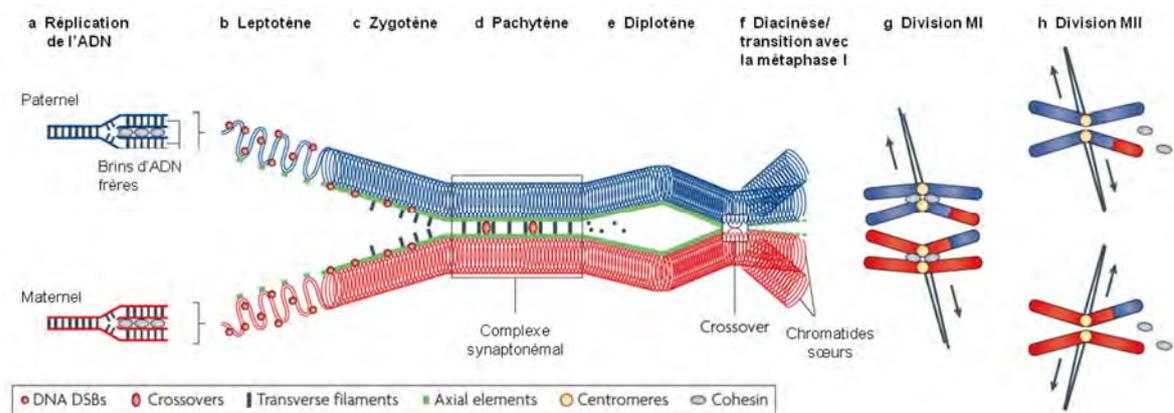


Figure 6: représentation schématique des évènements d'appariement et d'échange de matériel génétique survenant au sein des paires chromosomiques au cours de la prophase de la première division méiotique (adapté de Burgoyne et al., 2009 (65)).

Le MSUC est un phénomène épigénétique physiologique qui intervient au cours du stade pachytène de la prophase de la méiose I. Ce processus apparaît localement dans les régions chromosomiques non-appariées et correspond à l'apparition de modifications épigénétiques localisées aboutissant à la répression transcriptionnelle des régions touchées. C'est un mécanisme de protection permettant d'assurer la production de gamètes génétiquement équilibrés. Il intervient notamment de manière normale au niveau des régions non-appariées du bivalent X-Y dans la méiose mâle, cette inactivation transcriptionnelle étant nécessaire au bon déroulement de la méiose (Meiotic Sex Chromosome Inactivation ou MSCI) (66)(67). Il débute par une séquestration localisée de la protéine BRCA1, déjà présente sur place pour intervenir dans la réparation des DSB. Elle-même recrute la protéine kinase ATR, qui va ensuite phosphoryler le variant d'histone H2AX (γ H2AX) présent sur l'ADN en méiose. Ces facteurs s'accumulent localement et

permettent l'amplification du phénomène le long de l'axe chromosomique, aboutissant à l'hétérochromatinisation de la région.

Des auteurs ont montré que le MSUC intervient au niveau des zones d'asynapsis anormal (68), notamment sur les chromosomes transloqués chez les porteurs de TR (69)(70). Ils ont également déterminé qu'il en résulte une inhibition transcriptionnelle de la chromatine non-appariée (71) qui se poursuit après la méiose dans les spermatides, qui sont des cellules normalement hautement transcriptionnellement actives (72).

Comment le MSUC déclenche-t-il l'apoptose du spermatocyte ? Plusieurs hypothèses non-exclusives ont été émises quant aux raisons de l'échec de la méiose dans les cas d'asynapsis d'autosomes :

- La première explique la survenue du MSUC dans le but d'éviter que la division cellulaire ne se poursuive en cas de persistance des DSB au stade pachytène, en signalant l'arrêt à un point de contrôle analogue à celui du stade G2/M de la mitose, appelé point de contrôle du pachytène, suivi de l'apoptose de la cellule. Cependant plusieurs modèles dans lesquels la méiose se poursuit en l'absence de réparation des DSB indiquent que la persistance de DSB est insuffisante pour déclencher l'apoptose des spermatocytes I.
- La deuxième explication avancée est une perturbation de l'inactivation normale des chromosomes sexuels en cas de MSUC dans des régions d'asynapsis anormal étendu. En effet, la consommation des facteurs de répression de la chromatine non-appariée impliqués dans le MSUC par les chromosomes transloqués pourrait empêcher l'inactivation correcte des chromosomes X et Y au pachytène puisque le MSUC intervient à la fois de manière normale au niveau des régions non-appariées du bivalent sexuel (phénomène de MSCI) et dans les zones anormales d'asynapsis. La survenue d'un synapsis non-homologue entre un chromosome sexuel et un segment autosomal transloqué pourrait également interférer avec le MSCI, entraînant la réactivation transcriptionnelle de gènes normalement inactifs sur les chromosomes sexuels (71).
- La troisième hypothèse émise est que le MSUC entraînerait la répression transcriptionnelle de gènes cruciaux pour la méiose et les étapes post-méiotiques

dans les régions d'asynapsis. Cela conduirait à un arrêt en méiose ou en post-méiose et l'entrée de la cellule en apoptose, contribuant à la perte de gamètes.

Cependant les régions transloquées peuvent éviter le MSUC en formant un synapsis non-homologue (par exemple par autosynapsis c'est-à-dire repli du chromosome sur lui-même). Dans ce cas, le spermatocyte risque tout de même d'entrer en apoptose au prochain point de contrôle de la méiose, celui du fuseau en métaphase I, si le réarrangement chromosomique est associé à une fréquence élevée d'univalence (65).

V. Intérêt du modèle porcin pour l'étude d'anomalies de la méthylation de l'ADN en lien avec l'infertilité et les translocations chromosomiques

1. Généralités

Dans l'espèce porcine, la faible prolificité est synonyme de perte économique importante pour les éleveurs et elle représente la première cause de réforme des animaux dans les centres d'insémination artificielle (33%). C'est pourquoi la recherche agronomique s'intéresse depuis de nombreuses années aux déterminants de l'infertilité dans cette espèce, et notamment à ses causes génétiques.

En effet mis à part l'Homme, le porc est l'espèce qui a été le mieux étudiée concernant la survenue et la nature des réarrangements chromosomiques. Les translocations réciproques sont les anomalies chromosomiques de structure les plus répandues dans l'espèce porcine, avec 0.43% d'animaux porteurs (73). Elles sont responsables d'une hypoprolificité d'intensité variable (diminution de 10 à 100% du nombre de petits par portée) (74) (75) (73) (76) d'une anomalie à l'autre et d'un animal à l'autre, mais qui dans tous les cas représente une perte financière importante pour les éleveurs. Les animaux porteurs de ces translocations présentent dans la grande majorité des cas un phénotype normal (74), et, en l'absence de diagnostic de l'anomalie chromosomique, peuvent être conservés comme reproducteurs dans les centres d'insémination artificielle. La diffusion commerciale de la semence de ces animaux propage alors ces anomalies dans la population sur des générations. C'est pourquoi de nombreux pays dont la France ont mis en place depuis une quinzaine d'années une stratégie de contrôle caryotypique systématique des jeunes porcs destinés à la

reproduction avant leur entrée en service en centre d'insémination. La plateforme de diagnostic cytogénétique de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) a une activité de contrôle chromosomique des porcs très importante puisqu'elle traite la majorité des demandes d'analyses cytogénétiques de l'ensemble du territoire français mais aussi des demandes de l'étranger, permettant un accès facilité à des données cytogénétiques et à des échantillons issus d'animaux porteurs d'anomalies caryotypiques et/ou du spermogramme. Cette plateforme est couplée à une activité de recherche puisque ses locaux abritent également une partie de l'équipe CytoGene de l'UMR 1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage GenPhySE (INRA-ENSAT-ENVT), d'où l'intérêt du modèle porcin pour les recherches de l'équipe.

En dehors de l'espèce humaine, et bien que la souris soit le modèle clé des études sur la lignée germinale (77), la méthylation de l'ADN en lien avec l'infertilité mâle a été étudiée essentiellement dans des espèces d'élevage, en particulier bovines (78) du fait de l'intérêt économique de la reconnaissance des causes d'hypoproliférite chez les animaux reproducteurs. Cependant il n'existe que peu d'études sur ces espèces. En ce qui concerne le porc en particulier, il n'y avait pas jusqu'à très récemment de données concernant le profil global de méthylation de l'ADN du porc et son lien avec différents critères d'importance économique tels que la fertilité.

Par ailleurs, le porc est un bon modèle pour étudier certaines pathologies humaines, notamment dans le domaine de la cytogénétique, car ces deux espèces présentent de grandes similarités physiologiques, anatomiques, développementales mais aussi génétiques et cytogénétiques.

C'est pourquoi une des thématiques de recherche de l'équipe CytoGene de l'UMR 1388 GenPhySE, qui regroupe des personnels de l'Institut National de Recherche Agronomique de Toulouse (INRA) et de l'ENVT, est l'étude des altérations du spermogramme en lien avec la présence d'anomalies chromosomiques. Ainsi ils ont initié récemment des recherches pour étudier le lien possible entre la présence de ces translocations et des anomalies de méthylation de l'ADN spermatique chez le porc. C'est sur cette thématique que j'ai réalisé un travail expérimental dans le cadre du master 2 recherche Gènes, Cellules et Développement de l'Université Paul Sabatier et de ma thèse de médecine.

2. Travaux de thèse d'A. Congras au sein de l'équipe GenPhySE (UMR 1388 INRA-ENVT)

L'étude de la méthylation d'une sélection de gènes soumis à empreinte parentale dans les cellules germinales de porcs à qualité de semence dégradée a fait l'objet d'une thèse scientifique au sein de mon équipe d'accueil (79). Les résultats de ce travail, le premier sur le thème de la méthylation de l'ADN dans les cellules spermatiques en lien avec les anomalies du spermogramme dans l'espèce porcine, a été le point de départ de mon projet de recherche.

Dans cette étude, A. Congras a comparé la méthylation de l'ADN pour 38 loci soumis à empreinte parentale, parmi lesquels les gènes dont la méthylation a été le plus fréquemment étudiés chez l'Homme en lien avec l'infertilité (notamment *H19/IGF2*, *MEST*, *PEG3*) dans la semence de 12 porcs dont certains étaient fertiles et d'autres infertiles. Elle a mis en évidence un DMR au niveau du locus multigénique *GNAS* pour 3 porcs infertiles (figure 7) : l'animal n°1746 qui est porteur d'une translocation réciproque t(13;17) et présente une asthénotéatospermie (AT), l'animal n°1948 qui est porteur d'une translocation réciproque t(1;14) (caryotypes de ces deux animaux : annexes 4 et 5) et présente une oligoasthénotéatospermie (OAT) et l'animal n°2861 au caryotype normal et qui présente une téatospermie (T) (tableau 1).

Le locus *GNAS* est soumis à empreinte parentale et comprend différents transcrits : le transcrit codant NESP55 est exprimé sur l'allèle maternel, les différentes formes du transcrit codant GNASXL (ou XLAS) ainsi que le transcrit non-codant 1A (ou A/B) et le transcrit non-codant antisens AS (ou NESPAS) sont exprimés sur l'allèle paternel, tandis que le transcrit codant $G\alpha$ (ou GNAS) est d'expression biallélique dans la plupart des tissus. Les 4 principaux transcrits, NESP55, GNASXL, 1A et $G\alpha$, sont produits à partir de promoteurs alternatifs et d'un épissage alternatif de quatre premiers exons uniques, et partagent les exons 2 à 13 (figure 8).

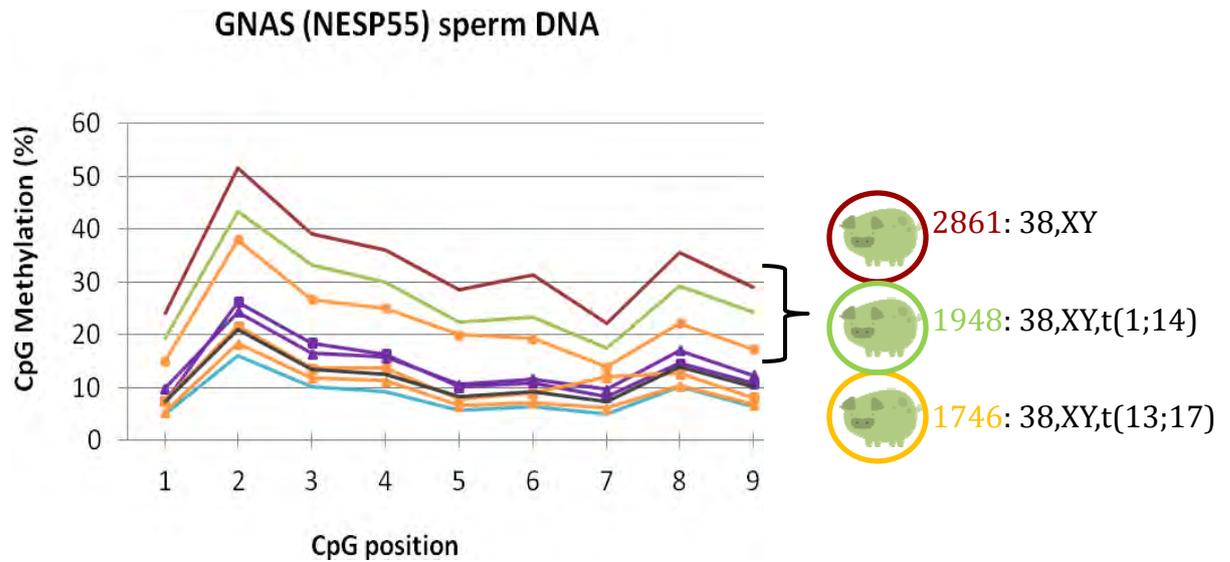


Figure 7: niveau de méthylation au locus NESP55 d'un groupe contrôle de porcs fertiles (ligne noire) et de 8 porcs infertiles à qualité de semence dégradée (lignes colorées), déterminé par pyroséquençage après conversion bisulfite de l'ADN. Les résultats correspondent à la moyenne de 2 expériences (adapté de Congras et al., 2014).

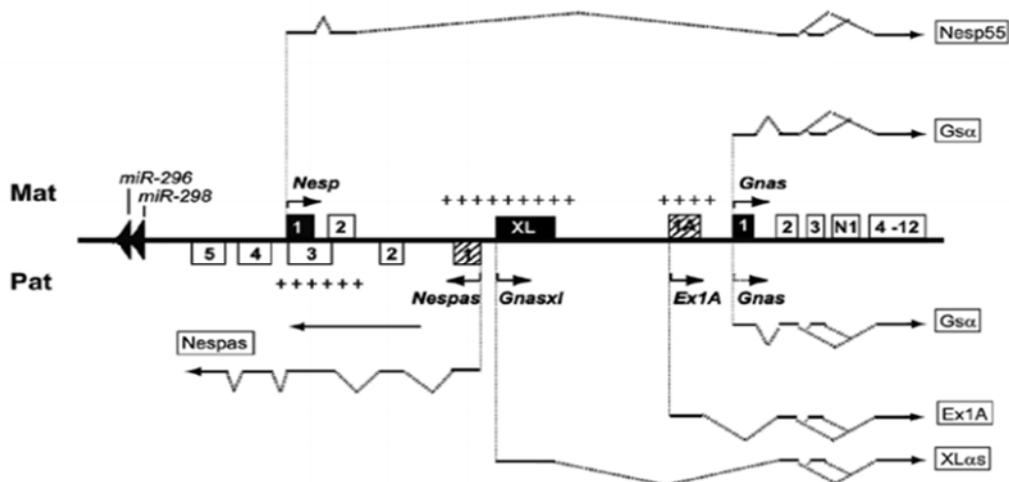


Figure 8: représentation schématique du locus soumis à empreinte *GNAS* chez la souris (adapté de Peters and Williamson, 2007(80)). Les carrés noirs représentent les premiers exons des transcrits codants et les carrés hachurés les premiers exons des transcrits non codants. La méthylation différentielle entre allèle paternel et maternel est indiquée par le signe +.

Notamment, $G\alpha$ code pour la sous-unité α de la protéine G stimulatrice, tandis que les transcrits non-codants jouent un rôle majeur dans le maintien de l’empreinte du locus. *GNAS* est impliqué dans le métabolisme des graisses et des sucres, la thermorégulation et la succion (81), et joue un rôle majeur dans la croissance fœtale (82). Des mutations de ce gène sont impliquées chez l’Homme dans plusieurs maladies du système endocrine comme le syndrome de McCune-Albright, des tumeurs endocrines, la dysplasie fibreuse polyostotique (mutations activatrices), des pseudohypoparathyroïdies, l’hétéroplasie osseuse progressive (mutations inactivatrices) et des macro-adénomes hypophysaires ACTH-indépendants sécrétant la GH (mutations somatiques) (83).

Ces travaux ont également retrouvé une altération de l’expression des différents transcrits de *GNAS* chez les 3 individus porteurs du DMR sur ce locus (figure 9). Bien que des anomalies de méthylation de nombreux gènes soumis à empreinte aient été liées à des anomalies du spermogramme chez l’Homme, ces résultats sont les premiers établissant un lien entre une anomalie de méthylation au niveau du locus *GNAS* et des altérations du spermogramme, et *a fortiori* dans l’espèce porcine. Il est par ailleurs intéressant de noter que parmi les trois porcs présentant ce DMR, on retrouve les deux seuls porcs à qualité de semence dégradée porteurs d’une translocation chromosomique réciproque de la cohorte (annexes 4 et 5). Cet élément pose la question d’une éventuelle relation entre le phénomène épigénétique d’inactivation méiotique de la chromatine non-appariée qui existe chez les porteurs de translocation chromosomique, et la survenue d’anomalies de méthylation de l’ADN dans les cellules germinales de ces animaux, ainsi que de leurs conséquences éventuelles sur l’expression génique et la gamétogenèse. En effet le MSUC aboutit à une hétérochromatinisation et une répression transcriptionnelle de la région touchée qui pourrait passer par des modifications de la méthylation de l’ADN, ce qui serait intéressant puisque des anomalies de méthylation sont déjà connues pour leur association avec des anomalies du spermogramme chez l’Homme en dehors de tout remaniement chromosomique.

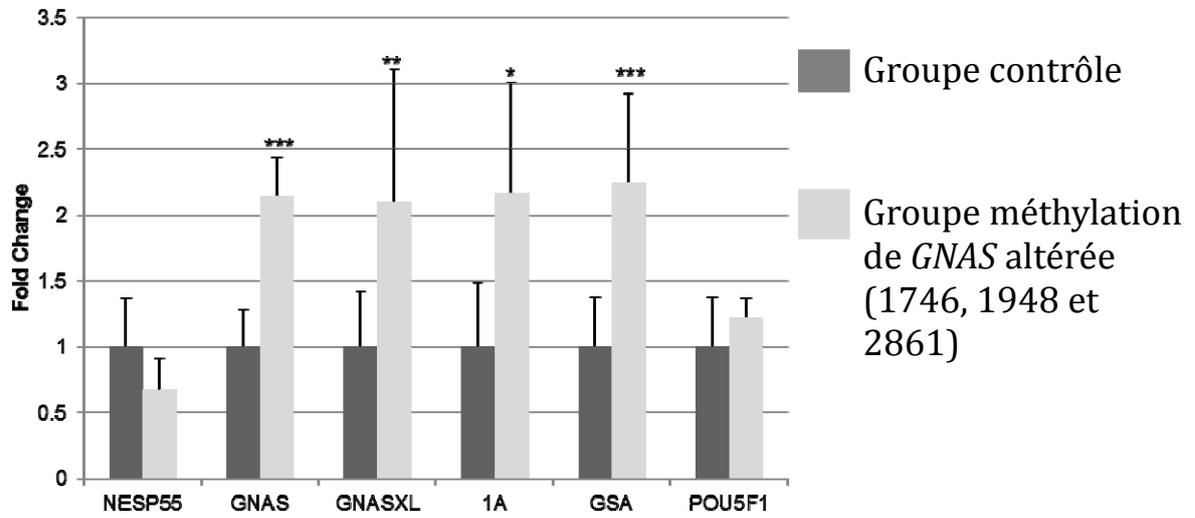


Figure 9: niveau d'expression des principaux transcrits du locus *GNAS* déterminé par PCR quantitative pour un groupe contrôle fertile constitué de porcs fertiles et infertiles non-porteurs du DMR sur *GNAS* et d'un groupe constitué des 3 porcs infertiles porteurs du DMR sur *GNAS* (adapté de Congras et al., 2014).

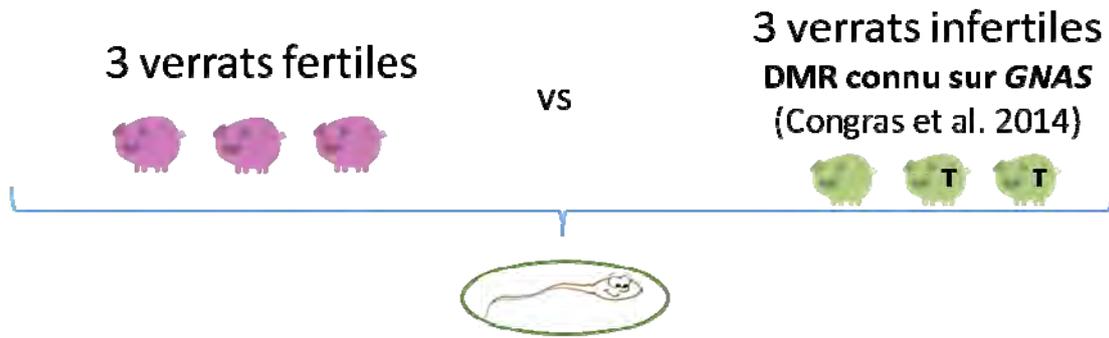
Etude de la méthylation de l'ADN et de l'expression génique chez des porcs à qualité de semence dégradée en lien avec la présence d'une translocation chromosomique réciproque équilibrée

I. Objectifs de l'étude

Nous nous sommes donc intéressés au lien possible entre la découverte d'anomalies de la méthylation de l'ADN dans les cellules spermatiques de deux animaux infertiles porteurs de translocations réciproques (84), et le déclenchement du phénomène de MSUC avec inactivation transcriptionnelle des régions concernées dans les cellules germinales de ces animaux transloqués. Pour cela nous avons étudié ces mêmes individus par 3 approches complémentaires : l'étude de la méthylation sur l'ensemble du génome dans les cellules spermatiques, l'étude du transcriptome dans le tissu testiculaire, et l'étude microscopique en fluorescence *in situ* dans les spermatocytes du MSUC et de l'activité transcriptionnelle autour d'un point de cassure chez un animal transloqué. Ce travail présentait trois objectifs principaux :

- Etendre à l'échelle du génome entier l'étude des différences de méthylation de l'ADN entre des animaux à qualité de semence dégradée présentant déjà un DMR commun et des animaux fertiles, et chercher les conséquences transcriptionnelles des éventuelles anomalies de méthylation mises en évidence
- Etudier la transcription des gènes situés à proximité des points de cassure dans les cellules germinales des deux porcs à qualité de semence dégradée porteurs d'une translocation réciproque, et mettre en relation ces résultats avec l'appariement et l'extension du phénomène de MSUC aux chromosomes transloqués au cours de la méiose chez ces animaux
- Rechercher une relation de causalité entre les anomalies de la méthylation constatées, l'extension du phénomène de MSUC aux chromosomes transloqués et l'expression génique chez les deux animaux à la spermatogenèse altérée et porteurs de translocation chromosomique.

1^{ère} partie : analyses tout génome



Analyse de la méthylation de l'ADN spermatique

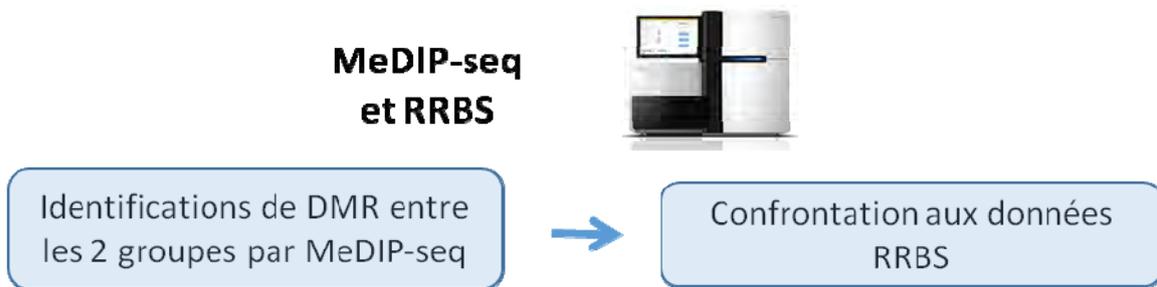


Figure 10A: schéma représentant la première partie de la stratégie expérimentale du projet. DMR : région différenciellement méthylée. T : animal porteur d'une translocation chromosomique réciproque

2^{ème} partie : analyses locales

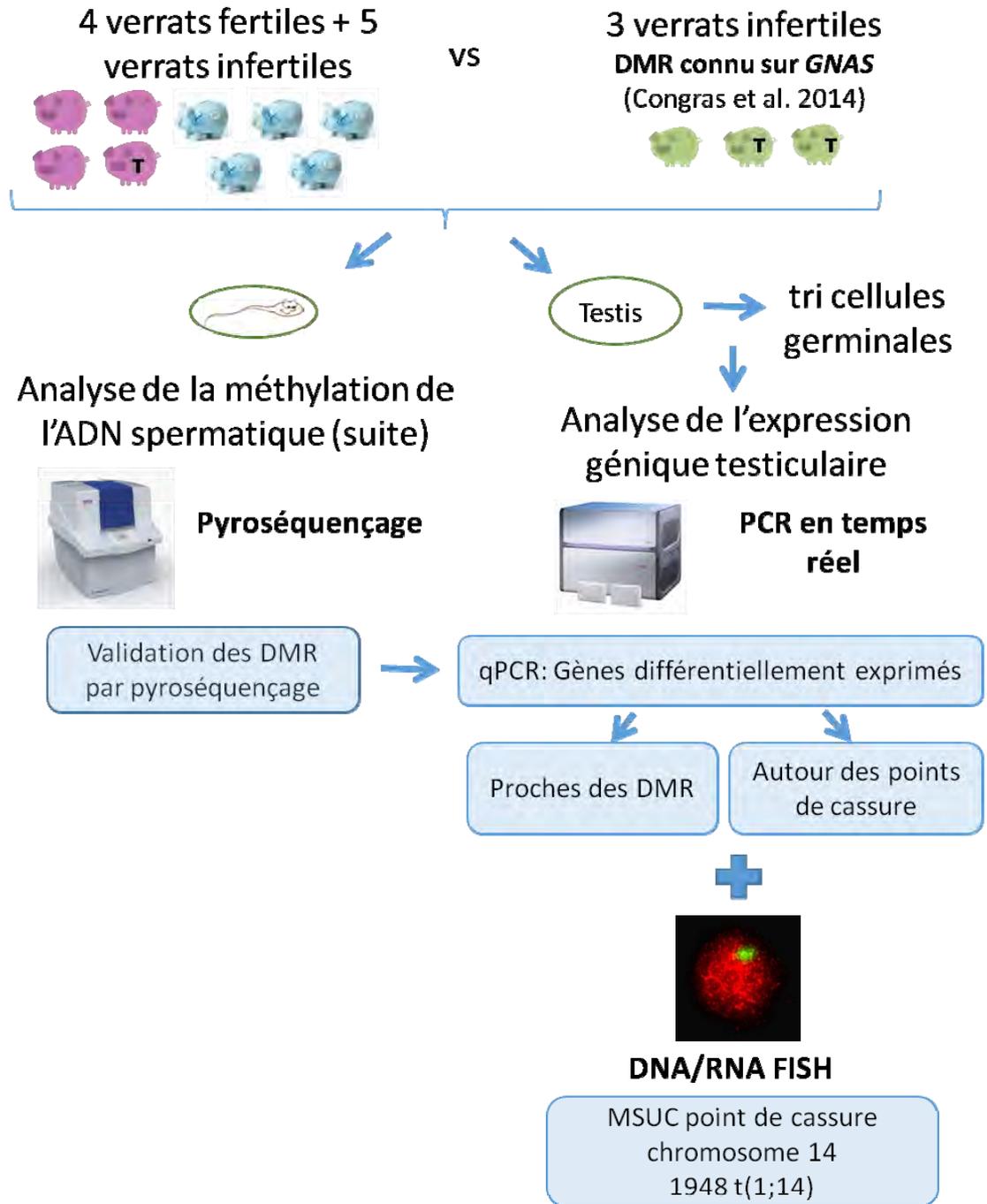


Figure 10B: schéma représentant la seconde partie de la stratégie expérimentale du projet. DMR : région différenciellement méthylée. T : animal porteur d'une translocation chromosomique réciproque

II. Méthodologie

1. Stratégie expérimentale (figure 10)

a. Etude cellulaire par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

Nous avons étudié par FISH le tissu testiculaire de l'animal 1948 portant la translocation réciproque t(1;14). En effet l'appariement des chromosomes impliqués dans la translocation de cet animal avaient précédemment été étudié par immunolocalisation et FISH au sein du laboratoire (Barasc et al., travaux non-publiés), montrant la formation d'un quadrivalent dans 70% des spermatocytes étudiés et d'un trivalent + univalent (der14) dans 30% des spermatocytes. 11% des quadrivalents colocalisaient avec le bivalent sexuel (région γ H2AX positive), démontrant l'existence d'un asynapsis. Dans le second cas de figure, l'association de l'univalent (der14) au bivalent XY était comme attendu très fréquente (77%) (figure 11).

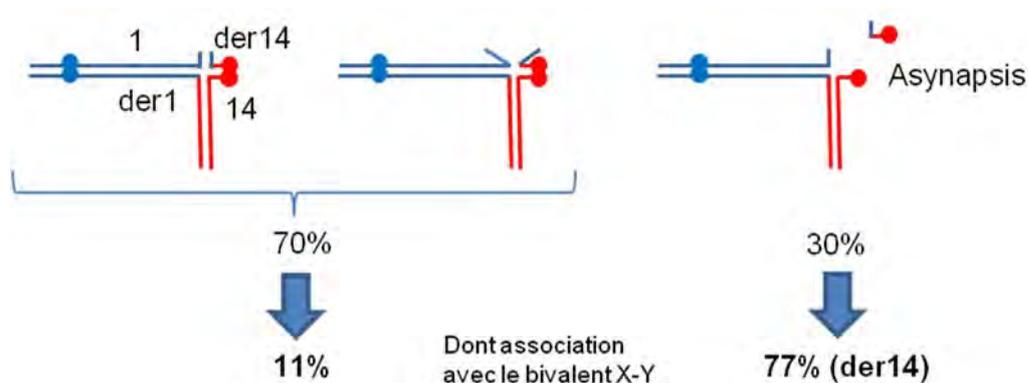


Figure 11: représentation schématique de l'appariement des chromosomes transloqués de l'animal 1948 t(1;14) et leur association avec la région d'inactivation transcriptionnelle de la chromatine non-appariée des chromosomes X et Y.

Les chromosomes transloqués présentant un fréquent mésappariement au cours du stade pachytène de la prophase I, nous avons recherché par RNA- et DNA-FISH sur cellules testiculaires l'existence d'une inactivation transcriptionnelle des gènes de la région du point de cassure du chromosome 14 à ce même stade. Ces résultats ont ensuite été confrontés à ceux obtenus par PCR quantitative (qPCR).

	Désignation de l'animal	Spermogramme	Caryotype	Race
Groupe DMR GNAS	1746	Asthéno-tératospermie	38, XY trcp(13;17)	Pietrain
	1948	Oligo-asthéno-tératospermie	38, XY trcp(1;14)	GP1062*
	2861	Tératospermie	38, XY	Pietrain
Groupe contrôle fertile	755	Normal	38, XY	Large White
	1662	Normal	38, XY	Pietrain
	5812	Normal	38, XY	Large White
	7035	Normal	38, XY trcp(3;4)	Large White
Groupe contrôle infertile	1857	Asthéno-tératospermie	38, XY	Pietrain
	2872	Oligospermie	38, XY	Pietrain
	3462	Asthéno-tératospermie	38, XY	P76*
	4223	Oligospermie	38, XY	Pietrain
	5363	Asthénospermie	38, XY	Large White

Tableau 1 : Caractéristiques des animaux de l'étude.

* Lignées synthétiques commerciales, trcp : translocation réciproque

b. MeDIP-seq

Le MeDIP-seq (Methylated DNA ImmunoPrecipitation followed by Sequencing, (85)) permet d'étudier la méthylation de l'ADN à l'échelle du génome entier. Il est basé sur l'enrichissement de l'ADN méthylé par immunoprécipitation grâce à des anticorps anti-méthylcytosines, puis le séquençage haut débit de la fraction d'ADN obtenue. La quantification du nombre de lectures obtenues pour chaque portion du génome séquencée permet de déduire son niveau de méthylation.

Nous avons choisi d'étudier par cette technique la méthylation de l'ADN de cellules spermatiques des 3 animaux présentant des anomalies de méthylation du locus *GNAS* (84), qui forment le groupe DMR *GNAS* (animaux 1746, 1948 et 2861), et de 3 animaux fertiles du groupe contrôle fertile (755, 1662 et 5812) (Tableau 1). L'analyse des données de MeDIP-seq a permis d'identifier de nombreux DMR dont nous n'avons retenu dans un

premier temps que ceux présents chez au moins 2 des 3 individus du groupe DMR *GNAS* versus l'ensemble des 3 témoins. Parmi ces régions, seuls les DMR correspondant à des gènes ou des promoteurs de gènes connus chez le porc ou à des homologues de gènes connus dans d'autres espèces de mammifères ont été sélectionnées pour validation directe par pyroséquençage (annexe 1).

Dans un second temps, nous sommes repartis de l'ensemble des DMR identifiés en MeDIP-seq, que ceux-ci soient communs ou non à plusieurs animaux du groupe DMR *GNAS*, et avons comparé ces résultats avec ceux obtenus par la technique RRBS.

c. RRBS

La technique de RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing, (86)) est basée sur la digestion enzymatique de l'ADN génomique, l'ajout d'adaptateurs de séquençage aux deux extrémités des fragments ainsi formés, puis une purification pour sélectionner les fragments de petite taille (200-300 bp). Après conversion bisulfite transformant en uracils les cytosines non-méthylées, puis amplification par PCR qui convertit ces uracils en thymines, l'ADN est analysé par séquençage haut débit et le ratio cytosine/thymine détermine le pourcentage de méthylation pour chaque CpG étudié. Le RRBS permet une analyse quantitative et base-spécifique de la méthylation de l'ADN sur une petite partie du génome (moins de 10%) mais très informative car contenant une grande partie des îlots CpG (autour de 70% par estimation *in silico*).

Nous avons croisé les données de RRBS avec celles de MeDIP-seq en calculant les moyennes des valeurs de RRBS pour chaque DMR identifié en MeDIP-seq et pour chaque animal, puis sélectionné ceux présentant des gains de méthylation statistiquement significatifs (test-t de Student, $p < 0.05$) en RRBS chez les 3 animaux du groupe DMR *GNAS* par rapport à 2 animaux contrôles fertiles (755 et 1662) (annexe 2). Les DMR avec des données de RRBS manquantes pour un ou plus des 5 animaux ont été exclus de l'analyse.

d. Validation des DMR par pyroséquençage après conversion bisulfite

Nous avons ensuite analysé l'ensemble des DMR identifiés selon la stratégie décrite précédemment sur un panel plus large d'animaux par conversion bisulfite et pyroséquençage de l'ADN spermatique (87). Dans cette technique, après une étape de conversion bisulfite qui transforme les cytosines non-méthylées en uracils, l'ADN est

amplifié par PCR conventionnelle, ce qui convertit les uracils en thymines. Le pyroséquençage est ensuite réalisé, il correspond à l'ajout d'une série de nucléotides dans un ordre dépendant de la séquence à analyser, et dont l'incorporation est détectée par enregistrement d'un signal lumineux émis par libération d'un pyrophosphate. Pour chaque position CpG, le ratio d'intensité lumineuse cytosine/thymine détermine le taux de méthylation. Cette technique est idéale pour valider des DMR mis en évidence par séquençage haut-débit puisqu'elle permet une mesure quantitative et résolutive à l'échelle d'un CpG, rapide (résultat en 1 à 2 heures) et sur une centaine de bases (quelques CpG) au maximum.

Nous avons inclus dans cette analyse 6 animaux supplémentaires dont 1 verrat fertile porteur d'une translocation (groupe contrôle fertile) et 5 verrats à qualité de semence dégradée mais à caryotype normal et ne présentant pas une hyperméthylation du locus *GNAS* (groupe contrôle infertile) (tableau 1).

e. Mesure des niveaux d'expression génique testiculaire

Pour l'étude de l'expression génique dans les cellules testiculaires, nous avons adopté une approche gène-candidat.

Concernant les translocations chromosomiques nous avons choisi d'étudier les gènes situés dans un intervalle de 1 Mb autour du point de cassure des chromosomes transloqués chez les deux animaux transloqués infertiles (chromosome 1 et 14 pour l'animal 1948 et chromosome 17 pour l'animal 1746) (annexe 3). Les points de cassure avaient été localisés précédemment par array painting (88) sur une puce pan-génomique de 4,2 millions de sondes (Nimblegen) à partir des chromosomes dérivés microdisséqués, à l'exception du point de cassure situé sur le chromosome 13 (animal 1746) pour lequel cette analyse n'avait pas pu être faite (point de cassure trop proche du centromère).

Concernant l'étude des DMR, nous avons choisi d'étudier l'expression :

- Du gène sur lequel se trouve le DMR lorsque c'est un gène connu référencé dans la base de données Ensembl
- Du gène Ensembl le plus proche du DMR (dans un intervalle maximum de 1Mb) dans les autres cas, dans l'hypothèse où la région du DMR serait localisée sur un promoteur ou un enhancer régulant l'expression de ce gène

2. Matériel et méthodes

a. Animaux étudiés

Nous avons étudié 3 porcs infertiles (groupe DMR *GNAS*) présentant une altération de la méthylation de l'ADN au niveau du locus soumis à empreinte *GNAS*, mise en évidence au cours des travaux de thèse d'Annabelle Congras dans le laboratoire (84). Les autres porcs de l'étude sont 4 porcs fertiles (groupe contrôle fertile) et 5 porcs infertiles ne présentant pas d'anomalie de méthylation au niveau du locus *GNAS* (groupe contrôle infertile) (tableau 1). L'ensemble de ces animaux provient de l'unité expérimentale INRA UEICP Genesi de Rouillé.

b. Tissus étudiés

i. Sperme

Le sperme des animaux a été recueilli au sein de l'unité de Rouillé, sa qualité a été évaluée par étude de la couleur, du volume, de la morphologie, de la motilité et de la concentration en spermatozoïdes. L'ADN spermatique a été extrait par lyse cellulaire suivie d'une purification par solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique puis précipité et lavé à l'éthanol 70%. Le culot d'ADN était alors repris et dilué dans du tampon TE. La quantité d'ADN obtenue était mesurée par spectrométrie au Nanodrop™ 1000. Nous avons utilisé cet ADN pour les analyses de MeDIP-seq et de pyroséquençage.

ii. Biopsies testiculaires

Des prélèvements de tissu testiculaire ont été recueillis par castration chirurgicale sur le site de Rouillé, puis cryoconservés dans l'azote liquide. Nous avons extrait l'ARN de ces tissus par méthode au Trizol avec les colonnes du kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel). Après contrôle de sa qualité et de sa quantité, nous avons converti cet ARN en ADNc à l'aide des réactifs du kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. L'ADNc ainsi obtenu a été employé dans les analyses de PCR quantitative.

iii. Spermatogonies et spermatocytes triés par FACS

Nous avons tenté d'extraire et de marquer les spermatocytes et spermatogonies extraits de biopsies testiculaires avec des anticorps dirigés contre les complexes

synaptonémaux (anticorps anti-SCP1 et anti-SCP3) et des anticorps dirigés contre des protéines nucléaires (anticorps anti-OCT4 et anti-SALL4). Nous avons pour cela testé différents protocoles adaptés de ceux décrits sur modèle murin (89)(90) qui avaient pour étapes communes la dilacération du tissu, puis sa digestion enzymatique dans du PBS additionné de collagénase, DNase et/ou trypsine. Après récupération du culot cellulaire, celui-ci était incubé dans du PBS en présence des anticorps primaires et de Tween qui perméabilise les membranes cellulaire. Après lavage, une nouvelle incubation du culot cellulaire en présence des anticorps secondaires était réalisée (anticorps anti-rabbit vert et anti-mouse rouge). Après nouveau lavage, le culot obtenu était repris dans du PBS et son contenu était analysé au microscope pour contrôler la présence de spermatocytes et spermatogonies et l'absence d'agrégats avant transfert au plateau technique de cytométrie et tri cellulaire de l'UMR INSERM 1048 (Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires) de Ranguel.

c. Comparaison du méthylome spermatique des porcs infertiles et contrôles

i. MeDIP-seq

Le MeDIP-seq a été réalisé en triplicats expérimentaux sur l'ADN spermatique des 6 animaux (3 contrôles fertiles et les 3 infertiles du groupe DMR *GNAS*) par la Plateforme Génomique de Toulouse GeT-PlaGe, sur séquenceur haut débit HiSeq 2000 (Illumina). Les résultats de MeDIP-seq des animaux de ces deux groupes ont été comparés à l'aide du package MEDIPS (programme R) (91).

ii. RRBS

Les données de RRBS ont été obtenues par l'équipe de Michael Weber de l'Institut de Recherche de l'École de Biotechnologies de Strasbourg sur le sperme des 3 animaux du groupe DMR *GNAS* et de 2 animaux du groupe contrôle fertile (755 et 1662).

Les comparaisons des moyennes de score RRBS entre animaux ont été réalisées par des tests de Student avec homogénéité des variances (testée par un test de Fisher).

iii. Pyroséquençage

Nous avons dessiné les 3 amorces nécessaires au pyroséquençage (deux amorces d'amplification et une amorce de séquençage) avec le logiciel PyromarkAssay Design 2.0.

Le nombre de CpG étudiés pour chaque DMR allait de 3 à 10 selon les possibilités de dessin d'amorces offertes par la séquence génomique concernée.

Nous avons effectué la conversion bisulfite sur 500ng d'ADN génomique avec le MethylEdge Bisulfite Conversion kit de Promega. L'amplification a été réalisée par PCR conventionnelle (95°C 15mn ; 45 cycles : 94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 30s ; 72°C 10mn) puis contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose.

Le pyroséquençage comprend une étape de fixation des amplicons à des billes de sépharose (pour chaque région étudiée, une des amorces d'amplification est biotynilée en 5' pour permettre cette fixation) suivie du lavage et de la dénaturation des produits de PCR sur la station de travail du PyroMark Q24, puis du couplage à l'amorce de séquençage, le produit final étant pyroséquéncé en présence des réactifs du kit Pyromark Gold Reagents sur l'appareil Pyromark Q24 de Qiagen. Le pyrogramme obtenu est analysé sur le logiciel du Pyromark Q24 et donne un résultat sous forme de pourcentage de méthylation de chaque CpG étudié.

d. Etude du transcriptome spermatique des gènes d'intérêt par qPCR

Nous avons dessiné les amorces de qPCR dans les régions d'intérêt avec le logiciel Primer-BLAST, et les avons testées par PCR conventionnelle sur un ADNc témoin. Nous avons ensuite évalué leur efficacité et leur spécificité par qPCR suivie d'une cinétique de fusion sur une série de dilutions (1/20, 1/40, 1/60, 1/100) en utilisant le même ADNc témoin. Cette validation a été réalisée sur la plateforme GeT-PlaGe (INRA, site de Castanet-Tolosan) avec l'appareil LightCycler 480 de Roche et le FastStart SYBR Green Master mix de Roche.

Nous avons ensuite mesuré les niveaux d'expression des gènes candidats dont les amorces étaient validées sur des ADNc produits à partir d'ARN totaux issus de biopsies testiculaires pour les 2 verrats infertiles transloqués avec DMR sur *GNAS* (1746 et 1948), 2 verrats du groupe contrôle infertile (1857 et 5363), et 2 verrats du groupe contrôle fertile (755 et 7035) qui ont servi de référence pour la réalisation des tests statistiques. Nous avons réalisé les mesures en triplicat pour chaque échantillon et avons effectué une deuxième quantification pour valider certains gènes dont le premier dosage indiquait une sur- ou une sous-expression chez l'animal ou les animaux concerné(s) (porteur(s) de la translocation ou du DMR correspondant au gène). Les comparaisons entre animaux ou

entre groupe d'animaux ont été réalisées par des tests de Student, en prenant en compte l'homogénéité des variances. Ces analyses ont été réalisées sur la plateforme GeT-TRIX (INRA, site de St Martin-du-Touch) avec l'appareil ViiA™ 7 Real-Time PCR System de Life Technologies.

Nous avons utilisé les gènes de ménage TBP (TATA box-binding protein), ACTB (Actin- β) et le gène marqueur des spermatogonies OCT4 (Octamer-binding protein 4) comme gènes de référence.

e. Etude cellulaire de l'expression génique par FISH et immunomarquage

i. Préparation des sondes de FISH

Les sondes ont été marquées en Random Priming (kit Bioprime Life technologies). Pour cela, nous avons dénaturé à 100°C pendant 5 mn en présence d'amorces non-spécifiques la sonde Cot-RNA et la sonde BAC PERV qui marque la région péri-centromérique du bras q du chromosome 14 porcin, puis les avons marquées avec de la biotine pour la sonde Cot-RNA et de la biotine ou de la digoxigénine pour la sonde PERV par incubation à 37°C sur la journée. Après centrifugation et lavages à l'éthanol, les culots ont été additionnés de milieu d'hybridation et incubés la journée à 37°C. Les sondes ont été ensuite conservées à -20°C.

ii. Préparation des lames

RNA-FISH et immunomarquage

Des biopsies testiculaires de l'animal transloqué t(1;14) ont été décongelées puis dilacérées au scalpel sur glace dans du milieu de culture RPMI. Après 5 mn de sédimentation le surnageant a été centrifugé et le culot a ensuite été étalé sur lame puis fixé au formaldéhyde, lavé et marqué successivement avec les anticorps primaires et secondaires (Cot-biotine, streptavidine conjuguée à Alexa fluor 594, et anti-streptavidine conjugué au Texas Red pour visualiser l'ARN ; anti- γ H2AX et IgG anti-souris conjugué à Alexa 488 pour visualiser la/les zone(s) γ H2AX positive(s) ; PERV-biotine et streptavidine conjuguée à Alexa fluor 594 pour visualiser l'ARN de PERV). Le protocole utilisé a été précédemment décrit en détail (92). 50 noyaux de spermatocytes ont été capturés au microscope à l'aide du logiciel Cytovision.

DNA-FISH

Après rinçage au PBS+Tween, déshydratation à l'éthanol et dénaturation dans une solution de formamide à 70%, les lames préalablement utilisées pour la RNA-FISH ont été hybridées successivement avec la sonde PERV-digoxigénine puis avec un anticorps anti-digoxigénine FITC. Après lavage au PBS+Tween, les lames ont été montées au Vectashield avec Dapi et les 50 noyaux précédemment analysés en RNA-FISH ont été relocalisés et la fluorescence correspondant à la sonde PERV capturée et superposée aux images de RNA-FISH.

III. Résultats

1. Mise au point d'une méthode de préparation des tissus au tri cellulaire

Malgré de nombreuses tentatives d'adaptation de protocoles de tri de spermatocytes à partir de tissu testiculaire sur modèle murin (89)(90) nous ne sommes pas parvenus à obtenir une suspension cellulaire qualitativement et quantitativement satisfaisante pour permettre la réalisation d'un tri des spermatocytes et spermatogonies par FACS à partir des biopsies testiculaires dont nous disposons. La cryoconservation des biopsies dans l'azote liquide à -80°C est probablement à l'origine d'une lyse cellulaire importante entraînant la coagulation quasi-systématique de la suspension cellulaire obtenue, malgré l'utilisation d'enzymes telles que la DNase et la collagénase IV, de filtres et l'agitation permanente de la suspension cellulaire au cours de la préparation.

2. Etude d'expression par FISH de la région localisée autour du point de cassure du chromosome 14 de l'animal t(1 ;14)

L'analyse microscopique des spermatocytes en première division méiotique marqués par RNA- et DNA-FISH a montré comme attendu l'absence de signal Cot RNA (spécifique des régions répétées sur l'ensemble du génome, marqueur global de l'activité transcriptionnelle) et donc d'activité transcriptionnelle dans les régions γ H2AX positives (régions soumises au phénomène de MSUC) dans 100% des 50 noyaux étudiés (figure 12). Par ailleurs dans 50% des cellules la région du point de cassure du chromosome 14 (étudiée par la sonde PERV) se situait partiellement (28%) ou totalement (22%) dans la zone γ H2AX positive, ce qui confirme l'hypothèse d'une localisation des régions

transloquées mal appariées au cours de la méiose dans la zone γ H2AX positive, ce qui traduit l'extension de la zone de MSUC au-delà des chromosomes sexuels.

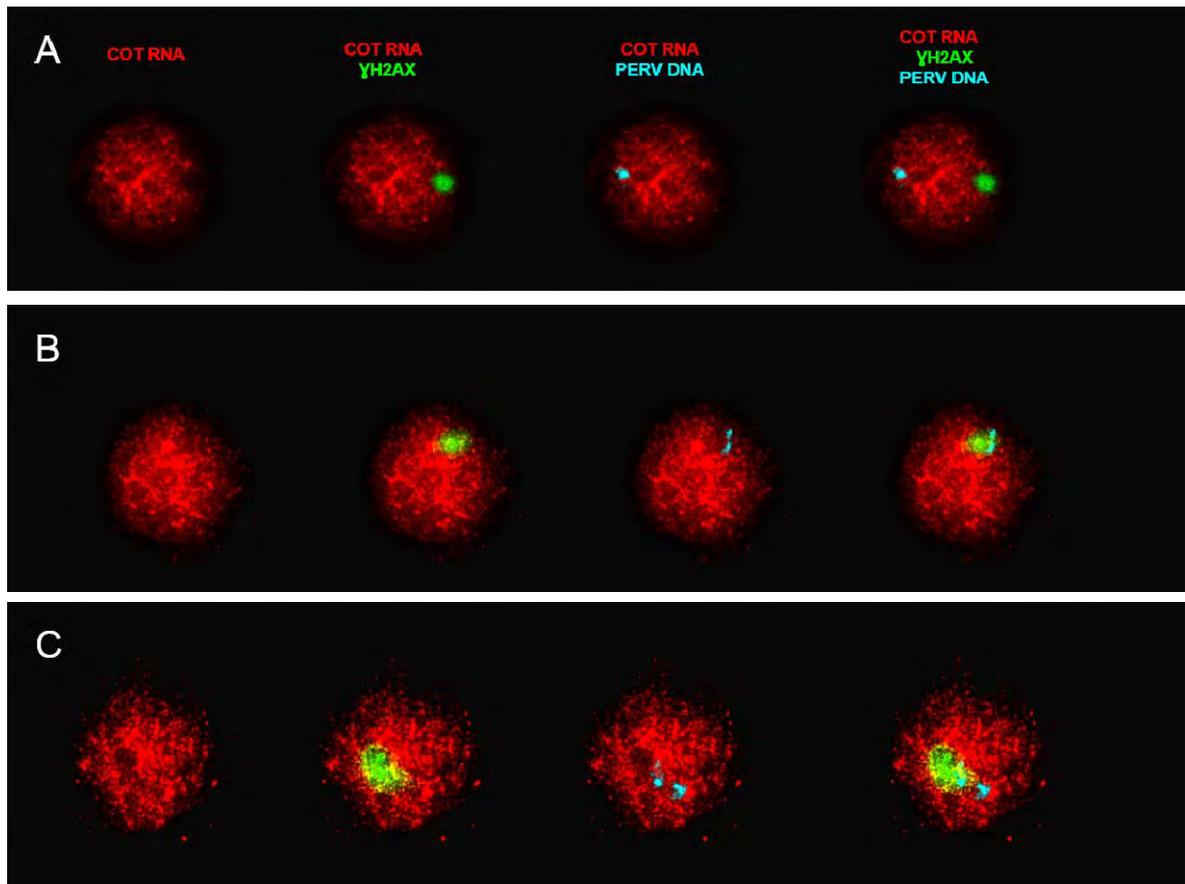


Figure 12: analyse du statut transcriptionnel des spermatocytes de l'animal t(1;14) par Cot-RNA FISH avec marquage de la région génomique du point de cassure du chromosome 14 par la sonde BAC PERV. Noyaux dans lesquels la sonde PERV est A- en dehors de B- complètement incluse C- partiellement incluse dans la zone d'inactivation transcriptionnelle γ H2AX positive.

Nous avons ensuite étudié la transcription de gènes situés dans la région du point de cassure du chromosome 14 en marquant l'ARN correspondant à la sonde *PERV* (sonde BAC péricentromérique du chromosome 14). Ce marquage RNA-FISH a été couplé à de la DNA-FISH pour *PERV* de manière à établir un lien de causalité entre la présence de *PERV* dans la région γ H2AX positive et la répression transcriptionnelle de *PERV* (figure 13). Sur 42 noyaux étudiés, 18 (42,9%) présentaient une colocalisation de l'ADN de *PERV* et de γ H2AX avec absence de signal ARN-*PERV* et 17 (40,5%) ne présentaient pas de colocalisation de l'ADN de *PERV* et de γ H2AX mais une colocalisation des signaux ADN et ARN de la sonde *PERV*. Ceci conforte l'hypothèse d'une inactivation transcriptionnelle des régions transloquées mal appariées au cours de la méiose due au phénomène de MSUC.

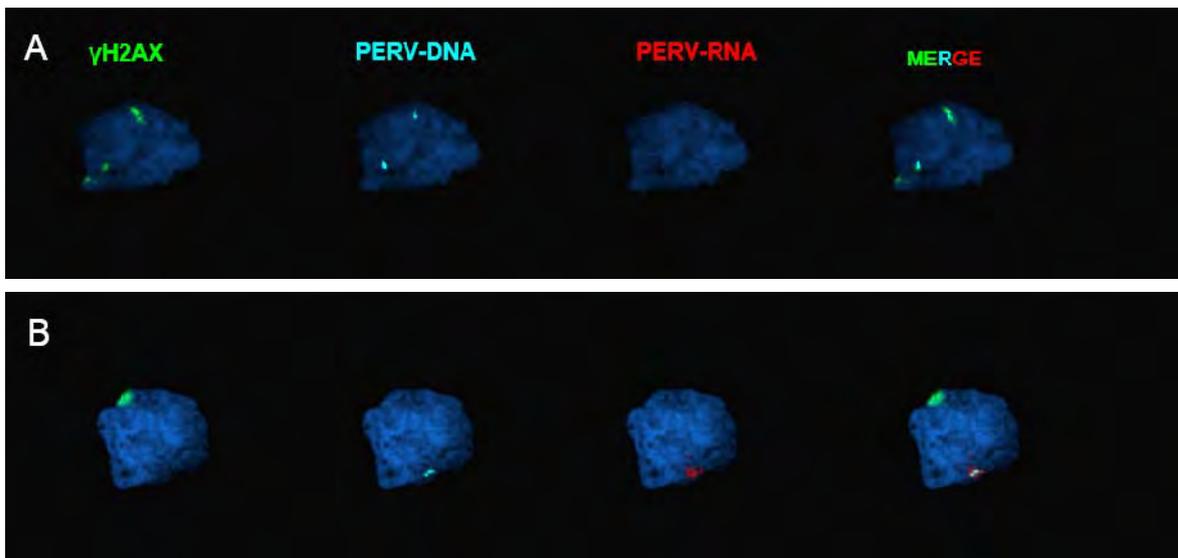


Figure 13: analyse par RNA- et DNA-FISH avec la sonde BAC *PERV* de la région du point de cassure du chromosome 14 des spermatocytes de l'animal t(1;14). **A-** ADN-*PERV* dans la zone γ H2AX positive et absence de signal ARN-*PERV* **B-** ADN-*PERV* en dehors de la zone γ H2AX positive et présence de signal ARN-*PERV* superposé au signal ADN-*PERV*.

Ces résultats nous ont amené à proposer l'hypothèse que les gènes situés à proximité des points de cassures de la translocation pourraient être transcriptionnellement inactifs et présenter des marques épigénétiques particulières. Ces deux aspects ont donc été étudiés plus en détail en analysant le méthylome spermatique issus de ces animaux ainsi que le profil d'expression à proximité des points de cassure.

3. Etude de la méthylation de l'ADN spermatique sur l'ensemble du génome

a. Analyses des données de MeDIP-seq et de RRBS

Les données de MeDIP-seq ont été analysées à la recherche de DMR entre 3 animaux contrôles fertiles et les 3 animaux infertiles porteurs du DMR sur *GNAS* (tableau 2). Nous avons ainsi identifié pour les animaux 2861, 1948 et 1746 respectivement 260, 1023 et 175 DMR correspondant à des gains de méthylation et seulement 5, 2 et 5 DMR correspondant à des pertes de méthylation. La totalité des DMR identifiés représente 414929 pb soit 0,013% de la totalité du génome, ce qui corrobore les analyses faites précédemment au laboratoire et chez l'Homme montrant l'absence d'altération du niveau global de méthylation de l'ADN chez les individus infertiles (84)(93)(94). Par ailleurs, 1% des DMR correspondent à des CNV (Copy Number Variants ou variants du nombre de copies) identifiés par CGH-array chez les animaux étudiés mais aucun n'est commun aux 3 animaux, ce qui conforte l'hypothèse que les DMR communs entre ces animaux ne correspondent pas à des polymorphismes du nombre de copies des régions concernées. Parmi l'ensemble des DMR mis en évidence grâce à l'analyse des données de MeDIP-seq par MEDIPS, seuls 38 étaient communs aux 3 animaux du groupe DMR *GNAS*. Par ailleurs l'analyse a retrouvé le DMR préalablement mis en évidence sur le locus *GNAS*, ce qui nous a permis de valider à la fois notre approche expérimentale et notre méthode d'analyse. A partir des données de MeDIP-seq, nous avons ensuite sélectionné pour leur localisation au niveau de gènes ou de prédictions de gènes 10 DMR communs aux 3 animaux du groupe DMR *GNAS* sur les 38 existants (régions qui présentaient une différence de méthylation entre les 3 animaux du groupe DMR *GNAS* et les 3 contrôles fertiles) (annexe 1). L'ensemble de ces DMR correspondaient à un gain de méthylation chez les animaux du groupe DMR *GNAS*.

Ultérieurement, suite à l'obtention des données de RRBS, nous avons pu sélectionner 8 nouveaux DMR dont les niveaux de méthylation étaient significativement différents entre le groupe contrôle fertile et le groupe DMR *GNAS* par les deux approches haut débit (RRBS et MeDIP-seq) (tableau 3, annexe 2). Ces DMR sont situés dans des prédictions de gènes Genscan ou Ensembl. Cette analyse a mis en évidence une différence de méthylation entre les 2 groupes pour seulement 0,16% des séquences étudiées, mais elle a cependant confirmé les DMR localisés sur les loci *GNAS* et *ARPC1A* mis en évidence en

MeDIP-seq (annexe 6). Là encore, la confirmation du DMR du locus *GNAS* constitue un contrôle positif en faveur d'une bonne sensibilité des deux méthodes utilisées. Une analyse visuelle des résultats de RRBS à l'aide du logiciel IGV nous a également permis d'affiner la localisation des DMR identifiés en MeDIP-seq au niveau des gènes *EYS*, *ARPC1A* et *RUNX3*.

Animaux	Nombre de DMR	Taille cumulée des DMR (pb)	% génome	DMR gain (taille en pb)	DMR perte (taille en pb)	DMR dans CNV (% CNV/DMR totaux)
2861	265	75935	0.002	260 (73740)	5 (2195)	11 (4.15)
1948 t(1 ;14)	1025	291075	0.01	1023 (290277)	2 (798)	6 (0.58)
1746 t(13 ;17)	180	47919	0.001	175 (46225)	5 (1694)	1 (0.55)
2861+1948	107	45793	0.001	107	0	0
2861+1746	58	18042	0.0006	58 (18042)	0	0
1948+1746	75	21025	0.0007	75 (21025)	0	0
2861+1948+1746	38	12662	0.0004	38 (12662)	0	0

Tableau 2 : DMR mis en évidence par MeDIP-seq chez les animaux du groupe DMR *GNAS* versus les 3 animaux du groupe contrôle fertile (755, 1662 et 5812).

Animaux	Nombre de DMR en gain couverts par le RRBS	Nombre de DMR en perte couverts par le RRBS	DMR validés (p<0.05)	DMR sélectionnés pour validation en pyroséquençage
1948 vs 1662	88	0	16	4
2861 vs 1662	30	0	14	4
1746 vs 1662	18	0	3	0
Total	136	0	33	8

Tableau 3 : DMR mis en évidence chez les animaux du groupe DMR *GNAS* versus l'animal contrôle 1662 après recouplement des données de MeDIP-seq par les données de RRBS.

Cependant parmi l'ensemble des DMR mis en évidence par ces deux techniques, aucun n'est localisé à proximité des points de cassures étudiés correspondant aux translocations réciproques portées par les animaux 1746 t(13 ;17) et 1948 t(1 ;14), respectivement au niveau des chromosomes 17, 1 et 14.

b. Validation des DMR par pyroséquençage

Nous sommes parvenus à dessiner des amorces de pyroséquençage efficaces pour 7 des 10 DMR sélectionnés en MeDIP-seq seul et 6 des 8 DMR retenus grâce à l'analyse supplémentaire des données de RRBS (tableau 4).

13 régions différentiellement méthylées ont donc été réanalysées par pyroséquençage. Le gain de méthylation chez les animaux du groupe DMR *GNAS* par rapport aux contrôles fertiles et infertiles a été confirmé pour 5 des 6 DMR mis en évidence en couplant les données de MeDIP-seq et de RRBS, et pour seulement 2 des 7 DMR vus sur les analyses de MeDIP-seq seul (figure 14). Les 6 DMR restants n'ont pas été validés par le pyroséquençage (figure 15). La distribution étendue des valeurs de taux de méthylation pour certain loci testés induit une interprétation plus facile des résultats sous forme de moyenne de méthylation pour chaque groupe étudié (figures 14 et 15).

Analyses	DMR confirmés	DMR non-confirmés	Echec pyroséquençage	Total
MeDIP-seq seul	1.1289, ARPC1A (2)	4.2890, 12.1217, USP2, 4.3130, SMOC2 (5)	GRAMD1B, FARP1, X.2031(3)	10
MeDIP-seq + RRBS	11.190, 4.2009, 13.3692, XYLT1, 7.1079 (5)	7.1361 (1)	HOXC4, CHRNE (2)	8
Total	7	6	5	18

Tableau 4 : DMR (désignés par le gène correspondant) validés par pyroséquençage chez les animaux du groupe DMR *GNAS* versus les 4 animaux du groupe contrôle fertile et les 5 animaux du groupe contrôle infertile.

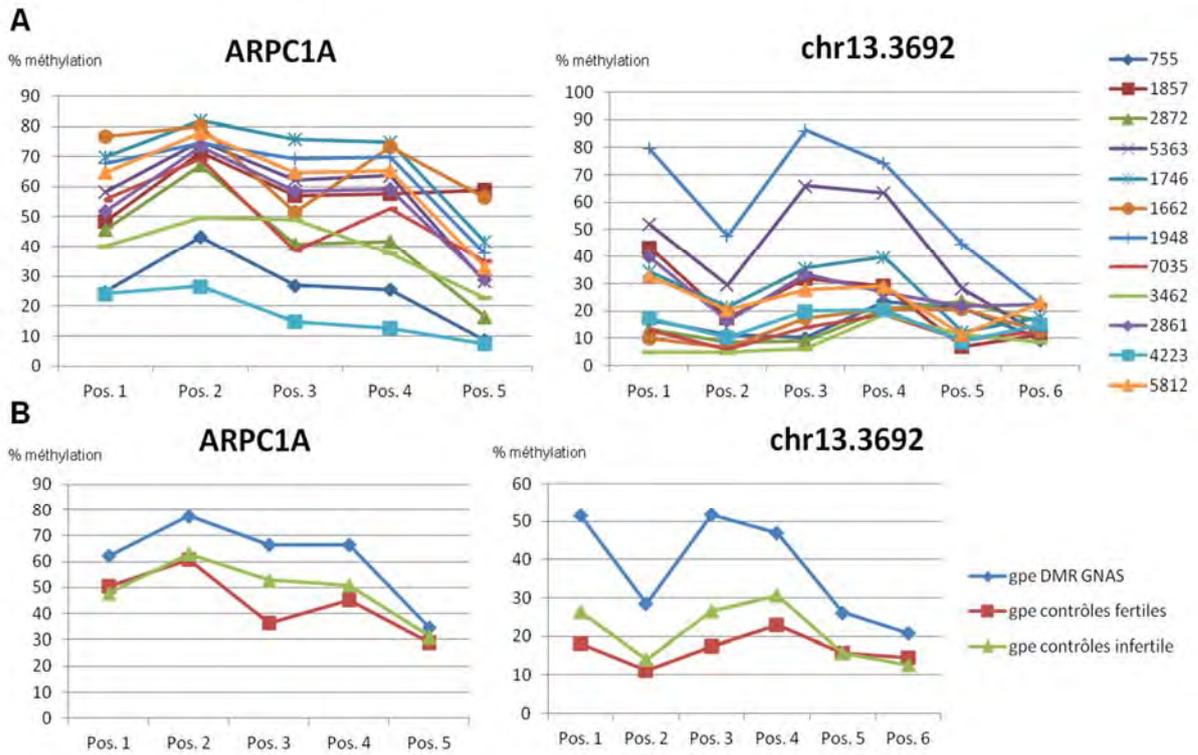


Figure 14: profils de méthylation de 2 DMR confirmés par pyroséquençage. Niveau de méthylation pour chaque position CpG A- pour chaque individu B- exprimé en moyenne pour chacun des 3 groupes étudiés.

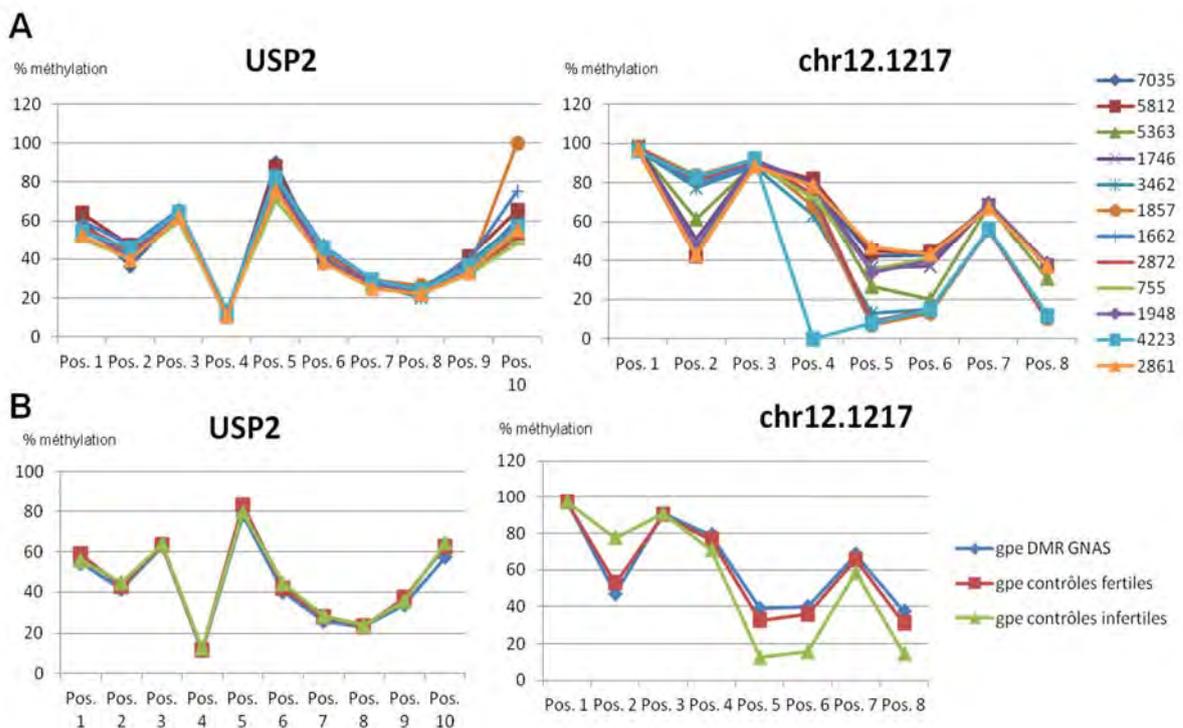


Figure 15: profils de méthylation de 2 DMR non-confirmés par pyroséquençage. Niveau de méthylation pour chaque position CpG A- pour chaque individu B- exprimé en moyenne pour chacun des 3 groupes étudiés.

4. Etude transcriptionnelle par PCR quantitative à partir d'ARN testiculaires

a. Gènes situés sur ou à proximité des DMR

Nous avons étudié l'activité transcriptionnelle des gènes Ensembl localisés sur ou à proximité de 6 des 7 régions présentant des DMR en MeDIP-seq (annexe 1), et de 3 des 6 DMR supplémentaires mises en évidence en recoupant les résultats de MeDIP-seq et de RRBS (annexe 2). Nous n'avons pas étudié les gènes correspondant à des DMR dont nous n'avons pu tester la méthylation par pyroséquençage. Au total, 4 gènes sur les 9 étudiés étaient surexprimés chez les animaux du groupe DMR *GNAS* (1746, 1948) par rapport aux autres animaux (contrôles fertiles et/ou infertiles) (figure 16 et tableau 5). Cependant les niveaux de suractivation restent modérés (autour de 2).

Animaux concernés	Catégorie	Résultat vérifié par 2 nd dosage		Pas de différence	Pas de différence (résultat non-vérifié)	
		Différence significative				
		Gain	Perte			
1746, 1948, 2861	DMR MeDIP-seq	<i>SNX7, LMO4, CUEDC1</i>	-	-	<i>ENSSSCG00000023510, ARPC1A, SMOG2</i>	6
	DMR MeDIP-seq + RRBS	<i>LNX2</i>	-	-	<i>DYRK1A, XYLT1</i>	3
1948	Point de cassure chr. 1	<i>STOM, GGTA1, ENSSSCG00000022449</i>	<i>DAB2IP</i>	-	<i>RAB14</i>	5
	Point de cassure chr.14	-	<i>CDK20</i>	-	<i>SPIN1</i>	2
1746	Point de cassure chr. 17	<i>PTGIS</i>	<i>SLC9A8</i>	<i>B4GALT5, ENSSSCG00000027934</i>	<i>UBE2V1, CEBPB, TMEM189</i>	7
Total		9		4	10	23

Tableau 5 : Niveaux d'expression des gènes situés sur ou à proximités des DMR (animaux 1746, 2861 et 1746) ou au niveau des points de cassure. Les différences d'expression significatives correspondent à une p-valeur inférieure à 0.05 pour un test de Student réalisé entre les animaux contrôles et les animaux infertiles (correspondance entre DMR et gène analysé : cf annexes 1 et 2).

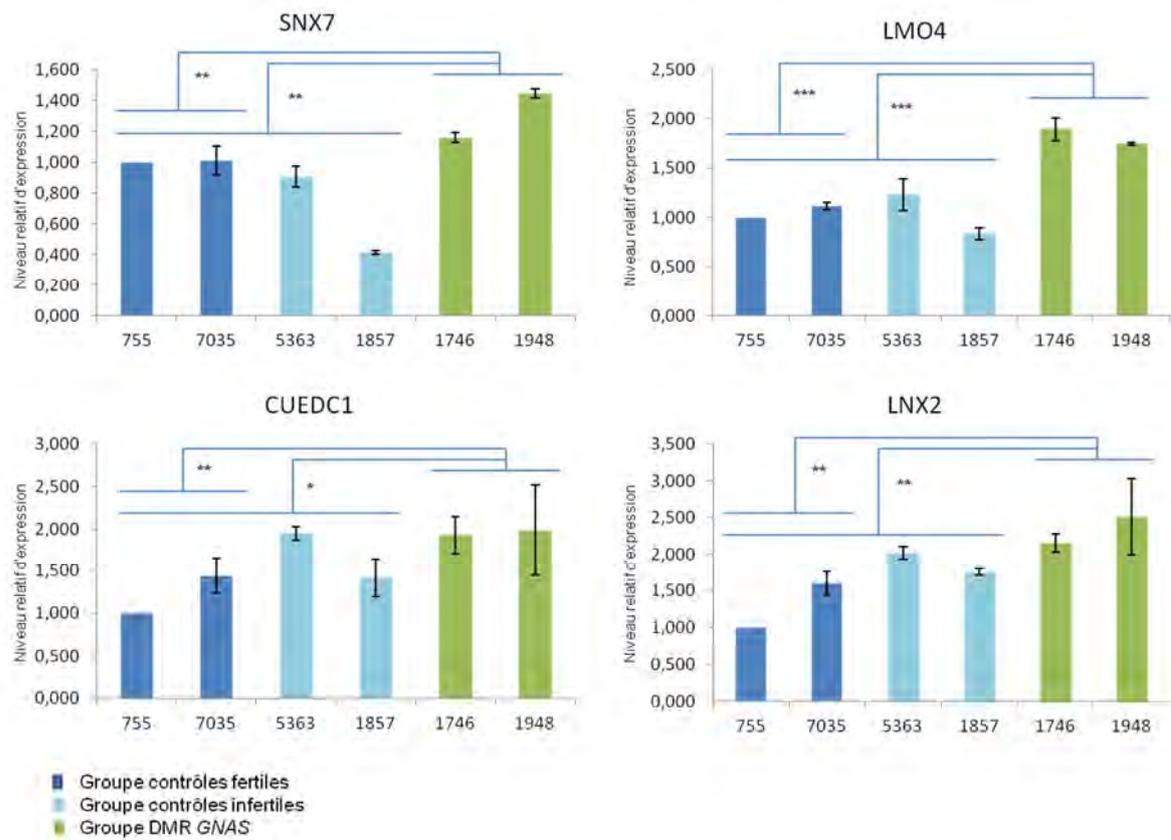


Figure 16: niveau d'expression des gènes situés sur ou à proximité des DMR et différentiellement exprimés chez les animaux 1746 et 1948. T-test $*0.05 < p < 0.01$, $**0.01 < p < 0.001$, $***p < 0.001$

b. Gènes à proximité des points de cassure des translocations chromosomiques

Nous avons étudié l'expression de 14 des 16 gènes Ensembl situés dans un intervalle d'1 Mb autour des points de cassure des translocations chromosomiques des animaux 1746 et 1948 (annexe 3).

Au total, nous avons observé une répression transcriptionnelle chez l'animal porteur de la translocation (animal 1948 pour la t(1 ;14) et 1746 pour la t(13 ;17)) par rapport à l'ensemble des autres animaux testés pour 3 gènes situés respectivement à proximité de chacun des 3 points de cassure chromosomiques étudiés (chromosomes 1 (*DAB2IP*), 14 (*CDK20*) et 17 (*SLC9A8*)), tandis que 3 et 1 gène(s) situé(s) respectivement autour des points de cassure des chromosomes 1 et 17 étai(en)t sur-exprimé(s) chez l'animal porteur de la translocation (figure 17 et tableau 5).

Certains DMR et gènes des points de cassure n'ont pas pu être testés car nous ne sommes pas parvenus à dessiner des couples d'amorces efficaces avant la rédaction de ce rapport.

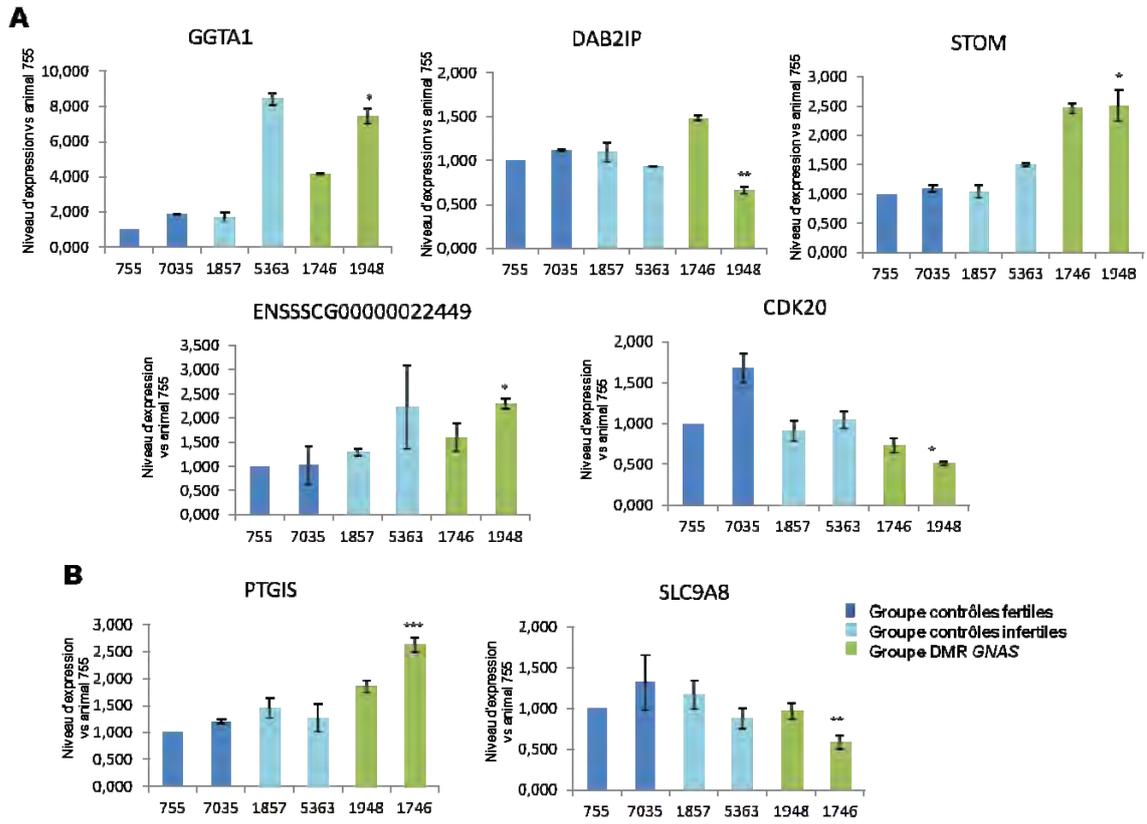


Figure 17: niveau d'expression des gènes situés au niveau des points de cassures des translocations et différentiellement exprimés chez l'animal porteur de la translocation par rapport à l'ensemble des autres animaux. A- t(1;14), animal 1948 et B- t(13;17), animal 1746 . T-test *0.05<p<0.01, **0.01<p<0.001, ***p<0.001

IV. Discussion

1. Validité de la stratégie expérimentale

L'intérêt de croiser les données de deux méthodes d'étude de la méthylation par séquençage haut débit réside dans les inconvénients intrinsèques de chacune des méthodes : en effet le MeDIP-seq présente une bonne couverture du génome mais une mauvaise spécificité car il fait ressortir de nombreux faux positifs qu'il est fastidieux de vérifier en pyroséquençage (5 faux positifs sur 10 DMR testés après sélection sur les données de MeDIP-seq seul). Le RRBS quant à lui présente une couverture du génome beaucoup plus faible, de l'ordre de 5%, mais couvre une grande partie de l'ensemble des CpG (3 millions de CpG couverts dans notre analyse sur 20 millions au total), il permet ainsi d'éliminer un certain nombre de faux positifs produits par le MeDIP-seq. Par ailleurs la validité de ces deux techniques est attestée par le fait que le DMR du locus *GNAS*, qui fait ici office de contrôle positif, est retrouvé pour chacune d'elles.

D'après les résultats de (84), nous nous attendions à un plus grand nombre de DMR entre les animaux étudiés et les contrôles, puisque l'étude de 38 loci par MeDIP-qPCR a mis en évidence dans leur étude un DMR au niveau du locus *GNAS* confirmé par pyroséquençage. Le MeDIP-seq de qualité moyenne pour l'animal 1746 explique en partie la perte d'information pour l'ensemble de l'analyse comparative, mais la raison majeure est probablement que peu de régions sont différentiellement méthylées dans l'ADN spermatique de ces animaux.

Nous n'avons pas développé de puce à ADN bien que celles-ci soient les approches génome-entier les plus fréquemment employées dans les études chez l'Homme (95) (96) car cet outil n'est pas disponible commercialement dans l'espèce porcine et présente des limites importantes en termes de couverture du génome et de résolution de l'analyse.

2. Méthylation de l'ADN spermatique et infertilité

Nos données confirment que le niveau global de méthylation de l'ADN dans les cellules spermatiques n'est pas altéré chez des porcs à qualité de semence dégradée (84), comme cela a été observé chez l'Homme (93)(94).

Notre étude à l'échelle du génome entier en combinant des analyses de données produites par MeDIP-seq et RRBS a permis d'identifier de nouveaux DMR chez 3 animaux

infertiles à qualité de semence dégradée porteurs d'un DMR au locus *GNAS* (84).

Cependant nous n'avons pu confirmer par pyroséquençage l'existence que de 2 des 10 DMR ressortis de l'analyse par MeDIP-seq seul. Plusieurs éléments peuvent expliquer ce résultat, et en particulier l'existence de fortes variations interindividuelles du niveau de méthylation de nombreux loci (figure 14). En effet nous avons utilisé comme contrôles 4 animaux fertiles et 5 animaux infertiles supplémentaires pour le pyroséquençage contre seulement 3 animaux contrôles fertiles pour le MeDIP-seq, aboutissant à la mise en évidence d'une distribution large des niveaux de méthylation pour chaque CpG pour la majorité des loci testés, et non d'une altération de la méthylation spécifique aux animaux infertiles du groupe DMR *GNAS*. Ceci représente une différence importante avec les résultats obtenus par Congras et al. (84), mais elle est possiblement expliquée par le fait que nous n'avons pas étudié spécifiquement des régions connues comme régulatrices de l'empreinte parentale, dont la méthylation est étroitement contrôlée car elle a un rôle clé dans l'expression du ou des gènes qu'elles régulent, impliquant de faibles variations interindividuelles du niveau de méthylation pour chaque CpG. Le faible nombre d'animaux étudiés a également réduit la puissance de l'étude et donc notre capacité à mettre en évidence des DMR d'intensité et de taille faibles. Par ailleurs un biais lié à l'impossibilité d'étudier spécifiquement la méthylation dans les cellules germinales « précoces » (spermatocytes en particulier) a été introduit, les spermatozoïdes arrivés à maturité étant probablement le plus souvent issus de cellules présentant à la base le moins d'anomalies de méthylation de l'ADN.

Il est intéressant de noter que les altérations de la méthylation observées étaient majoritairement dans le sens du gain de méthylation, et en particulier que les DMR communs aux différents animaux du groupe DMR *GNAS* étaient tous des gains. Nous n'avons pas d'explication à ce phénomène qui a déjà été observé dans une étude antérieure chez des souris soumises in utero à une malnutrition (97).

3. Phénotype spermatique des animaux porteurs de translocation réciproque équilibrée

Etonnamment, parmi les 4 animaux porteurs de translocation chromosomique réciproque équilibrée de notre étude (tableau 1), seul le 1948 avait un phénotype d'oligospermie (associé à une asthénospermie et une tératospermie), tandis que deux autres

avaient un spermogramme altéré sans oligospermie (le 2861 était asthénospermique et le 1746 asthénotératospermique) et que le 7035 avait un spermogramme normal. Ceci est en contradiction avec la théorie qui veut que l'apparition d'un asynapsis au cours de la méiose est presque toujours accompagné d'une perte de spermatocytes par apoptose et donc d'une oligospermie (65). Cependant l'appariement des chromosomes transloqués n'a été étudié que pour le 1948, montrant effectivement l'existence d'un asynapsis, et il est possible que le pourcentage de méiocytes présentant un asynapsis soit très faible voire nul pour les 3 autres animaux, expliquant l'absence d'anomalie de nombre de spermatozoïdes chez ces individus.

4. Translocations chromosomiques et méthylation de l'ADN dans les cellules germinales

Nous avons retrouvé comme attendu une colocalisation du segment transloqué du chromosome 14 avec la région γ H2AX positive, ainsi qu'une altération de la transcription de gènes localisés autour des points de cassure des chromosomes transloqués, en FISH comme en qPCR. Cependant nous n'avons pas mis en évidence d'altérations de la méthylation des gènes autour des points de cassure des translocations réciproques t(1;14) et t(13;17). Ceci va dans le sens de l'absence d'association entre le phénomène d'inactivation méiotique de la chromatine non-appariée (MSUC) et le processus épigénétique qu'est la méthylation de l'ADN, malgré le fait que leur survenue respective est plus fréquente au cours de la méiose de mâles ayant une spermatogenèse altérée.

5. Etude transcriptionnelle par PCR quantitative

L'existence d'une extension de la zone de MSUC aux régions chromosomiques transloquées fait prédire une répression transcriptionnelle des gènes entourant les points de cassure dans les cellules germinales des animaux concernés, or parmi les 7 gènes différentiellement exprimés chez les animaux transloqués, seuls 3 sont sous-exprimés tandis que 4 sont sur-exprimés. Par ailleurs la distance d'un gène au point de cassure semble avoir un impact sur son expression pour le chromosome 1 puisque *DAB2IP*, le seul gène significativement sous-exprimé chez l'animal t(1;14) est le plus proche du point de cassure. Pour le chromosome 14 là encore c'est le gène le plus proche du point de cassure, *CDK20*, qui est le seul sous-exprimé, mais il se situe à environ 2500 pb du point de cassure seulement, donc on peut supposer que des modifications de la séquence et de

l'environnement chromatinien à proximité du gène puissent être des facteurs de confusion dans l'interprétation de ce résultat. On ne retrouve pas ce lien pour le chromosome 17, puisque les deux gènes différentiellement exprimés, *PTGIS* et *SLC9A8*, sont parmi les plus éloignés du point de cassure dans la fenêtre d'1 Mb étudiée.

Nous avons également identifié quatre gènes différentiellement exprimés et associés à un DMR chez les animaux infertiles du groupe DMR *GNAS* par rapport aux contrôles. Ce nombre est relativement faible, reflétant le faible nombre de DMR associés à des gènes mais aussi le manque de temps qui nous a empêchés d'étudier tous les gènes candidats, en particulier pour les DMR confirmés par RRBS. Une analyse transcriptomique par puce d'expression Agilent 60K à partir d'ARN testiculaire a été initiée au laboratoire et permettra ultérieurement de répondre plus précisément à ces questions.

6. Fonction des gènes étudiés

Aucun des gènes étudiés dans notre travail n'est connu pour être impliqué dans la spermatogenèse. Il est donc difficile d'invoquer une causalité des anomalies de méthylation dans les altérations du spermogramme présentées par les porcs du groupe DMR *GNAS*. Cependant ces observations pourraient mettre en évidence de nouvelles fonctions associées à la spermatogénèse pour ces gènes différentiellement exprimés chez ces animaux infertiles. Par ailleurs les conséquences somatiques éventuelles de la transmission de ces anomalies à la descendance ne sont pas connues puisque ces animaux sont infertiles.

7. Perspectives

Ce travail pourrait être poursuivi par l'étude des anomalies de méthylation de l'ADN spermatique sur un plus grand nombre d'individus précisément phénotypés afin d'obtenir une puissance statistique suffisante pour mettre en évidence des anomalies communes associées à un phénotype précis.

Par ailleurs la mise au point d'une technique efficace de préparation cellulaire pour tri par FACS permettrait d'analyser spécifiquement la méthylation et l'expression génique dans les méiocytes où l'on observe le processus de MSUC.

Ces découvertes pourraient également permettre de définir de nouveaux marqueurs épigénétiques pour expliquer des troubles de la fertilité, que ce soit dans un contexte

médical ou agronomique. La détection de ces anomalies dans le sang circulant serait un atout majeur pour utiliser ces marqueurs comme critères de sélection des verrats entrant en centre d'insémination artificielle.

Conclusion

Le domaine de l'épigénétique est un champ d'étude relativement récent et qui se développe parallèlement aux innovations technologiques dans le domaine de la biologie moléculaire. Dans le cadre de la recherche sur l'infertilité, de nombreux travaux ont déjà permis d'entrevoir le rôle important des mécanismes épigénétiques dans la lignée germinale, en particulier pour le bon déroulement de la spermatogenèse qui permet d'assurer la qualité du sperme. Des anomalies de méthylation de nombreux loci génomiques dans les cellules spermatiques ont en particulier été associées aux différentes catégories d'anomalies du spermogramme chez l'Homme.

Notre étude, qui avait pour but d'étudier la méthylation de l'ADN chez des porcs aux qualités de semence dégradées et de faire le lien entre les anomalies constatées et l'existence d'une translocation chromosomique réciproque, a permis de mettre en évidence une vingtaine de régions différentiellement méthylées (DMR) chez ces animaux par rapport à des porcs au spermogramme normal. Par ailleurs nous avons constaté une surexpression génique à proximité pour quatre DMR, permettant donc d'évoquer une conséquence directe de ces anomalies de méthylation sur la transcription génique à proximité. Cependant il n'a pas pu être établi de lien entre ces DMR et l'existence d'une translocation réciproque chez deux des porcs au spermogramme altéré, puisqu'aucun DMR mis en évidence n'est localisé à proximité des points de cassure des translocations. De fait, notre travail ne permet pas de mettre en évidence la participation de modifications de la méthylation de l'ADN parmi les mécanismes épigénétiques impliqués dans la répression transcriptionnelle de la chromatine non-appariée (MSUC) qui intervient au cours de la méiose chez les porteurs de translocation chromosomique et aboutit à l'apoptose d'une partie des méiocytes chez ces individus.

La poursuite de l'analyse au niveau moléculaire des effecteurs impliqués dans le MSUC permettra de connaître plus précisément ses étapes successives et les mécanismes mis en jeu.

Etude de la méthylation de l'ADN et de l'expression génique chez des porcs à qualité de semence dégradée porteurs d'une translocation chromosomique réciproque équilibrée

Résumé

L'infertilité est une préoccupation majeure en médecine humaine et en agronomie. Des analyses épigénétiques ont mis en évidence des anomalies de la méthylation de plusieurs gènes dans la lignée germinale d'individus infertiles, fournissant de nouvelles informations sur les causes génétiques d'infertilité. De plus, il a été récemment suggéré qu'un des mécanismes par lequel les translocations chromosomiques équilibrées affectent la fertilité est l'induction dans les cellules germinales de modifications épigénétiques au niveau de gènes critiques pour la méiose.

Mon équipe d'accueil a précédemment identifié une méthylation anormale sur un locus soumis à empreinte parentale chez trois porcs infertiles, dont deux porcs porteurs d'une translocation réciproque. Notre objectif était donc d'explorer l'impact des translocations chromosomiques sur la méthylation de l'ADN pendant la méiose mâle dans un contexte de spermatogenèse altérée. Nous avons comparé la méthylation de l'ADN localement autour des points de cassure des translocations et à l'échelle du génome entier dans la lignée germinale de ces trois porcs et de contrôles fertiles par séquençage haut-débit.

Nous avons identifié 18 régions différentiellement méthylées (DMR) dont 7 ont été confirmés par pyroséquençage, mais aucune à proximité des points de cassure des translocations. Nous avons ensuite quantifié l'activité transcriptionnelle et mis en évidence 7 gènes différentiellement exprimés autour des points de cassure et 4 gènes différentiellement exprimés en lien avec les DMR. Aucun de ces gènes n'a de fonction connue dans la spermatogenèse. Une étude sur un plus grand nombre d'individus et en concentrant les analyses sur les méiocytes permettrait de mieux comprendre comment des anomalies du profil de méthylation de l'ADN et des translocations chromosomiques affectent la spermatogenèse.

DNA methylation and gene expression study in boars with low semen quality carrying a balanced reciprocal chromosomal translocation

Abstract

Infertility is a concern for both human and livestock. Epigenetic analyses have highlighted abnormalities in the methylation of several genes in the germline of infertile subjects, providing new information on genetic causes of infertility. Furthermore, it has been recently hypothesized that one mechanism through which balanced chromosomal translocations affect fertility is the induction in germ cells of epigenetic modifications on genes critical for meiosis.

Our team previously found an abnormal methylation in an imprinted locus in three infertile boars, including two boars carrying a reciprocal translocation. We thus aim to explore the impact of chromosomal translocations on DNA methylation during male meiosis, in a context of altered spermatogenesis. We analyzed genome-wide DNA methylation and local methylation around the translocations breakpoints in the germline of these three boars compared to fertile controls by performing high-throughput sequencing of methylated sperm DNA.

We identified 18 differentially methylated regions (DMR), 7 of which were confirmed by pyrosequencing but none around chromosomal translocation breakpoints. We then quantified transcriptional activity and highlighted in the infertile pigs 7 differentially expressed genes surrounding chromosomal breakpoints and 4 differentially expressed genes related to DMRs. Future work on a larger scale and focusing on meiocytes should provide more insights on how abnormal methylation patterns and chromosomal translocations affect spermatogenesis.

Références bibliographiques

1. Trasler JM. Epigenetics in spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 10 juill 2009;306(1-2):33-6.
2. Carrell DT, Hammoud SS. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Mol Hum Reprod.* janv 2010;16(1):37-47.
3. Boissonnas CC, Jouannet P, Jammes H. Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertil Steril.* 1 mars 2013;99(3):624-31.
4. Piccolo FM, Fisher AG. Getting rid of DNA methylation. *Trends Cell Biol.* févr 2014;24(2):136-43.
5. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 15 mai 2011;25(10):1010-22.
6. Monk D. Germline-derived DNA methylation and early embryo epigenetic reprogramming: The selected survival of imprints. *Int J Biochem Cell Biol.* 9 mai 2015;
7. Saitou M, Kagiwada S, Kurimoto K. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Dev Camb Engl.* janv 2012;139(1):15-31.
8. Fulka H, Mrazek M, Tepla O, Fulka J. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reprod Camb Engl.* déc 2004;128(6):703-8.
9. Seisenberger S, Peat JR, Reik W. Conceptual links between DNA methylation reprogramming in the early embryo and primordial germ cells. *Curr Opin Cell Biol.* juin 2013;25(3):281-8.
10. Houshdaran S, Cortessis VK, Siegmund K, Yang A, Laird PW, Sokol RZ. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS One.* 2007;2(12):e1289.
11. Daxinger L, Whitelaw E. Transgenerational epigenetic inheritance: more questions than answers. *Genome Res.* déc 2010;20(12):1623-8.
12. Hyldig SMW, Croxall N, Contreras DA, Thomsen PD, Alberio R. Epigenetic reprogramming in the porcine germ line. *BMC Dev Biol.* 2011;11:11.
13. Petkov SG, Reh WA, Anderson GB. Methylation changes in porcine primordial germ cells. *Mol Reprod Dev.* janv 2009;76(1):22-30.
14. Gkoutela S, Zhang KX, Shafiq TA, Liao W-W, Hargan-Calvopiña J, Chen P-Y, et al. DNA Demethylation Dynamics in the Human Prenatal Germline. *Cell.* 4 juin 2015;161(6):1425-36.
15. Guo F, Yan L, Guo H, Li L, Hu B, Zhao Y, et al. The Transcriptome and DNA Methylome Landscapes of Human Primordial Germ Cells. *Cell.* 4 juin 2015;161(6):1437-52.
16. Kerjean A, Dupont JM, Vasseur C, Le Tessier D, Cuisset L, Pàldi A, et al. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum Mol Genet.* 1 sept 2000;9(14):2183-7.

17. Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T, Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod Oxf Engl*. janv 2007;22(1):26-35.
18. Buiting K, Gross S, Lich C, Gillessen-Kaesbach G, el-Maarri O, Horsthemke B. Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet*. mars 2003;72(3):571-7.
19. Radford EJ, Ferrón SR, Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting as an adaptative model of developmental plasticity. *FEBS Lett*. 7 juill 2011;585(13):2059-66.
20. Chess A. Random and non-random monoallelic expression. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. janv 2013;38(1):55-61.
21. Kaneda M. Genomic imprinting in mammals-epigenetic parental memories. *Differ Res Biol Divers*. sept 2011;82(2):51-6.
22. Filipponi D, Feil R. Perturbation of genomic imprinting in oligozoospermia. *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc*. janv 2009;4(1):27-30.
23. Griffin DK, Finch KA. The genetic and cytogenetic basis of male infertility. *Hum Fertil Camb Engl*. mars 2005;8(1):19-26.
24. Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. *Reprod Camb Engl*. juill 2003;126(1):13-25.
25. Cox GF, Bürger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu B-L, et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet*. juill 2002;71(1):162-4.
26. Manning M, Lissens W, Liebaers I, Van Steirteghem A, Weidner W. Imprinting analysis in spermatozoa prepared for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Int J Androl*. avr 2001;24(2):87-94.
27. Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet Lond Engl*. 22 mai 2004;363(9422):1700-2.
28. Benchaib M, Braun V, Ressnikof D, Lornage J, Durand P, Niveleau A, et al. Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum Reprod Oxf Engl*. mars 2005;20(3):768-73.
29. Kelly TLJ, Li E, Trasler JM. 5-aza-2'-deoxycytidine induces alterations in murine spermatogenesis and pregnancy outcome. *J Androl*. déc 2003;24(6):822-30.
30. Hartmann S, Bergmann M, Bohle RM, Weidner W, Steger K. Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *Mol Hum Reprod*. juin 2006;12(6):407-11.
31. Marques CJ, Francisco T, Sousa S, Carvalho F, Barros A, Sousa M. Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa. *Fertil Steril*. juill 2010;94(2):585-94.
32. Song S, Ghosh J, Mainigi M, Turan N, Weinerman R, Truongcao M, et al. DNA methylation differences between in vitro- and in vivo-conceived children are associated with ART procedures rather than infertility. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):41.

33. Lazaraviciute G, Kauser M, Bhattacharya S, Haggarty P, Bhattacharya S. A systematic review and meta-analysis of DNA methylation levels and imprinting disorders in children conceived by IVF/ICSI compared with children conceived spontaneously. *Hum Reprod Update*. déc 2014;20(6):840-52.
34. Pacheco SE, Houseman EA, Christensen BC, Marsit CJ, Kelsey KT, Sigman M, et al. Integrative DNA methylation and gene expression analyses identify DNA packaging and epigenetic regulatory genes associated with low motility sperm. *PLoS One*. 2011;6(6):e20280.
35. Marques CJ, Costa P, Vaz B, Carvalho F, Fernandes S, Barros A, et al. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod*. févr 2008;14(2):67-74.
36. Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet*. 1 nov 2007;16(21):2542-51.
37. Montjean D, Zini A, Ravel C, Belloc S, Dalleac A, Copin H, et al. Sperm global DNA methylation level: association with semen parameters and genome integrity. *Andrology*. mars 2015;3(2):235-40.
38. Hammoud SS, Purwar J, Pflueger C, Cairns BR, Carrell DT. Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertil Steril*. oct 2010;94(5):1728-33.
39. Li B, Li J, Xiao X, Ma Y, Wang J, Liang X, et al. Altered DNA methylation patterns of the H19 differentially methylated region and the DAZL gene promoter are associated with defective human sperm. *PLoS One*. 2013;8(8):e71215.
40. Navarro-Costa P, Nogueira P, Carvalho M, Leal F, Cordeiro I, Calhaz-Jorge C, et al. Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm. *Hum Reprod Oxf Engl*. oct 2010;25(10):2647-54.
41. Sugimoto K, Koh E, Sin H-S, Maeda Y, Narimoto K, Izumi K, et al. Tissue-specific differentially methylated regions of the human VASA gene are potentially associated with maturation arrest phenotype in the testis. *J Hum Genet*. août 2009;54(8):450-6.
42. Nanassy L, Carrell DT. Abnormal methylation of the promoter of CREM is broadly associated with male factor infertility and poor sperm quality but is improved in sperm selected by density gradient centrifugation. *Fertil Steril*. juin 2011;95(7):2310-4.
43. Wu W, Shen O, Qin Y, Niu X, Lu C, Xia Y, et al. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant promoter methylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *PLoS One*. 2010;5(11):e13884.
44. Rotondo JC, Selvatici R, Di Domenico M, Marci R, Vesce F, Tognon M, et al. Methylation loss at H19 imprinted gene correlates with methylenetetrahydrofolate reductase gene promoter hypermethylation in semen samples from infertile males. *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc*. sept 2013;8(9):990-7.

45. Wu W, Lu C, Xia Y, Shen O, Ji G, Gu A, et al. Lack of association between DAZ gene methylation patterns and spermatogenic failure. *Clin Chem Lab Med CCLM FESCC*. mars 2010;48(3):355-60.
46. Minor A, Chow V, Ma S. Aberrant DNA methylation at imprinted genes in testicular sperm retrieved from men with obstructive azoospermia and undergoing vasectomy reversal. *Reprod Camb Engl*. juin 2011;141(6):749-57.
47. Ferfour F, Boitrelle F, Ghout I, Albert M, Molina Gomes D, Wainer R, et al. A genome-wide DNA methylation study in azoospermia. *Andrology*. nov 2013;1(6):815-21.
48. Boissonnas CC, Abdalaoui HE, Haelewyn V, Fauque P, Dupont JM, Gut I, et al. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet EJHG*. janv 2010;18(1):73-80.
49. Aston KI, Punj V, Liu L, Carrell DT. Genome-wide sperm deoxyribonucleic acid methylation is altered in some men with abnormal chromatin packaging or poor in vitro fertilization embryogenesis. *Fertil Steril*. févr 2012;97(2):285-92.
50. Schütte B, El Hajj N, Kuhtz J, Nanda I, Gromoll J, Hahn T, et al. Broad DNA methylation changes of spermatogenesis, inflammation and immune response-related genes in a subgroup of sperm samples for assisted reproduction. *Andrology*. nov 2013;1(6):822-9.
51. Poplinski A, Tüttelmann F, Kanber D, Horsthemke B, Gromoll J. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. *Int J Androl*. 1 août 2010;33(4):642-9.
52. Friemel C, Ammerpohl O, Gutwein J, Schmutzler AG, Caliebe A, Kautza M, et al. Array-based DNA methylation profiling in male infertility reveals allele-specific DNA methylation in PIWIL1 and PIWIL2. *Fertil Steril*. avr 2014;101(4):1097-103.e1.
53. Rybar R, Markova P, Veznik Z, Faldikova L, Kunetkova M, Zajicova A, et al. Sperm chromatin integrity in young men with no experiences of infertility and men from idiopathic infertility couples. *Andrologia*. juin 2009;41(3):141-9.
54. Laurentino S, Beygo J, Nordhoff V, Kliesch S, Wistuba J, Borgmann J, et al. Epigenetic germline mosaicism in infertile men. *Hum Mol Genet*. 1 mars 2015;24(5):1295-304.
55. Jenkins TG, Aston KI, Trost C, Farley J, Hotaling JM, Carrell DT. Intra-sample heterogeneity of sperm DNA methylation. *Mol Hum Reprod*. avr 2015;21(4):313-9.
56. Cheng P, Chen H, Zhang R-P, Liu S, Zhou-Cun A. Polymorphism in DNMT1 may modify the susceptibility to oligospermia. *Reprod Biomed Online*. mai 2014;28(5):644-9.
57. Bahreinian M, Tavalae M, Abbasi H, Kiani-Esfahani A, Shiravi AH, Nasr-Esfahani MH. DNA hypomethylation predisposes sperm to DNA damage in individuals with varicocele. *Syst Biol Reprod Med*. 6 mars 2015;1-8.
58. O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril*. janv 2010;93(1):1-12.

59. Olszewska M, Fraczek M, Huleyuk N, Czernikiewicz A, Wiland E, Boksa M, et al. Chromatin structure analysis of spermatozoa from reciprocal chromosome translocation (RCT) carriers with known meiotic segregation patterns. *Reprod Biol.* sept 2013;13(3):209-20.
60. Martin RH. Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update.* août 2008;14(4):379-90.
61. Braude P, Pickering S, Flinter F, Ogilvie CM. Preimplantation genetic diagnosis. *Nat Rev Genet.* déc 2002;3(12):941-53.
62. Kleinjan DJ, van Heyningen V. Position effect in human genetic disease. *Hum Mol Genet.* 1998;7(10):1611-8.
63. Ioannou D, Griffin DK. Male fertility, chromosome abnormalities, and nuclear organization. *Cytogenet Genome Res.* 2011;133(2-4):269-79.
64. Acloque H, Bonnet-Garnier A, Mompert F, Pinton A, Yerle-Bouissou M. Sperm nuclear architecture is locally modified in presence of a Robertsonian translocation t(13;17). *PLoS One.* 2013;8(10):e78005.
65. Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Turner JMA. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genet.* mars 2009;10(3):207-16.
66. Turner JMA, Aprelikova O, Xu X, Wang R, Kim S, Chandramouli GVR, et al. BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol.* 14 déc 2004;14(23):2135-42.
67. Baarends WM, Wassenaar E, van der Laan R, Hoogerbrugge J, Sleddens-Linkels E, Hoeijmakers JHJ, et al. Silencing of unpaired chromatin and histone H2A ubiquitination in mammalian meiosis. *Mol Cell Biol.* févr 2005;25(3):1041-53.
68. Turner JMA, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu X, Deng C-X, et al. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet.* janv 2005;37(1):41-7.
69. Oliver-Bonet M, Benet J, Sun F, Navarro J, Abad C, Liehr T, et al. Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Hum Reprod Oxf Engl.* mars 2005;20(3):683-8.
70. Ferguson KA, Chow V, Ma S. Silencing of unpaired meiotic chromosomes and altered recombination patterns in an azoospermic carrier of a t(8;13) reciprocal translocation. *Hum Reprod Oxf Engl.* avr 2008;23(4):988-95.
71. Homolka D, Ivanek R, Capkova J, Jansa P, Forejt J. Chromosomal rearrangement interferes with meiotic X chromosome inactivation. *Genome Res.* oct 2007;17(10):1431-7.
72. Turner JMA, Mahadevaiah SK, Ellis PJI, Mitchell MJ, Burgoyne PS. Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Dev Cell.* avr 2006;10(4):521-9.
73. Ducos A, Berland H-M, Bonnet N, Calgaro A, Billoux S, Mary N, et al. Chromosomal control of pig populations in France: 2002-2006 survey. *Genet Sel Evol GSE.* oct 2007;39(5):583-97.

74. Ducos A, Berland HM, Pinton A, Guillemot E, Seguela A, Blanc MF, et al. Nine new cases of reciprocal translocation in the domestic pig (*Sus scrofa domestica* L.). *J Hered. avr* 1998;89(2):136-42.
75. Popescu C, Boscher J, Le Henaff G, Jouet H. A new reciprocal translocation in a hypoprolific boar. *Génétique Sélection Évolution*. 1986;18(2):123-30.
76. Quach TA, Villagómez D a. F, Coppola G, Pinton A, Hart EJ, Reyes ER, et al. A cytogenetic study of breeding boars in Canada. *Cytogenet Genome Res*. 2009;126(3):271-80.
77. Tang WWC, Dietmann S, Irie N, Leitch HG, Floros VI, Bradshaw CR, et al. A Unique Gene Regulatory Network Resets the Human Germline Epigenome for Development. *Cell*. 4 juin 2015;161(6):1453-67.
78. Jena SC, Kumar S, Rajput S, Roy B, Verma A, Kumaresan A, et al. Differential methylation status of IGF2-H19 locus does not affect the fertility of crossbred bulls but some of the CTCF binding sites could be potentially important. *Mol Reprod Dev. avr* 2014;81(4):350-62.
79. Congras A, Yerle-Bouissou M, Pinton A, Vignoles F, Liaubet L, Ferchaud S, et al. Sperm DNA methylation analysis in swine reveals conserved and species-specific methylation patterns and highlights an altered methylation at the GNAS locus in infertile boars. *Biol Reprod. déc* 2014;91(6):137.
80. Peters J, Williamson CM. Control of imprinting at the Gnas cluster. *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc. déc* 2007;2(4):207-13.
81. Constância M, Kelsey G, Reik W. Resourceful imprinting. *Nature*. 4 nov 2004;432(7013):53-7.
82. Richard N, Molin A, Coudray N, Rault-Guillaume P, Jüppner H, Kottler M-L. Paternal GNAS mutations lead to severe intrauterine growth retardation (IUGR) and provide evidence for a role of XL α s in fetal development. *J Clin Endocrinol Metab. sept* 2013;98(9):E1549-56.
83. Bastepe M. The GNAS Locus: Quintessential Complex Gene Encoding G α 1, XL α s, and other Imprinted Transcripts. *Curr Genomics. sept* 2007;8(6):398-414.
84. Congras A, Yerle-Bouissou M, Pinton A, Vignoles F, Liaubet L, Ferchaud S, et al. Sperm DNA methylation analysis in swine reveals conserved and species-specific methylation patterns and highlights an altered methylation at the GNAS locus in infertile boars. *Biol Reprod. déc* 2014;91(6):137.
85. Down TA, Rakyant VK, Turner DJ, Flicek P, Li H, Kulesha E, et al. A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis. *Nat Biotechnol. juill* 2008;26(7):779-85.
86. Meissner A, Gnirke A, Bell GW, Ramsahoye B, Lander ES, Jaenisch R. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(18):5868-77.
87. Dupont J-M, Tost J, Jammes H, Gut IG. De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal Biochem*. 1 oct 2004;333(1):119-27.

88. Gribble SM, Ng BL, Prigmore E, Fitzgerald T, Carter NP. Array painting: a protocol for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. *Nat Protoc.* 2009;4(12):1722-36.
89. Homolka D, Ivanek R, Capkova J, Jansa P, Forejt J. Chromosomal rearrangement interferes with meiotic X chromosome inactivation. *Genome Res.* oct 2007;17(10):1431-7.
90. Gaysinskaya V, Soh IY, van der Heijden GW, Bortvin A. Optimized flow cytometry isolation of murine spermatocytes. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* juin 2014;85(6):556-65.
91. Lienhard M, Grimm C, Morkel M, Herwig R, Chavez L. MEDIPS: genome-wide differential coverage analysis of sequencing data derived from DNA enrichment experiments. *Bioinforma Oxf Engl.* 15 janv 2014;30(2):284-6.
92. Barasc H, Mary N, Letron R, Calgato A, Dubez AM, Bonnet N, et al. Y-autosome translocation interferes with meiotic sex inactivation and expression of autosomal genes: a case study in the pig. *Sex Dev Genet Mol Biol Evol Endocrinol Embryol Pathol Sex Determ Differ.* 2012;6(1-3):143-50.
93. Marques CJ, Costa P, Vaz B, Carvalho F, Fernandes S, Barros A, et al. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod.* févr 2008;14(2):67-74.
94. Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet.* 1 nov 2007;16(21):2542-51.
95. Pacheco SE, Houseman EA, Christensen BC, Marsit CJ, Kelsey KT, Sigman M, et al. Integrative DNA methylation and gene expression analyses identify DNA packaging and epigenetic regulatory genes associated with low motility sperm. *PLoS One.* 2011;6(6):e20280.
96. Urdinguio RG, Bayón GF, Dmitrijeva M, Toraño EG, Bravo C, Fraga MF, et al. Aberrant DNA methylation patterns of spermatozoa in men with unexplained infertility. *Hum Reprod Oxf Engl.* mai 2015;30(5):1014-28.
97. Radford EJ, Ito M, Shi H, Corish JA, Yamazawa K, Isganaitis E, et al. In utero effects. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. *Science.* 15 août 2014;345(6198):1255903.

Annexes

Identifiant gènes porcins	Homologue mammifère	Coordonnées (Sscrofa10.2)	MeDIP-seq	Gène Ensembl proche (qPCR)
chr1.1289	EYS humain	chr1:51162301-51162700	DMR gain 3 animaux étudiés vs contrôles	ENSSSCG00000023510
chr4.2890	RUNX3 murin	chr4:130742301-130742500		ENSSSCG00000006877 SNX7
chr4.3130	SLFN5 murin	chr4:141136101-141136500		ENSSSCG00000006928 LMO4
« USP2 »	USP2 murin	chr12:9812401-9812600		-
chr12.1217	VEZF1 humain	chr12:35163801-35164200		ENSSSCG00000017622 CUEDC1
chrX.2031	-	chrX:125332401-125332500		ENSSSCG00000012679 GPC4
ENSSSCG00000026863 FARP1	-	chr11:74574401-74574600	DMR gain pour 2861 et 1948	-
ENSSSCG00000007609 ARPC1A	-	chr3:6432877-6459632		-
ENSSSCG00000004013 SMOC2	-	chr1: 2230520-2365999	DMR gain pour 1746 et 1948	-
ENSSSCG00000015144 GRAMD1B	GRAMD1B humain	chr9: 55749696-55793772		-

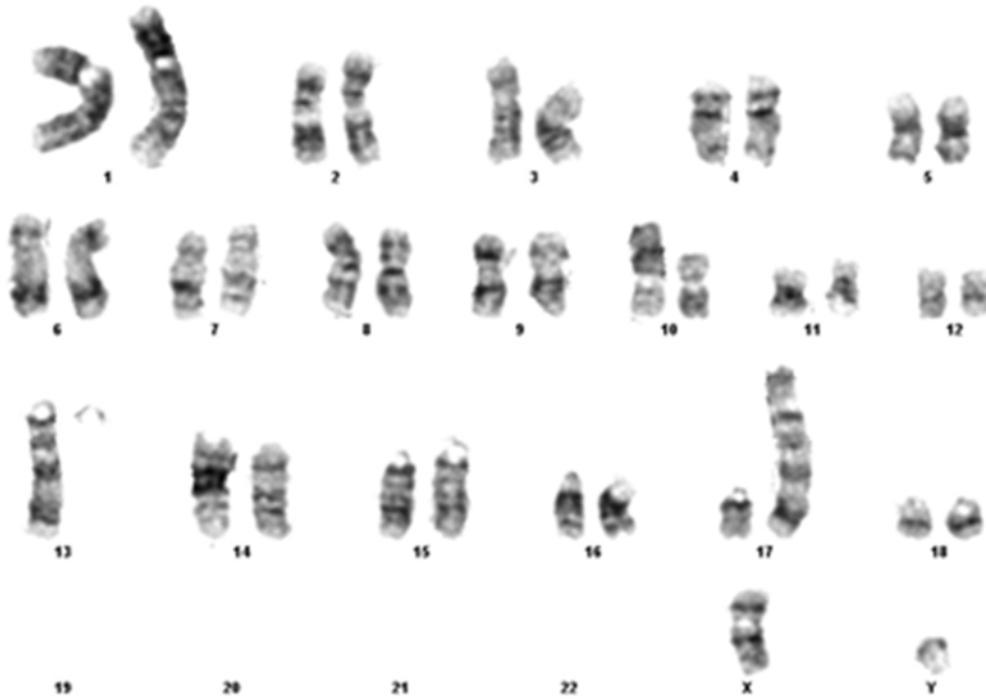
Annexe 1 : gènes présentant un DMR en MeDIP-seq chez les 3 animaux du groupe DMR *GNAS* versus 3 animaux contrôles (755, 1662 et 5812).

Identifiant gènes porcins	Homologue mammifère	Coordonnées (Sscrofa10.2)	Gène Ensembl proche (qPCR)
ENSSSCG00000007872 « XYLT1 »	XYLT1 humain et murin	chr3:27911401-27911700	-
chr4.2009	Sik1 murin, Khl31 murin	chr4:96939401-96939500	CD32
-	NFE2L1 humain	chr5 :20194701-20195000	ENSSSCG00000000285 HOXC4
chr7.1079	-	chr7:29026401-29026800	ENSSSCG000000020713 BTN2L
chr7.1361	KIF6 humain et murin	chr7:39948101-39948400	ENSSSCG000000001594 KIF6
chr11.190	-	chr11:4560201-4560400	ENSSSCG000000009308 LNX2
ENSSSCG00000017909 CHRNE	-	chr12:54081301-54081400	
chr13.3692	-	chr13:211254501-211254800	ENSSSCG000000030480 DYRK1A

Annexe 2 : DMR entre les animaux du groupe DMR *GNAS* et 2 animaux du groupe contrôle fertile (755 et 1662) sélectionnés par croisement des données de MeDIP-seq et de RRBS.

Chromosome et point de cassure	Nom	Identifiant	Coordonnées (Sscrofa10.2)
chr1:293925712 (1948)	DAB2IP	ENSSSCG000000005524	chr1: 294001795-294026582
	GGTA1	ENSSSCG000000005518	chr1: 293629345-293704926
	RAB14	ENSSSCG000000005514	chr1: 293477531-293504330
	STOM	ENSSSCG000000005516	chr1: 293510864-293528679
	-	ENSSSCG000000022449	chr1: 293612916-293613989
chr14:148080 (1948)	CDK20	ENSSSCG000000009578	chr14: 137245-145584
	SPIN1	ENSSSCG000000023190	chr14: 530200-534522
chr17:57858240 (1746)	UBE2V1	ENSSSCG000000030632	chr17: 57860294-57894555
	PTGIS	ENSSSCG000000007463	chr17: 57474335-57521756
	CEBPB	ENSSSCG000000024816	chr17: 57946112-57947682
	TMEM189	ENSSSCG000000027287	chr17: 57826767-57852468
	DRK1	ENSSSCG000000007462	chr17: 57361964-57464964
	B4GALT5	ENSSSCG000000007465	chr17: 57581157-57602483
	-	ENSSSCG000000007461	chr17: 57320300-57338520
	SLC9A8	ENSSSCG000000007466	chr17: 5765930-57684163
	-	ENSSSCG000000027934	chr17: 57758720-57767720

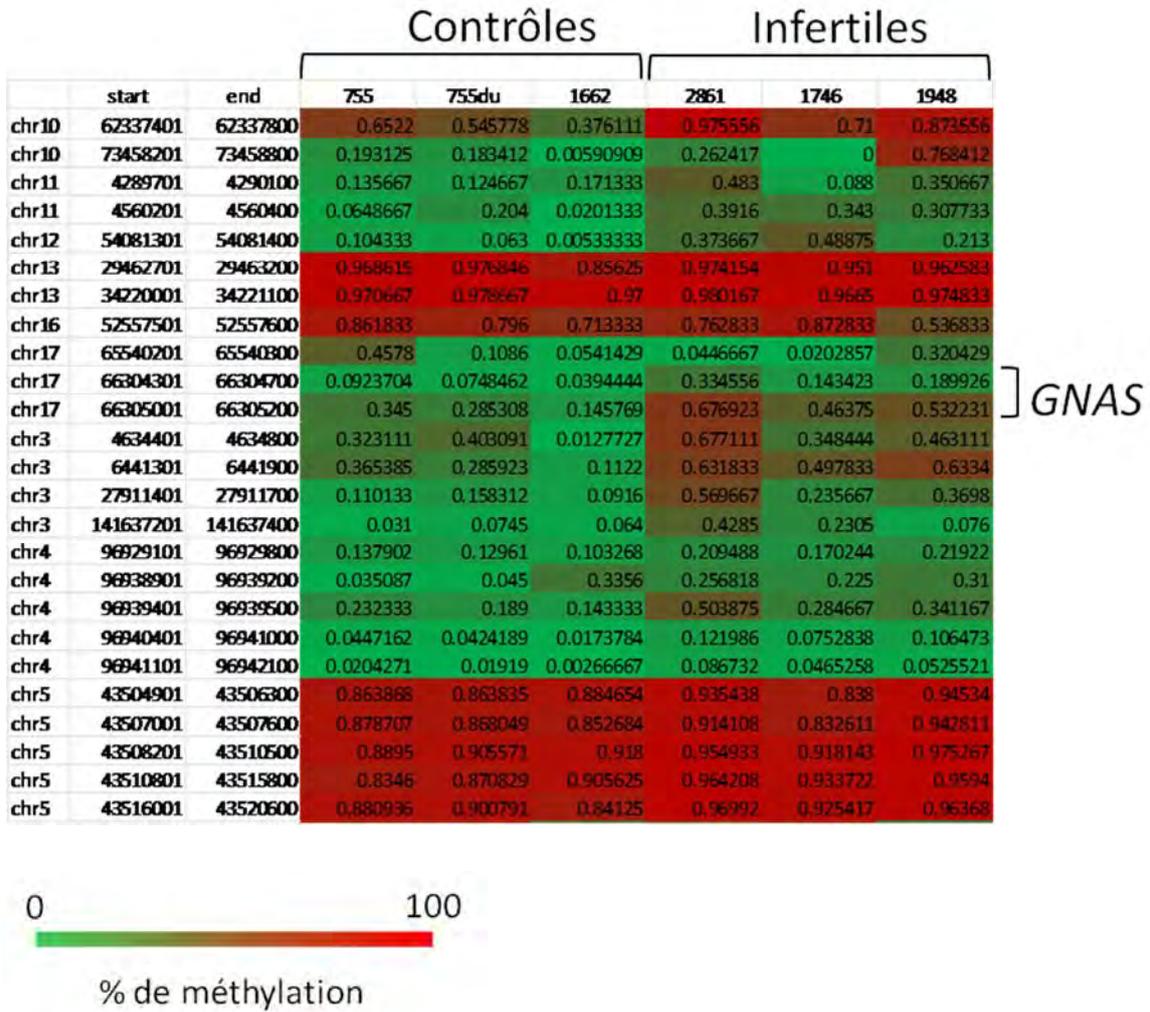
Annexe 3 : gènes Ensembl situés dans une fenêtre d'1 Mb autour des points de cassure chromosomiques des animaux 1746 (translocation 13-17) et 1948 (translocation 1-14).



Annexe 4 : caryotype en bandes G de l'animal 1746 porteur d'une translocation réciproque t(13;17).



Annexe 5 : caryotype en bandes G de l'animal 1948 porteur d'une translocation réciproque t(1;14).



Annexe 6 : exemple de résultats obtenus en RRBS. Données obtenues par RRBS en comparant les niveaux de méthylation des 3 infertiles du groupe DMR *GNAS* et ceux des 3 contrôles fertiles pour les DMR mis en évidence en MeDIP-seq entre les animaux 1662 (contrôle fertile) et 2861 (DMR *GNAS*)

Etude de la méthylation de l'ADN et de l'expression génique chez des porcs à qualité de semence dégradée porteurs d'une translocation chromosomique réciproque équilibrée

RESUME EN FRANÇAIS :

Il existe des anomalies de méthylation de l'ADN dans la lignée germinale d'hommes au spermogramme anormal. De plus les translocations chromosomiques réciproques (TR) affectent la spermatogenèse en induisant des modifications épigénétiques pendant la méiose. Nous avons comparé la méthylation de l'ADN et l'activité transcriptionnelle autour des points de cassure des TR et à l'échelle du génome entier chez des porcs contrôles et 3 porcs au spermogramme altéré présentant une anomalie de méthylation commune de l'ADN spermatique, dont 2 portent une TR. Ces derniers présentaient 18 régions différemment méthylées (DMR) dont 4 proches d'un gène différemment exprimé. Il n'y avait aucun DMR autour des points de cassure des TR mais 7 gènes différemment exprimés chez les porcs transloqués. Nous confirmons un lien entre anomalies de méthylation de l'ADN spermatique et anomalies du spermogramme mais n'avons pas constaté d'anomalies de méthylation de l'ADN induites par les translocations chromosomiques au cours de la méiose mâle.

TITRE EN ANGLAIS: DNA methylation and gene expression study on boars with low semen quality carrying a balanced reciprocal chromosomal translocation

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Biologie Médicale

MOTS-CLÉS : sperme, épigénétique, infertilité, méthylation de l'ADN, spermatogenèse, translocation chromosomique, translocation réciproque, porc, spermogramme anormal

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :
UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage GenPhySE
INRA, 24 chemin de Borde Rouge, 31326 Castanet-Tolosan
INPT-ENVT, 23 chemin des Capelles, 31300 Toulouse

Université Toulouse III-Paul Sabatier
Faculté de médecine Toulouse-Purpan,
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

Directeur de thèse : Dr Hervé ACLOQUE