



Etude des mécanismes de transmission de dérégulations épigénétiques : analyse de la transmission spermatique chez l'homme

Céline Bruno

► To cite this version:

Céline Bruno. Etude des mécanismes de transmission de dérégulations épigénétiques : analyse de la transmission spermatique chez l'homme. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCI002 . tel-02119364

HAL Id: tel-02119364

<https://theses.hal.science/tel-02119364>

Submitted on 3 May 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE
FRANCHE-COMTE
PREPAREE A l'unité INSERM 1231 - Equipe GAD**

Ecole doctorale n°554
« Environnements-Santé »

Doctorat de Sciences de la Vie et de la Santé

Par
Madame Céline BRUNO

**Etudes des mécanismes de transmission de dérégulations épigénétiques :
Analyse de la transmission spermatique chez l'homme**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le Jeudi 20 Décembre 2018

Composition du Jury :

Mr Patrick Callier
Mme Jeanne Perrin
Mme Julie Cocquet
Mme Hélène Jammes
Mme Oxana Blagoskonov
Mme Patricia Fauque

Professeur à l'Université Bourgogne-Franche-Comté
Professeur à l'Université Aix-Marseille
Directeur de recherche à l'Institut Cochin - Paris V
Directeur de recherche à l'INRA Jouy-en-josas
Maitre de Conférence à l'Université Bourgogne-Franche-Comté
Professeur à l'Université Bourgogne-Franche-Comté

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Directrice de thèse

J'adresse mes remerciements et j'exprime ma profonde reconnaissance à

Madame le Professeur Jeanne Perrin qui m'a fait l'honneur de juger ce travail et d'apporter son expertise dans le domaine de l'infertilité masculine.

Madame le Docteur Julie Cocquet qui m'a fait l'honneur de juger ce travail et d'apporter son expertise dans le domaine de la régulation épigénétique au cours de la spermatogenèse.

Monsieur le Professeur Patrick Callier qui suit ce travail depuis son commencement et qui, je l'espère, sera conquis par l'épigénétique !

Madame le Docteur Hélène Jammes qui a suivi de près l'évolution de ce travail. Merci encore pour ton expertise et tes encouragements tout au long de ces années.

Madame le Docteur Oxana Blagoskonov qui a accepté d'examiner ce travail. Merci pour cette très belle collaboration Cecossienne et à notre petit trafic de paillettes !

Ma directrice de thèse, Madame le Professeur Patricia Fauque, ce fut une réelle chance de pouvoir travailler ensemble sur ce sujet, je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée. Je tiens particulièrement à te remercier pour ta patience et ton soutien, ce fut en effet une aventure particulière où il a fallu aussi gérer les doutes, les propres exigences, ce qui n'a pas toujours été facile. J'espère toutefois avoir été à la hauteur de tes attentes. Et viva l'épigénétique !

Je tiens particulièrement à remercier Madame le Docteur Véronique Duranthon qui m'a initié à la recherche et au monde merveilleux du développement embryonnaire pré-implantatoire.

Ainsi que Monsieur le Professeur Pierre Jouannet qui m'a guidé vers la voie de la recherche scientifique et particulièrement celle de l'épigénétique.

Sans Vous rien n'aurait été possible !

A l'équipe GAD

Magali, merci pour ton efficacité, ce travail n'aurait pas été aussi abouti sans ton aide, et tout ça avec une constante bonne humeur. Merci ma belle !

Cécile, ça y est ! On est presque en haut de la montagne ☺ merci pour ton soutien et ta disponibilité dans mes moments de doute.

Julie, je te souhaite également une belle aventure, tous les ingrédients sont là et elle est déjà bien partie !

A tous les membres de l'équipe GAD, pour votre accueil et vos conseils malgré nos échanges trop peu fréquents, particulièrement à Laurence Faivre, Christel Thauvin, Virginie Carmignac et Laurence Jego.

Elodie, merci pour notre toute nouvelle collaboration notamment sur les dossiers du CECOS, je suis ravie d'échanger avec toi, merci pour ton aide et ton soutien ces derniers mois.

Un grand MERCI à l'ensemble de l'équipe du centre d'AMP du CHU de Dijon, merci à vous tous, pour tous les bons moments et pour cette petite vie de famille toujours un peu mouvementée ! Merci à vous les techs Bruno, Cindy, Clarisse, Déborah, Flavie, Nico, Raymond, pour votre jeunesse et votre vivacité (oui, toi aussi Bruno ;)), à vous mes secrétaires et infirmières préférées Bathilde, Corinne, Leïla, Sandrine, Véro, Nath et Claire, pour votre constante bonne humeur, à vous les gynécos, Mathilde C&K, Perrine, Isabelle et Mr Sagot pour notre douce collaboration, c'est tellement rare !! A vous Caroline, Marie-Laure et Steph pour nos échanges et votre soutien. Et à vous les sages-femmes : Aurélie, Céline, Isa, Flo et Laurence pour votre écoute, votre bienveillance, vous êtes au TOP !! Et à toi Nathalie, tu vas vraiment nous manquer !!

A ma famille, qui supporte depuis toutes ces années mon marathon des études ! Merci à vous pour votre soutien et votre amour !

A Marjo, merci ma copine d'être toujours là pour moi dans les bons et les mauvais moments... il y a des rencontres qui comptent.

A tous mes amis, Béma, Claire, Julie, Béné D&G, Sophie C&K, Solène, Cécile, Déborah, Pauline, Aïda, Cath, Axel, Delphine... j'ai quelques WE à rattraper !!

A mon amour, Fabien je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien, ta patience et pour ta compréhension. A toutes ces heures passées au téléphone et surtout à nos futurs tête à tête !!!

A tes amours d'enfants : Lélia et Mathis, merci pour votre force et de m'avoir accepté dans vos vies. Je vous dédie cette thèse pour vous dire combien il est important d'aller au bout de ses rêves !

TABLE des MATIERES

I Préambule	8
II Etat des connaissances	12
II.1. Epigénétique	14
II.1.A. Les principales marques épigénétiques.....	15
II.1.A.1 Les histones et leurs modifications post traductionnelles	15
II.1.A.1.a Acétylation des histones	17
II.1.A.1.b Méthylation des histones	17
II.1.A.2 Méthylation de l'ADN.....	19
II.1.A.3 Régulation épigénétique : rôle des petits et longs ARNs non codants.....	22
II.1.B Empreinte parentale – Gènes soumis à empreinte (GSE)	26
II.1.B.1 Organisation des gènes soumis à empreinte.....	27
II.1.B.2 Mécanisme de l'empreinte parentale	29
II.1.B.3 Rôle des gènes soumis à empreinte	32
II.1.B.4 Régulation de l'expression des GSE.....	33
II.1.B.5 Exemples de dérégulations des régions soumises à empreinte chez l'Homme.....	35
II.1.B.5.a Syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW)	36
II.1.B.5.b Syndrome de Silver-Russell (SRS).....	37
II.1.B.5.c Facteurs trans et cis impliqués dans le SBW et SRS.....	39
II.1.C Techniques d'analyse de la méthylation de l'ADN	40
II.1.C.1. Analyse de la méthylation de l'ADN sur des régions spécifiques	41
II.1.C.1.a Analyse par digestion enzymatique et Southern Blot.....	41
II.1.C.1.b MS-PCR: PCR méthylation spécifique.....	41
II.1.C.1.c Allèle Specific methylation real time quantitative- PCR :ASM RTQ-PCR	43
II.1.C.1.d Clonage-séquençage	44
II.1.C.1.e Pyroséquençage	44
II.1.C.2 Analyse globale de la méthylation de l'ADN	47
II.1.C.2.a Analyse de la méthylation sur puces	47
II.1.C.2.b Etude de la méthylation par séquençage à haut débit.....	49
II.1.C.2.c Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS)	50
II.2 Modifications épigénétiques au cours de la spermatogenèse.....	53
II.2.A Modifications de la chromatine durant la spermatogenèse.....	55
II.2.A.1 Modifications des histones.....	55
II.2.A.2 Transition histones-protamines	56
II.2.B Méthylation de l'ADN et spermatogenèse	59
II.2.B.1 La reprogrammation épigénétique gamétique	59
II.2.B.2 Etat de méthylation du spermatozoïde	62
II.2.C Petits ARN non codants et spermatogenèse	62
II.3 Modifications épigénétiques durant le développement pré-implantatoire	65
II.4 Dérégulations épigénétiques spermatiques chez l'homme	68
II.4.A Dérégulations épigénétiques et infertilité masculine.....	68
II.4.A.1 Défauts d'organisation chromatinienne et infertilité.....	68
II.4.A.2 Niveau de méthylation et paramètres spermatiques	69
II.4.A.3 Petits ARN non codants et infertilité	73
II.4.B Dérégulations épigénétiques spermatiques et facteurs environnementaux	74
II.5 Origines des dérégulations épigénétiques spermatiques	75
II.5.A Le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS).....	75
II.5.A.1 Epidémiologie et données cliniques du TDS	75
II.5.A.2 Origine fœtale du TDS	77
II.5.A.3 Tumeur germinale testiculaire.....	79
II.5.A.3.a Epidémiologie.....	79
II.5.A.3.b Histopathogénécité des tumeurs germinales testiculaires	80
II.5.A.3.c Etiologie des tumeurs testiculaires	81
II.5.B Les perturbateurs endocriniens.....	82
II.5.C Effets de la nutrition et du métabolisme.....	84
II.6 Conséquences des dérégulations épigénétiques spermatiques.....	86
II.6.A Conséquences à court terme : influence sur le développement embryonnaire	86
II.6.B Conséquences à long terme	89
II.7 Risque de transmission : le spermatozoïde vecteur d'un risque épigénétique ?	89

II.7.A. Définition : Transmission intergénérationnelle et transgénérationnelle	90
II.7.B Etude de la transmission épigénétique chez les mammifères	93
II.7.B.1 Transmission via la méthylation de l'ADN	93
II.7.B.2 Transmission via une dérégulation des histones et des nucléosomes	100
II.7.C. Transmission via une dérégulation de la méthylation de l'ADN chez l'homme.....	103
III Hypothèses et Objectifs du travail	104
IV Travaux personnels :	108
Analyse expérimentale du risque de transmission d'une épimutation chez l'homme	108
IV.A Evaluation du risque de transmission d'une épimutation liée à un défaut de méthylation chez l'homme.....	110
IV.A.1 Contexte scientifique et modèle expérimental	110
Article I.....	118
IV.B Analyse des profils de méthylation des spermatozoïdes de pères d'enfant atteint de syndromes liés à l'empreinte parentale	128
IV.B.1 Contexte scientifique et modèle expérimental.....	128
IV.B.2 Résultats.....	134
IV.B.2.a Caractéristiques de la population	134
IV.B.2.b Analyse de la méthylation de l'ADN spermatique	139
IV.B.3 Discussion.....	139
IV.C Intégrité épigénétique des spermatozoïdes chez des patients atteints de séminome : Evaluation des risques et conséquences potentielles pour la descendance	142
IV.C.1 Contexte scientifique et modèle expérimental.....	142
Article II	146
V Résultats et Discussion	158
VI Perspectives	164
Références Bibliographiques	168
ANNEXE	188

Liste des abréviations utilisées

AMP : Assistance Médicale à la Procréation
ASM RTQ-PCR : Allèle Specific methylation real time quantitative- PCR
C : Cytosine
CGP : Cellules germinales primordiales
CNV : Copies Number Variation
CpG : dinucléotide Cytosine-phosphophate-Guanine
DMR : Région Différentiellement Méthylée
DNMT: DNA MéthylTransférase
DOHaD :Developmental Origin Health and Desease
FIV : Fécondation *In Vitro*
GCNIS : Germ Cell Neoplasia In Situ
GSE : Gènes Soumis à Empreinte
HAT : Histones AcétylTransférase
HDAC : Histones DésACétylTransférase
HMT : Histones MéthylTransférases
ICSI : Intra-Cytoplasmic Sperm Injection
ICR : Imprinting Center Region
jpc: jours post-coïtum
miARN : micro ARN
OAT : Oligo-Asthéno-Tératozoospermie
PE : Perturbateur Endocrinien
piARN : Piwi-interacting ARN
POHaD : Paternal Origin and Health and Desease
RRBS : Reduced Representation Bisulfite Sequencing
SAM :S-Adénosyl-Méthionine
siARN: si ARN endogène
SBW : Syndrome de Beckwith-Wiedemann
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SRS : Syndrome de Silver-Russell
T : Thymine
TET : Ten-Eleven Translocation
TDS : Syndrome de Dysgénésie Testiculaire
TP : Protéine de Transition
U : Uracile
5meC : 5 methyl-Cytosine

I Préambule

Au prix de la modernité, l'Homme a en un siècle transformé son environnement comme jamais l'humanité ne l'avait fait jusqu'ici. Le XXIème siècle est marqué par la prise de conscience de l'influence de l'ère de l'industrialisation à outrance et de ses conséquences sur l'environnement. En effet, la communauté internationale scientifique ne cesse de rapporter des résultats d'études tout à fait alarmistes sur les effets des modifications environnementales induites par l'Homme : augmentation de la température et ses conséquences sur le climat et les éco-systèmes, dont la disparition déjà non négligeable de nombreuses espèces. Les dérégulations environnementales induites par l'Homme semblent évoluer de manière exponentielle, et rien ne semble arrêter ce phénomène, ni les scientifiques dont les cris d'alarme restent sans réaction encore moins les politiques.

Or c'est pourtant l'Homme lui-même qui, à bas bruit, mais peut-être de manière durable risque d'en payer les conséquences. En effet si les premiers signes d'une baisse de la fécondité dans les pays développés sont connus depuis plusieurs décennies, on rapporte depuis peu une augmentation de certains cancers et, fait marquant, chez des individus de plus en plus jeunes. L'impact de l'environnement est bien là, et l'Homme comme la nature évoluent en s'adaptant mais semble t-il bien moins vite que les connaissances scientifiques. En effet, les dérégulations épigénétiques sont fortement suspectées mais les mécanismes en cause sont loin d'être connus, tout comme les risques, pour l'Homme, et pour sa descendance. Les gamètes ne semblent pas épargnés par ce phénomène. Alors qu'allons-nous transmettre aux générations futures ?

II Etat des connaissances

II.1. Epigénétique

En 1942, Conrad H Waddington redéfinit le terme « épigénétique » au sens moderne comme la branche de la biologie étudiant les interactions entre les systèmes « gènes » et « environnement » donnant naissance au phénotype de l'individu (Holliday, 2006; Jammes et al., 2011). L'épigénétique correspond à un ensemble de processus moléculaires s'apposant sur le génome : les marques épigénétiques qui participe au contrôle et à l'orchestration de l'activité des gènes. En effet, chacune de nos cellules contient l'ensemble de notre patrimoine génétique : 46 chromosomes hérités de nos parents sur lesquels ont compte environ 25 000 gènes. Mais si toutes nos cellules contiennent la même séquence génétique, leur programmation et leur expression sont différentes. Les marques épigénétiques induisent des changements durables de l'expression des gènes sans altération de la séquence d'ADN (pas de mutation) et sont transmises au cours des divisions cellulaires (mitoses) permettant aux cellules de maintenir en mémoire leur identité cellulaire. Néanmoins sous l'effet de stimuli extérieurs ces marques épigénétiques peuvent être modifiées et se transmettre malgré la disparition du stimulus. Cette dynamique épigénétique, est très présente au cours du développement où les différenciations cellulaires, nécessaires à l'embryogenèse, s'accompagnent d'une succession finement orchestrée d'épigénomes cellulaires. Une fois ces cellules différenciées, leurs marques épigénétiques doivent se maintenir et se transmettre au cours des divisions cellulaires, permettant une transmission stable et héritable de l'identité cellulaire au cours des divisions cellulaires.

Ainsi, l'épigénétique correspond à **l'étude des changements dans l'activité des gènes**, n'impliquant **pas de modification de la séquence d'ADN** et pouvant être **transmis lors des divisions cellulaires**. Cependant, contrairement aux mutations qui affectent la séquence d'ADN, **les modifications épigénétiques sont quant à elles réversibles**.

Néanmoins un nombre croissant d'études rapporte l'implication de dérégulations épigénétiques dans la survenue de pathologies humaines tels que les cancers, les troubles du métabolisme (obésité, diabète, résistance à l'insuline), troubles du comportement, infertilité... (Jenkins et al., 2016a; Moore-Morris et al., 2018; Verma et al., 2014; Zeilinger et al., 2013). Et si ce constat est aujourd'hui indéniable, les mécanismes et l'origine de telles dérégulations restent quant à eux très peu connus. La relation étroite entre épigénétique et environnement, laisse cependant supposer que des modifications (ou dérégulations) épigénétiques pourraient apparaître de

manière adaptative en réponse à l'influence de l'environnement (Barker, 2007; Sinclair et al., 2007).

Afin d'appréhender les enjeux inhérents aux dérégulations épigénétiques, nous aborderons dans un premier temps les principaux mécanismes épigénétiques connus aujourd'hui pour intervenir dans le processus de la spermatogenèse, nous étudierons ensuite les principales dérégulations épigénétiques retrouvées au niveau des spermatozoïdes et nous nous interrogerons sur leurs origines et leurs conséquences potentielles à court et à long terme afin d'aborder la question du risque de transmission via le spermatozoïde chez l'Homme.

II.1.A. Les principales marques épigénétiques

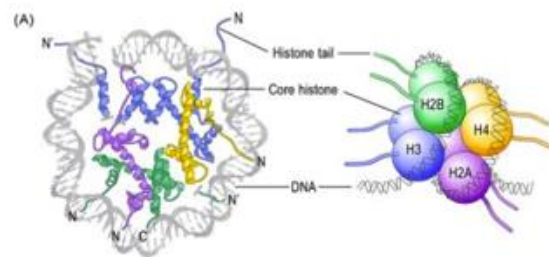
La chromatine est constituée d'un complexe ADN/protéines dont l'unité structurale est le nucléosome : la double hélice d'ADN (146pb) enroulée autour d'un octamère d'histones. Les nucléosomes jouent un rôle dans la compaction de l'ADN et influence ainsi l'activité transcriptionnelle des gènes. Deux états de la chromatine ont été observés : l'euchromatine, décondensée, qui contient aussi bien des gènes actifs qu'inactifs, et l'hétérochromatine, hautement condensée, qui reflète un état silencieux. La régulation de ces états peut se faire via le positionnement des nucléosomes, les différentes modifications post-traductionnelles des histones, l'incorporation de variants d'histones et le recrutement de protéines associées aux histones. Il semble évident que l'organisation et les modifications des protéines de la chromatine influencent les profils de méthylation de l'ADN, notamment par modulation de l'accessibilité des DNA méthyltransférases (DNMTs) à la molécule d'ADN.

II.1.A.1 Les histones et leurs modifications post traductionnelles

Les histones sont des protéines constituant le nucléosome, unité structurale de la chromatine permettant de compacter l'ADN. Le nucléosome est en effet constitué de deux tours de double hélice de l'ADN enroulés autour d'un octamère d'histones composés de deux copies de 4 histones H2A, H2B, H3 et H4. S'y ajoute l'histone H1 qui se lie à l'ADN internucléosomale dans les formes compactes de la chromatine (Kowalski and Pałyga, 2012). Les modifications biochimiques post traductionnelles sur les extrémités amino et carboxy-terminales des histones nucléosomales (ex : acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitinylation et SUMOylation), font

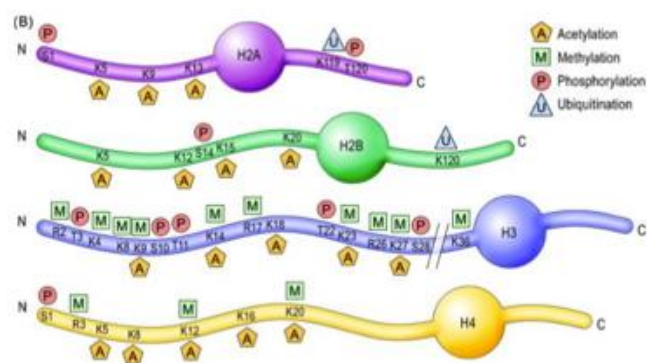
parties des modifications épigénétiques importantes associées à la chromatine. Ces différentes modifications post traductionnelles agissent pour certaines directement sur l'architecture de la chromatine, comme cela a été démontré dans le cadre de l'acétylation des histones, mais aussi dans le recrutement d'autres protéines de la chromatine qui pourront elles aussi moduler l'activité transcriptionnelle. Chaque combinaison va déterminer des domaines ouverts ou fermés à la transcription. A l'heure actuelle plus d'une centaine de modifications ont été répertoriées. Ainsi chaque combinaison de modifications définit une information spécifique modulant l'état de compaction de la chromatine et ainsi l'activation ou la répression des gènes. Afin d'illustrer ces différentes combinaisons nous présenterons ci-après brièvement les modifications des histones les plus décrites : l'acétylation et la méthylation (Gräff and Mansuy, 2008)(Figure 1).

Nucléosome:



Les principales modifications sont:

- a) **Acétylation (lysines)**
- b) **Méthylation (lysines/arginines)**
- c) **Phosphorylation (sérines)**
- d) **Ubiquitination (lysines)**



II.1.A.1.a Acétylation des histones

L'acétylation des résidus des régions N-terminales des histones, neutralise leurs charges positives et réduit ainsi leur affinité pour l'ADN, chargé négativement. La chromatine adopte une structure moins compacte et augmente ainsi l'accessibilité de l'ADN aux régulateurs transcriptionnels (Smith and Meissner, 2013; Woodcock, 2006). L'acétylation est effectuée par les Histones AcétylTransférases (HAT) et la désacétylation par les Histones DésAcétylTransférases (HDAC).

II.1.A.1.b Méthylation des histones

La méthylation des histones est plus complexe. En effet les lysines peuvent être mono-, di- ou tri-méthylées et les arginines peuvent être mono- ou di-méthylées. Les réponses à ces modifications seront fonction du résidu impliqué, de sa position sur la queue de l'histone mais aussi de sa position au sein du génome (Li et al., 2007). Cette diversité participe à la complexité du code des histones et à la diversité des réponses épigénétiques. Ainsi certaines modifications ont été retrouvées plus spécifiquement au niveau des régions euchromatiques comme l'histone 3 lysine 4 triméthylée (H3K4me3), l'histone 3 lysine 36 triméthylée, (H3K36me3) et l'histone 3 lysine 79 mono et/ou biméthylée (H3K79me1/2) participant à l'expression des gènes et d'autres au niveau des régions hétérochromatiques intervenant dans la répression des gènes, c'est le cas par exemple de l'histone 3 lysine 9 triméthylée (H3K9me3) et de l'histone 3 lysine 27 triméthylées (H3K27me3) (Du et al., 2015; Smith and Meissner, 2013).

La méthylation des histones peut ainsi être tantôt associée à la répression ou à l'activation des gènes. Par exemple la méthylation de la lysine 9 ou de la lysine 27 sur l'histone 3 (H3K9me ; H3K27me) entraîne le recrutement de protéines à chromobox (CBX) qui reconnaissent cette marque et s'y attachent (Romero et al., 2012). Un phénomène d'auto-recrutement va favoriser la compactation de la chromatine et entraîner la répression transcriptionnelle (Manzo et al., 2017) (Figure 2).

A l'inverse la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3, présente au niveau des promoteurs des gènes à îlots CpG, favorise quant à elle la transcription des gènes (Zhao and Garcia, 2015).

La méthylation des histones est réalisée par les Histones MéthylTransférases (HMT). Toutes ces modifications d'histones sont interconnectées et peuvent agir en cis (sur une même histone) ou en trans (entre différentes histones au sein d'un même

nucléosome ou sur des nucléosomes différents) (Santos-Rosa and Caldas, 2005). Ceci confère un niveau supplémentaire dans le déchiffrement du code des histones. De plus il existe également un lien entre modifications des histones et méthylation de l'ADN, par exemple des protéines présentant un domaine de liaison à l'ADN méthylé (methyl CpG binding Protein ou MBD) qui peuvent recruter des complexes co-répresseurs contenant des enzymes HDAC et entraîner ainsi une désacétylation des histones (Bird, 2002).

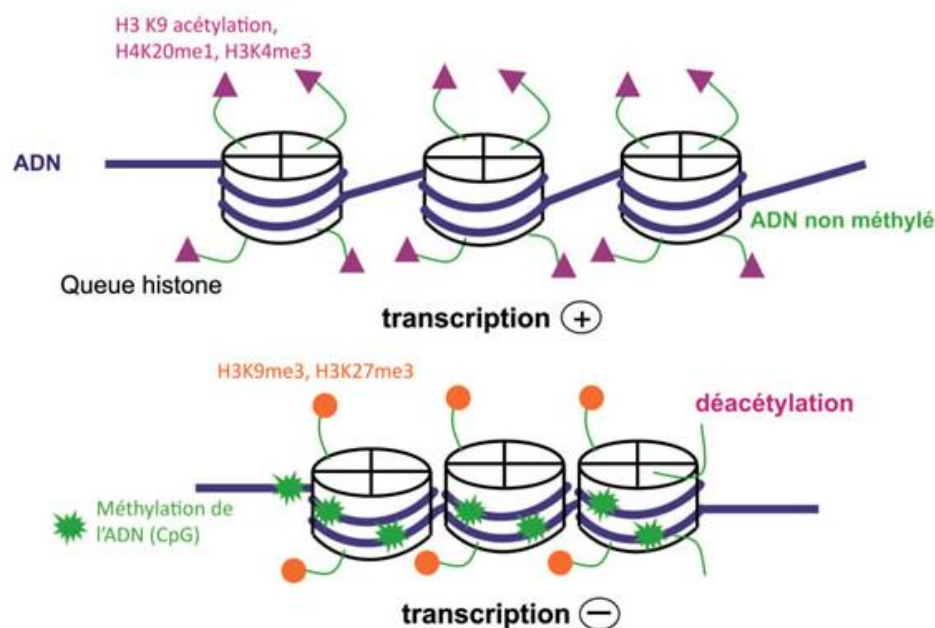


Figure 2 : Combinaison des marques épigénétique et état transcriptionnel

De manière générale, l'association acétylation des histones et ADN non méthylé au niveau des îlots CpG rend la chromatine non compacte et la transcription possible. Au contraire, la méthylation de l'ADN associée à une acétylation des histones (et certaines de leurs méthylations sont associés à la compaction de la chromatine et à une répression de l'expression des gènes.

H3 : histone H3 ; H4 : Histone H4 ; K9 et K27 lysines 9 et 27 ; H4K20me1 : histone 4 lysine 20 monométhylée ; H3K4me3 : histone 3 lysine 4 triméthylée. Extrait de Perino et al, 2016

II.1.A.2 Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est une des marques épigénétiques la plus analysée. Chez les vertébrés, la méthylation de l'ADN est un processus de régulation épigénétique qui consiste en l'apposition d'un groupement méthyl sur le cinquième carbone d'une cytosine (5meC) situé sur un dinucléotide cytosine-phosphosphate-guanine (CpG) (Figure 3). Cette réaction est catalysée par une famille d'enzymes appelées les DNA méthyltransférases (DNMTs) à partir du substrat S-adénosyl-méthionine (SAM) qui agit comme donneur de groupement méthyl. Il existe deux catégories de DNMTs, celles impliquées dans la méthylation de maintenance DNMT1/DNMT1o et celles permettant la méthylation de l'ADN *de novo* DNMT3a/DNMT3b/DNMT3l. Cette dernière intervient plus spécifiquement comme cofacteur durant la gamétogenèse (Bourc'his et al., 2001). Récemment DNMT3c a été identifiée comme un médiateur dans la méthylation des transposons dans les cellules germinales (Barau et al., 2016).

DNMT1 intervient quant à elle lors de la mitose, reconnaît spécifiquement les dinucléotides hémiméthylés au cours de la phase S du cycle cellulaire et permet la maintenance et une propagation stable du profil global de 5meC aux cellules filles (Sharif et al., 2007). Ce mécanisme illustre l'importance des marques épigénétiques dans l'hérédité de l'identité cellulaire et la sauvegarde de la mémoire transcriptionnelle (Bird, 2002).

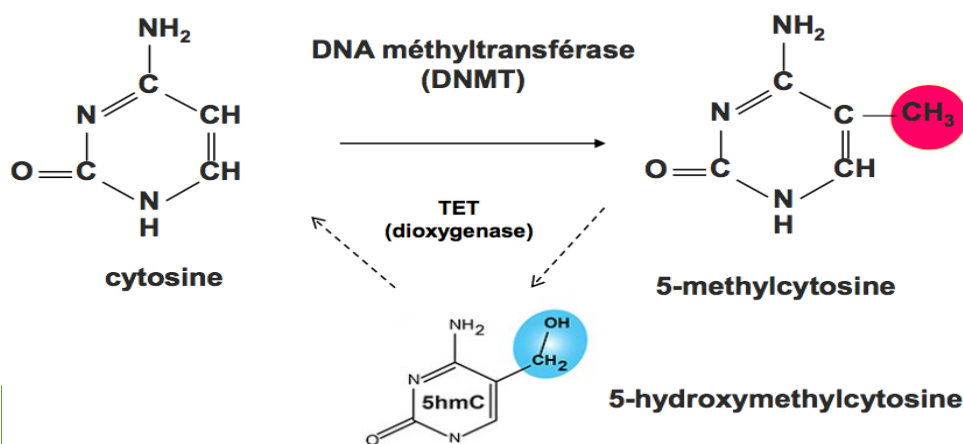


Figure 3 : Méthylation de l'ADN.

Modification de la cytosine en 5-méthylcytosine par l'ajout d'un groupement méthyl (-CH₃) sur le cinquième carbone du noyau pyrimidique. Réaction catalysée par une ADN méthyltransférase (Dnmt). Processus de déméthylation de l'ADN conduit par les enzymes TETs qui ont la propriété d'oxyder la 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine.

Le processus de déméthylation est longtemps resté énigmatique, on sait maintenant que cette déméthylation a lieu grâce un ensemble d'enzymes spécialisées les protéines Ten-Eleven Translocation (TET) et des protéines d'excision et de réparation (MBD4, APEX1, PARP1) qui convertissent la 5-méthylcytosine en 5-hydroxy-méthylcytosine (Hajkova et al., 2010; Kagiwada et al., 2013a) (Figure 3). En effet, les enzymes TETs ont la propriété d'oxyder la 5mC en 5-hydroxyméthylcytosine (5hMC), 5-formylcytosine et en 5-carboxylcytosine. Les deux derniers produits d'oxydation peuvent être ensuite remplacés par une cytosine.

Chez les mammifères, 98% du génome présente des régions pauvres en dinucléotides CpG et pour la majorité méthylées qui correspondent aux séquences génomiques répétées telles que les séquences des rétrotransposons. Les 2% restants du génome sont organisés en clusters CpG appelées îlots CpG (régions de plus de 500pb, >60% en CpG), localisés majoritairement au niveau des promoteurs et/ou des exons et généralement faiblement méthylés (Bourc'his et al., 2001; Gardiner-Garden and Frommer, 1987).

La méthylation de l'ADN est généralement associée à la régulation de l'expression des gènes en fonction du niveau de méthylation de leurs promoteurs. En effet, une hyperméthylation de ces derniers bloquera l'accès à la machinerie transcriptionnelle créant une répression de l'expression des gènes, alors qu'une hypométhylation facilitera l'activation des gènes.

La méthylation de l'ADN est également une marque épigénétique majeure impliquée dans l'établissement de l'empreinte génomique parentale chez les mammifères, permettant l'expression monoallélique en rendant silencieux l'allèle parental soumis à empreinte (chapitre II.1.B). Elle est également impliquée dans la compaction du génome et l'inactivation du chromosome X au cours du développement chez la femme.

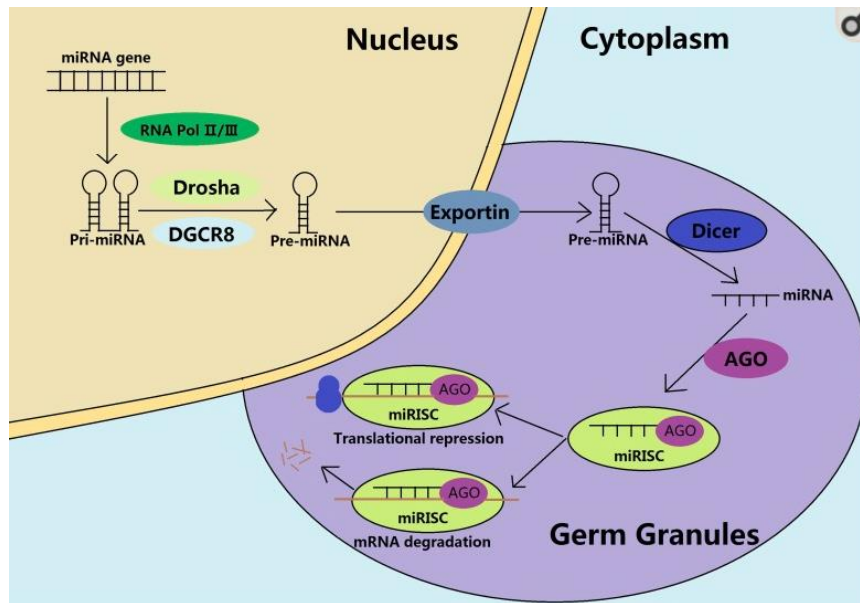


Figure 4 : Biosynthèse des microARNs

Les gènes de miARN sont transcrits par l'ARN pol II sous la forme de longs précurseurs appelés "pri-miARN" (précurseurs en double épingle). Ces précurseurs sont ensuite clivés dans le noyau par un complexe nommé microprocesseur formé des enzymes Drosha (enzymes ARNse III) et DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8 gene) enzymes capables de se fixer sur les doubles brins d'ARN. On obtient un précurseur intermédiaire : pré-miARN qui est un ARN long d'environ 70 nucléotides, replié en tige-boucle imparfaite par complémentarité de bases entre la première moitié et la deuxième moitié de la séquence. Après export nucléaire (via l'exportine 5), le pré-miARN est clivé par une endoribonucléase : Dicer, qui permet l'hydrolyse de la structure double boucle. Un brin des 2 brins interagit avec les protéines argonautes pour composer le complexe RISC (ARN-induced silencing complex), qui reconnaît alors l'ARNm cible. Extrait de Ge et al, 2017.

II.1.A.3 Régulation épigénétique : rôle des petits et longs ARNs non codants

Découvert dans les années 90 (Lee et al., 1993) pour les petits ARN non codants et plus récemment pour les longs ARN non codants, ils sont maintenant reconnus comme de puissants régulateurs épigénétiques. Ils peuvent en effet, contrôler l'expression des gènes à la fois au niveau transcriptionnel par remodelage chromatinien et également au niveau post transcriptionnel par inhibition directe des transcrits.

Plusieurs classes de petits ARN non codants ont été décrites, en fonction de leur taille, leur biosynthèse et de leur mécanisme d'action. On distingue : les microARNs (miARN), les piARN (piwi ARN) et les siARN endogènes (siARN).

-Les microARNs (miARN)

Les miARNs (environ 21-24 nucléotides) sont les plus caractérisés et présentent principalement des propriétés de régulation post transcriptionnelle, leur appariement à une séquence complémentaire du transcrit (ARNm) du gène cible induit soit sa dégradation soit réprime sa traduction (Bartel, 2009). Le génome humain comprendrait environ 1000 gènes (Bentwich et al., 2005; Lewis et al., 2005) à l'origine de la transcription de miARN, qui cibleraient environ 60% des gènes (Friedman et al., 2009) et sont présents dans de nombreux types cellulaires. La biosynthèse des miARNs est illustrée dans les figures 4 et 5A.

Les miARNs bien que découverts récemment sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques telle que la différenciation cellulaire, la croissance, le métabolisme et l'apoptose. De plus il a été rapporté des cas de dérégulations de miARNs à l'origine de tumeurs.

-Les piARNs : Piwi-interacting ARN

Les piARNs sont des petits ARN (26-31 nucléotides) exprimés dans les cellules germinales et dans l'embryon précoce chez les animaux. Leur rôle serait de bloquer l'activité d'éléments mobiles présents dans le génome, comme les transposons, pendant le développement précoce de l'embryon afin de protéger le génome. Leur biosynthèse est partiellement décrite, ils agiraient en association avec les protéines piwi au sein du complexe : piRISC (piARN-induced silencing complex) et après appariement, inhiberaient l'ARN cible (Siomi et al., 2011) (Figure 5C).

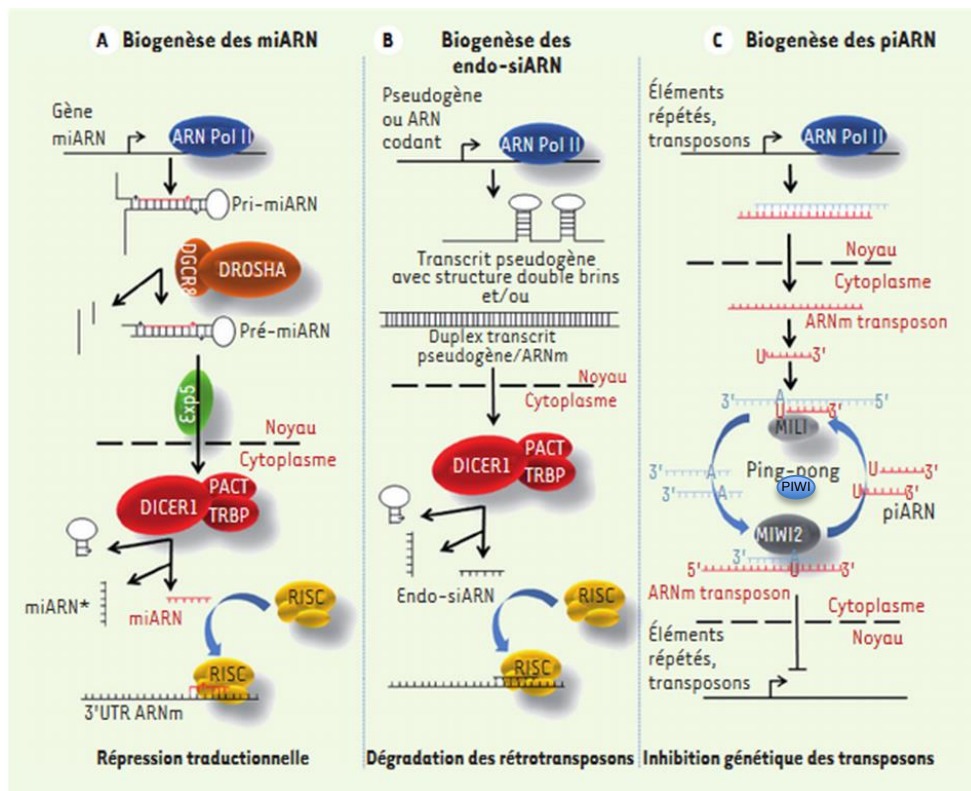


Figure 5 : Voies de biogenèse des petits ARN non codants.

A/ Biogenèse des miARNs) **B/** Biogenèse des endo-siARNs. Les précurseurs des siARN endogènes sont des transcrits composés de longues structures en tête d'épingle ou d'ARN double brin dérivés de transcrits hybrides sens/anti-sens provenant du même locus (cis-endo-siARN) ou de deux locus différents (trans-endo-siARN). À partir de ces précurseurs sont produits les petits endo-siARN, un processus dépendant du clivage par DICER1 mais pas de DGCR8. **C/** Biogenèse des piARNs. Les piARNs sont générés grâce au cycle « ping-pong » à partir de transcrit d'éléments répétés ou de transposons. Ils sont ensuite chargés sur la protéine PIWI qui va produire un piARN secondaire (en bleu), clivé ensuite par le complexe MIWI2 pour donner naissance aux piARNs terminaux impliqués dans la régulation et la dégradation d'éléments transposables délétères. D'après Romero et al., 2012

- les si ARN endogènes (siARNs)

Les siARNs endogènes (siARN) mammifères sont des petits ARN non codants de 21 nucléotides, transcrits à partir d'éléments transposables et/ou de pseudogènes (Romero et al., 2012) (Figure 5B). Cette nouvelle classe de petits ARN non codants a été décrite dans les ovocytes (Watanabe et al., 2008), les cellules souches embryonnaires (Babiarz et al., 2008) et récemment dans les cellules germinales mâles ((Song et al., 2011). Les données détaillant le rôle et l'importance de ces siARNs dans la régulation de la spermatogenèse sont toujours parcellaires.

-Les longs ARN non codants

De longs ARN non codants d'environ 200 nucléotides qui les distinguent des petits ARN non codants, une fois transcrits, jouent aussi un rôle majeur dans le contrôle de la transcription de certaines régions chromosomiques. Ils ont la propriété de s'accoler sur des domaines chromosomiques particuliers et bloquent ainsi la transcription. L'exemple le plus connu est celui de XIST (X-inactive specific transcript), un long ARN non codant impliqué dans l'inactivation du chromosome X chez la femelle des mammifères. La figure 6 illustre les différents modes d'action des longs ARN non codants (Pedrazzini, 2015).

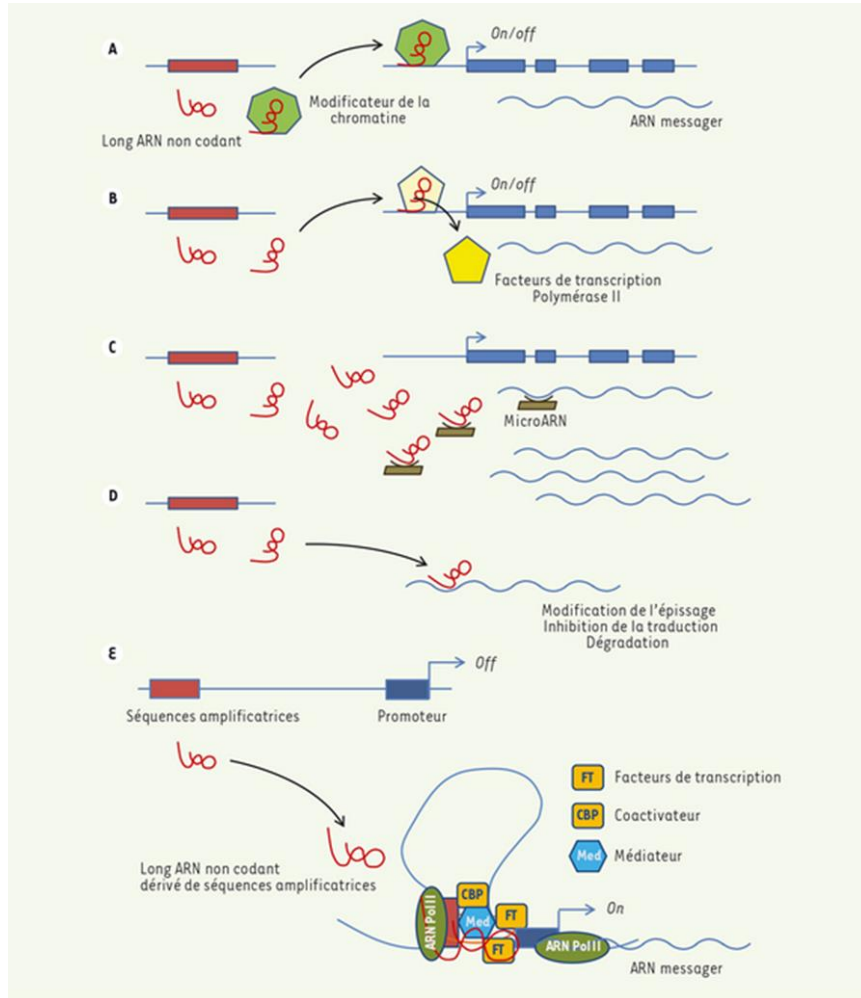


Figure 6 : Rôles des longs ARN non codants.

Les longs ARN non codants agissent à travers divers mécanismes pour réguler l'expression des gènes codants. **A.** Ils dirigent des modificateurs de la chromatine vers des gènes cibles spécifiques. **B.** Ils déplacent des régulateurs de l'expression (activateurs ou répresseurs) des séquences régulatrices de l'expression. **C.** Ils entrent en compétition avec des miARN et protègent des ARN messagers de la dégradation par ces miARN. **D.** Ils modulent des événements d'épissage et interfèrent avec la traduction. **E.** Ils promeuvent l'association des séquences amplificatrices et promotrices pour initier la transcription. La Figure décrit une activation en *cis*, mais l'association peut aussi s'effectuer avec une région du génome non adjacente pour activer un gène en *trans*. D'après Pedrazzini 2015.

II.1.B Empreinte parentale – Gènes soumis à empreinte (GSE)

Un autre niveau de régulation de l'expression des gènes réside dans l'origine de l'allèle exprimé et dépend de facteurs épigénétiques.

Les gènes soumis à empreinte (GSE) (~1% des gènes) présentent une expression monoallélique dépendante de l'origine parentale de l'allèle. Les GSE paternelle verront leur allèle maternel s'exprimer et inversement l'allèle paternel s'exprimera en solo lorsqu'il s'agit d'un GSE maternel. Cette asymétrie fonctionnelle est en fait connue de longue date comme l'atteste l'étude de phénotypes d'animaux hybrides qui sont très différents phénotypiquement selon l'origine du génome parental (Figure 7).



Figure 7: Le croisement d'un tigre et d'une lionne donne un trigron de phénotype intermédiaire entre les deux espèces, alors que le croisement lion et tigresse donne le ligre, qui est un animal géant de près d'un tiers de plus la taille du lion ou d'un tigre.

L'empreinte parentale, encore appelée « empreinte génomique », a été mise en évidence chez les mammifères dans les années 1980 grâce à des expériences de transferts nucléaires qui ont permis de démontrer la non-équivalence des 2 génomes parentaux : la formation de zygotes gynogénètes (2 génomes maternels) conduit à un développement embryonnaire mais à l'absence de développement des annexes embryonnaires, alors que la formation de zygotes androgénètes (2 génomes paternels) conduit au développement des annexes sans développement embryonnaire (Barton et al., 1984; Surani et al., 1984). Ces expériences ont démontré que pour obtenir un développement normal, il ne suffit pas d'avoir un génome diploïde, mais qu'une contribution paternelle et maternelle est indispensable, faisant suspecter l'expression d'allèle spécifique de gènes impliqués dans le développement précoce. Ainsi l'empreinte génomique parentale est définie comme le phénomène de marquage différentiel des génomes parentaux qui conduit

à l'expression monoallélique d'un gène. Ces 2 allèles ont subi des modifications épigénétiques différentes (méthylation, acétylation, etc.) selon leur origine parentale, aboutissant à l'expression ou à la non-expression d'un gène en fonction de cette origine parentale (Figure 8).

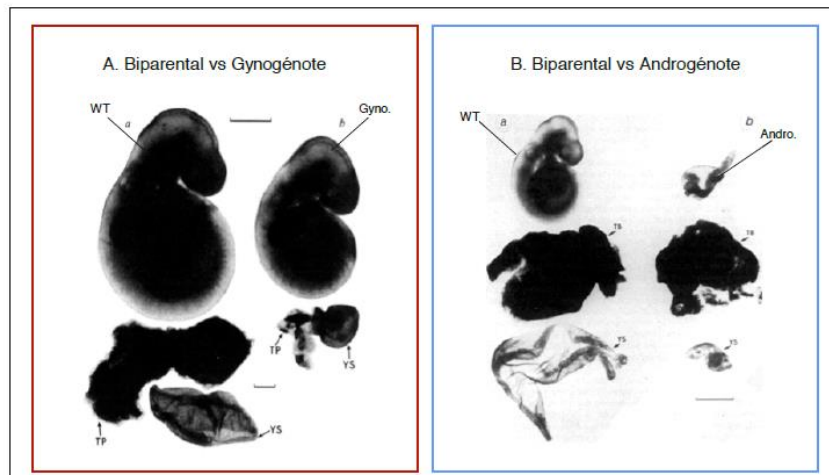


Figure 8 : Non équivalence fonctionnelle des génomes parentaux

Cette propriété a été mise en évidence en 1984, par la production d'embryons diploïdes uniparentaux par transfert de noyaux gamétiques. A : les gynogénotes (Gyno) sont issus de la réunion de deux génomes maternels et les androgénotes (Andro) de deux génomes paternels. Les deux types d'embryons présentent une létalité embryonnaire à 9,5 jpc associée à des phénotypes en miroir. Les gynogénotes développent des tissus embryonnaires et très peu d'annexes embryonnaires alors que les androgénotes présentent une hyperprolifération extra-embryonnaire et pratiquement pas de tissus embryonnaire.

WT : embryons sauvages ; TP : trophoblaste ; YS : sac vitellin.

II.1.B.1 Organisation des gènes soumis à empreinte

Près de 100 GSE sont actuellement référencés chez l'homme (Babak et al., 2015; Wilkins et al., 2016; geneimprint.com). Il existe plusieurs clusters de GSE localisés principalement dans des régions spécifiques du génome (régions télomériques) suggérant un contrôle coordonné des gènes d'une région soumise à empreinte. Ces contrôles sont assurés par certaines régions différentiellement méthylées appelées « centres d'empreintes » (Imprinting Center Region : ICR) régulant en *cis* l'expression monoallélique de plusieurs gènes dans une région donnée.

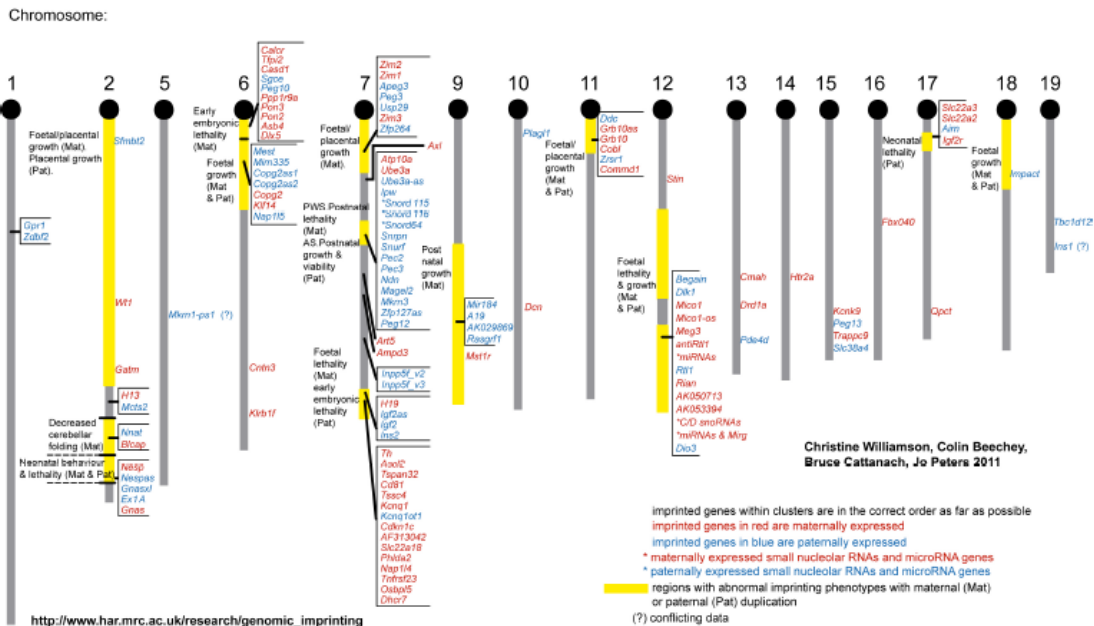


Figure 9 : Carte des gènes soumis à empreinte chez la souris

Adapté de <http://www.mousebook.org/catalog.php?catalog=imprinting>

Chez la souris, 24 ICRs ont été identifiés présentant un fort dimorphisme sexuel dans leur répartition puisque 21 d'entre elles sont méthylées au cours de l'ovogenèse (ICR maternelle) et seulement 3 au cours de la spermatogenèse (ICR paternelle) (Proudhon et al., 2012; Reik and Walter, 2001). A noter qu'un locus est dit soumis à empreinte maternelle ou paternelle en fonction de la provenance de la méthylation de son ICR mais les GSE qu'elle contrôle peuvent aussi bien être exprimés à partir de l'allèle maternel que de l'allèle paternel. Une cartographie des gènes soumis à empreinte chez la souris est présentée dans la Figure 9.

II.1.B.2 Mécanisme de l’empreinte parentale

Les ICRs suivent une dynamique de méthylation au cours du développement qui a été désigné par : cycle de l’empreinte. (Reik and Walter, 2001). Il existe deux périodes critiques dans la mise en place ou le maintien de l’empreinte : la gamétogenèse et le développement embryonnaire préimplantatoire. La reprogrammation majeure prend place dans les cellules germinales primordiales où les marques d’empreinte sont effacées permettant de restaurer un état de totipotence. Les marques de l’empreinte sont ensuite apposées durant la spermatogenèse ou l’ovogenèse en fonction du sexe de l’individu. Après la fécondation, il existe une déméthylation globale du génome qui sera suivie d’une vague de méthylation *de novo*, mais dont les ICRs sont protégés permettant le maintien de l’empreinte. La méthylation de l’ADN est actuellement le marquage épigénétique le plus étudié pour décrire les différentes étapes du cycle de l’empreinte parentale. (Figure 10).

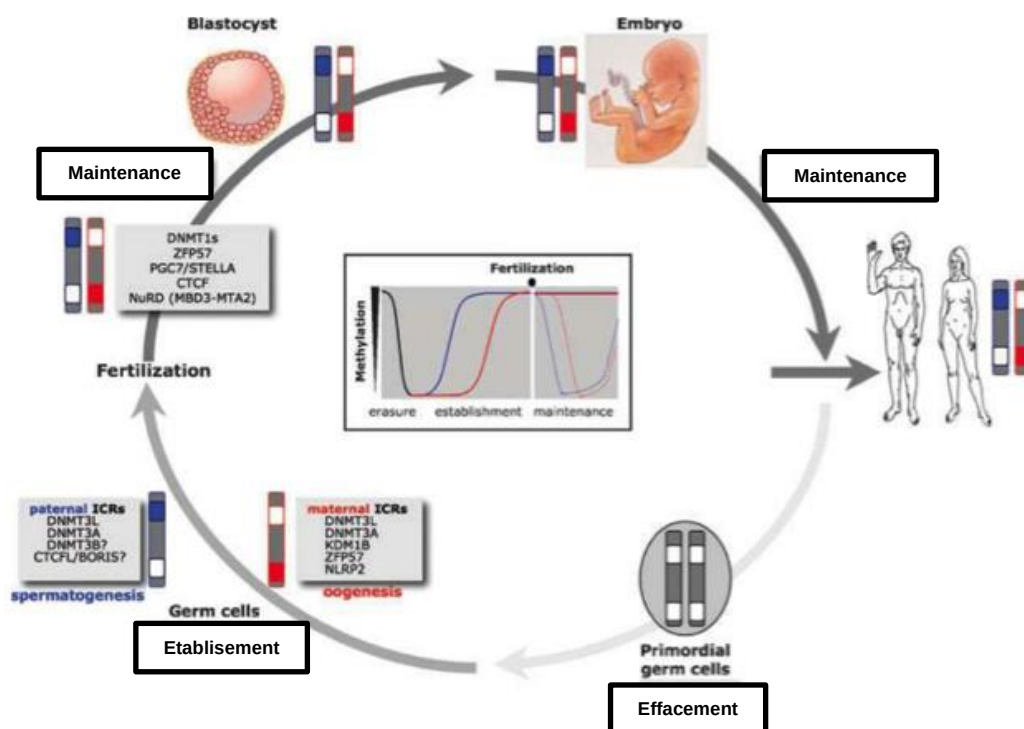


Figure 10 : Cycle de l’empreinte

Dynamique de la méthylation de l’ADN au cours du développement embryonnaire et de la gamétogenèse : i) effacement de l’empreinte dans les cellules germinales fœtales, ii) établissement de l’empreinte paternelle (bleu) et maternelle (rouge) au niveau des centres d’empreinte (ICRs) durant la spermatogenèse et l’ovogenèse, iii) maintenance des marques d’empreinte après la fécondation. D’après Demars et Gicquel, 2011.

Effacement de l'empreinte dans les cellules germinales primordiales

Comme chez la souris, les cellules germinales primordiales humaines (PGCh, *Primordial Germ Cells*) subissent un effacement de l'empreinte sur les deux allèles lors de la colonisation des gonades (Gkountela et al., 2013; Guo et al., 2017; Seisenberger et al., 2012a) . Néanmoins compte tenu, des difficultés pour obtenir des échantillons de gonades et de cellules germinales humaines, le phénomène d'effacement de l'empreinte durant la gamétogenèse reste à ce jour peu documenté. Cependant les données actuellement disponibles suggèrent un phénomène similaire chez l'Homme (Figure 11). Puis une apposition des marques dépendantes du sexe de l'individu va s'effectuer au cours de la gamétogenèse.

Etablissement de l'empreinte au cours de la gamétogenèse

Dans la lignée germinale mâle, la méthylation est plus précoce que dans la lignée germinale femelle. En effet, au cours de la spermatogenèse, l'apposition d'un nouveau profil de méthylation a lieu avant les divisions méiotiques. Chez la souris, elle intervient à 16 jours de développement embryonnaire dans les gonocytes quiescents, pour être complète au stade pachytène des spermatocytes après la naissance (Li et al., 2004).

Chez la femelle, la reméthylation a lieu après les divisions méiotiques au moment de la maturation ovocytaires des ovocytes bloqués en prophase de méiose I (Li et al., 2004; Lucifero et al., 2004). Ainsi de grandes différences apparaissent dans la cinétique d'apposition des marques épigénétiques en fonction des sexes. Chez la femme cette apposition survient après la puberté, au cours de la maturation ovocytaire.

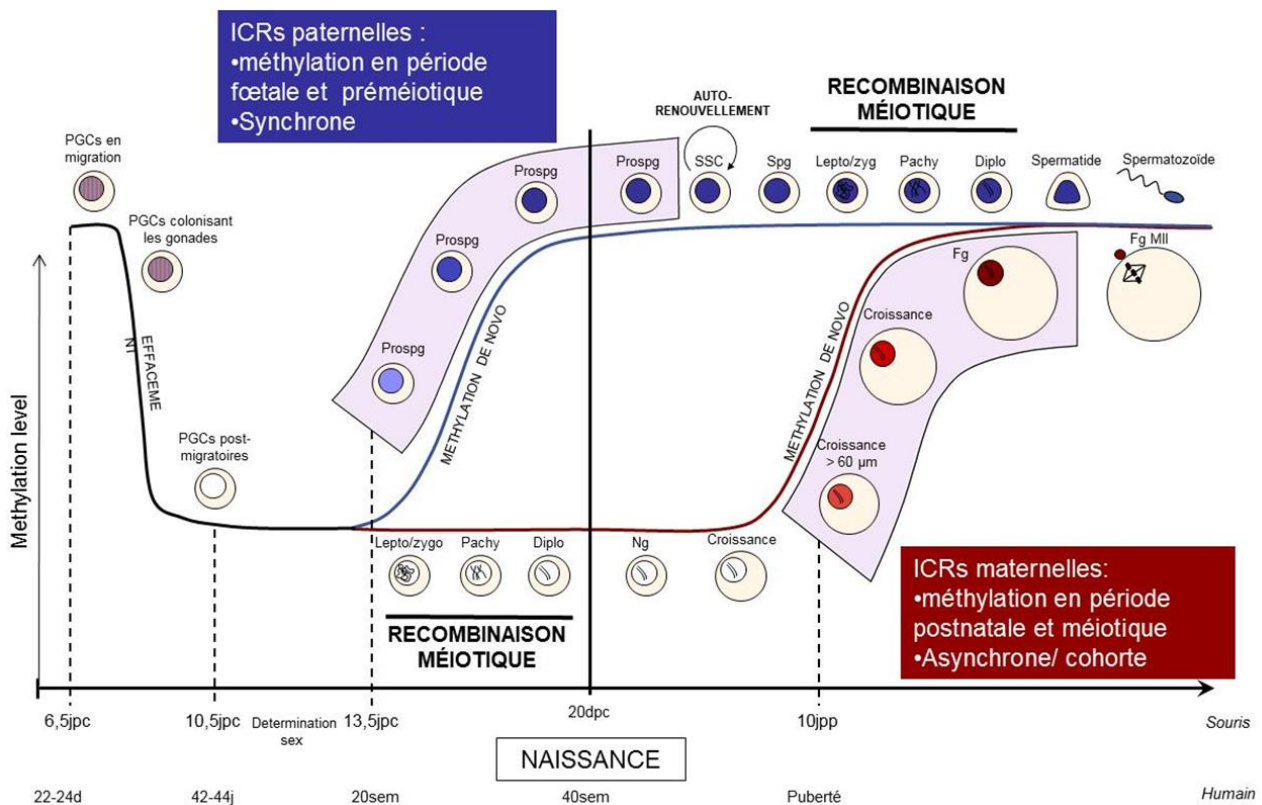


Figure 11 : Evolution du niveau de méthylation de l'ADN au cours de la gamétogenèse

Effacement de la méthylation de l'ADN au cours de la migration des cellules germinales dans les gonades entre 6,5 et 10,5 jpc chez la souris et par extrapolation entre 22-24 jours et 42-44 jours chez l'Homme. Réapposition différentielle et en fonction du sexe des individus : dès la période foetale chez les mâles et à la puberté dans la lignée femelle. Extrait de Fauque P.

Maintien des marques d'empreinte

Immédiatement après la fécondation, une deuxième vague de déméthylation globale du génome a lieu, à laquelle les ICRs échappent (Smallwood et al., 2011). Les ICRs mis en place durant la gamétogenèse semblent protégés de cette vague de déméthylation. Les marques de méthylation allèle-spécifique sont alors conservés (Reik et Walter 2001) et s'en suivra une expression monoallélique des GSE dans les tissus considérés du futur individu.

Les mécanismes qui permettent le maintien des marques d'empreinte durant le développement embryonnaire pré-implantatoire restent encore inconnus. Cependant des pistes s'orientent vers l'implication du motif de liaison commun à toutes les ICRs, le motif hexanucléotidique TGCCGC de liaison à la protéine ZFP57 qui protégerait les allèles méthylés de la vague de déméthylation (Quenneville et al., 2011). Un deuxième motif a aussi été identifié : CCTC permettant la liaison de la protéine CTCF et qui protégerait les allèles déméthylés de la re-méthylation (Wang et al., 2012). En plus de ZFP57, NLRP5, KHDC3L et NRLP7 on été impliqués dans des défauts d'empreinte (Docherty et al., 2015) et plutôt qu'un défaut d'expression, un défaut de localisation dans l'ovocyte et/ou dans le zygote seraient en cause (Monk et al., 2017).

II.1.B.3 Rôle des gènes soumis à empreinte

La majorité des GSE sont particulièrement impliqués au cours du développement embryonnaire, la croissance foeto-placentaire ainsi que dans la croissance et le comportement des individus après la naissance. En effet, si les fonctions des GSE peuvent être tout à fait variées : facteur de croissance (Igf2), suppresseur de croissance neuronale (Ndn), transporteur de solutés (famille Slc) ou encore présentant des fonctions pro-apoptotiques (Zac1, Cdkn1c), en revanche leur profil d'expression tissulaire est informatif car ils s'expriment principalement durant la vie *in utero* (embryon et placenta) et dans le système nerveux après la naissance (Babak et al., 2015). De plus il est important de rappeler que l'expression des GSE est également tissu spécifique.

Ainsi une grande majorité des GSE joue un rôle sur le développement embryonnaire. Une partie d'entre eux est exprimé à partir de l'allèle paternel et tendent à promouvoir la croissance alors que l'autre partie, exprimée à partir de l'allèle maternel tend à la réprimer. L'empreinte génomique parentale servirait alors à modérer la croissance pendant le développement et les échanges entre la mère et le

foetus via le placenta, mais aussi d'un point de vue cognitif après la naissance (Barlow and Bartolomei, 2014; Proudhon et al., 2012).

II.1.B.4 Régulation de l'expression des GSE

Les GSE sont en général regroupés en cluster contrôlés par des ICRs. Ces séquences, qui peuvent s'étendre sur plusieurs kilobases et qui sont riches en CpG, régulent l'expression monoallélique de l'ensemble des gènes du locus par les insulateurs et par de grands ARN non codants (Wan and Bartolomei, 2008). A noter qu'en rapport avec la spécificité générale de la distribution de la méthylation dans les gamètes mâles et femelles, les ICR paternelles se distinguent par une localisation intergénique et une plus faible densité en CpG comparées aux ICR maternelles, qui sont riches en CpG et associées en général à des promoteurs (Kobayashi et al., 2006; Schulz et al., 2010).

Dans ce travail de thèse nous nous sommes intéressés à des dérégulations impliquant des GSE localisés sur la région 11p15, nous allons donc spécifiquement étudier la régulation puis les dérégulations connues de cette région.

Régulation des GSE de la région 11p15.5 chez l'Homme

La région 11p15.5 chez l'Homme est organisée en 2 DMRs, chacune d'elles étant sous le contrôle de 2 ICRs, l'une paternelle : ICR1 (ICR *H19/IGF2*) et la seconde maternelle ICR2 (ICR *KCNQ1*) (Figure 12). De plus, ces deux ICRs sont régulés différemment, ICR1 fonctionne comme un insulator alors que ICR2 sert de promoteur à un ARN non codant.

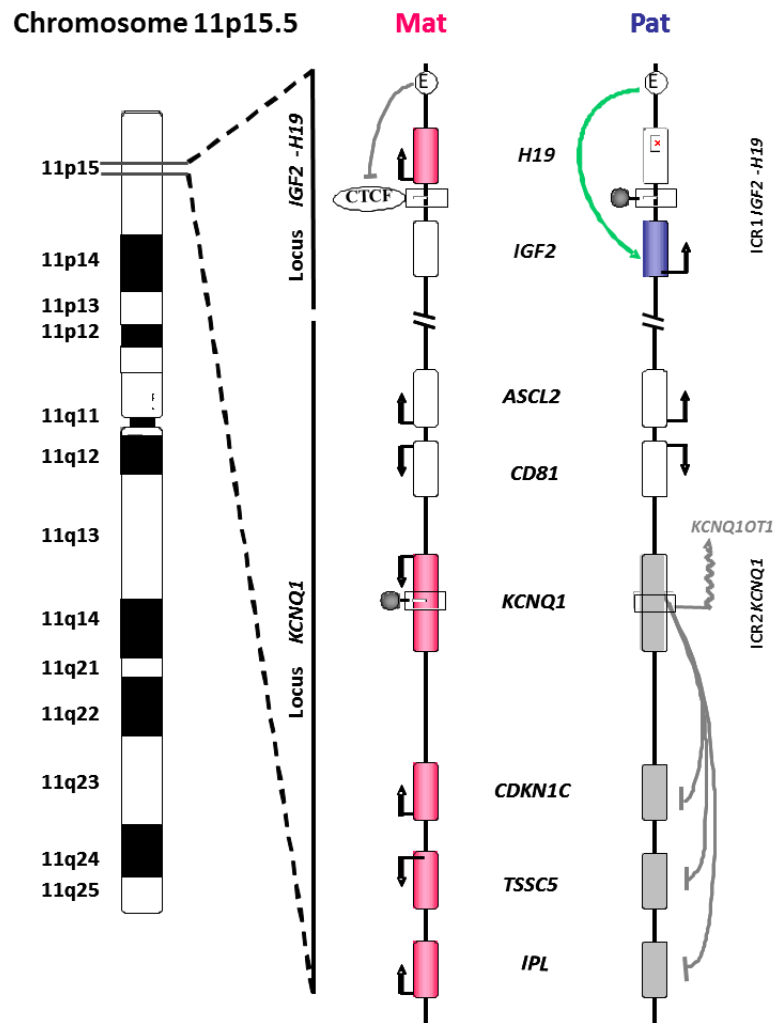


Figure 12 : Représentation de la région 11p15.5 chez l'homme.

Chez l'Homme la région 11p15.5 est composée de deux centres d'empreintes. Le premier (ICR1) régule l'expression des gènes *H19* (expression maternelle) et *IGF2* (expression paternelle) et le deuxième (ICR2) les gènes *CDKN1C*, *KCNQ1* à expression maternelle, régulés par l'ARN non codant *KCNQ1OT1* à expression paternelle.

Concernant l'ICR1, l'expression monoallélique des gènes *H19* et *IGF2* dépend de la méthylation paternelle de ces DMRs en association avec des modifications d'histones. L'ICR1 de *H19/IGF2* contient 4 sites de fixation (CCCTC) au facteur CTCF qui peut se lier seulement sur l'allèle maternel déméthylé. Lorsque CTCF est lié, il agit comme un insulateur et bloque l'accès du promoteur d' *IGF2* aux enhancers présents en aval de *H19* sur l'allèle maternel. En effet, CTCF en synergie avec des cohésines peut initier la création d'une boucle chromosomique (Filippova, 2008; Parelho et al., 2008). La méthylation de l'ICR de *H19* sur l'allèle paternel empêche CTCF de se lier et le promoteur d' *IGF2* peut alors se lier aux enhancers.

Les gènes *H19* and *IGF2* sont principalement exprimés durant le développement foeto-embryonnaire et inhibés dans la plupart des tissus après la naissance. Le gène *IGF2* code une protéine qui joue un rôle majeur dans la croissance embryonnaire et foétale, le gène *H19* encode un long ARN non codant qui permet de réguler la croissance et la prolifération cellulaire (Shmela and Gicquel, 2013).

En ce qui concerne l'ICR2, c'est une empreinte maternelle localisée au niveau du 11^{ème} intron du gène *KCNQ1* comprenant un promoteur pour l'ARN non-codant *KCNQ1OT1* (ARN anti-sens). L'ICR2 présente une méthylation de l'ADN associée à des marques répressives des histones sur l'allèle maternel et inversement sur l'allèle paternel (Figure 12). Les marques d'empreinte sur l'allèle maternel entraînent la répression de l'ARN non-codant *KCNQ1OT1* (et permet l'expression des gènes *CDKN1C*, *KCNQ1* sur cet allèle). En revanche, sur l'allèle paternel non-méthylé, l'expression de *KCNQ1OT1* entraîne la répression de tous les gènes codants (Koerner et al., 2009; Pandey et al., 2008).

II.1.B.5 Exemples de dérégulations des régions soumises à empreinte chez l'Homme

Plusieurs syndromes impliquant des anomalies de méthylation touchant des régions soumises à empreinte ont été décrits à ce jour : tel que les syndromes de Beckwith-Wiedemann (SBW), de Silver-Russell (SRS), de Prader-Willi (PWS), d'Angelman (AS), de Kagami-Ogata (KOS), de Temple (TS), le Transient Neonatal Diabetes Mellitus (TNDM), et le pseudohypoparathyroidisme de type Ib (PHP1b).

Afin d'illustrer des cas de dérégulations des régions soumises à l'empreinte chez l'Homme nous poursuivons notre analyse de la région 11p15.5. Les dérégulations de cette région sont en effet impliquées dans la survenue de deux pathologies liées à l'empreinte parentale : le syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) et celui de Silver-Russell (SRS) dont les phénotypes sont opposés. D'une manière générale, le SBW est dû à différentes atteintes génétiques ou épigénétiques de la région 11p15 qui vont conduire à une sous expression des gènes maternelles et/ou une sur expression paternelle entraînant une croissance excessive. A l'inverse le SRS est lié à des défauts de la région 11p15 entraînant une sous expression des gènes paternels et/ou sur expression maternelle expliquant le retard de croissance caractéristique de ce syndrome. Les principales anomalies génétiques et épigénétiques de la région 11p15 impliquées dans le SBW et SRS et connues à ce jour sont recensées dans le tableau 1.

II.1.B.5.a Syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW)

Le syndrome de Syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) (OMIM 130650) est une maladie pan-ethnique avec une prévalence estimée à 1/13 700 toutes causes confondues. Elle touche aussi bien les filles que les garçons, hormis dans les cas de jumeaux monozygotes où il existe une prédominance de filles. Le SBW s'accompagne d'une croissance fœtale (2^{ème} moitié de la grossesse) et postnatale excessive (taille et poids de naissance), d'une viscéromégalie, d'une macroglossie, d'anomalies du développement telles que l'omphalocèle, hernie ombilicale, diastasis des droits ou hypertrophie hémicorporelle. Des tumeurs (néphroblastome ou tumeur de Wilms, neuroblastome, hépatoblastome, corticosurénalome, rhabdomyosarcome) sont associées dans environ 10 % des cas, cette fréquence pouvant varier de 2 à 30 % des cas selon l'anomalie moléculaire en cause mais étant surtout associée aux anomalies localisées au niveau de ICR1 (Tableau 1).

Dans la population générale, le SBW est dans 60% des cas lié à une anomalie épigénétique (ou épimutation) due à une perte fonctionnelle de la méthylation de l'ICR2, conduisant à une expression biallélique du transcrit non codant *KCNQ1OT1* et à une diminution de l'expression du gène *CDKN1C* (Demars et al., 2011; Gicquel et al., 2005; Le Bouc et al., 2010). Dans 10% des cas une autre épimutation touchant l'ICR1 peut être en cause. Dans ce cas il existe un gain de méthylation de

l'ICR1/*H19*, conduisant à une diminution d'expression du gène *H19*, et à l'expression biallélique du gène *IGF2*.

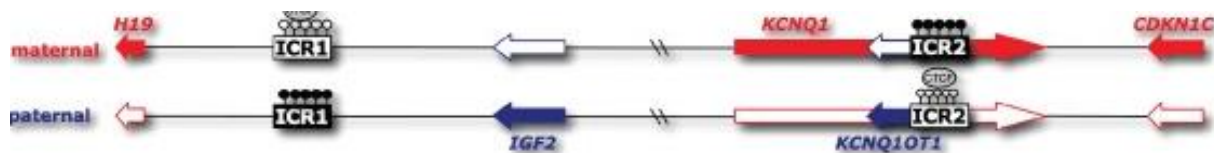
Dans 20% des cas, une anomalie structurale est en cause liée une disomie uniparentale paternelle (présence de 2 copies d'un même chromosome paternel) qui entraîne un déséquilibre d'expression des gènes soumis à empreinte du bras court du chromosome 11 conduisant à la surexpression du gène *IGF2* et à la répression du gène *KCNQ1*. A noter qu'une disomie uniparentale est due à un défaut de recombinaison mitotique qui a lieu précocement durant le développement et qui entraîne un mosaïcisme cellulaire. Dans 5% des cas, la pathologie est associée à une mutation causant une perte de fonction de la protéine CDKN1C. Enfin dans moins de 2% des cas, des anomalies cytogénétiques (duplication paternelle de la région 11p15, inversion avec point de cassure dans l'un des domaines de la région 11p15, trisomie partielle 11p15) sont identifiées.

II.1.B.5.b Syndrome de Silver-Russell (SRS)

Le syndrome de Silver Russell (SRS) (OMIM 180860) est bien plus rare de celui de SBW, puisque son incidence est évaluée à 1/100 000 et sa prévalence à 1-9/1 000 000. Ce syndrome, miroir du SBW touche autant les filles que les garçons, associe un retard de croissance intra-utérin et postnatal avec un périmètre crânien normal, une asymétrie hémicorporelle de type hypotrophie, des anomalies faciales caractéristiques (visage triangulaire) et des troubles alimentaires parfois majeurs (Netchine et al., 2007).

Dans plus de 60% des cas une perte de méthylation de l'ICR1 (locus *H19/IGF2*) est impliquée dans l'apparition d'un SRS (Gicquel et al., 2005; Netchine et al., 2007). L'hypométhylation de l'ICR1 sur l'allèle paternel permettrait la fixation de CTCF de façon biallélique, et réprimerait l'expression du gène *IGF2* expliquant ainsi le RCIU et la petite taille post-natale observés dans ce syndrome.

Dans 10% des cas, le SRS est associé à une disomie uniparentale maternelle du chromosome 7 (Gicquel et al., 2005). La majorité des cas de SRS sont sporadiques mais des formes familiales autosomiques dominantes ou autosomiques récessives, ou encore liées à l'X ont été rapportées. Les autres causes sont plus rares et comprennent des translocations de l'ensemble de la région 11p15 ou une duplication de l'ICR2 maternelle.



Syndrome de Beckwith-Wiedemann

Altérations de toute la région 11p15 inversion maternelle/ translocation déséquilibrée paternelle 1% isodisomie paternelle 20-25%	
Altérations de l' ICR1 <i>Gain de méthylation de l'ADN / ICR1 10%</i> >facteurs Trans : pas de connu pas de mutation CTCF pas de MHD >facteurs Cis 20% délétion maternelle 1,4kb de ICR1 : 10% mutation maternelle du site OCT4/SOX2 duplication de l'ICR1 paternel : rare pas d'UPiD segmentaire	Altérations de l' ICR2 <i>Mutation maternelle de CDKN1C 5%</i> <i>Perte de méthylation de l'ADN / ICR2 60%</i> >facteurs Trans : 25% MHD mutations NLRP2 rare de mutation ZFP57 >facteurs cis: très rare délétion ICR2 maternel : rare microduplication ICR2 maternel pas d'UPiD segmentaire
Altérations de toute la région 11p15 translocation déséquilibrée maternelle 1% isodisomie maternelle exceptionnelle	
Altérations sur l'ICR1 <i>Perte de méthylation de l'ICR1 60%</i> > facteurs trans: 10% MHD pas de mutation ZFP57 pas mutation de MBD3 pas de mutation CTCFL/BORIS >facteurs cis : rare microduplications ICR1 maternel : rare délétion enhancers : rare pas UPiD segmentaire	Altérations de l'ICR2 duplications de l'ICR2 maternel pas de UPiD segmentaire

Syndrome de Silver-Russell

Tableau 1 : Principales altérations génétiques et épigénétiques affectant les régions ICR1 et ICR2 dans les syndromes de Beckwith-Wiedemann et de Silver-Russell.

MHD : multilocus hypométhylation disorders ; UPiD : uniparentale isodisomie
Adapté de Demars et Gicquel. 2011.

A noter que les patients SRS liés à une dérégulation de l'ICR1 sont plus à risque de présenter des symptômes classiques du syndrome alors que ceux dûs à une disomie uniparentale du chromosome 7 sont plus à risque de présenter des problèmes d'apprentissage notamment de la parole (Netchine et al., 2007).

Néanmoins comme pour le SBW, pour une même anomalie moléculaire détectée il existe des variabilités phénotypiques (Demars et Gicquel 2012). Cela peut être lié à un mosaïcisme cellulaire, comme c'est le cas pour les disomies uniparentales du chromosome 7 et préfigure d'une apparition post zygotique de l'anomalie moléculaire. Cependant, la découverte d'une perte de méthylation sur plusieurs loci soumis à empreinte dans certains cas de pathologies liées à l'empreinte à suggérer l'implication de facteurs en *trans* (Brioude et al., 2018; Rossignol et al., 2006).

II.1.B.5.c Facteurs trans et cis impliqués dans le SBW et SRS

Ainsi, dans près de 60% des cas, les syndromes de SBW et SRS sont associés à une anomalie épigénétique isolée de la région 11p15. Néanmoins, aujourd'hui nous ne savons pas quelle est la proportion d'épimutation primaire (sans facteur génétique associé) et d'épimutation secondaire à une dérégulation d'un facteur génétique en *cis* ou en *trans*. Les principaux facteurs *cis* ou *trans* connus à ce jour pour être impliqués dans les SBW et SRS sont répertoriés dans le tableau 1. L'implication de facteurs *trans* dans la pathogenèse des syndromes liés à l'empreinte date de 2006, quand il a été découvert que des patients atteints de SBW et ceux présentant un « transient neonatal diabetes mellitus de type 1 » présentaient une perte de méthylation de l'ADN sur des loci différents du locus causal (ICR2 et ZAC1, respectivement) (Rossignol et al., 2006). Ceci a été confirmé depuis dans d'autres études pour les syndromes de SBW et le SRS et a permis de définir une nouvelle classe de pathologie liée à l'empreinte : multilocus hypomethylation disorder (MHD) (Demars et Gicquel 2012 ; Brioude et al., 2018). Les principales caractéristiques sont le profil en mosaïque pouvant impliquer à la fois des ICRs maternelles ou paternelles, suggérant plutôt une apparition durant la maintenance de l'empreinte (post zygotique) plutôt que lors de l'établissement de l'empreinte.

II.1.C Techniques d'analyse de la méthylation de l'ADN

Les techniques moléculaires utilisées pour analyser la méthylation de l'ADN ont considérablement évolué cette dernière décennie avec notamment l'arrivée du séquençage à haut débit. Si les techniques de PCR méthylation spécifique restent la référence pour détecter des anomalies de méthylation de l'ADN dans des régions connues, tout comme le pyroséquençage ou le clonage séquençage, l'analyse de la méthylation globale a connu un essor fulgurant avec l'arrivée des puces à ADN et des nouvelles approches utilisant le séquençage haut débit tel que le Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS).

Historiquement la détection de la méthylation de l'ADN repose sur trois principes : 1/ elle peut être détectée directement parce qu'elle crée ou fait disparaître un site de restriction enzymatique de l'ADN 2/ l'ADN méthylé peut être sélectionné/enrichi par immuno-précipitation avec des anticorps anti 5MeC (voir des anticorps dirigés contre des protéines reconnaissant spécifiquement l'ADN méthylé 3/ la bisulfitation de l'ADN (Figure 13) permet de « fixer » l'état de méthylation de l'ADN et le rend donc analysable par des techniques bas débit comme la PCR de méthylation spécifique (MS-PCR) ou encore par le pyroséquençage ainsi que par des technologies haut débit comme le séquençage, l'utilisation de puces dédiées ou le RRBS.

Compte tenu du nombre important de techniques publiées à ce jour, nous nous focaliserons dans ce chapitre sur les techniques les plus référencées actuellement avec notamment celles utilisées dans ce travail expérimental.

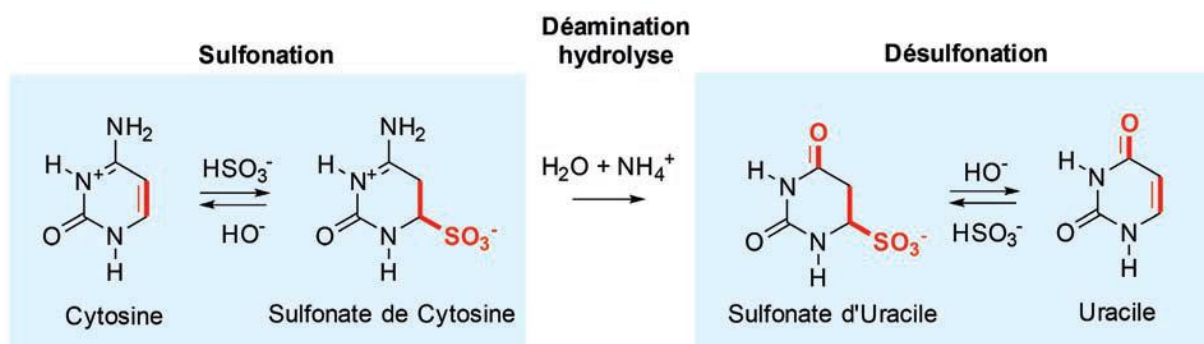


Figure 13 : Bisulfitation de l'ADN

Cette réaction enzymatique permet de convertir, par désamination hydrolytique, une cytosine (C) en uracile (U). Ainsi seules les cytosines méthylées resteront présentes après traitement au bisulfite.

II.1.C.1. Analyse de la méthylation de l'ADN sur des régions spécifiques

II.1.C.1.a Analyse par digestion enzymatique et Southern Blot

C'est une des premières techniques décrites qui est basée sur l'utilisation de deux enzymes de restriction reconnaissant le même site, l'une étant sensible à la méthylation et l'autre pas (Gicquel et al., 2005). En effet MspI a la propriété de couper l'ADN au niveau d'un site CCGG indifféremment du statut de méthylation alors que HpaII est sensible à la méthylation et ne peut couper cette séquence qu'en l'absence de cytosine méthylée. L'ADN obtenu est ensuite analysé par Southern Blot. Ainsi la comparaison des bandes obtenues après migration permet d'identifier la présence de cytosine méthylée : une différence de taille sera en faveur d'une méthylation alors qu'une taille identique indiquera l'absence de méthylation sur ce site.

Cette technique a l'avantage d'être peu coûteuse, elle est rapide et permet d'analyser un grand nombre d'échantillons. Elle a été la technique de référence dans de nombreux laboratoires de routine, notamment pour le diagnostic de pathologies liées à l'empreinte. Cependant cette technique est restreinte à un nombre très limité de CpGs localisés spécifiquement sur un site CCGG.

II.1.C.1.b MS-PCR: PCR méthylation spécifique

C'est la technique de détection de la 5meC la plus sensible analytiquement (environ 0.01%) et la plus sensible à un locus spécifique (Herman et al., 1996). Elle utilise deux paires d'amorces complémentaires de la version méthylée (M) et de la version non-méthylée (U) de l'ADN bisulfite considéré. Idéalement, ces amorces encadrent la région à interroger et ne contiennent pas de CG (mais ce n'est pas toujours réalisable). La technique est facile à mettre en œuvre, économique et spécifique de la séquence d'ADN sondée. La détection des amplicons peut se faire soit par électrophorèse en gel d'agarose, soit par MS-PCR quantitative (qMS-PCR) les amplicons sont détectés lors de leurs fusions thermiques (relargage et capture du SYBR Green lors de la fusion puis de la reconstitution des amplicons). Après bisulfitation, les amplicons M conservant le dinucléotide CG sont reconnus par une amorce GC alors que les amplicons U contenant le dinucléotide UG sont reconnus avec une amorce AG.

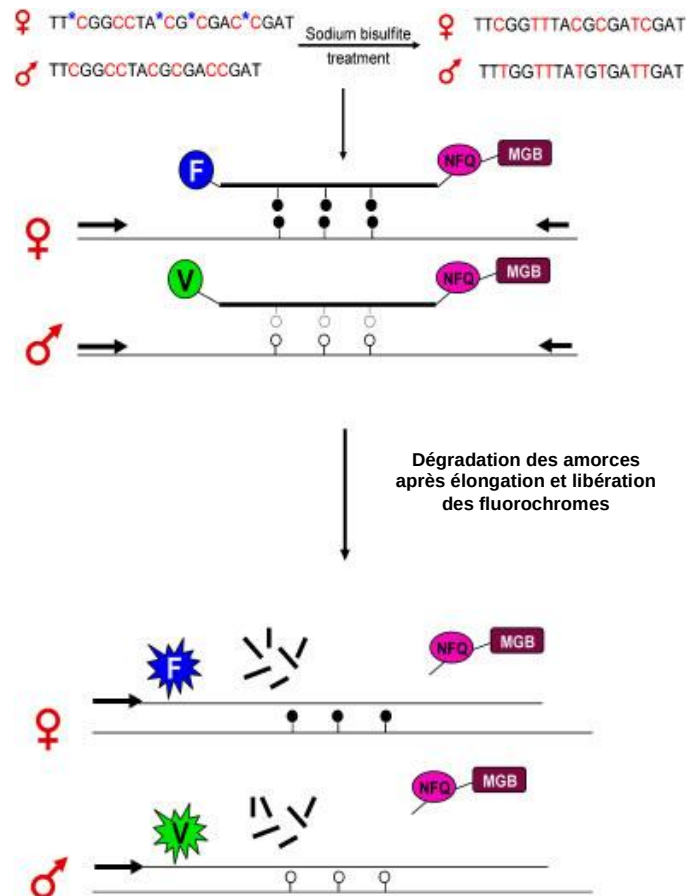


Figure 14 : Principe de l' ASMM RTQ-PCR

Après traitement au bisulfite de sodium, les 2 amorces sont couplées avec des fluorochromes différents FAM (F) et VIC (V), qui reconnaissent spécifiquement soit l'allèle méthylé soit le non méthylé. Après élongation les amorces sont dégradées et les deux fluorochromes sont alors libérés et détectés.

Cercles noirs : cytosines méthylées; cercles blancs: cytosines non méthylées; NFQ: non fluorescent quencher; MGB: minor groove binder.

Extrait d' Azzi et al, 2011.

Les amplicons U contiennent en plus des T des U et sont donc plus riches en ces bases que les amplicons M. Leur température de fusion (T_m) est moins élevée que la température de fusion des amplicons M. Seuls quelques sites CG dans environ 200 pb d'ADN sont interrogeables par chaque qMS-PCR : c'est la limite de la technologie.

Dans une autre variante de qMS-PCR, plus onéreuse : MethyLight, des sondes TaqMan reconnaissent chaque type d'amplicons U et M. La quantification des amplicons devient alors possible grâce à l'utilisation d'étalons.

II.1.C.1.c Allèle Specific methylation real time quantitative- PCR :ASM RTQ-PCR

L'ASMM RTQ-PCR a été développée par l'équipe d'Irène Netchine (Azzi et al., 2011) et permet d'allier quantification et détection allélique. En effet cette technique est basée sur l'association d'une technologie utilisant le génotypage des allèles et la sonde TaqMan couramment utilisée dans la qRT-PCR.

Un traitement au bisulfite de sodium est initialement réalisé afin d'identifier les CpG méthylés. La discrimination des 2 allèles est ensuite effectuée en utilisant 2 sondes qui reconnaissent spécifiquement l'allèle méthylé (contenant des résidus C) et l'allèle non méthylé (contenant des résidus T). Le principe de la qRT-PCR est ensuite appliqué. Cette technique a été développée spécifiquement pour l'analyse des régions spécifiques ICR1 et ICR2 de la région 11p15 dans le cadre des diagnostics des pathologies liées à l'empreinte : le SRS et le SBW.

Cette technique offre une sensibilité plus importante que le southern blot, elle est de plus, plus rapide, simple et moins onéreuse.

II.1.C.1.d Clonage-séquençage

Le principe repose sur l'isolement dans des bactéries (= clonage) des produits de PCR obtenus après amplification de l'ADN bisulfite (Zhang et al., 2009). On a ainsi dans chaque bactérie un seul fragment de PCR qu'il sera facile d'analyser après amplification par culture bactérienne. Cette analyse consiste en un séquençage du fragment inséré dans la bactérie. Par comparaison avec la séquence d'origine, il est facile de vérifier au niveau des doublets CG si le brin examiné a conservé une Cytosine (C) (donc ce site était initialement méthylé) ou si il présente une Thymine (T) (signe que ce site était déméthylé). En plus de l'information sur l'état de méthylation de tous les CG, on a également une information sur l'haplotype épigénétique, c'est à dire la répartition des doublets CG méthylés et déméthylés sur les deux allèles.

La difficulté de mise en œuvre de cette technique vient du fait que pour avoir une représentation correcte de l'état de méthylation des différentes molécules d'ADN présentes dans l'échantillon initial, il faut analyser plusieurs clones bactériens (au minimum 20, et plus on en analyse, meilleure est la représentation statistique), ce qui représente rapidement une quantité de travail très importante. De ce fait, cette technique est maintenant réservée pour un screening d'une population modérée d'individus.

II.1.C.1.e Pyroséquençage

Il s'agit d'une technologie de séquençage direct qui permet d'obtenir rapidement un profil de méthylation pour tous les doublets CG d'une région donnée (Tost and Gut, 2007). Cependant, contrairement au clonage, elle ne donne **aucune indication quant aux haplotypes de méthylation** (c'est à dire quant à la répartition des CG méthylés et déméthylés sur les deux allèles). Son **principal avantage est sa rapidité**.

Principe du Pyroséquençage

Les nucléotides ne sont pas ajoutés tous ensemble comme dans les réactions de séquence normales, mais l'un après l'autre (Figure 15). Si le nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la Polymérase, il est incorporé

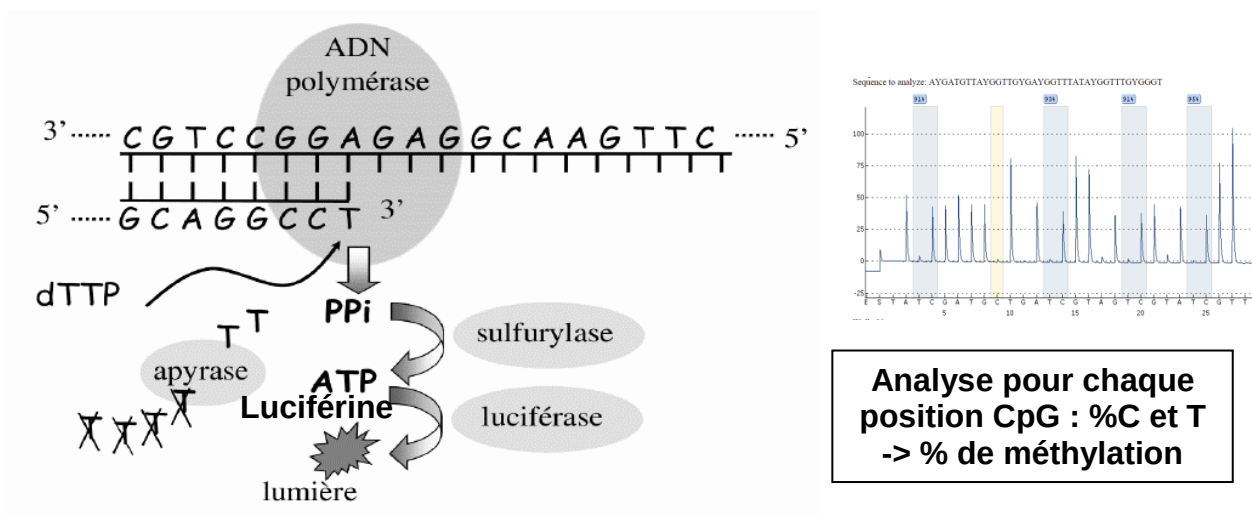


Figure 15: Principe de la technique du pyroséquençage

Réaction de néosynthèse d'un brin d'ADN par incorporation séquentielle de nucléotides, accompagnée de la libération d'un pyrophosphate induisant une émission de lumière. D'après reasearchate.net

dans le brin en cours de synthèse en libérant un PyroPhosphate. Grâce à une ATP Sulfurylase, ce pyrophosphate est transformé en ATP qui est utilisé par la luciférase pour émettre un signal lumineux. C'est ce signal qui est capté par le séquenceur qui le reproduit sous la forme d'un pic sur le Pyrogramme. La hauteur de ce pic est fonction de l'intensité du signal lumineux, **elle-même** proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés en même temps. On peut donc déduire la séquence par la taille des pics obtenus. Par ailleurs, en cas de mélange de nucléotides à une même position (polymorphisme de séquence), la taille des pics permet d'avoir une quantification de la proportion de brins porteurs de l'un ou l'autre des nucléotides.

Après traitement de l'ADN au bisulfite, l'information épigénétique est transformée en un polymorphisme génétique C ou T au niveau de chaque CG de la région. Les proportions respectives de C et de T pour chaque position peuvent donc être mesurées par pyroséquençage. C'est cette **proportion (sous forme de ratio T/C) qui reflète le pourcentage de méthylation.**

On obtient donc une mesure précise et quantitative de la proportion de CG méthylés et déméthylés pour chaque position, mesure qui repose non pas sur l'analyse de quelques brins comme dans le cas du clonage, mais sur l'ensemble des molécules d'ADN présentes initialement dans l'échantillon. Dans la mesure où cette analyse est rapide, on peut envisager de passer aisément un grand nombre d'échantillons. Il existe cependant des limites : la taille des fragments analysables ne dépasse pas en moyenne 50 - 60 nucléotides à chaque séquence et cette technique ne donne aucune information quant à la répartition de la méthylation sur les deux allèles. Par exemple, si une position est méthylée à 50%, cela peut correspondre soit à un allèle toujours méthylé et l'autre toujours déméthylé (cas des DMRs), soit à une position méthylée dans 50 % des cas sans spécificité d'allèle.

Etapas du pyroséquençage

Après traitement au bisulfite et amplification par PCR, les fragments d'ADN ciblés sont passés au pyroséquenceur (Figure 15).

Des adaptateurs vont se fixer aux extrémités des fragments d'ADN simple brin. L'un des adaptateurs contient la biotine qui se fixe à la streptavidine, elle-même fixée sur une bille. Le rapport billes/molécules d'ADN est tel que la plupart des billes ne fixent qu'une molécule de fragment d'ADN.

Après dénaturation, l'amplicon PCR monocaténaire biotinylé est isolé et s'hybride avec une amorce de séquençage. L'amorce hybride et le modèle simple brin sont

incubés avec les enzymes ADN polymérase, ATP sulfurylase, luciférase et apyrase, ainsi que les substrats adénosine 5 'phosphosulfate (APS) et luciférine. Le premier désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP) est ajouté à la réaction. L'ADN polymérase catalyse l'addition du dNTP à l'amorce de séquençage, si elle est complémentaire à la base dans le brin matrice. Chaque incorporation est accompagnée par la libération de pyrophosphate (PPi) en une quantité équimolaire à la quantité de nucléotides incorporés.

L'ATP sulfurylase convertit le PPi en ATP en présence d'APS. Cet ATP entraîne la conversion de la luciférine par la luciférase en oxyluciférine qui génère de la lumière visible en des quantités qui sont proportionnelles à la quantité d'ATP. La lumière produite dans la réaction catalysée par la luciférase est détectée par une caméra à dispositif à couplage de charge et considérée comme un pic dans la sortie de données brutes (Pyrogram). La hauteur de chaque pic (signal lumineux) est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés. (Figure 15).

II.1.C.2 Analyse globale de la méthylation de l'ADN

II.1.C.2.a Analyse de la méthylation sur puces

Après traitement au bisulfite de sodium les séquences d'ADN obtenues sont ensuite analysées grâce à une puce sur laquelle se réalise une hybridation via une amorce allèle spécifique de 50 paires de bases et d'une extension d'une seule base marquée par un fluorochrome. Lors de cette étape, chaque séquence d'ADN va se fixer sur l'amorce qui aura la séquence complémentaire.

A ce jour les deux fournisseurs de puces épigénétiques sont illumina et Agilent qui utilisent des technologies différentes. La première consiste à génotyper des single Nucleotide Polymorphism (SNP) alors que la seconde est basée sur l'utilisation de sondes de 60 bases.

Puce à ADN Illumina

Cette technologie est basée sur l'utilisation de puces couplées à des billes (bead-arrays) et permet de génotyper l'ADN génomique après traitement au bisulfite. Pour chaque site de méthylation, deux sondes spécifiques sont produites et couplées aux billes. L'une se termine par "CG" ce qui permet d'hybrider les fragments méthylés, la seconde se termine par "CA" pour l'hybridation des fragments non méthylés

(conversion des cytosines non méthylées en uracile par le bisulfite). S'il y a hybridation parfaite (sonde méthylée/ADN méthylé ou sonde non méthylée/ADN non méthylé), il y a élongation en 3' d'une seule base couplée à un fluorochrome dont la fluorescence est détectée. En cas de mismatch (sonde méthylée/ADN non méthylé ou sonde non méthylée/ADN méthylé), cette élongation n'est pas possible. Le niveau de méthylation du locus est ensuite déterminé par le ratio de fluorescence des signaux méthylés versus non méthylés.

La puce Infinium Human 450K (qui a remplacé la 27K) couvre 99 % des séquences de références des gènes (en moyenne 17 sites par gène répartis sur le promoteur ; les régions 5' et 3' non traduites ; le 1^{er} exon principalement), 96 % des îlots CpG et leurs régions flanquantes plus quelques loci de types sites CpG en dehors des îlots ou régions promotrices des miARNs.

Les avantages sont multiples : analyse simultanée de 12 échantillons par puce, faible quantité d'ADN nécessaire (0,5 à 1 µg), automatisation possible et protocole compatible avec des échantillons inclus en paraffine.

Puce à ADN Agilent

La société Agilent propose un panel plus large de produits pour les études épigénétiques sur puces à ADN. La technologie repose sur l'utilisation de puces à oligonucléotides de 60 bases produites *in situ* par dépôt des nucléotides sous forme de jet c'est-à-dire sans aucun contact. Agilent propose l'étude de la méthylation avec 2 types de lames au format 244K c'est-à-dire constituées de 244 000 sondes.

- Human CpG island microarrays : Ces puces interrogent 27 800 îlots CpG couvrant environ 20 Mb sur le génome.

-Human DNA methylation microarray : Elles sont développées pour analyser les régions promotrices des gènes (5 081 régions) en plus des 27 627 îlots CpG de la précédente puce.

Enfin, Agilent possède un outil sur internet nommé e-array qui permet à chaque laboratoire de créer des puces à façon en fonction de leurs projets (épigénétique, transcriptomique, CGH-array...) et selon tous les formats proposés par le fabricant.

De façon générale, l'utilisation des puces à ADN dans l'analyse de la méthylation a l'avantage de pouvoir intégrer les résultats obtenus avec d'autres données de type profil d'expression des gènes ou profil de miRNA.

II.1.C.2.b Etude de la méthylation par séquençage à haut débit

L'avènement du séquençage à haut débit couplé à des techniques de détection des cytosines méthylées a révolutionné l'étude de la méthylation de l'ADN ces dernières années.

Méthode de détection immunologique : MeDIP-Seq

Les anticorps spécifiques des cytosines méthylées permettent une détection par immunoprécipitation, selon une méthode appelée MeDIP (Methylated DNA ImmunoPrecipitation) (Taiwo et al., 2012). En pratique, l'ADN est fragmenté par sonication, et les fragments les plus méthylés seront les plus favorablement précipités en présence de l'anticorps, permettant d'obtenir une fraction du génome enrichie en méthylation. Couplée au séquençage à haut débit (MeDIP-seq), cette méthode permet de mesurer une densité locale de méthylation, avec une résolution d'environ 200 nucléotides correspondant à la taille moyenne des fragments obtenus à l'issue de la sonication, avec un coût raisonnable. Elle autorise une couverture complète du génome, avec cependant un biais pour les régions les plus riches en motifs CpG.

Une approche similaire, consiste à détecter des régions méthylées non pas par des anticorps mais des complexes protéiques MBD-seq (methylated binding domain sequencing).

Méthodes de détection chimique par le bisulfite : MethylC-Seq

Le traitement au bisulfite de l'échantillon d'ADN permet une lecture de la méthylation par polymorphisme nucléotidique simple (SNP) dans laquelle un T correspond à une cytosine non modifiée et un C à une cytosine méthylée sur le génome de référence avant conversion. Pour information, les techniques de détection chimique ne permettent pas la distinction entre cytosines méthylées et hydroxyméthylées mais, compte tenu de la représentation beaucoup moins importante de ces dernières (de 0,001 à 0,3 % des cytosines selon le contexte cellulaire), le taux de faux positifs reste très acceptable. Le séquençage complet de l'ADN après traitement au bisulfite, ou WGBS (Whole-Genome Bisulfite Sequencing) permet d'accéder au statut de méthylation de toutes les cytosines, représentant l'excellence de toutes les méthodes de cartographie de la méthylation génomique. Incidemment, cela équivaut à séquencer un génome dans son intégralité, avec une couverture d'au moins 30 X

pour atteindre une représentation génomique et donc une définition optimale : le coût est ainsi encore significativement élevé pour cette méthode.

II.1.C.2.c Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS)

Le RRBS est une technique de séquençage à haut débit, dérivé du WGBS (Whole Genome Bisulfite Sequencing), qui permet d'analyser le profil de méthylation de l'ADN avec une résolution à la paire de base. Cette technique combine l'utilisation d'enzyme de restriction et le séquençage haut débit de l'ADN bisulfité afin d'analyser les zones du génome riche en dinucléotides CpG. Cette technique a été développée par Meissner et al. en 2005 afin de réduire la quantité de nucléotides devant être séquencés à seulement 1% du génome, réduisant ainsi considérablement le coût et la durée du séquençage (Meissner et al., 2005). Le principe de la digestion enzymatique permet de cibler la majorité des promoteurs riches en îlots CpG, ainsi que des régions telles que des séquences répétées qui sont difficiles à designer lorsque des approches classiques de séquençage au bisulfite sont utilisées (Gu et al., 2011).

Principe du RRBS

La première étape consiste à utiliser une enzyme de restriction MspI, insensible à la méthylation, qui coupe l'ADN génomique au niveau des sites CCGG (Figure 16). Une réparation des extrémités des fragments est ensuite réalisée en ajoutant des dNTP. Des adaptateurs venant se fixer aux extrémités de chaque fragment sont ensuite incorporés et vont servir de support pour la réalisation de l'amplication par PCR (utilisation de primers spécifiques). Une migration sur gel d'agarose permet de sélectionner la taille des fragments à analyser. Un traitement au bisulfite de sodium, permet de traiter l'ADN et de convertir les cytosines non méthylées en uracile. Une seconde amplication et purification de l'ADN permet de constituer la librairie à séquencer. Le séquençage est actuellement réalisé par la méthode illumina, avec en général une lecture des 36 bases terminales. Des logiciels spécifiques sont nécessaires pour réaliser l'alignement et l'analyse car l'effet de la digestion par MspI conduit à des fragments débutant soit par un C soit par un T, induisant un biais dans la composition des bases (non randomisé) (Maq, BB Seeker, Bismark ou BSMAP).

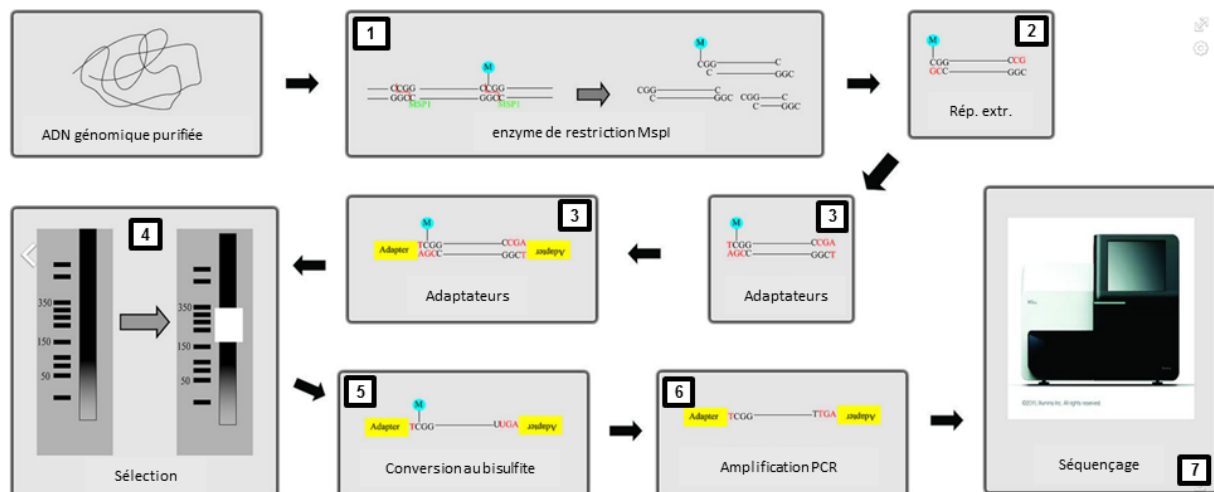


Figure 16: Principe de la technique du RRBS

1/ enzyme de restriction MspI, insensible à la méthylation, qui coupe l'ADN génomique au niveau des sites CCGG. 2/ réparation des extrémités des fragments en ajoutant des dNTP. 3/ adaptateurs se fixant aux extrémités servant de support pour l'amplication par PCR 4/ migration sur gel d'agarose : sélection des fragments à analyser. 5/ traitement au bisulfite de sodium, conversion des cytosines non méthylées en uracile. 6/ seconde amplication et purification de l'ADN permet de constituer la librairie à séquencer 7/ séquençage.

Avantages

L'utilisation d'une enzyme de restriction spécifique libérant les dinucléotides CpGs préalablement au séquençage permet de réduire la durée et le coût du séquençage. Un des avantages majeurs du RRBS est la faible quantité d'ADN (10-300ng) nécessaire qui offre la possibilité d'utiliser des échantillons précieux. De plus, cette technique permet d'explorer des zones du génome difficilement analysables par les méthodes conventionnelles de puce à ADN (illumina). C'est le cas en effet pour les régions répétées et riches en CG où le design d'étiquettes est compliqué et sous représenté dans les puces commerciales. Le recours à une enzyme de conversion permet de couvrir plus largement ces régions, et a tout son intérêt dans les études sur le développement et le cancer (Smith et al., 2009).

Limites

MspI couvre une grande partie du génome mais pas totalement et des CpGs peuvent manquer lors de l'analyse. Durant l'étape d'amplication par PCR, il est important d'utiliser une polymérase « non proofreading » dans le cas contraire la polymérase s'arrêterait à l'uracile sur le fragment simple brin (ssDNA) entraînant des erreurs lors du séquençage (Meissner et al., 2005). Le séquençage de l'ADN bisulfité est réalisé à partir d'ADN simple brin, et nécessite une dénaturation complète pour prévenir du risque de formation de double brin (dsDNA) qui limiterait considérablement l'interprétation des résultats.

Comparaisons avec d'autres techniques

Les résultats obtenus à partir de RRBS et de MethylC-seq sont très concordants (Harris et al., 2010). Evidemment la MethylC-seq présente une meilleure couverture de l'ensemble des CpGs du génome, néanmoins le RRBS offre une meilleure visibilité des îlots CpG (Harris et al., 2010). En comparaison avec la meDiP-Seq, qui utilise le principe d'immunoprécipitation des cytosines méthylées suivi d'un séquençage, le RRBS offre une meilleure résolution : au nucléotide près en alors que la meDiP-Seq est limitée à 150 paires de bases (Harris et al., 2010). Pour finir les résultats obtenus à partir de RRBS et de puce à ADN Illumina Infinium sur le niveau de méthylation de l'ADN sont fortement comparables avec un indice de corrélation de Pearson de 0.92 (Bock et al., 2010) (Figure 17).



Figure 17 : Comparaison de 4 techniques d'analyse de la méthylation de l'ADN : WGBS, MeDIP-seq, RRBS et puce à ADN 450K bead array en terme de couverture du génome, de résolution et de coût

MeDIP-seq : Methylated DNA ImmunoPrecipitation-sequencing; RRBS: Reduced representation bisulfite sequencing WGBS : whole genomenucleotide sequencing
D'après Bourc'his 2015

II.2 Modifications épigénétiques au cours de la spermatogenèse

Le spermatozoïde est une cellule hautement différenciée capable de féconder un ovocyte et de transmettre l'information génétique aux générations suivantes. Un long processus de différenciation cellulaire : la spermatogenèse, orchestré par deux étapes clefs : la méiose et la spermiogenèse, permet au spermatozoïde d'acquérir un génome haploïde hautement condensé pourvu d'un flagelle. Durant la vie fœtale les cellules germinales colonisent les tubes séminifères constituant un pool de cellules diploïdes indifférenciées appelées spermatogonies A. Après la naissance chez la souris et juste avant la puberté chez l'homme, ces spermatogonies A vont se différencier en spermatocyte primaire (ou spermatocyte I) qui ont la capacité d'entrer en méiose pour donner des spermatides rondes (cellules haploïdes). Débute ensuite la spermiogenèse processus de différenciation par lequel les spermatides rondes transcriptionnellement actives vont devenir des cellules pourvu d'un flagelle et d'un génome quasi inactif : les spermatozoïdes (Figure 18).

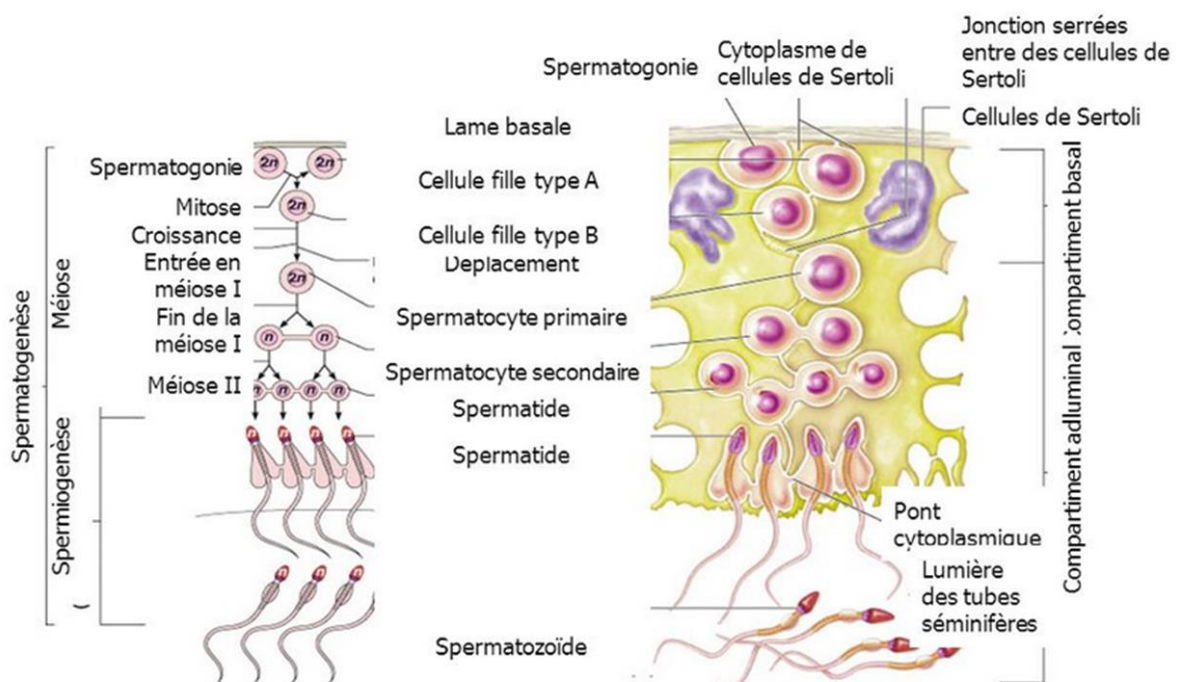


Figure 18 : La spermatogenèse

Chez l'homme, la spermatogenèse est un processus complexe de différenciation cellulaire au cours duquel a lieu la méiose et qui aboutit à la formation d'une cellule haploïde hautement spécifique : le spermatozoïde. Ce processus a lieu au sein des tubes séminifères en interaction avec les cellules de Sertoli et dure environ 64 jours.

Durant la spermatogenèse de nombreuses modifications épigénétiques vont se succéder pour aboutir à un profil épigénétique spécifique (Figure 19). Tout débute par un effacement majeur des marques épigénétiques dans les cellules germinales primordiales suivi d'une réapposition progressive, et sexe spécifique (notamment au niveau des gènes soumis à empreinte (GSE). Après la méiose, le noyau des cellules germinales mâles va être le siège d'une profonde réorganisation : acétylation des histones, intégration d'histones variants suivi d'une transition histone-protamines. De plus bien que transcriptionnellement « peu actif », le spermatozoïde possède néanmoins un stock d'ARNm et des petits ARN non-codants, certes en quantité dérisoire en comparaison à l'ovocyte mais qui pourrait jouer un rôle important durant la fécondation et les premières étapes du développement embryonnaire, en particulier lors de l'activation du génome embryonnaire.

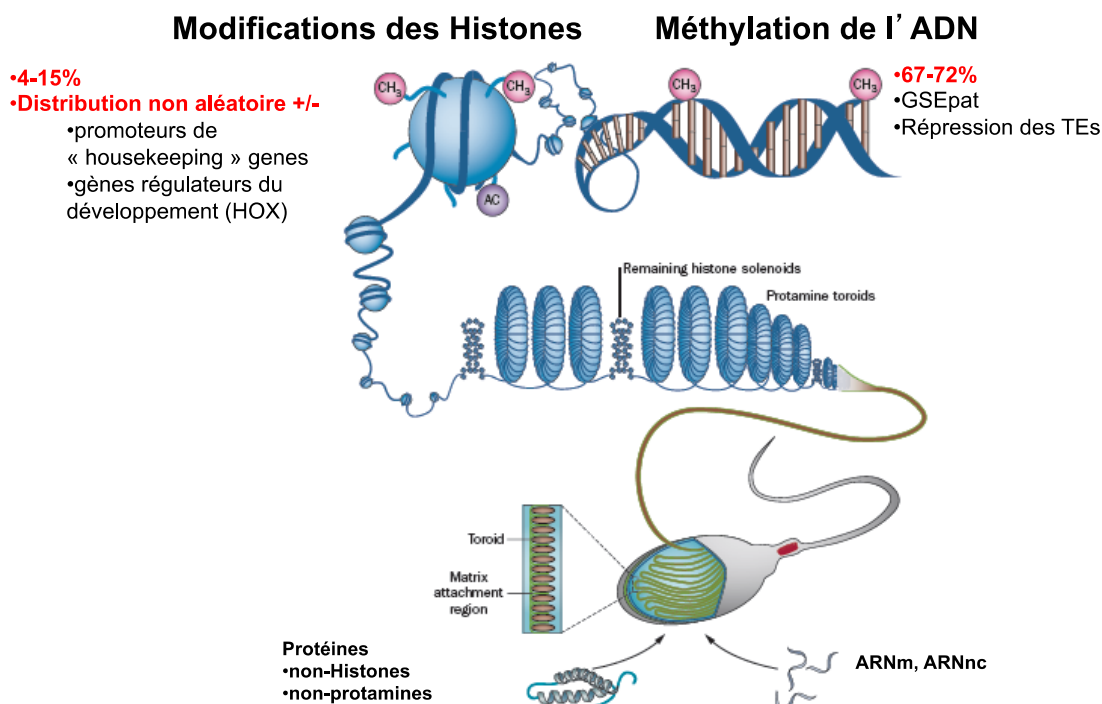


Figure 19 : Modifications épigénétiques au cours de la spermatogenèse

Modification des histones, de la méthylation de l'ADN, des petits ARN non codants (ARNnc). Adapté de Carell et al, 2012.

II.2.A Modifications de la chromatine durant la spermatogenèse

II.2.A.1 Modifications des histones

Jusqu'au stade spermatide, l'ADN est compacté autour de nucléosome. Durant la spermatogenèse, les histones nucléosomales sont remplacées par des variants d'histone, puis par des protéines de transition pour aboutir à une structure chromatinienne 6 à 10 fois plus condensée autour des protamines (Balhorn, 2007; Barral et al., 2017) (Figure 20).

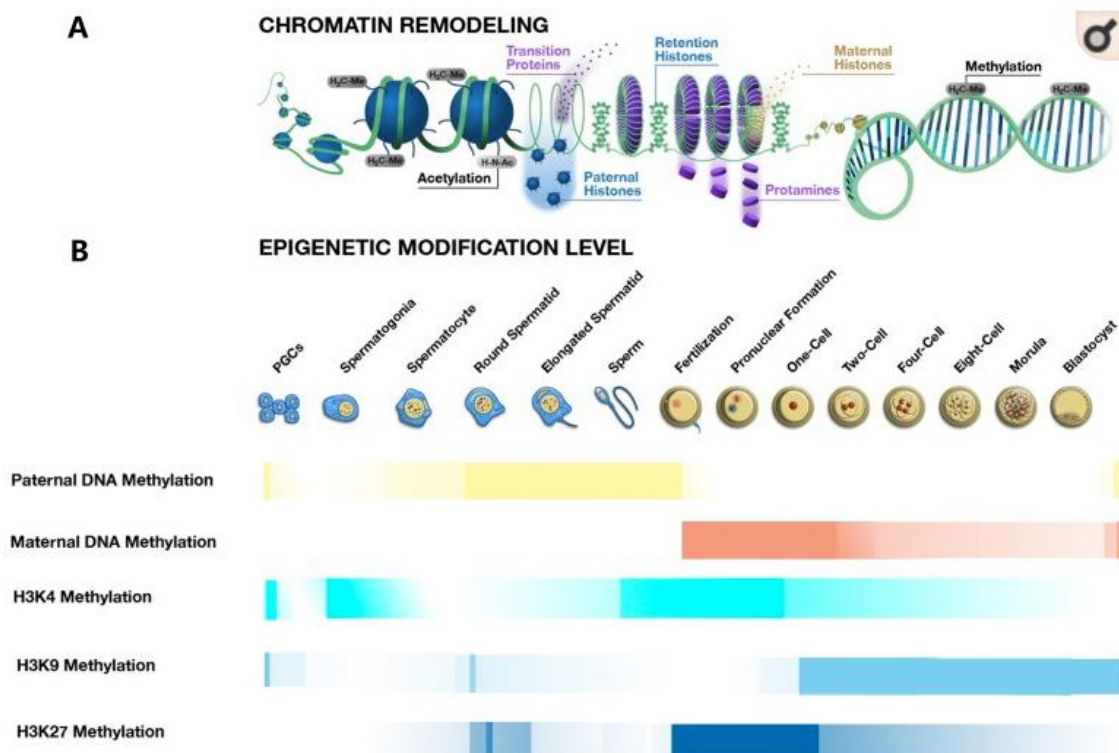


Figure 20 : Evolution des marques épigénétiques au cours de la spermatogenèse et du développement embryonnaire précoce

- Remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse puis décondensation de la chromatine après la fécondation. Durant la spermiogenèse (spermatide -> spermatozoïde) les histones sont remplacées par les protamines, seul 5% des histones sont retenues en périphérie du noyau. Après la fécondation, les histones maternelles vont remplacer les protamines.
- Transformation des principales marques épigénétiques durant la spermatogenèse. Extrait de Ge et al, 2017

Ces profonds changements chromatinien apparaissent suite à une succession de modifications biochimiques au niveau des histones. En effet initialement les histones H3 et H4 sont fortement acétylées au niveau des cellules germinales primordiales, puis une désacétylation va progressivement se produire durant le processus méiotique. Lors de l'élongation des spermatides ré-apparaît une hyperacétylation de l'histone H4 (Carrell, 2012). Celle-ci conduirait à l'ouverture de la chromatine ce qui permettrait à la topoisomérase d'agir et de créer des points de cassures facilitant ainsi la libération des histones (Hoghoughi et al., 2018; Rathke et al., 2014).

La méthylation des histones et le timing d'apposition jouent également un rôle majeur dans la différenciation cellulaire et l'efficacité de la spermatogenèse. En effet, une orchestration synchronisée de la méthylation mono-, bi-, tri-méthylée des histones H3K4, H3K9 et H3K27 est essentielle pour la progression de la spermatogenèse (Ge et al., 2017) (Figure 20). Par exemple, le niveau de méthylation de H3K4 dans les spermatogonies est un prérequis majeur pour amorcer la différenciation cellulaire afin d'obtenir des spermatocytes I. Tout comme l'acétylation, le niveau de méthylation globale des histones diminue fortement durant la méiose, cependant certaines histones vont échapper à cette vague de déméthylation et avoir un rôle prépondérant durant la méiose. C'est le cas des histones H3K9 et H3K27 qui voient leur niveau de méthylation augmenter durant la méiose (Carrell, 2012) (Figure 20).

Parallèlement à ces modifications post traductionnelles des histones, des variants d'histones, synthétisés durant la spermatogenèse et pour la plupart testicule-spécifique, vont progressivement remplacer les histones (Rathke et al., 2014). La présence de ces variants d'histones va modifier la structure de la chromatine et ainsi enclencher des processus impliqués dans l'initiation de la transcription et la réparation de l'ADN (Bao and Bedford, 2016).

II.2.A.2 Transition histones-protamines

Dans les spermatides, entre le retrait des histones et l'incorporation des protamines, près de 90% de la chromatine est constituée de protéine de transition. Il existe deux types de protéines de transition TP1 et TP2 chez les mammifères. Le rôle de chacune de ces protéines n'est pas totalement défini, mais elles interviendraient dans la relaxation de l'ADN permettant de libérer les histones, préambule nécessaire à la protamination. L'étape ultime est le remplacement par les protamines. Chez l'homme, il existe deux types de protamines P1 et P2 dont le ratio est normalement

de 0,8-1,2 (Carrell and Liu, 2001). La compaction des protamines résulte de la formation de ponts disulfure entre celles-ci créant une structure chromatinienne toroïdale près de 10 fois plus compacte (Cree et al., 2011). Cependant, cet échange n'est pas total, environ 5-15% du génome humain (seulement 2% chez la souris) est maintenu compacté autour de nucléosome composé par des histones ou des histones variants et leur répartition n'est pas aléatoire (Hammoud et al., 2009) . En effet, d'après les données établies par Hammoud et al, les régions enrichies en histones correspondraient à des loci impliqués dans le développement de l'embryon : clusters de gènes soumis à empreinte, miARNs, cluster HOX gènes, des promoteurs de gènes impliqués dans le développement et des facteurs de transcription (Erkek et al., 2013; Hammoud et al., 2009a). Pour d'autres, elles correspondraient à des régions pauvres en gènes et riches en séquences répétées (Carone et al., 2014; Samans et al., 2014). La non-concordance de ces observations pourraient être liées à différentes méthodes d'isolement des histones, particulièrement à la concentration de nucléase micrococcal (MNase) utilisée pour isoler la fraction nucléosomale (Carone et al., 2014). En effet, les nucléosomes présents en regard des promoteurs sont nettement plus résistant à la digestion par la MNase, et leur isolement nécessite une concentration élevée d'enzyme contrairement aux régions pauvres en gènes et riches en séquences répétées.

Ainsi, le rôle des ~ 5% d'histones présentes dans le spermatozoïde humain est encore largement débattu (pour revue Champroux et al., 2018) et soulève également la question du risque de transmission inter (voir trans) générationnelle via le gamète (chapitre II.7).

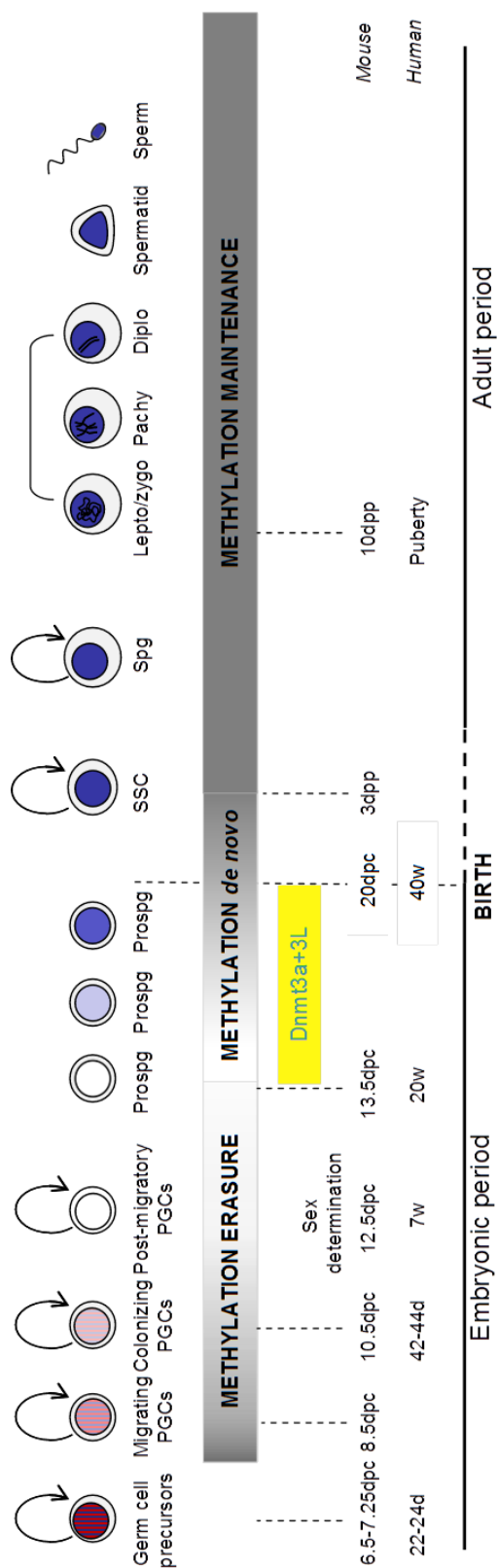


Figure 21 : Reprogrammation épigénétique durant la spermatogenèse : évolution de la méthylation de l'ADN
D'après Bourc'his D et Fauque P *Human Reproductive Genetics* 2014

II.2.B Méthylation de l'ADN et spermatogenèse

II.2.B.1 La reprogrammation épigénétique gamétique

Dans l'embryon de souris, tout commence vers 6 jours post-coïtum (jpc); une poignée de cellules prennent un destin germinale au sein de l'épiblaste proximal, sous l'impulsion de facteurs de croissance produits par l'ectoderme extra-embryonnaire avoisinant. D'une situation à la base de l'allantoïs, les cellules germinales primordiales (CGP) entrent ensuite en phase de prolifération et de migration de 8,5 à 9,5 jpc et colonisent les ébauches gonadiques entre 10,5 et 11,5 jpc. Jusqu'à ce stade, les gonades sont sexuellement indifférenciées.

A 12,5 jpc, l'expression du gène *Sry* (chromosome Y) détermine l'identité sexuelle de l'embryon : les PGC femelles entrent en méiose, alors que les CGP mâles conservent leur activité mitotique jusqu'à 14,5 jours. A ce stade, les CGP mâles arrêtent de se diviser (phase de quiescence G0/G1) et prennent le nom de prospermatogonies. L'arrêt mitotique est levé à la naissance et les prospermatogonies se différencient en cellules spermatogoniales souches (SSC), dont les divisions asymétriques produisent des cellules à capacité d'auto-renouvellement qui maintiennent la réserve de cellules précurseurs, et des cellules s'engageant dans le processus de différenciation spermatogénétique pour produire les spermatozoïdes.

L'acquisition de l'identité « germinale » s'accompagne d'une reprogrammation épigénétique intense en deux temps, tout d'abord au cours de la migration des CGP vers les gonades, puis au moment de leur arrivée dans les gonades vers 10,5 jpc (Figure 21). L'initiation de cette reprogrammation n'est pas très bien connue, néanmoins la migration est marquée par l'expression de *Blimp1*, initiateur spécifique de différenciation des cellules germinales primordiales par répression du programme « somatiques » des cellules épiblastiques. *Blimp1* (B-lymphocyte-induced maturation protein 1) interagit avec plusieurs régulateurs épigénétiques, dont notamment les histones déacétylases. D'autres facteurs transcriptionnels ont été identifiés à ce stade de différenciation : *Prdm14* et *Tcfap2c*. Le premier permettrait la réactivation de la pluripotence et le maintien du statut de méthylation des histones, le second assurerait la migration et la maintenance de la population des CGP (Magnúsdóttir et al., 2013).

A l'issue de cette reprogrammation, d'un taux de méthylation de l'ADN initial de 60 à 80 %, la cellule CGP ayant colonisé les gonades mâles atteint un niveau basal de

méthylation de 7 à 15% environ (Kagiwada et al., 2013b; Messerschmidt et al., 2014; Monk, 2015; Seisenberger et al., 2012b). Cet effacement des marques épigénétiques est à la fois lié à une perte de la maintenance, par répression de DNMTs de novo et DNMTI-cofacteur UHRF1 (effet de dilution lors de la réplication de l'ADN) (Kagiwada et al., 2013a) couplé à un phénomène actif de déméthylation régulé par le complexe enzymatique TET qui convertit la 5meC en hydroxyméthylcytosine (5hmC) (Hajkova et al., 2010). Cette relaxation est nécessaire pour activer l'expression des gènes de germinabilité et de pluripotence et concerne également les gènes soumis à empreinte (chapitre II.2.A).

Bien que la majorité du génome soit déméthylé dans les CGP, l'analyse globale du profil de méthylation du génome a révélé qu'un certain nombre de loci (4730) échappent à cette déméthylation (avec >40% 5meC) correspondant principalement à des régions riches en séquences répétées (Hackett et al., 2013; Seisenberger et al., 2012a; Tang et al., 2015) et des loci connus pour être associés à des troubles du métabolisme et du développement neurologiques (Gkoutela et al., 2015; Guo et al., 2015). C'est le cas chez la souris de IAPTR1, élément répété le plus mobile et potentiellement mutagène, qui nécessiterait d'un « silencing » durant la reprogrammation des cellules germinales (Heard et Martienssen, 2014). La raison pour laquelle ces éléments échappent à la reprogrammation n'est pas encore très claire mais ceci pourrait permettre de maintenir une certaine stabilité du génome limitant ainsi l'apparition de mutation.

Suite à cette vague de déméthylation, une reméthylation spécifique va s'effectuer au niveau des spermatogonies et des spermatocytes I, avant l'entrée en méiose (Figure 21). Ce phénomène de reméthylation se déroule majoritairement durant la vie fœtale mais ne s'achève qu'au stade pachytène dans le spermatocyte, soit après la naissance (Trasler, 2009). Cette phase de reméthylation va permettre l'établissement subséquent de marques de méthylation qui reflètent le sexe de l'individu : établissement de l'empreinte parentale (chapitre II.1.B) Ces marques différentielles parentales ont une incidence cruciale sur le développement de l'embryon, en modulant la dose des gènes concernés par expression mono-allélique (Hackett et al., 2013). Chez la souris, la réalisation d'un KO conditionnel de DNMT3A dans les cellules germinales (*de novo* DNA méthyltransférase dans les CGP) induit une apoptose de celles-ci et une perte d'empreinte paternelle (Oakes et al., 2007), un KO de DNMT3I (cofacteur de DNMT3A) est responsable d'un arrêt de la méiose au

niveau des spermatocytes par asynapsis des chromosomes ainsi que des défauts de méthylation des GSE et des éléments répétés (Oakes et al., 2007).

Chez l'homme, compte tenu des limites éthiques et d'accessibilité des cellules germinales, ce phénomène de reprogrammation est nettement moins documenté. Une première étude basée sur l'analyse de méthylation de l'ICR *H19/IGF2*, GSE paternel, révélait une déméthylation totale de ce locus dans les spermatogonies fœtales (Kerjean et al., 2000). Quant à l'analyse sélective des cellules germinales à partir de biopsie testiculaire d'hommes adultes, elle montrait des niveaux différents de méthylation de cet ICR : une méthylation incomplète des spermatogonies devenant totale dans les spermatides et les spermatozoïdes analysés. Une deuxième étude, d'analyse globale de la méthylation par l'immunohistochimie à l'aide d'anticorps 5meC, réalisée à partir de biopsies de gonades à différents stades de la vie fœtale ainsi que des biopsies testiculaires réalisées chez des enfants, montrait une augmentation progressive du niveau de méthylation au cours de la différenciation des cellules germinales (Wermann et al., 2010). De plus, l'absence de méthylation sur la DMR *MEST/PEG1* (empreinte maternelle) au niveau des spermatogonies et des spermatocytes I, observée par Kerjean et al, suggérait un mécanisme similaire d'effacement d'empreinte maternelle au cours de la spermatogenèse chez l'homme. Néanmoins si les données établies chez l'homme semblent conforter l'idée qu'il existerait comme chez la souris un phénomène d'effacement, la chronologie exacte de ces événements, notamment de la reméthylation reste encore à définir. Des données récentes établies chez le singe ouistiti vont dans ce sens (Langenstroth-Rower et al., 2017). En effet, après analyse de la méthylation globale et par pyroséquençage sur des séquences soumises à empreinte (*H19*, *LIT1*, *SNRPN*, *MEST*, *OCT4*, *MAGE-A4* et *DDX-4*), l'équipe de Langenstroth-Rower ont mis en évidence que le niveau de méthylation s'établit progressivement jusqu'à l'âge adulte dans cette espèce. Néanmoins le statut de méthylation de la séquence *alu* était totalement établi à la naissance, suggérant que sur l'ensemble du génome les séquences répétées sont fortement inactivées par la méthylation, prévenant ainsi les possibles réactivations (Langenstroth-Röwer et al., 2017).

II.2.B.2 Etat de méthylation du spermatozoïde

L'analyse globale de méthylation de l'ADN du spermatozoïde réalisé par séquençage après traitement au bisulfite révélait un haut niveau de méthylation 80% (Molaro et al., 2011) en comparaison à un ovocyte mature (55%) ou un embryon (Guo et al., 2015; Smith and Meissner, 2013). Cependant, ce degré de méthylation n'est pas uniforme, il existe des régions fortement hypométhylées, correspondant à des promoteurs de gènes impliqués dans le développement précoce de l'embryon, et qui seraient plus larges et d'un niveau de méthylation plus faible qu'elles ne le sont dans les cellules somatiques (Camprubí et al., 2017). C'est le cas de la famille des gènes HOX (gènes essentiels au développement axial de l'embryon), a contrario les promoteurs des gènes impliqués dans la pluripotence (*Oct4*, *Nanog*) sont quant à eux fortement méthylés (Ward, 2010). La relation entre ce profil de méthylation spécifique et le début du développement embryonnaire n'est pas encore très clair, mais il se pourrait que certains gènes impliqués dans le développement soient « apprêtés », c'est-à-dire hypométhylés, en vue d'une activation rapide afin d'amorcer le début du développement embryonnaire. D'autant plus que ces régions correspondraient aux rares régions du génome spermatique associées à des histones ou des variants d'histones, contrairement au reste du génome soumis au haut degré de compaction imposé par la protamination (Hammoud et al., 2009, Erkek et al., 2013).

II.2.C Petits ARN non codants et spermatogenèse

Malgré une faible quantité d'ARN dans le spermatozoïde, plusieurs classes de petits ARN non codants ont pu être identifiées. Il s'agit principalement de miARNs et de piARNs, et notamment des tARN-derived small ARNs : (tsARNs) qui sont fortement présents dans le spermatozoïde mature mais dont on connaît peu de chose à l'heure actuelle (Chen et al., 2016a; Jodar et al., 2013; Krawetz et al., 2011). D'autres classes, en quantité nettement plus faible ont pu être détectées tels que les des endogenous small interfering ARNs (siARNs), snARNs ou encore les snoARNs.

- miARNs et spermatogenèse

Les miARNs représentent la majorité des petits ARN non codants dans les cellules germinales males, et certains sont exclusivement ou préférentiellement exprimés au niveau du testicule (Kotaja, 2014). Par exemple, miR-146 est fortement exprimé dans les spermatogonies de type A chez la souris et participe au maintien du statut indifférencié des spermatogonies en modulant l'activité de l'acide rétinoïque, inducteur de la différenciation spermatogoniale (Huszar and Payne, 2013). Les miARNs interviennent également lors de la transition histone-protamine, c'est le cas de miR-469 et miR122a qui ont pour cibles certaines protéines de transition (Tp2) (Yu et al., 2005). Chez l'homme, miR-34c serait fortement exprimé durant la spermatogenèse (Krawetz et al., 2011) et impliqué à plusieurs niveaux de la différenciation spermatique, chez la souris sa présence apparaît essentielle lors de la synthèse de l'ADN du zygote ainsi que lors de la première division mitotique (Liu et al., 2012). Leur rôle semble donc crucial dans la maturation de la lignée germinale et le contrôle de la fertilité masculine mais également dans le développement embryonnaire.

- piARNs et spermatogenèse

Les piARNs ont également été isolés dans les cellules germinales chez de nombreuses espèces (Hammoud et al., 2009; Krawetz et al., 2011; Peng et al., 2012). Lors de la reprogrammation, le génome subit des vagues successives de déméthylation/reméthylation qui pourraient faciliter l'activation des éléments transposables comme : SINE, LINE, LTR and MER. Les piARNs pourraient alors les reconnaître et participer à leur inactivation. (Krawetz et al., 2011). Leur rôle dans le spermatozoïde n'est pas tout à fait clair, mais les piARNs pourraient intervenir dans la prévention de la réactivation des TE dans l'embryon (Jodar et al., 2013).

- tsARNs et spermatogenèse

La présence des tsARNs a été rapportée pour la première fois en 2012 dans des spermatozoïdes de souris après analyse par séquençage des ARN spermatiques (Chen et al., 2016a; Jodar et al., 2013; Krawetz et al., 2011). Ils dérivent essentiellement de l'extrémité 5' des tARNs (29-34 nucléotides) et seraient plus abondants que les miARNs dans le sperme. Le détail de leur biogenèse reste encore inconnue, mais l'injection de tsARNs dans l'embryon de souris modifieraient l'expression des gènes embryonnaires indiquant leur rôle potentiel au cours du

développement embryonnaire précoce (Sharma, 2015).

De plus récemment, des études ont montré que la modification de composition des petits ARNs au cours de la spermatogenèse pourrait être liée aux échanges s'établissant durant la maturation spermatique notamment au niveau de l'épididyme. En effet, il a été montré que des épидидyosomes (vésicules provenant de l'épithélium epididymaire) contiennent des petits ARNnc (Champroux et al., 2018 ; Sharma et al., 2016).

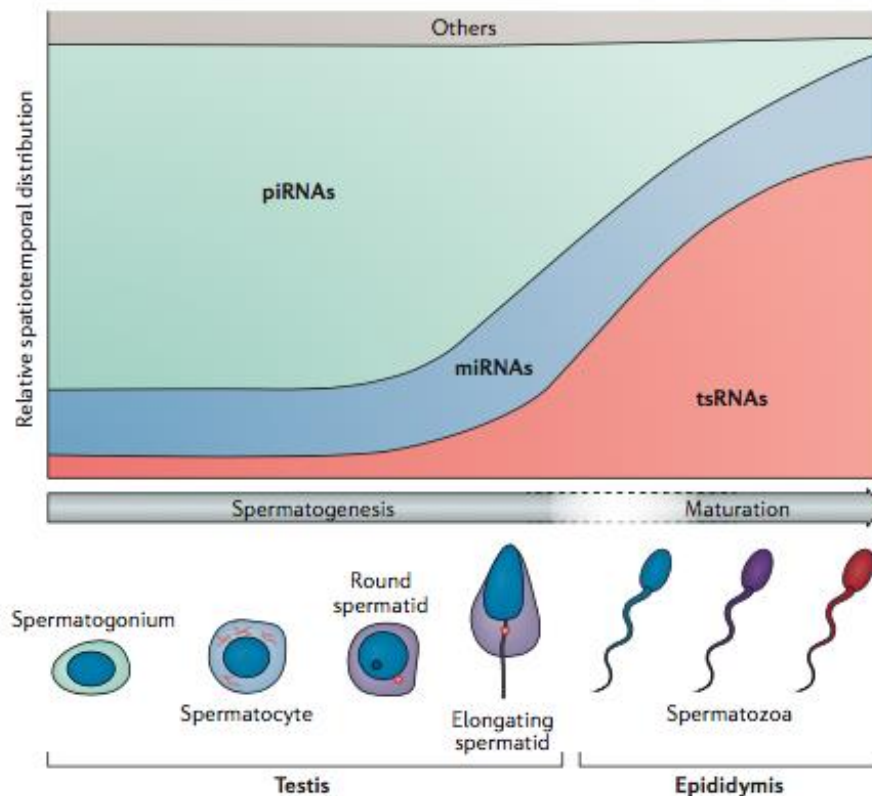


Figure 22 : Evolution spatio-temporelle des petits ARN non codants au cours de la spermatogenèse
Extrait de Chen et al, 2016a

II.3 Modifications épigénétiques durant le développement pré-implantatoire

Au sein de l'embryon, les cellules sont au départ toutes identiques, présentant la capacité de totipotence. Elles vont rapidement recevoir des signaux très orchestrés les conduisant à activer ou inactiver certains de leurs gènes pour les différencier en telle ou telle lignée cellulaire et permettre le développement de l'organisme. Des enchainements de modifications épigénétiques : méthylation de l'ADN, conformation de la chromatine, petits ARN... sont à l'origine de cette différenciation. Les mécanismes d'action commencent à être identifiés mais restent pour autant parcellaires (pour revue Hanna et al., 2018).

Chez les mammifères tout commence par une profonde reprogrammation épigénétique. Toutefois, l'état de la chromatine de chacun des deux génomes parentaux étant différent, les modifications épigénétiques qui les affectent sont asymétriques. En effet, au stade zygote, le génome paternel subit de profonds changements, les protamines sont remplacées par des histones maternelles et s'accompagne d'un profond effacement de la méthylation de l'ADN. Une déméthylation active médiée par les protéines TETs a été proposée (chapitre II.1.A.2). Le niveau de méthylation de l'ADN du génome maternel est quant à lui préservé à ce stade. De plus, les histones associées au génome paternel sont hyperacétylées, alors que la méthylation persiste sur les histones associées au génome maternel.

S'en suit, une déméthylation passive jusqu'au stade blastocyte sur les deux génomes parentaux. En effet, une autre partie de l'effacement se réalise par un mécanisme passif, résultant d'une dilution de la 5mC lors des divisions cellulaires après la fécondation (Shen et al., 2014; Wang et al., 2012), autrement dit par une dilution des marques épigénétiques lors de la réplication de l'ADN, le rétablissement de la méthylation n'est pas effectué après la synthèse de l'ADN. Cette déméthylation n'est pas totalement uniforme et des séquences spécifiques y échappent, notamment les ICRs et les séquences répétées tel que l'IAP (Smallwood et al., 2011). Ce mécanisme de résistance n'est pas totalement résolu, mais le facteur maternel CGP7 (Stella, Dppa3) pourrait prévenir le phénomène de déméthylation en se fixant sur H3K9me2, inactivant ainsi l'action de Tet3 (Wei et al., 2015). Cet état de déméthylation établit les propriétés de totipotence puis de pluripotence des cellules

embryonnaires, cellules capables de se différencier vers tous les types cellulaires d'un organisme.

A la suite de cette vague de déméthylation, une reméthylation progressive de l'ADN va se mettre en place, catalysée par les *de novo* DNA méthyltransférases DNMT3A et DNMT3B (Goll and Bestor, 2005) initiant la reprogrammation du génome embryonnaire ainsi que l'activation du génome embryonnaire. Le lien entre modifications épigénétiques et activation du génome embryonnaire n'est pas totalement élucidé.

Comme pour le niveau de méthylation de l'ADN, un profond remodelage des histones apparaît conduisant à une réorganisation progressive de la structure chromatienne, par exemple l'histone H3K4me3 doit être reprogrammée afin d'initier l'activation du génome embryonnaire et apparaît grâce à l'activité des deméthylases KDM5B et KDM1A (Zhang et al., 2015). De nouvelles techniques d'analyse des histones ATAC-seq (Assay for Transposase Accessible Chromatin with sequencing) (Wu et al., 2017) et Hi-C (Du et al., 2017) ont montré que les zygotes présentent un état chromatinien très lâche, qui se normalise progressivement en un état plus canonical au stade blastocyte.

La cinétique de reprogrammation n'est pas identique entre les espèces. En effet chez la souris, la déméthylation embryonnaire s'effectue au cours du premier cycle cellulaire, le mécanisme de reméthylation apparaissant dès le stade 2 cellules, contrairement à l'homme ou au lapin où le phénomène de déméthylation est plus long, persistant jusqu'au stade blastocyte. A partir de ce stade, la méthylation de l'ADN se réappose différenciellement entre la masse cellulaire interne et le trophectoderme ; constituant la première différenciation cellulaire.

Cette période fortement dynamique est caractérisée par un profond remodelage de la chromatine ce qui la rend très vulnérable aux perturbations environnementales.

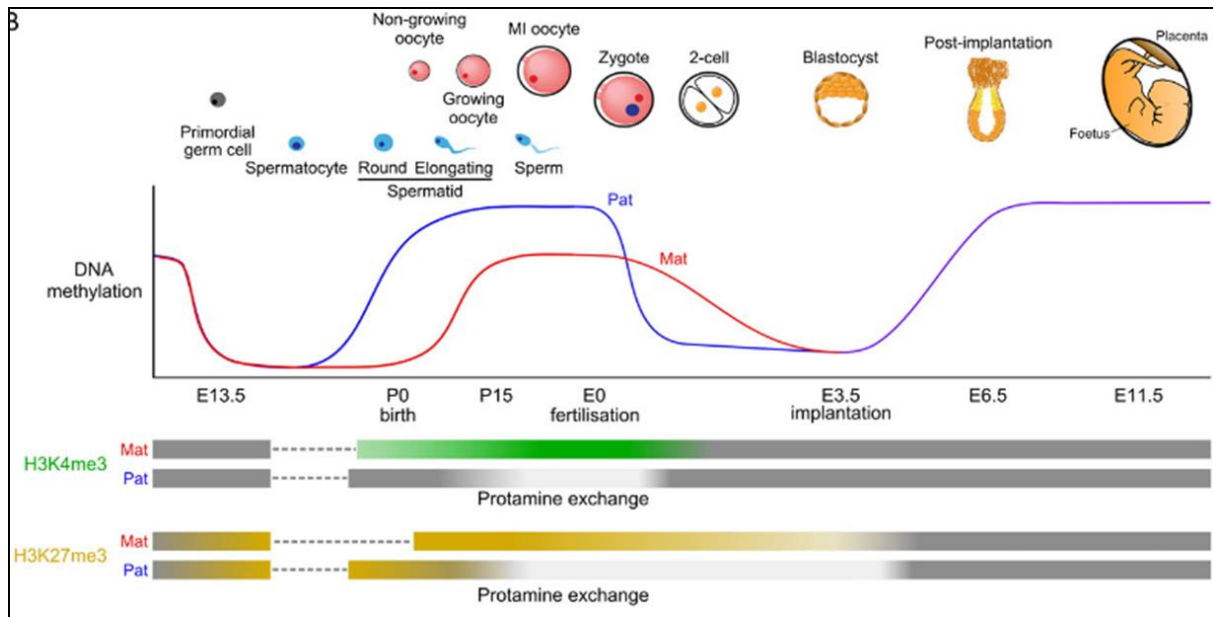


Figure 23 : Modification de la méthylation de l'ADN et des histones au cours de la gamétogenèse et du développement embryonnaire préimplantatoire chez la souris

Extrait d'Hanna et al., 2018.

II.4 Dérégulations épigénétiques spermatiques chez l'homme

Les premières observations de dérégulations épigénétiques au niveau des spermatozoïdes ont tout d'abord été constatées dans le contexte de l'infertilité masculine. Il apparaît aujourd'hui qu'il existe en effet un lien incontesté entre perturbations épigénétiques et infertilité masculine, et que chaque niveau de régulation (méthylation de l'ADN, modifications d'histones, organisation chromatinienne du spermatozoïde..) puisse être en cause (Boissonnas et al., 2013). L'origine de telle dérégulation est encore aujourd'hui peu documentée, mais semble multifactorielle et les facteurs environnementaux sont les premiers suspects. Il est difficile d'évaluer les conséquences de telle dérégulation, d'évaluer leur caractère pathologique ou non mais selon le niveau de dérégulation et la période d'apparition, ces dérégulations pourraient potentiellement impacter durablement la santé des enfants.

II.4.A Dérégulations épigénétiques et infertilité masculine

II.4.A.1 Défauts d'organisation chromatinienne et infertilité

Des cas d'infertilité masculine rattachés à des défauts de modification post traductionnelle des histones ont été décrits chez la souris et chez l'homme, c'est le cas par exemple d'une diminution du niveau de l'acétylation de l'histone H4 (Grimes and Henderson, 1984; Sassone-Corsi, 2002; Sonnack et al., 2002; Fenic et al., 2004). De plus, chez la souris, l'inhibition d'enzymes spécifiques impliquées dans les mécanismes de régulation de l'acétylation et de la méthylation des histones entraînent une infertilité des souris, une inhibition de l'activité de H3K4 méthyltransférase MII2 conduit en effet à une diminution significative du nombre de spermatocytes et un blocage de la différenciation spermatique (Glaser et al., 2009). Des défauts peuvent apparaître lors de la transition histone-protamine. Chez la souris, un KO de TP1 provoque une infertilité, bien qu'un phénomène de compensation par TP2 puisse apparaître (Shirley et al., 2004). Un ratio P1/P2 anormal et/ou un faible taux de protamines sont associés à une augmentation de la fragmentation de l'ADN, ce qui suggère qu'une condensation atypique de l'ADN serait plus exposée à des altérations de l'ADN et au stress oxydatif (Aoki et al., 2005; Torregrosa et al., 2006; Aoki et al., 2006a). De plus, l'analyse globale du génome réalisée par Hammound et al, sur la rétention des histones et le statut de méthylation

de l'ADN du sperme de 7 hommes infertiles (4 hommes présentant 1 ratio P1/P2 altéré et 3 hommes dont le développement de leurs embryons s'est arrêté lors d'une FIV) a révélé que la répartition des histones semblait d'une part non programmée chez ces patients (c'est à dire présentant une répartition randomisée) avec d'autre part une sous représentation des histones régulatrices H3K4me et H4K27me au niveau de régions impliquées dans le développement embryonnaire (facteurs de transcription, GSE) (Hammoud et al., 2009b). Des défauts de méthylation de l'ADN de promoteurs de gènes impliqués dans le développement et ceux de GSE ont également été rapportés. De plus, la réalisation de fécondation *in vitro* avec des spermatozoïdes présentant un ratio P1/P2 altéré conduirait à une diminution de la qualité embryonnaire et des taux de grossesses (Aoki et al., 2006b). Ainsi une protamination défectueuse pourrait avoir un impact nuisible sur le pouvoir fécondant du spermatozoïde et le développement de l'embryon.

II.4.A.2 Niveau de méthylation et paramètres spermatiques

De nombreuses études ont rapporté un lien entre altérations spermatiques et un défaut de méthylation de l'ADN chez l'homme (Tableau 2). Considérant l'importance de la mise en place de l'empreinte génomique durant la spermatogenèse et des conséquences potentielles en cas de dérégulation, un intérêt particulier s'est porté sur le statut de méthylation des GSE dans les spermatozoïdes d'hommes infertiles. Marques et al, a ainsi comparé le niveau de méthylation de la DMR paternelle *H19* et celle maternelle (non méthylée) de *MEST* d'hommes infertiles à des hommes fertiles (Marques et al., 2004). 25% des hommes oligozoospermiques présentaient une baisse significative du niveau de méthylation de la DMR *H19-IGF2*, associée à une corrélation entre la perte de méthylation et la diminution de la numération spermatique. Un statut anormalement méthylé de la DMR *MEST* avait été également observé chez les patients présentant une oligozoospermie. Depuis, des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs équipes comprenant l'implication d'autres GSE (Boissonnas et al., 2010; Hammoud et al., 2010; Kobayashi et al., 2007; Poplinski et al., 2010; Sato et al., 2011) ainsi que pour certaine un lien entre défaut de méthylation de la DMR *H19-IGF2* et tératozoospermie (Boissonnas et al., 2010). D'après une récente méta-analyse (Santi et al., 2017), l'infertilité masculine serait caractérisée par un risque 9 fois plus élevé d'être associée à un défaut de méthylation sur la DMR *H19-IGF2* et d'environ 5% pour *MEST* et *SNRPN* que dans les groupes contrôles. Néanmoins ces résultats sont soumis à quelques réserves,

Tableau 2 : Méthylation de l'ADN spermatique et infertilité: Overview et principaux résultats.

Références	Analyse de la méthylation	Population- Echantillons	Principaux résultats
Méthylation des GSE et paramètres spermatiques			
Marques 2004	BS 2 GSE	27 NZ hommes 43 O modéré : 1 OA, 24 OT & 18 OAT 49 O sévère : 1 OA, 23 OT & 25 OAT	corrélation hypométhylation <i>H19</i> & oligozoospermie
Marques 2008	BCS 2 GSE	5 NZ hommes 14 OAT (O+/-sévère) 6 OT (O+/-sévère)	corrélation défaut méthylation <i>H19</i> &/or <i>MEST</i> & O < 10M /ml (7/15 patients) pas corrélation avec méthylation de LINE 1
Kobayashi 2007	BCS 7 GSE	79 NZ hommes 18 O	34 patients avec défauts de méthylation spz corrélation hypométhylation <i>H19</i> & oligozoospermie
Boissonnas 2010	BPS 2 GSE	17 NZ hommes 19 T 22 O (+/- OA +/- OT)	corrélation hypométhylation <i>H19</i> & oligozoospermie & tératozoospermie
Hammoud 2010	BCS 7 GSE	5 NZ donneurs 10 OAT	corrélation défauts d'empreinte (6/7 GSE) & oligozoospermie
Poplinski 2010	BPS 2 IG	33 NZ, hommes fertiles 148 patients AMP infertiles	corrélation hypométhylation <i>H19</i> & oligozoospermie corrélation hyperméthylation <i>MEST</i> & asthénozoospermie & tératozoospermie
Sato 2011	COBRA 8 GSE	209 NZ hommes 61 O sévère 67 O modérée	Défaut de méthylation / 47 échantillons avec au moins 1 défaut d'empreinte (13,9%) (18 maternels, 18 paternels & 11 les deux)
Montjean 2013	BCS 2 GSE	294 patients AMP infertiles: -119 NZ -175 O	corrélation hypométhylation <i>H19</i> & oligozoospermie
Montjean 2015	BCS 1 GSE	92 patients AMP infertiles: -62 NZ -30 OAT	corrélation hypométhylation <i>H19</i> & oligozoospermie & mobilité corrélation inverse index fragmentation ADN & dénaturation ADN spermatique
Kuhtz 2014	DBS	-27 NZ -27 OAT	Pas corrélation méthylation ADN & morphologie spermatique
Méthylation des promoteurs des gènes impliqués dans la spermatogenèse			
Nanassy 2011	BPS	40 NZ, hommes fertiles with P1/P2 : N 32 O	corrélation hyperméthylation promoteur <i>CREM</i> & oligozoospermie pas corrélation avec mobilité & tératozoospermie
Li 2013	BCS 2 GSE 2 gènes de pluripotence	20 NZ hommes 40 patients infertiles > 2 years : ->20 A & 20 O	corrélation hyperméthylation du promoteur <i>DAZL</i> & infertilité

Khazamipour 2009	msPCR	biopsie testiculaire : 32 NOA 5 OA	corrélation hyperméthylation du promoteur <i>MTHFR</i> & NOA
Wu 2010	msPCR	54 NZ, hommes fertiles 94 hommes infertiles > 2ans : ->30 NZ & 64 O	corrélation hyperméthylation du promoteur <i>MTHFR</i> & oligozoospermie
Du 2016	-BS	-8 NZ -7 A	134 DMRs entre spz mobile d'hommes NZ et spz peu mobile d'hommes A
Méthylome & paramètres spermatiques			
Houshdaran 2007	illumina methyl-light screening 36 gènes cibles	70 patients AMP+ 1 donneur catégorisation des échantillons/ paramètres spz	corrélation défauts d'empreinte et région non soumise à empreinte, TE et altérations paramètres spermatiques
Pacheco 2011	illumina Infinium Human methylation 27K arrays	21 ART patients catégorisation des échantillons/ mobilité	Défauts de méthylation 9,189 CpG corrélation hypométhylation spz & asthénozoospermie
Krausz 2012	illumina infinium HD 450K arrays	8 NZ : 3 fractions : bon (swim-up), mauvais (swim-down)& total	Low intra & inter variabilité pour NZ
Urduingio 2015	illumina infinium HD 450K arrays	5 hommes fertiles 7 hommes infertiles	Défauts de méthylation 2752 CpGs, <-> régions spz hautement méthylées + Défauts de méthylation <i>H19-MEST-Igf2-MTHFR</i>
Jenkins 2014	illumina infinium HD 450K arrays	17 NZ donneurs fertiles (2 échantillons collectés 9-19 années d'écart)	Effet de l'âge / méthylation globale spz 117 gènes associés à des altérations de méthylation
Jenkins 2016	illumina infinium HD 450K arrays	27 hommes fertiles (<2 mois) 29 hommes infertiles (>12 mois)	2 hypométhylation & 3 hyperméthylation régions associées à la fertilité Corrélation diminution methylation HSPA1L and HSPA1B & infertilité

A : asthénozoospermie ; AMP : assistance médicale à la procréation ; BCS : bisulfite-clonage séquençage ; BQE : bonne qualité embryonnaire ; BPS : bisulfite pyroséquençage ; BS : bisulfite sequençag ; DBS : depp bisulfite sequençage ; DMR : Differencial methylated region ; GSE : gène soumis à empreinte ; MQE : mauvaise qualité embryonnaire ; N : normozoospermie ; NOA : non obstructive azoospermie ; NZ : normozoospermique ; O : oligozoospermie ; OA : obstructive azoospermie ; OAT : oligoasthénéo-tératozoospermique ; PN : poids de naissance ; Spz : spermatozoïde ; T : Tératozoospermique ; TA : taux d'accouchement ; TI : taux d'implantation ; TF : taux de fécondation ; TFC : taux de fausse-couche ; TG : taux de grossesse

l'inclusion des études ne tenant pas compte des méthodes d'analyse de la méthylation de l'ADN et des types d'infertilité (variabilité de l'altération spermatique, infertilité idiopathique..).

D'autres études se sont portées sur le niveau de méthylation des promoteurs de gènes impliqués dans la spermatogenèse. Des altérations de méthylation des promoteurs de *DAZL* et *CREM* ont ainsi été rapportées chez des patients présentant une OAT. De plus une hyperméthylation du promoteur du gène méthylène-tetrahydro-folate reductase (*MTHFR*), gène codant pour une enzyme clef dans la voie des folates et indispensable dans les processus de méthylation, a été retrouvé dans 53% de cas d'azoospermie non obstructive (Khazamipour et al., 2009) et certains cas d'infertilité inexpliquée (Houshdaran et al., 2007; Pacheco et al., 2011; Wu et al., 2010).

L'émergence des nouvelles technologies d'analyse de la méthylation de l'ADN a permis d'étudier ces potentielles altérations sur l'ensemble du génome. Des modifications du statut de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes ont ainsi été identifiées à la fois au niveau des GSE, des régions non soumises à empreinte ainsi que sur des séquences répétées chez des patients infertiles présentant des altérations spermatiques (Houshdaran et al., 2007; Pacheco et al., 2011). Néanmoins cette association n'a pas été retrouvée au sein d'une population d'hommes normozoospermiques en comparant les fractions « swim-up et swim-down, suggérant une faible variabilité intra et inter individuelle au sein de sperme d'hommes normozoospermiques (Krausz et al., 2012). Plus récemment et afin de déterminer si l'infertilité idiopathique pourrait être liée à un défaut de méthylation de l'ADN spermatique, une étude a comparé le méthylome d'hommes normozoospermiques fertiles et infertiles (Urdinguio et al., 2015a). Cette étude a mis en évidence 2752 CpG présentant un profil de méthylation altéré, et fait important, correspondant à des CpGs spécifiquement hyperméthylés dans les spermatozoïdes (en comparaison aux cellules somatiques). Dans leur analyse, Jenkins et al ont quant à eux mis en évidence une forte association entre altération du niveau de méthylation de 2 régions *HSPA1L* et *HSPA1B* et l'infertilité masculine (infertilité idiopathique supérieure à 12 mois) ouvrant la porte à de potentiels marqueurs épigénétiques de l'infertilité (Jenkins et al., 2016a).

II.4.A.3 Petits ARN non codants et infertilité

Un autre niveau de régulation pourrait être impliqué dans la survenue de l'infertilité masculine : les petits ARN non codants. Ils jouent un rôle crucial dans la maturation spermatique et la fertilité masculine, et des dérégulations de 7 miARNs (miR34c-5p, miR-122, miR-146b-5p, miR-181a, miR-374b, miR-509-5p, miR513a-5p) ont été identifiés dans l'infertilité masculine notamment dans des cas d'azoospermie et d'asthénozoospermie (Kotaja, 2014). Par exemple, miR-122 qui est impliqué dans la régulation post transcriptionnelle des protéines de transition TP2 en ciblant la région 3' de l'ARNm dans les spermatides rondes, leur sous expression est associée à des cas d'oligozoospermie et d'oligo-asthénozoospermie (Abu-Halima et al., 2013). De même, il a été montré qu'une altération des protéines impliquées dans le processus de synthèse des petits ARN aura de sévères répercussions sur la différenciation des spermatozoïdes. Une inhibition de Dicer dans les cellules de Sertoli s'accompagne d'une absence de spermatozoïde et d'une atrophie testiculaire, le KO conditionnel du gène *miwi* entraîne un arrêt de la différenciation spermatique (Papaioannou et al., 2009). De plus l'inactivation simultanée de miR43b/c et miR-449 entrainerait un dysmorphisme sexuel associé à un retard de croissance et une infertilité (Yuan et al., 2015).

Du fait de leur localisation nucléaire et leur probable implication dans la régulation de la conformation chromatinienne, des dérégulations de long ARN non codants pourraient également être en cause dans certaine forme d'infertilité. En effet il a été rapporté que le long ARN non codant : HOTAIR pouvait réduire l'acétylation de l'histone H4 au niveau du promoteur de *Nrf2* et par conséquent diminuer l'expression de *Nrf2* qui est associée à une altération des paramètres spermatiques tel que l'asthénozoospermie et l'oligo-asthénozoospermie (Zhang et al., 2015).

II.4.B Dérégulations épigénétiques spermatiques et facteurs environnementaux

Plus récemment des études ont montré que certains facteurs environnementaux modifieraient le profil épigénétique des spermatozoïdes. En effet, les spermatozoïdes d'hommes obèses ou de fumeurs présenteraient des modifications du niveau de méthylation de l'ADN (Jenkins et al., 2017; Soubry et al., 2016). De même la consommation d'alcool (Finegersh et al., 2015) ou une forte supplémentation vitaminique en folate entraînent des perturbations de la méthylation de l'ADN spermatique (Aarabi et al., 2015), bien que ce ne soit pas le cas avec des doses classiquement utilisées (Chan et al., 2017). De plus, un effet de l'âge a également été rapporté (Jenkins et al., 2014). En comparant le méthylome de sperme de 17 hommes fertiles à un intervalle allant de 9 à 19 ans, l'équipe de Jenkins a pu identifier 139 régions hypométhylées et 8 hyperméthylées à un âge paternel avancé, suggérant que certaines modifications puissent être mémorisées par les cellules germinales. De plus, une étude récente a rapportée pour la première fois une corrélation directe entre le taux de POP (persistent of organics pollutants) présents dans le sang et le niveau de méthylation spermatique chez l'homme, suggérant l'impact de perturbateurs endocriniens sur la régulation épigénétique spermatique (Soubry et al., 2017). L'impact environnemental semble indéniable néanmoins une question fondamentale demeure, comment distinguer dérégulation et variabilité épigénétique ? Car en effet si les variabilités inter et intra individuelles semblent tout à fait stables (Dere et al., 2016), une empreinte géographique semble toutefois exister (Consales et al., 2014). Une des difficultés actuelles réside donc dans l'interprétation des résultats.

Si certaines de ces changements semblent réversibles à l'âge adulte, leurs survenues durant le développement à des périodes de profondes reprogrammations épigénétiques semblent quant à elles très propices à l'apparition de dérégulations épigénétiques (ou épimutation). C'est ce qui est largement décrit chez l'animal, où l'exposition *in utero* à des perturbateurs endocriniens, tel que la vinclozolin, composé anti-androgénique et fongicide, ou le méthoxychlore, un composé oestrogénique et utilisé comme pesticide ou encore le cyclophosphamide, agent anti-cancéreux et immunosuppresseur présentent tous des effets sur la fonction de reproduction et sur les marques épigénétiques : méthylation de l'ADN, modifications post-traductionnelles des histones altérant à la fois la spermatogenèse et le profil de méthylation des GSE chez les souriceaux des générations suivantes, pouvant aller

selon les auteurs jusqu'aux générations F3-F4 (Guerrero-Bosagna et al., 2012; Manikkam et al., 2012, 2013, 2014; Radford et al., 2012; Skinner et al., 2013) (revue chapitre II.7).

II.5 Origines des dérégulations épigénétiques spermatiques

II.5.A Le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS)

II.5.A.1 Epidémiologie et données cliniques du TDS

Depuis plusieurs décennies, nous observons dans les pays industrialisés une diminution des paramètres spermatiques, notamment du nombre de spermatozoïdes, ce qui pourrait expliquer l'augmentation des cas d'infertilité actuellement observés (Carlsen et al., 1992; Swan et al., 2000). La publication de Skakkebaeck et Carlsen en 1992 a été un véritable détonateur dans la communauté scientifique. En effet, basée sur 61 articles publiés de 1938 à 1990 concernant 14 947 hommes en bonne santé, issus de tous les continents, cette première méta-analyse concluait à une baisse de plus de 50% de la fertilité en cinquante ans (Carlsen et al., 1992). Depuis l'hypothèse du déclin de la fertilité ne cesse d'être alimentée à la fois dans les pays développés et depuis peu dans les pays émergents (Feki et al., 2009; Haimov-Kochman et al., 2012; Jouannet et al., 2001; Levine et al., 2017) (Figure 24).

De plus la réalisation d'études prospectives multicentriques a permis d'identifier des variabilités géographiques en Europe et aux Etats-Unis (Auger et al., 2001; Jørgensen et al., 2001; Swan et al., 2003). Des différences sur le nombre total de spermatozoïdes ont été observées entre des pays européens (1082 recueils de partenaires de femmes enceintes) notamment entre la Finlande et les Pays-Bas (Jørgensen et al., 2001), ainsi qu'aux Etats-Unis (763 recueils de partenaires de femmes enceintes) avec une baisse plus importante de la concentration, du nombre total et de la mobilité des spermatozoïdes d'hommes fertiles dans des zones semi-rurales et agricoles en comparaison aux zones urbaines ou moins exposées à l'agriculture (Redmon et al., 2013; Swan et al., 2003). Il existe donc des arguments solides en faveur d'une variabilité géographique de la production de spermatozoïdes. Ces différences ne peuvent, semble-t-il, pas être expliquée par des différences

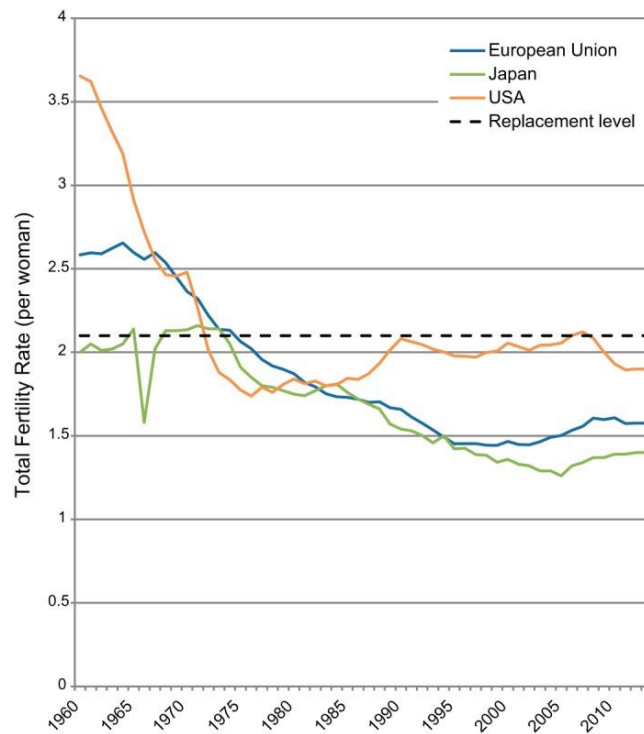


Figure 24 : Evolution de la fertilité dans les pays développés
d'après Skakkebaeck 2016.

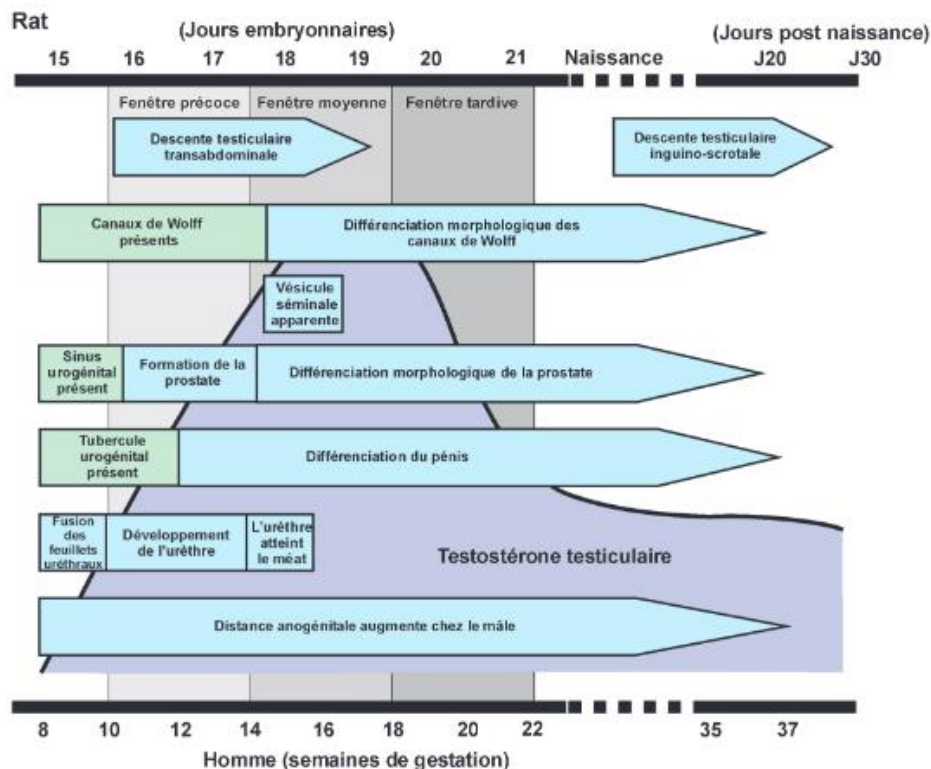


Figure 25 : Fenêtre de masculinisation au cours du développement fœtal chez le rat et l'homme

Chez le fœtus humain, la fenêtre se situe entre 8 et 14 semaines de gestation, au moment de l'augmentation de la production de testostérone. Cette fenêtre est fondamentale pour le développement et la masculinisation de l'appareil génital interne et externe.
D'après Welsh et al. 2008.

génétiques, les populations étudiées étant relativement homogènes de ce point de vue. On peut suspecter plus probablement l'influence de facteurs environnementaux sur le fonctionnement de l'appareil génital.

Les altérations de la production des spermatozoïdes ne sont pas les seules modifications de la fonction génitale de l'homme dont l'incidence semble avoir augmentée au cours des dernières décennies. Une augmentation similaire de l'incidence de cryptorchidies, d'hypospadias ainsi qu'une diminution du taux de testostérone s'observe dans les pays développés (Skakkebaek et al., 2016). De plus, si le cancer du testicule ne représente que 1% des cancers de l'ensemble des cancers il n'en demeure pas moins le plus fréquent de l'homme jeune et son incidence tend à augmenter régulièrement depuis plusieurs décennies dans les pays développés, que ce soit les séminomes ou les tumeur non séminomateuses (Skakkebaek et al., 2016).

II.5.A.2 Origine fœtale du TDS

L'augmentation de l'incidence d'anomalies de l'appareil génital masculin a conduit Skakkebaek et ses collaborateurs à évoquer l'hypothèse d'une entité commune permettant d'expliquer ce phénomène de « syndrome de dysgénésie testiculaire » (Skakkebaek et al., 2001). Selon ce concept toutes les anomalies observées pourraient être la conséquence d'un développement anormal des testicules avant la naissance ou durant la période prépubertaire. L'hypothèse d'une origine fœtale s'appuie sur différents arguments et notamment sur le fait que les deux grandes fonctions du testicule, la gamétogenèse et la stéroïdogénèse, prennent place au cours de la vie fœtale. En effet, le développement des organes génitaux internes et externes se fait à partir de la 8^{ème} semaine de gestation chez l'homme sous le contrôle de la testostérone (Welsh et al., 2008) (Figure 25).

Ainsi, l'altération de la production des androgènes fœtaux expliquerait à la fois l'apparition des cas d'hypospadias et de cryptorchidie à la naissance. Ceci a largement été confirmé expérimentalement chez les rongeurs, où la diminution de la production de testostérone entraîne à la fois hypospadias et cryptorchidie, ainsi qu'une diminution de la production spermatique (Skakkebaek et al, 2001 ; 2016).

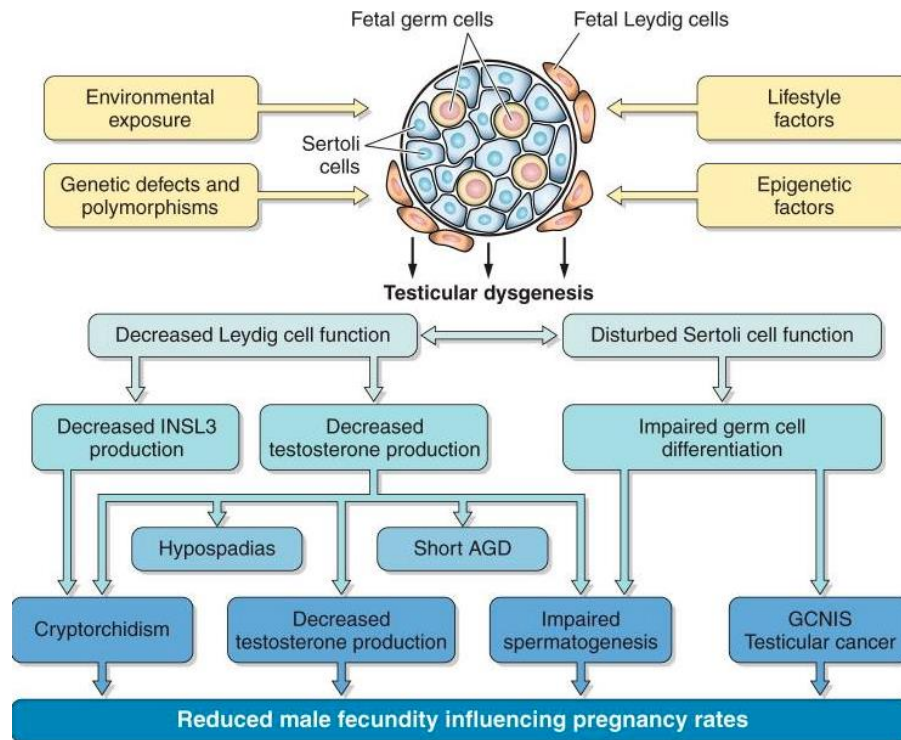


Figure 26 : Syndrome de dysgénésie testiculaire d'après l'hypothèse de Skakkebaeck

Extrait de Skakkebaeck 2016.

II.5.A.3 Tumeur germinale testiculaire

II.5.A.3.a Epidémiologie

Les tumeurs germinales du testicule sont des tumeurs peu fréquentes, avec une incidence estimée de 6 à 11 pour 100 000 hommes en Europe, soit 1000 à 1500 nouveaux cas diagnostiqués par an en France. Néanmoins, elles constituent les tumeurs malignes les plus fréquentes de l'homme jeune (60%), pour une gamme d'âge de 15 à 40 ans (Gilbert et al., 2011; Oosterhuis and Looijenga, 2005; Rajpert-De Meyts et al., 2015). De plus, on observe une augmentation constante de l'incidence des tumeurs testiculaires germinales au cours des dernières décennies notamment en Europe. En France, on observe une élévation de 2,5% par an du nombre de cas de tumeurs testiculaires sur la période 1980-2005. (Figure 27). D'après Mc Glynn, cette élévation ne peut être expliquée ni par un vieillissement de la population, ni par une évolution des pratiques de dépistage (Mc Glynn et al., 2012). En revanche, l'augmentation du nombre de cas de cancers testiculaires germinaux a été corrélée à l'exposition *in utero* de plus en plus importante à des facteurs environnementaux (de type perturbateur endocrinien), au même titre que la réduction de la numération de spermatozoïdes et de la fertilité masculine observées actuellement (Skakkebaek et al., 2016). Les cancers testiculaires germinaux pourraient donc être la conséquence d'une dérégulation précoce sur la production de cellules germinales et le reflet de la détérioration de la reproduction chez l'homme (Le Cornet et al., 2014; Skakkebaek et al., 2001).

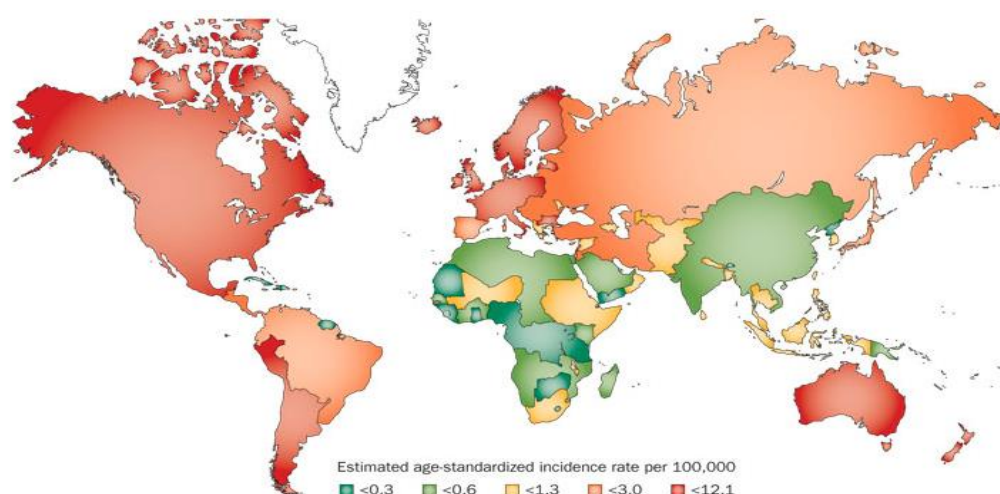


Figure 27 : Représentation mondiale de l'incidence du cancer testiculaire
d'après Mc Glynn, 2012.

II.5.A.3.b Histopathogénécité des tumeurs germinales testiculaires

On peut distinguer deux grands types de tumeurs germinales testiculaires définies en 2004 par la World Health Organization (Williamson et al., 2017) à partir de leurs caractéristiques épidémiologiques et histologiques: 1) les tumeurs séminomateuses ou seminomes, dont la composante cellulaire ressemble à des cellules germinales fœtales, et 2) les tumeurs non-séminomateuses, qui montrent des caractéristiques de cellules somatiques embryonnaires (carcinome ou tératome embryonnaire) et/ou extra- embryonnaires (choriocarcinome vitellin).

Les séminomes purs représentent 50% des cas, les tumeurs non-séminomateuses 30%, et le reste est constitué de tumeurs mixtes. Tous les cancers germinaux proviennent d'un précurseur commun appelé maintenant « néoplasie in situ des cellules germinales » (nouveau terme proposé par la World Health Organization, « germ cell neoplasia in situ » (GCNIS), anciennement appelé «carcinome in situ » (CIS)) (Rajpert-De Meyts et al., 2015).

L'hypothèse établie par Skakkebaeck, et selon laquelle les GCNIS résulteraient d'une anomalie de la différenciation des cellules germinales fœtales (plus particulièrement des gonocytes), est soutenue par deux arguments majeurs (Figure 28). Premièrement, des cas de GCNIS ont été détectés dans les testicules de nouveaux nés, suggérant leur formation à un stade encore plus précoce, c'est à dire durant la vie fœtale (Rajpert-De Meyts et al., 1998). Deuxièmement, de plus en plus d'études montrent une similitude entre les cellules qui composent les GCNIS et les gonocytes fœtaux (Skakkebaek et al. 2016 ; Dieckmann and Skakkebaek, 1999). En effet, au-delà d'un aspect morphologique proche de celui des gonocytes (Skakkebaek et al., 1987), les CGNIS expriment des marqueurs moléculaires caractéristiques des CGP et des gonocytes (alors qu'ils sont absents des cellules germinales adultes) tel que c-KIT, OCT3/4 et NANOG, la protéine AP-2 γ (Rajpert-De Meyts et al., 2015; Sonne et al., 2009a). Enfin, Almstrup et collaborateurs se sont intéressés au profil épigénétique de ces deux populations cellulaires et rapportent de grandes similitudes entre les GCNIS et les gonocytes, très différents des cellules germinales de l'adulte (Almstrup et al., 2010).

II.5.A.3.c Etiologie des tumeurs testiculaires

Il est clairement établi qu'il existe une prédisposition génétique dans la survenue des cancers testiculaires telle que l'amplification de certaines zones chromosomiques et plus particulièrement la région du bras court du chromosome 12, qui contient les gènes NANOG, STELLAR et GDF3 (pour revue Skakkebaeck et al, 2016). Toutefois et comme pour le TDS, la part environnementale, notamment les perturbateurs endocriniens, est fortement suspectée dans l'augmentation de l'incidence des tumeurs testiculaires.

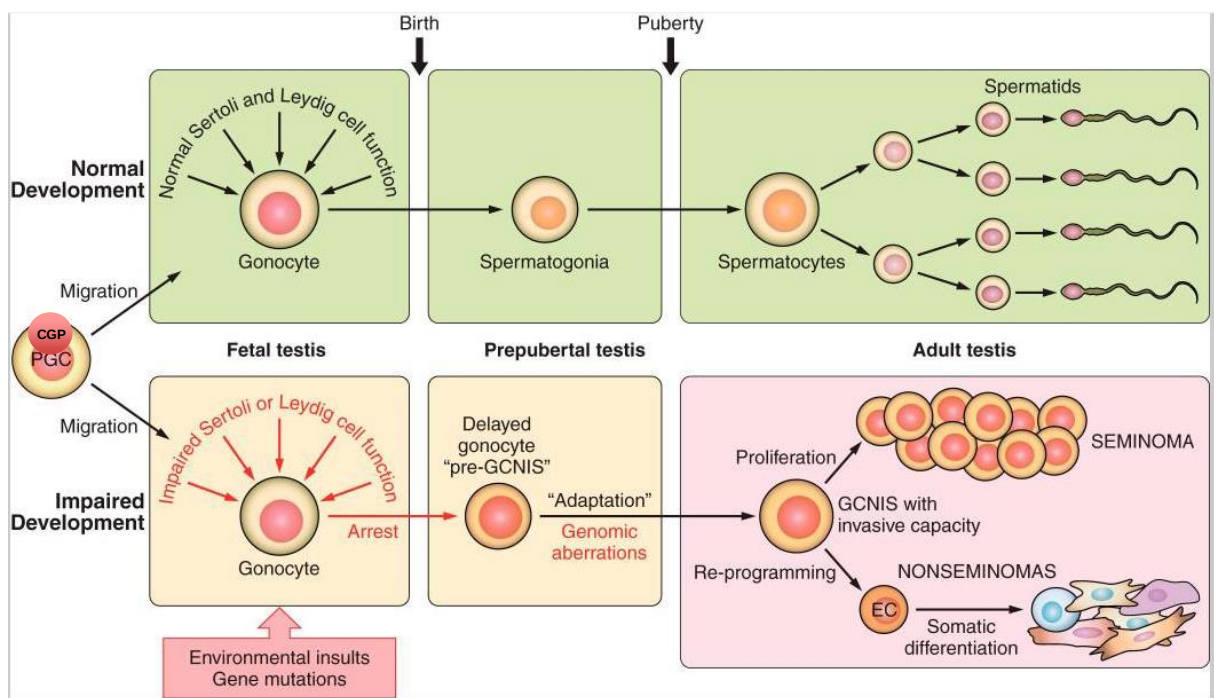


Figure 28 : Histopathogénicité des tumeurs germinales d'après l'hypothèse de Skakkebaeck
D'après Skakkebaeck 2016.

II.5.B Les perturbateurs endocriniens

Ces substances sont présentes dans notre environnement, notre nourriture et interfèrent dans la biosynthèse, le métabolisme ou bien l'action des hormones.

On dénombre aujourd'hui une centaine de molécules identifiées comme perturbateur endocrinien (PE) et plus de 1000 sont suspectées de l'être, présentes dans l'environnement, naturelles ou synthétisées par l'homme comme les bouteilles en plastique, les boîtes de conserves, les détergents, les cosmétiques, les jouets, les pesticides... Chez l'homme, de plus en plus d'études mettent en évidence les effets délétères des perturbateurs endocriniens sur la santé humaine : baisse de la fertilité, augmentation du risque d'obésité, de diabète, d'endométriose et augmentation du risque de cancers (Latini et al., 2010; Sweeney et al., 2015) (Tableau 3).

La reproduction est particulièrement vulnérable aux perturbateurs endocriniens, car sous l'influence d'une interaction hormonale hautement régulée entre les organes, et dépendante des doses d'hormones, du timing et du stade de développement. Les PE peuvent agir comme agonistes ou antagonistes des hormones sexuelles (œstrogènes ou androgènes) et ce à tous les stades du développement notamment durant la période fœtale. Deux grands modes d'action ont été proposés pour les anti-androgènes. Certains ont directement une activité antagoniste au niveau du récepteur et d'autres perturbent la synthèse et/ou le métabolisme des androgènes. Par exemple, certains phtalates peuvent inhiber la synthèse d'androgènes des cellules de Leydig fœtales de rats (Parks et al., 2000). Cet effet s'accompagne de malformation de l'épididyme, d'hypospadias, de la persistance de tétines (auréoles de structures mammaires) et d'une diminution de la distance anogénitale.

Chez le mâle, il semble exister de grande ressemblance entre l'effet des œstrogènes et celui des substances anti-androgéniques peut-être du fait que les œstrogènes peuvent diminuer le taux de récepteur aux androgènes (Sharpe et al., 2003; Williams et al., 2001). De plus, les œstrogènes peuvent inhiber l'expression de l'*INSL3*, qui permet la descente testiculaire. Ainsi l'action des perturbateurs endocriniens durant la période critique du développement fœtal correspondant à la morphogenèse testiculaire conduirait au syndrome de dysgénésie testiculaire.

Les données obtenues chez l'animal sont en effet peu rassurantes. Une relation entre perturbateurs endocriniens et apparition de dérégulations épigénétiques a été

Tableau 3: Principaux effets transgénérationnels décrits dans la littérature adapté de Nilsson et al, 2018

Exposition	Effets sur le phénotype	Références
<i>Toxiques</i>		
Vinclozoline	altération fertilité chez male, atteintes prostatique et rénale, tumeurs, pathologies immune et reproduction	Anway et al, 2005; 2006; Jirtle et Skinner, 2007
Méthoxychlore	altération fertilité chez male, atteinte rénale, pathologies ovariennes et obésité	Anway et al, 2005; Mannikkam et al, 2014
Permethrine /DEET	atteintes prostatique et rénale	Mannikkam et al, 2012
Dioxine	atteintes prostatique et rénale, infertilité, impact négatif sur les issues de grossesse	Mannikkam et al, 2012; Bruner-Tran et al, 2011
BPA/phtalates (jet fuel)	atteintes prostatique et rénale et obésité	Mannikkam et al, 2013
mix hydrocarbures	atteintes prostatique et rénale, obésité, pathologies immunes et reproduction	Tracey et al, 2013
Vinclozoline, Permethrine /DEET, plastiques, Dioxine, jet fuel	OPK, IOP	Mannikkam et al, 2012
DDT	obésité	Skinner et al, 2013
phtalate	altération organisation cellules germinales / testicule	Doyle et al, 2013
phtalate	altération fonction ovarienne	
Tributylène	augmentation tissu adipeux	Chamorro-Garcia et al, 2013
BPA	altération fertilité, troubles cardiaques	Lombo et al, 2015
BPA	trouble du comportement, altération expression gènes neuronales	Wolstenholme et al, 2012
Atrazine	atteinte testiculaire, puberté précoce	McBirney et al, 2017
Benzo(a)pyrene	déficits comportementaux et physiologiques	Knecht et al, 2017
Mercure	changements comportementaux	Carvan et al, 2017
<i>Autres expositions</i>		
restriction calorique	mortalité cardio-vasculaire	Veenendaal et al, 2006
régime hyperlipidimique	augmentation BMI, résistance à l'insuline, augmentation cancer du sein	Masuyama et al, 2015; Nguyen et al, 2017
stress	diminution des relations sociales, augmentation anxiété	Kiss et al, 2016
prédiabète / diabète	infertilité masculine, intolérance glucose, résistance insuline	Wei et al, 2014
tabac	asthme	Rehan et al, 2013

clairement démontrée chez l'animal, notamment au niveau de la méthylation de l'ADN (Stouder and Paoloni-Giacobino, 2011; Yauk et al., 2008). De plus, de nombreuses expérimentations animales ont révélé l'impact des perturbateurs endocriniens sur le niveau de méthylation de l'ADN des cellules germinales notamment après une exposition *in utero* (Guerrero-Bosagna et al., 2012; Manikkam et al., 2012, 2013, 2014; Radford et al., 2012; Skinner et al., 2013) et ont rapidement soulevé la question du risque de transmission de telles dérégulations ; Les résultats de ces études sont présentés dans le chapitre II.7.

Chez l'Homme, les données épidémiologiques nous interpellent quant aux conséquences d'une exposition maternelle sur la santé des enfants que ce soit en préconceptionnelle ou durant la grossesse (Lan et al., 2017; Mustieles et al., 2018). En revanche, il existe encore peu d'information concernant l'exposition préconceptionnelle paternelle sur la santé de leurs enfants (Lan 2017 ; Soubry et al, 2018). Les quelques données disponibles ont montré que l'exposition des pères à des toxiques tels les solvants (Messerlian et al., 2017) pourraient être associée à une augmentation du poids de naissance chez l'enfant. Les mécanismes en cause ne sont pas connus mais l'implication de dérégulations épigénétiques est fortement suspectée. En effet une étude récente a mis en évidence une corrélation entre des dérégulations de 131 DMRs spermatique, situées en regard de gènes impliqués dans la croissance, le développement, la structure du cytosquelette, et la présence de phtalates urinaires (10 métabolites incriminés) (Wu et al, 2017). De plus Soubry et al, ont pu montrer une corrélation significative entre le taux d'organonophosphate (OP) urinaire et des défaut d'empreinte sur 3 GSE : Meg3, NDN et SNRPN après ajustement sur l'âge et le BMI (Soubry et al., 2017).

II.5.C Effets de la nutrition et du métabolisme

Les substances exogènes ne sont pas les seules en cause dans l'apparition de perturbation épigénétiques. Une littérature de plus en plus fournie, tend à étayer l'hypothèse de Baker, selon laquelle l'expérience environnementale (notamment nutritionnelle) durant la vie fœtale influence notre santé et la survenue de maladies à l'âge adulte, communément dénommée DOHaD (Developmental origin health and disease) (Barker, 2007). En effet, de nombreuses études épidémiologiques ont pu

mettre en évidence que des conditions nutritionnelles durant la grossesse peuvent avoir des conséquences sur le développement fœtal et à plus long terme. Un des exemples particulièrement bien étudié est l'impact de la sous-nutrition maternelle des femmes enceintes durant la famine hollandaise (1944-1945) (Roseboom et al., 2006), et du risque plus élevé de développer une obésité, des pathologies cardiaques ainsi que des troubles du bilan lipidique chez la descendance.

Chez l'animal, l'influence préconceptionnelle d'origine paternelle a également été rapportée. Il existe en effet de nombreux exemples concernant l'influence d'un régime alimentaire paternel sur le métabolisme de leurs progénitures et ce sur différents modèles : la drosophile (Öst et al., 2014) la souris (Carone et al., 2010; Lambrot et al., 2013; Rando and Simmons, 2015). Même si il existe encore très peu de données chez l'homme (Kaati et al., 2002; Pembrey et al., 2006), les rares études disponibles semblent plutôt en indiquer l'existence, ce qui a amené Soubry et al, à proposer le concept de la POHaD (pour Paternal Origin and Health and Disease) afin d'alerter sur le risque potentiel de la transmission d'origine paternelle (Soubry et al, 2018).

L'association de ces syndromes à des altérations des marques épigénétiques (Heijmans et al., 2009; Tobi et al., 2009) suggère que des modifications épigénétiques retiennent en mémoire les effets des facteurs environnementaux auxquels un individu est soumis tout au long de sa vie. En effet, dans le modèle murin, plusieurs études ont pu mettre en évidence le risque épigénétique créé suite à une carence alimentaire débutée 1/soit à l'âge adulte (Carone et al., 2010 ; Wei et al., 2014 ; de Castro-Barbosa et al., 2016 ; Sharma et al., 2016) sur les cellules germinales des sujets exposés et ainsi que chez leurs descendants non soumis au régime alimentaire (Wei et al, 2014 ; de Castro-Barbosa et al., 2016) 2/soit suite à l'exposition *in utero* spécifiquement entre 12,5 et 18,5 jpc (coïncident avec la période de réapposition des marques épigénétiques dans les CGP mâles) sur les 2 générations suivantes, alors que la souris F1 a été soumise à un régime normal dès la naissance (Radford et al., 2014a) (Tableaux 5&6 chapitre II-7).

Ainsi, l'état nutritionnel, le métabolisme, le stress, les toxiques pourraient altérer l'épigénome des cellules germinales au cours de la gamétogenèse et les dérégulations épigénétiques observées dans les spermatozoïdes pourraient être « héritées » de cette période fœtale. Ces expositions environnementales pourraient donc agir sur la reprogrammation épigénétique sur la 1^{ière} génération mais aussi potentiellement sur les générations suivantes via l'exposition des cellules germinales (cf chapitre II.7).

II.6 Conséquences des dérégulations épigénétiques spermatiques

II.6.A Conséquences à court terme : influence sur le développement embryonnaire

L'association entre infertilité masculine et défaut de méthylation de l'ADN spermatique a rapidement soulevée la question d'un impact potentiel du statut épigénétique du spermatozoïde sur la fécondation et le développement embryonnaire. Les études sur ce sujet restent toutefois peu nombreuses et somme toute contradictoires (Tableau 4). La toute première étude est celle de Benchaïb et al, qui grâce à une analyse globale de la méthylation par immunomarquage de la 5meC retrouvait une corrélation significative entre un haut niveau de méthylation de l'ADN spermatique et des taux de grossesse élevés en FIV conventionnelle, et inversement un bas niveau de méthylation était associé à de faible taux de grossesse, sans pour autant affecter les taux de fécondation et la qualité embryonnaire (Benchaib et al., 2005). Par contre, fait troublant il ne retrouvait pas de lien entre anomalies de la méthylation et les paramètres spermatiques. Grâce à des techniques d'analyse de la méthylation plus spécifique, d'autres études retrouvaient quant à elles une association entre une élévation du taux de fausses couches en FIV et des défauts de méthylation des GSE (Ankolkar et al., 2012; Kobayashi et al., 2007, 2017) ou encore des anomalies de la méthylation affectant les séquences répétées (El Hajj et al., 2011). Néanmoins, ces résultats ne sont pas univoques, et certaines études n'ont pas montré de lien entre anomalies de la méthylation des GSE et les issues de grossesse en FIV dont : les taux de clivage, fragmentation embryonnaire, taux d'implantation, taux d'accouchement et poids de naissance des enfants, et notamment avec la qualité embryonnaire (Montjean et al.2013 ; Boissonnas et al., 2010). Cependant les effectifs très limités de ces deux études pourraient l'expliquer. Dans une étude plus récente et réalisée à l'aide d'une analyse globale de la méthylation, Aston et collaborateurs se sont intéressés à l'impact des défauts de méthylation des spermatozoïdes sur la qualité embryonnaire. Ils ont pu montré d'une part des différences de méthylation entre des hommes normozoospermiques et des hommes infertiles et ont mis en évidence une association entre défaut de méthylation de l'ADN spermatique et la qualité embryonnaire (Aston et al., 2015). Cependant, même si l'effectif de cette étude et les moyens d'analyse de la méthylation de l'ADN sont tout à fait performants, le design

reste critiquable. En effet, afin de comparer l'impact de la méthylation sur la qualité embryonnaire, ils ont comparé 3 groupes : 1/embryons de bonne qualité ayant abouti à une grossesse vs 2/embryons de mauvaise qualité suivi d'une grossesse et 3/embryons de mauvaise qualité sans grossesse. On peut s'interroger sur le profil de méthylation des spermatozoïdes dans le groupe : embryons de bonne qualité mais sans grossesse. De plus les paramètres spermatiques des patients infertiles n'ont pas été rapportés notamment si ils présentaient une oligozoospermie. L'équipe de Denomme et al, met elle aussi en évidence une association entre des défauts de méthylation spermatiques et la morphologie embryonnaire, et fait intéressant ces défauts correspondaient à 1634 CpGs situés en regard de rétention d'histones (Denomme et al., 2017). Tout comme les histones les petits ARN non codants pourraient également joué un rôle dans le développement embryonnaire, comme le suggère l'étude de Cui (Cui et al., 2015) qui rapporte une corrélation entre le taux de miR34c et les issues de grossesses d'ICSI notamment sur la qualité embryonnaire. Se pose toutefois la question du statut épigénétique et du niveau de méthylation des spermatozoïdes fécondants. En effet, seule une proportion, plus ou moins importante de spermatozoïdes présente des défauts de méthylation, il se pourrait que les différences observées soient liées en réalité à la « qualité » des spermatozoïdes fécondants : niveau de méthylation normal, anomalie de la méthylation et/ou associé à d'autres anomalies épigénétiques.

Tableau 4: Implication des dérégulations épigénétiques sur le développement embryonnaire & les issues de grossesse

Références	Techniques	Population étudiée	Principaux résultats
Benchaiïb 2005	immunomarquage / 5meC	63 FIV conventionnelle	Corrélation méthylation spz & TG: TG avec hypométhylation spz: 8,3% vs 33.3% Pas de corrélation paramètres spermatiques & TF & qualité embryonnaire
Kobayashi 2007	BCS 7 IG	24 hommes avec défauts empreinte / spz 18 patients FIV (FIV et ICSI)	Corrélation défaut d'empreinte / spz et faible TG et TFC élevé
el Hajj 2011	BCS 7 IG - 2 éléments répétés	141 hommes infertiles : -106 infertilité masc. ou mixte -28 infertilité fem.	Corrélation hypométhylation ALU & TFC élevé pas de corrélation avec les issues de grossesse en FIV
Boissonnas 2010	BPS 2 GSE	24 hommes (44 FIV ou ICSI cycles) : -7 NZ (14 cycles) - 5 T (9 cycles) - 12 OAT (21 cycles)	Pas de corrélation défauts d'empreinte spz & qualité embryonnaire, TI, TA & PN
Ankoklar 2012	BCS	23 NZ 23 NZ + FCS	Corrélation méthylation <i>H19</i> & FCS
Ankoklar 2013	BCS	23 NZ 23 NZ + FCS	Pas de corrélation methylation <i>MEST</i> , <i>DLK1/GTL2</i> , <i>ZAC</i> and <i>LINE-1</i> & FCS
Montjean 2013	BCS 2 GSE	17 hommes défauts d'empreinte/ spz: -5 inséminations -12 ICSI	5 grossesses évolutives & naissance de nouveaux-nés en bonne santé
Cui 2015	RT-qPCR	162 patients ICSI	Corrélation taux de miR-34c et issue de grossesse et qualité embryonnaire Pas de corrélation avec TF
Aston 2015	infinium HumanMethylation450 BeadChip Illumina	54 NZ et fertile vs 127 infertile AMP: -55 patients AMP avec BQE & G -72 patients AMP avec MQE : ->42 G positive & 30 G négative	Différent profil de méthylation entre les hommes infertile vs NZ ->Association entre profil de méthylation spermatique et qualité embryonnaire
Denomme 2017	infinium HumanMethylation450 BeadChip Illumina	40 spermes (cycles DO femmes jeunes) comparaison BQE vs MQE	1634 CpG <-> site rétention d'histones (hypométhylation pour MQE) profil de méthylation des spz associé à la qualité des blastocystes
Kobayashi 2017	COBRA	219 AMP	Association défaut de méthylation spermatique et TFC augmenté 10,2% vs 25,4% (<i>GTL-2</i> <i>PEG3</i>)

AMP : assistance médicale à la procréation ; BCS : bisulfite-clonage séquençage ; BQE : bonne qualité embryonnaire ; BPS : bisulfite pyroséquençage ; GSE : gène soumis à empreinte ; MQE : mauvaise qualité embryonnaire ; N : normozoospermique ; OAT : olig-asthéo-tératozoospermique ; PN : poids de naissance ; Spz : spermatozoïde ; T : Tératozoospermique ; TA : taux d'accouchement ; TI : taux d'implantation ; TF : taux de fécondation ; TFC : taux de fausse-couche ; TG : taux de grossesse

II.6.B Conséquences à long terme

Il est désormais admis que des anomalies épigénétiques contribuent au développement et à la progression de maladies humaines tels que les cancers (Burgio et al., 2018), les troubles du métabolisme (obésité, diabète, résistance à l'insuline) (Davegårdh et al., 2018)(Tobi et al., 2009) et pourraient intervenir dans les maladies neurodégénératives et des troubles du comportement (Dall'Aglia et al., 2018).

En effet des anomalies épigénétiques activant des oncogènes ou inhibant des gènes suppresseurs de tumeurs ont été mis en évidence (Yamada and Yamada, 2018). De même des mutations affectant des gènes codant pour des enzymes responsables des marquages épigénétiques ont été identifiées dans des cellules tumorales. Reste à savoir si ces phénomènes sont la cause ou la conséquence du développement de cancer, il semble néanmoins qu'il participe à la progression tumorale (Burgio et al., 2018).

Comme le suggère Soubry, l'exposition maternelle durant le développement fœtale n'est pas la seule piste à explorer et des modifications épigénétiques préconceptionnelles d'origine paternelle pourrait déterminer la santé des futures descendants (Soubry, 2018).

II.7 Risque de transmission : le spermatozoïde vecteur d'un risque épigénétique ?

Chez les mammifères, il existe de nombreux exemples de l'effet environnemental d'une exposition maternelle sur sa descendance (Dominguez-Salas et al., 2014; Nilsson et al., 2018; Palma-Gudiel et al., 2015) et du risque de transmission de certaines pathologies au cours des générations (Radford et al., 2014). Ceci a été observé à la fois dans le cadre de l'expérimentation animale ainsi que chez l'homme et est connu aujourd'hui sous l'aphorisme : « they are what she hate ». Plus récemment les études se sont intéressées au versant paternel et interpellent sur la possibilité d'une influence préconceptionnelle d'origine paternelle (Rando and Simmons, 2015; Soubry et al., 2014; Soubry et al., 2018). Néanmoins les mécanismes d'action restent peu documentés.

Se pose alors une question fondamentale : est-ce qu'une épimutation peut être transmise via les gamètes chez les mammifères et chez l'homme? Le caractère transmissible d'une épimutation est largement décrit chez les plantes, leur permettant de s'adapter à leur environnement et de transmettre ce caractère épigénétique aux générations suivantes, phénomène d'adaptation vital pour la survie de l'espèce (Quadrana and Colot, 2016). Des exemples ont été rapportés dans plusieurs espèces (*C.elegans*, zebrafish) suite à l'exposition à des perturbateurs endocriniens (vinclozoline, méthoxychlore, dioxine, bisphenol A, le pesticide DDT dichlorodiphenyltrichloroethane, les phtalates), et à des régimes alimentaires déséquilibrés (restriction calorique, en protéines ou riche en graisses, en folate). Cependant les données chez les mammifères et particulièrement dans l'espèce humaine restent largement controversées (pour revue : (Champroux et al., 2018; Heard and Martienssen, 2014; Nilsson et al., 2018; Rando and Simmons, 2015; Sales et al., 2017; Wei et al., 2015).

Cette controverse réside dans la confusion des définitions utilisées, des modèles étudiés et des limites expérimentales et d'analyses. Pour y voir plus clair et après avoir précisé les concepts de transmission inter ou transgénérationnelle, nous nous focaliserons sur l'étude de la transmission paternelle car, au delà d'être le cœur du sujet, les cellules germinales males sont plus faciles à obtenir et ce en nombre suffisant, et d'autre part limite les biais liés à la gestation et notamment les biais comportementaux.

II.7.A. Définition : Transmission intergénérationnelle et transgénérationnelle

Comprendre la différence entre ces deux termes est importante car elle reflète une physiopathologie différente et nous conduit à considérer différents scénarios possibles.

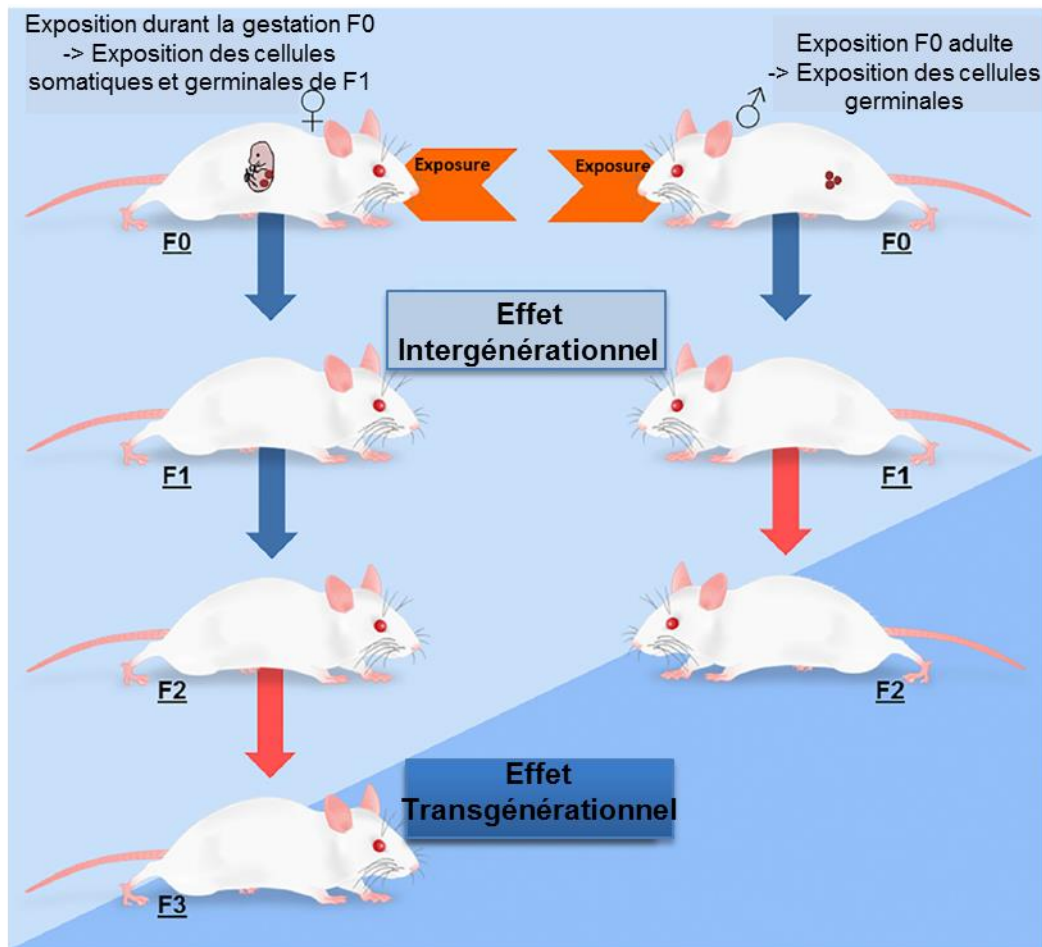


Figure 29 : Transmission intergénérationnelle et transgénérationnelle

A gauche, l'exposition durant la grossesse impacte les générations F1 et F2 et est définie comme une transmission intergénérationnelle. L'atteinte de la génération F3 est dite « transgénérationnelle (aucune exposition au facteur initial) ». Au contraire l'exposition durant la vie adulte que ce soit pour la lignée mâle ou femelle conduit à une transmission intergénérationnelle pour la génération F1 et transgénérationnelle pour la F2.
(Adapté de Sales et al., 2016)

L'exposition parentale (F0) pendant la grossesse peut influencer la santé de sa descendance (F1) ainsi que sa deuxième génération (F2) via l'exposition des cellules germinales de F1 ; c'est une transmission dite intergénérationnelle (on parle également d'effet multigénérationnel sur F1->F2). Cet effet peut avoir une action directe sur les cellules somatiques de l'embryon/fœtus (F1) affectant potentiellement la prolifération, la différenciation et le développement des organes. Cette exposition *in utero* peut également affecter les cellules germinales (futurs gamètes de F1) et donc affecter la génération F2 (Sales et al., 2016 ; Heard et Martienssen, 2014).

Un effet transgénérationnel est quant à lui défini par la persistance du phénotype en dehors de toute exposition (aucune cellule exposée). La persistance d'un phénotype en dehors de toute exposition cellulaire de l'individu au facteur initial, indique que l'effet du signal a été « mémorisé » à travers les générations en dehors de l'exposition initiale. Le modèle de transmission transgénérationnelle peut également correspondre à une exposition à l'âge adulte avec une transmission à la génération F2, car les cellules germinales fœtales de la génération F1 n'ont pas été exposées dans ce cas. Ainsi on ne peut parler de transmission transgénérationnelle dans le cadre d'une exposition *in utero* uniquement si le phénotype F3 est affecté. Ceci implique nécessairement la transmission via le gamète.

Ces définitions sont uniquement basées sur la notion de transmission d'un phénotype, les mécanismes sous-jacents restant à définir. Une mutation de la séquence d'ADN est un parfait exemple de transmission transgénérationnelle, vu que les générations successives peuvent présenter ce même phénotype altéré. La confusion apparaît lorsque des dérégulations épigénétiques (modification de la régulation de l'ADN ou de la chromatine) sont avancées pour expliquer des phénomènes de transmission transgénérationnelle. En effet, comme nous l'avons abordé dans les chapitres II.2.B.1 et II.3, il existe chez les mammifères deux périodes de reprogrammation : reprogrammation pré-conceptionnelle durant la gamétogenèse et péri-conceptionnelle durant le développement pré-implantatoire (Figures 21 et 23). Lors de ces deux phases de reprogrammation, les marques épigénétiques sont effacées puis réapposées afin d'assurer la différenciation cellulaire. Ceci suggère qu'une épimutation serait déprogrammée suivi d'une néoprogrammation conforme sans conséquence pour la descendance. Ce concept implique que des mécanismes épigénétiques peuvent tout à fait expliquer des

phénomènes de transmission intergénérationnelle mais que rien n'est certain en ce qui concerne la transmission transgénérationnelle. Ainsi l'étude de la transmission transgénérationnelle constitue un très bon modèle pour évaluer les possibilités de la transmission d'une épimutation.

II.7.B Etude de la transmission épigénétique chez les mammifères

II.7.B.1 Transmission via la méthylation de l'ADN

L'équipe de Skinner et al, a publié plusieurs études témoignant de l'effet transgénérationnel induit par l'exposition à un perturbateur endocrinien durant la gestation. Ces différentes études s'appuyaient sur un même protocole expérimental : exposition de souris gestantes, lors de la reprogrammation des cellules germinales, à différents perturbateurs endocriniens (vinclozoline, dioxine, phtalates, bisphénol A, DTT). Les analyses réalisées par meDIP-chip ont permis d'identifier des DMRs (régions différenciellement méthylées) potentiellement responsables de la transmission transgénérationnelle (F1 -> F3) des troubles du développement des organes sexuels et/ou des troubles du métabolisme (Manikkam et al., 2012 ; 2013 ; 2014 ; Guerrero-Bosagna et al., 2010 ; 2012 ; Skinner 2013 ; Tracey et al., 2013) (Tableau 5). Bien que ces différences de méthylation aient été identifiées dans les spermatozoïdes des individus non exposés de la génération F3, le design de ces études ne comprenait pas de comparaison avec les cellules germinales ou des cellules somatiques des générations précédentes, alors que les perturbations phénotypiques observées au cours des générations s'estompaient ou différaient en fonction du sexe de l'individu. Dans ce type de modèle et vu la complexité des interactions épigénétiques/ génétiques, l'analyse de la génération F3 seule semble insuffisante pour la compréhension des mécanismes en jeu.

Radford et collaborateurs ont quant à eux étudié le retentissement d'une carence alimentaire, débutée *in utero* spécifiquement au moment de la reprogrammation épigénétique des cellules germinales, sur les 2 générations suivantes, en analysant par meDIP-seq le profil épigénétique des cellules germinales et somatiques des générations F1 et F2 (Radford et al., 2014) (Tableau 6). Des anomalies de méthylation (166 DMRs) ont été détectées au niveau des spermatozoïdes des souris

Tableau 5 : Overview des publications sur la transmission transgénérationnelle après exposition à un toxique

Etudes	Phénotype	Toxique	Temps d'exposition	Espèces Génération	Effectif	Analyse génétique	Epimutation somatique	Epimutation cellule germinale	Méthodes d'analyse de la méthylation
Anway 2005	altération paramètres spermatiques (numération, mobilité) apoptose cellules germinales	M & V	E8 à E15 ->période de différenciation gonadique	souris F1->F4	n=4/ génération	NR	NR	F1: NR F2-F3: défaut méthylation ADN	MS-PCR
Guerrero-Bosagna 2010	NR	V	E8-E14	Rat F1->F3	n=6 2 pool de 3	F3: CNV Fam111a	NR	F1 -F2 : NR F3 : 16 DMRs	-MeDIP-Chip -bisulfite et spectrométrie
Stouder 2010	F1: baisse concentration spermatique F2-F3: normale	V	10-18 jours de G (période établissement de l'empreinte)	Souris F1->F3	n=5	non	F2-F3: légère hypométhylation <i>Peg3</i>	F1-F2: altération méthylation / 5 GSE F3: légère hyperméthylation de <i>Peg3</i>	pyroséquençage: 5 GSE : -2 paternels: <i>H19-Gtl2</i> -3maternels: <i>Peg1, Snrpn, Peg3</i>
Guerrero-Bosagna 2012	F3: anomalies spermatiques, testiculaires, prostatiques, rénales et OPK	V	E7-E13	Souris F1->F3	n=6 (2 pool de 3)	NR	NR	F1 F2: NR F3: 40 DMRs	MeDIP-Chip (triplicate)
Manikkam 2012	Troubles pubertaires, obésité, anomalies des ovaires (IOP ou OPK) F1->F3 anomalies testiculaires F1->F2 différence lignée femelle ou male	Dioycine (TCDD)	E8 à E14	Rat F1->F3	n= 3 par groupe	NR	non	F1 -F2 : NR F3: 50 DMRs	MeDIP-Chip (triplicate) + meDIPqPCR (confirmation)
Skinner 2013	F1 anomalies rénales, prostatiques, ovariennes et risque tumoral F3: obésité	DTT	E8 à E14	Rat F1->F3	n= 3 par groupe	non	cerveau, muscle, queue	F1-F2 : NR F3 : 39 DMRs	MeDIP-Chip
Manikkam 2013	Troubles pubertaires, obésité, anomalies des ovaires (IOP ou OPK) F1->F3 anomalies testiculaires F1->F2 différence lignée femelle ou male	mix PE: BPA-DEHP-DBP	E8 à E14	Rat F1->F3	meDIPchip 2à 3 par pool	NR	non	F2 : NR F1 - F3: 197 DMRs	MeDIP-Chip (triplicate) + meDIPqPCR (confirmation)
Tracey 2013	F1:anomalies rénales, prostate, pubertaire, ovaire (OPK, IOP) différence lignée femelle ou male F3: obésité, ovaire (OPK, IOP)	H jet fuel (JP-8)	E8 à E14	outbred Rat F1->F3	n= 3 par groupe	NR	non	F1 -F2 : NR F3 : s 33 DMRs	MeDIP-Chip (triplicate) + meDIPqPCR (confirmation)
Manikkam 2014	anomalies rénales, ovarienne et obésité	M	E8 à E14	Rat F1->F3	n= 3 par groupe	NR	non	F1 -F2 : NR F3 : 37 DMRs	MeDIP-Chip (triplicate) + meDIPqPCR (confirmation)

G : grossesse ; H : hydrocarbure ; M : Methoxycylhore ; MS-PCR :PCR méthylation sensitive; NR : non réalisé, proS : prospermatogonies, Transg. : transgénique ; V : vinclozoline ; DEHP : Di-ethylhexyl phtalate

Tableau 5 : Overview des publications sur la transmission transgénérationnelle après exposition à un toxique (suite)

	Phénotype	Toxique	Temps d'exposition	Espèces	Effectif	Analyse génétique	Epimutation somatique	Epimutation cellule germinale	Méthode analyse méthylation
Klaver 2015	F0: altération paramètres spermatiques et org. génitaux F1->F3: léger effet /paramètres spermatiques et org. génitaux F0->F3 pas d'altération fertilité	Décitabine Vorinostat	adulte male	souris F1->F3	n=10 / groupe	NR	F2 : <i>Mest</i> (GSE); <i>Abt1</i> F3: <i>Snrpn</i> (GSE); <i>Tcf3</i>	F2 et F3: <i>Oct4</i> et GSE (<i>Mest</i>) variabilité répartition modérée	bisulfite et pyroséquençage :20 échantillons / groupe et génération (sperme et sang) RRBS: 2-3 par génération
Iqbal 2015	NR	DEHP V (gavage)	-8,5-13,5 jpc: période effacement de l'empreinte -12,5 -17,5 jpc: période établissement de l'empreinte	souris ITgOG2 F1->F3	n=3	ARN array: -F1 proS : 7 / DEHP 2 / V -F2-F3: RAS	F2 : altération GSE modérée F3: pas d'altération	F1 proS : altération GSE modérée F2: non	MIRA-chip ciblée/ -promoteur -GSE -Seq. Répétées
Skinner 2015	NR	V	E8-E14	Rat F1 & F3	n=9 / CNV n=6 /analyse méthylation	CGHarray -sperme F1: 540 CNV -sperme F2: 4912 CNV -sperme F3: 9932 CNV	NR	F1: 39 DMRs F2: 506 DMRs	(MeDIP-Chip) (triplicate)

G : grossesse ; H : hydrocarbure ; M : Methoxyclhore ; NR : non réalisé, proS : prospermatogonies, Transg. : transgénique ; V : vinclozoline ; DEHP : Di-ethylhexyl phtalate

Tableau 6 : Synthèse des principales études évaluant les effets nutritionnel et métabolique au niveau de la méthylation de l'ADN dans la transmission intergénérationnelle chez les rongeurs

Etudes	Phénotype	Régime	Temps d'exposition	Espèces Génération	Effectif	Analyse génétique	Epimutation somatique	Epimutation cellule germinale	Méthode analyse méthylation
Carone 2010	NR	Pauvre protéine (10%)	F0 male adulte entre l'âge de 9 et 12 semaines	souris F0->F1	n=26 (arrays) n=2 (RRBS)	ARN microarrays RTqPCR : ↑expression gènes métabolisme lipidique	foie: déméthylation / -régions intergéniques (enhancer Ppara) -régions régulatrices impliquées dans la biosynthèse des lipides et cholestérol (non DMR) pas d'implication petits ARNs	pas de défaut de méthylation / enhancer Ppara	RRBS pan-H3 ChIP
Ng 2010	F0: ↑BMI, adiposité, IG, RI F1: ↑BMI, adiposité, IG, RI ≠F1 femelle et male F1 femelle: dysfonction cell. Beta pancréas	hyperL.	F0 male adulte	Rat F0->F1 femelle	n=11	ARN microarrays <i>Cell. pancréas</i> F1 femelle ->altération expression 642 gènes pancréatique dont: Il13ra2	↓méthylation cytosine -960 de Il13ra2	NR	BS / start (site de transcription en région proximal)
Radford 2012	NR	hypoC. (50%)	F0 gestante: 12,5-18,5 jpc	souris outbred F1->F2	n=15 (array) n=23 (BPS)	Transcriptome/qPCR à E16,5 F1 et F2 foie et placenta - F1 foetale :altération GSE -F2 foetale: pas d'atteinte	F1&F2	F1 foetale (E16,5) : pas d'altération / 4 GSE	BPS
Radford 2014	F1: hypotrophie naissance et à 3 mois F2 : ↑taux lipide sanguin	hypoC.	F0 gestante: 12,5-18,5 jpc	souris F1->F2	n=8 / group	Transcriptome F2: altération corrélation avec régions altérées / sperme F1	F2: RAS foie et cerveau	F1: 166 DMRs (promoteur et séquences non répétées)	meDIP-seq BPS
Martinez 2014	F1 : obésité et IG F2 : obésité et IG	F0 sous nutrition (restriction 50%)	F0 gestante 12,5jpc -> accouchement	souris gestante F0->F2	n=13 (control =10)	Transcriptome du foie: sous expression gène Lxra	F2 foie : hyperméthylation région promotrice du gène Lxra	F1 : hyperméthylation région promotrice du gène Lxra F2:NR	BPS
Wei 2014	F1->F2 : ↑taux leptine et insuline, altération taux de glucose , RI	hyperL.	souris adulte male	souris F1->F2	n=6 / groupe	ARN microarray F1: 409 gènes expression altérée	F1 pancréas : 9000 DMRs	F1 sperme: 6500 DMRs F2 : défaut de méthylation/ Pik3r1, Pik3ca	-MeDIP-Chip -BS
Shea 2015		3 ≠ : -normal - hyperL. - pauvre protéine	souris adulte male de l'âge de 3 semaines à 10-14 semaines	Souris F0 Sperme	n=12 (WGS) n=61 (RRBS)	CNV: digital droplet PCR	NR	F0: épivariation	-WGBS maps (30X) -RRBS
de Castro Barbosa 2016	F0: obésité et IG F1 femelle: IG ≠F1 femelle et male	hyperL.	rat male de 4 semaines à 12 semaines	Rat F0->F2	n= 5 à 11	NR	F2: pas d'altération commune avec sperme F0 et F1	18 DMRs altérées et communes entre F0 et F1 92 DMRs altérées et communes entre F0 et F1	-BS

BS : bisulfite séquençage ; BPS : bisulfite pyroséquençage ; hyperL. : hyperlipique ; hypoC. : hypocalorique ; IG : intolérance au glucose ; MND :micrococcal nucléase digestion ; RI : résistance insuline

F1 (souris exposées *in utero*), et bien que certaines soient connues pour échapper au phénomène de reprogrammation après la fécondation, ces DMRs n'ont pas été retrouvés chez les souris de la génération F2 (cellules somatiques du foie et du cerveau) cependant il existait une altération de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme, gènes jouxtant ces DMRs.

Iqbal et collaborateurs, ont poursuivi les explorations en évaluant l'effet d'un perturbateur endocrinien, la vinclozoline, administré durant la période de reprogrammation gamétique (effacement et rétablissement de l'empreinte dans la lignée mâle), sur la méthylation de l'ADN des cellules germinales des générations F1 et F2 (MIRA-chip, ciblé sur les régions promotrices, soumises à empreinte et les séquences répétées IAPs) (Iqbal et al., 2015) (Tableau 5). Ils ont également complété leur étude par une analyse transcriptomique des cellules germinales des générations F1 et F2 ainsi que les cellules somatiques des générations F2 et F3. Ainsi ils ont pu mettre en évidence que les modifications de méthylation et d'expression des gènes détectées dans les cellules germinales F1 ne persistaient pas dans celles de la génération F2. De plus, l'analyse ciblée des régions soumises à empreinte n'a pas montré non plus de persistance de changements de méthylation entre les prospermatogonies des F1 et F2, ni mis en évidence un défaut de transcription des GSE au niveau des cellules somatiques entre les générations F2 et F3. Les résultats de cette étude suggèrent que les perturbateurs endocriniens exerceraient un effet direct sur les cellules germinales fœtales exposées mais qu'une reprogrammation correcte de la méthylation de l'ADN préviendrait la transmission aux générations suivantes. Cette étude remet en cause l'idée selon laquelle les dérégulations épigénétiques pourraient être transmises via les gamètes, tout au moins via les modifications de méthylation de l'ADN.

Ainsi les résultats de ces deux précédentes études (Radford et al., 2014 et Iqbal et al., 2015) suggèrent que la méthylation de l'ADN ne pourrait à elle seule expliquer les phénomènes de transmission transgénérationnelle, et que d'autres facteurs épigénétiques pourraient être en cause (ou associés) comme l'organisation de la chromatine, les petits ARNs. Néanmoins ces études ont fait l'objet de quelques critiques, les principales reposant sur leurs effectifs et les analyses des données bioinformatiques (Guerrero-Bosagna, 2016; Nadeau, 2015; Sharma, 2015). Néanmoins les coûts engendrés par le design de telles études : nécessité d'analyser

le méthylome sur 3 générations, couplé nécessairement, si on souhaite être rigoureux, à une analyse du génome ou du transcriptome, limitent en effet le nombre d'inclusion. Concernant les analyses biostatistiques, Iqbal et Szabo ont pu apporter de nombreuses précisions et soulignent dans leurs réponses les défauts d'interprétation (Iqbal et al., 2016; Szabó, 2016).

Une autre limite pourrait venir de la technique d'analyse utilisée, ainsi les études basées sur de la meDIP-chip (Manikkam et al., 2012 ; 2013 ; 2014 ; Guerrero-Bosagna et al., 2010 ; 2012 ; Skinner 2013) mettent en évidence des DMRs au niveau de l'épigénome spermatique mais ces différences restent faibles 10-20% et seraient insuffisantes pour expliquer la pénétrance des phénotypes dans la descendance (Rando and Simmons, 2015; Tillo et al., 2016).

Les résultats de Skinner et coll, dans leur étude évaluant l'impact de la vinclozoline sur l'épigénome spermatique des générations F1 et F2 (meDIP-chip) rapportent des altérations de 39 et 506 DMRs respectivement (Skinner et al., 2015). Ils ont complété leur analyse en évaluant l'existence d'un polymorphisme génétique par CGHarray. Ils ont ainsi rapporté la présence de 540 CNV et 4912 CNV dans les spermatozoïdes de la génération F1 et F2 respectivement, sans aucune corrélation entre les CNVs et la localisation des DMRs. Ceci peut être dû au fait que les pools d'échantillons testés dans les 2 techniques ne soient pas les mêmes. Néanmoins ces résultats soulèvent une grande interrogation sur la valeur de ces DMRs et de leur implication réelle dans la transmission transgénérationnelle; d'autant plus lorsque l'on compare ces résultats avec ceux obtenus quelques années plus tôt par une étude présentant le même design (hormis pour la configuration de la meDIP-chip) par Guerrero-Bosagna et coll (Guerrero-Bosagna et al., 2010), aucune DMR et CNV ne sont comparable entre les deux études (Tableau 5).

En s'appuyant sur une technologie de WGBS (Whole Genome Bisulfite Sequencing) à forte résolution (30X), l'équipe de Shea et al., a analysé la méthylation des spermatozoïdes de souris exposées à différents régimes alimentaires (riche en graisse, pauvre en protéines) (Shea et al., 2015), connus pour altérer l'expression de gènes hépatiques impliqués dans le métabolisme lipidiques chez la descendance (Carone et al., 2010 ; Ng et al., 2010 ; 2014) (Tableau 6). L'effet des régimes alimentaires a induit de très modestes variations (10-20%) au niveau du méthylome

spermatique, avec plus d'épivariations (variation de la méthylation des cytosines présentes chez des animaux isogéniques élevés dans des conditions similaires notamment même régime diététique) au sein d'un même groupe qu'entre les groupes testés. Cette variabilité dépendante de la présence d'épivariation a ensuite été confirmée par l'analyse d'un méthylome (WGBS (7X)) de 12 échantillons de sperme de souris ainsi que d'une analyse par RRBS sur 61 échantillons de sperme de souris (Shea et al., 2015). De plus, ils ont observé que les plus fortes variations apparaissent sur des régions répétées de l'ADN principalement des cluster de ADN_r, connus pour être des loci fortement épi-variables dans le méthylome spermatique de souris (Tillo et al., 2016), laissant ainsi supposer que les variations de méthylation pourraient correspondre à des variations du nombre de copies de ADN_r. En tout état de cause, ces données ont conduit les auteurs à conclure que le régime alimentaire n'influençait pas la méthylation des spermatozoïdes.

Ces résultats soulignent l'importance d'une part de bien caractériser les variations de méthylation. En effet, rien n'indique à l'heure actuelle chez les rongeurs qu'une dérégulation de la méthylation de l'ADN soit réellement impliquée dans le phénomène de transmission transgénérationnelle, les interactions génétiques et épigénétiques étant probablement plus complexes. Le plus bel exemple de transmission transgénérationnelle liée à une épimutation secondaire est l'effet des insertions du rétrotransposon IAP (intercisternal A-particle) dans la variabilité d'expression des gènes *Agouti* et *Axin* chez la souris (Morgan et al., 1999; Rakyan et al., 2003). De manière conventionnelle, la transcription des rétrotransposons est normalement réprimée par la méthylation de l'ADN mise en place durant la reprogrammation épigénétique, mais les éléments IAPs associés aux loci des gènes *Agouti* et *Axin* échappent partiellement à ce mécanisme de répression. Les niveaux de méthylation de ces loci et par conséquent le niveau d'expression des transcripts (fusion transcript) déterminent la couleur du pelage (Morgan et al., 1999) ainsi que la masse corporelle des individus (Rakyan et al., 2003) au cours des générations. De façon intéressante, la méthylation de l'ADN sur ces loci est également affectée par des modifications nutritionnelles ou par l'effet de perturbateurs endocriniens survenant durant le développement embryonnaire (Waterland and Jirtle, 2003).

Les nouvelles techniques d'analyse du génome ont révélé la présence importante de rétrotransposons dans le génome des mammifères, et questionnement sur leur implication dans la survenue et la transmission d'épimutation (Ekram et al., 2012). En effet on peut imaginer qu'une dérégulation environnementale apparue aux moments des périodes clefs de reprogrammation, période à laquelle ces éléments maintiendraient leurs marques épigénétiques, pourraient être la source d'épimutation. Il se pourrait également qu'une levée des marques épigénétiques répressives puisse favoriser le caractère labile de ces éléments et être à l'origine de modifications de la séquence de l'ADN.

A partir d'une autre approche expérimentale, l'équipe de de Waal (de Waal et al., 2012) a pu montrer qu'une épimutation située sur le locus du gène *H19* chez la souris induite suite à une ICSI (ou liée à l'hyperstimulation ovarienne) était corrigée dans les cellules germinales adultes de la génération suivante, suggérant que la reprogrammation gamétique évite la transmission d'épimutation pour des séquences soumises à cette reprogrammation.

Une équipe Japonaise a étudié de façon originale la reprogrammation gamétique chez les animaux clonés (Kaneda et al, 2017 Yamanaka 2018). En effet, la reprogrammation nucléaire peut induire l'apparition d'épimutations chez les animaux clonés (Yamanaka 2011, Sawai 2009). Ils ont ainsi évalué la présence ou non de ces épimutations dans leurs descendance, notamment au niveau de deux GSE (*H19* et *PEG3*), 3 gènes non soumis à empreinte (*XIST*, *OCT4*, *NANOG*) et deux éléments répétés (Satellite I et satellite II). Aucune différence n'a été observée entre les spermatozoïdes d'animaux clonés et ceux non clonés (Yamanaka et al, 2018).

II.7.B.2 Transmission via une dérégulation des histones et des nucléosomes

Compte tenu de la présence de 5 à 15% d'entre elles dans les spermatozoïdes, les histones sont de sérieuses candidates quant au risque de transmission d'une épimutation. Une étude récente a en effet décrit un mécanisme de transmission transgénérationnelle impliquant une dérégulation des histones (Siklenka et al., 2015). A partir d'un modèle de souris transgénique surexprimant l'histone méthylase

KDMIA (ou lysine-specific histone demethylase) dans le sperme, la descendance non porteur du transgène présentait des anomalies du développement et une espérance de vie diminuée, effet persistant jusqu'à la génération F3. Plusieurs gènes des spermatozoïdes des souris transgéniques surexprimant KDMIA présentaient une sous-représentation de H3K4 diméthylée, sans anomalie de la méthylation de l'ADN, profil non retrouvé dans le sperme des générations suivantes non affectées par le transgène mais présentant un profil altéré en ARN, profil également observé dans les embryons à 2 cellules. L'interaction de plusieurs facteurs épigénétiques semble l'hypothèse la plus probable dans le cas de cette transmission transgénérationnelle sans que le mécanisme exact n'ait pu être identifié à ce jour. D'autres études ont rapporté l'implication des histones dans le mécanisme de transmission intergénérationnelle, néanmoins il n'existe aujourd'hui aucune preuve d'une possible transmission transgénérationnelle via les histones (Champroux et al., 2018; van de Werken et al., 2014).

II.7.B.3 Transmission via une dérégulation des Petits ARN

Une autre origine possible à la transmission transgénérationnelle via le gamète pourrait venir des petits ARN non codants. En effet, il a été rapporté chez la souris que les petits ARN contenus dans les spermatozoïdes étaient impliqués dans la transmission de troubles du métabolisme et du comportement (Fullston et al., 2016; Gapp et al., 2014) . Par exemple, la transmission de dérégulations hypothalamo-hypophysaire induites par le stress peuvent être reproduites après injection de 9 miRNAs dans l'embryon de souris (Gapp et al., 2014; Rodgers et al., 2015). De façon comparable, des mâles soumis à un stress engendraient une progéniture sujette à l'hyperglycémie due à une augmentation de la glucogenèse hépatique. Les pères stressés présentaient en effet une hyperméthylation du gène *SMBT2* dans le sperme, responsable de la dépendance aux glucocorticoïdes, retrouvée également sur les cellules hépatiques des progénitures F1. Cette répression induit une diminution de l'expression de miR-466-3p (encodé par le gène *SMBT2*) régulateur post transcriptionnel du gène *PEPCK* et diminue ainsi la synthèse de la protéine PEPCK impliqué dans la gluconéogenèse (Wu et al., 2016).

L'équipe de Fullston s'est également intéressée aux effets de l'obésité paternelle sur les générations suivantes. Dans un premier temps ils ont rapporté un effet transgénérationnel avec une expression phénotypique (troubles métaboliques et de la fertilité) variable en fonction du sexe et de la génération (Fullston et al., 2013). Cependant, les altérations du profil de microARNs spermatique observées chez des souris obèses n'étaient pas maintenues dans le sperme de leur descendance génération F1 (Fullston et al., 2016).

Dans un modèle transgénérationnel de souris (F1->F3) de mâles exposés à la vinclozoline dès 13,5 dpc du développement, Enriquez et coll ont mis en évidence des dérégulations des miARNs (dérégulations de l'interaction entre lin28/let-7/blimp1) dans les cellules germinales primordiales et qui pouvaient se transmettre sur 3 générations (Briño-Enríquez et al., 2015; Schuster et al., 2016).

Récemment, l'effet nutritionnel paternel a également été impliqué dans la dérégulation d'autres petits ARN. Chez la souris, à partir d'un modèle évaluant l'effet nutritionnel paternel sur le métabolisme de leur descendance, le rôle des tRNA, et plus précisément des fragments 5' des tARNs (tRFs), a été incriminé comme facteur épigénétique éventuel de transmission de désordres métaboliques suite à un régime pauvre en protéines (Sharma, 2016). Ces tRFs, qui pourraient être transférés dans le spermatozoïde via des exosomes épидидymaires particulièrement tRNA-Gly-CGG, pourraient réprimer la transcription de gènes embryonnaires régulés par des LTR du retro-élément MERVL (Sharma et al., 2016). Néanmoins, l'injection de ces tRFs dans les ovocytes n'a pas totalement reproduit ces dérégulations chez la descendance, suggérant plutôt l'implication d'une combinaison de plusieurs facteurs épigénétiques dans la survenue de la transmission (Chen et al, 2016 ; Tillo et al., 2016).

II.7.C.Transmission via une dérégulation de la méthylation de l'ADN chez l'homme

A l'heure actuelle, aucune étude n'a pu mettre en évidence la transmission d'une anomalie de la méthylation de l'ADN via les gamètes chez l'homme, bien que certains cas de cancer ait pu susciter cette réflexion (Suter et al., 2004; Chan et al., 2006; Hitchins et al., 2007). En effet, la publication, de 2 cas de transmission familiale de cancer colorectal sans polypose liés à une hyperméthylation du promoteur *MLH1* et *MSH2* a questionné la communauté scientifique et a largement contribué à alimenter le débat sur le risque de transmission d'une épimutation chez l'homme (Suter et al., 2004; Chan et al., 2006; Hitchins et al., 2007). Or depuis et grâce à l'avènement du pan-génomique, des mutations génétiques ont pu être identifiées et rattachées à ces défauts de méthylation : polymorphisme : c-27C>A et délétion du gène *EPCAM* impliqués respectivement dans l'hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* et *MSH2* (Hitchins et al., 2011; Ligtenberg et al., 2009).

De même, les enfants des femmes dont les mères ont été soumises à la famine hollandaise *in utero* étaient de plus petite taille à la naissance (-0,6 cm) avec une augmentation de l'indice pondéral (+ 1,2 kg/m²) par rapport aux enfants des mères non exposées. De plus une altération de leur état de santé avait été rapportée mais sans augmentation d'obésité ou de maladies cardiovasculaires. Ceux dont le père avait été exposé *in utero* à la famine avaient un poids plus élevé et un risque accru d'obésité (+ 1,6 kg/m²). Aucune différence n'a été observée à l'heure actuelle chez les arrières-petits enfants de femmes exposées à la famine (Veenendaal et al., 2013).

Les études transgénérationnelles chez l'homme demeurent néanmoins très délicates et nécessitent plusieurs décennies: nécessité d'étudier 2 à 3 générations successives, potentialité des biais environnementaux, psychiques et comportementaux. Pour l'instant, seuls des modèles originaux semblent permettre d'aborder la question chez l'Homme.

III Hypothèses et Objectifs du travail

Les notions selon lesquelles l'exposition environnementale peut être mémorisée et se transmettre par des mécanismes épigénétiques sont à la base du concept des origines développementales de la santé et des maladies (DOHaD) (Barker et al, 1998) et soulèvent la question d'une possible transmission transgénérationnelle chez l'Homme.

En effet, chez la souris il a été montré que les impacts environnementaux liés à l'alimentation, au stress, aux produits chimiques ou à d'autres influences psychoaffectives pourraient affecter plusieurs générations et, des modifications épigénétiques seraient impliquées qui se transmettraient via le gamète (Manikkam et al., 2012, 2013, 2014 ; Tracey et al., 2013 ; Guerrero-Bosagna et al., 2010 ; Skinner et al., 2013). Néanmoins les mécanismes restent peu documentés et le principal défi est d'identifier les messagers de cette exposition environnementale qui pourraient être transférés d'une génération à l'autre. Les principales pistes convergent vers certaines régions de l'ADN : les GSE, les séquences répétées dont les marques épigénétiques pourraient être altérées lors de la reprogrammation gamétique ou encore plus récemment vers les petits ARN non codants.

Dans ce travail nous avons souhaité aborder la question du risque de transmission de dérégulation épigénétique (épimutation) **chez l'Homme**, ce qui restreint considérablement les possibilités d'analyses. La première contrainte, d'ordre éthique, est liée à l'accessibilité des gamètes confinant principalement l'exploration au versant masculin et ainsi à l'étude de la spermatogenèse. La deuxième est liée aux possibilités limitées d'analyser l'effet d'une exposition épimutagène sur la descendance, en effet cela suggère l'identification de l'épimutation, de déterminer son origine et de réaliser l'analyse sur deux voir trois générations successives, ce qui serait temporellement difficile, tout en élimant l'implication de facteurs génétiques.

Ainsi nous avons tout d'abord porté notre attention sur les pathologies liées à l'empreinte parentale qui constituent une approche originale pour aborder le risque de transmission épigénétique chez l'Homme. En effet, le projet parental d'un patient présentant un syndrome de Silver-Russell lié à une hypométhylation du locus *H19/IGF2*, découverte lors de la prise en charge, a soulevé la question du risque de transmission à sa descendance, et constituait un excellent modèle pour évaluer la reprogrammation d'une épimutation chez l'homme. Ce travail constitue le corps du premier article.

De plus, le constat d'une fréquence plus élevée d'enfants issus d'AMP chez les enfants atteints de pathologies liées à l'empreinte suggère un effet de l'environnement dans la survenue de défauts de marquage de l'empreinte parentale (DeBaun et al, 2003 ; Gicquel et al, 2003 ; Maher et al, 2003 ; Blik et al, 2006 ; Kagami et al, 2007). A ce jour aucune des techniques d'AMP n'a été mise en cause et il se pourrait que ces anomalies soient dû à un défaut d'établissement de l'empreinte durant la reprogrammation gamétique. Afin d'évaluer cette hypothèse, nous avons analysé le niveau de méthylation de plusieurs DMRs impliquées dans les syndromes de SBW et SRS sur les spermatozoïdes de pères d'enfants atteints de ces syndromes. Les résultats préliminaires sont présentés dans ce travail de thèse et feront l'objet d'une prochaine publication après inclusion d'un nombre suffisant de cas.

Nous avons poursuivi notre exploration sur l'origine et le risque de transmission des épimutations chez l'homme, par un tout autre modèle, portant cette fois sur l'analyse de la méthylation de l'ADN des GSE de spermatozoïdes d'hommes atteints de séminome. En effet, depuis plusieurs décennies le constat de l'augmentation de l'incidence des cancers du testicule dans les pays développés, tel que les séminomes, suggère l'implication de modifications environnementales (Le Cornet et al., 2014; McGlynn et al., 2003; Purdue et al., 2005; Znaor et al., 2014), qui pourraient survenir durant la période fœtale comme le suppose la théorie de la DOHaD. De plus les caractéristiques épigénétiques des cellules séminomateuses : hypométhylation de l'ADN spécifique de certaines régions soumises à empreinte, et particulièrement proches de celles observées dans les spermatozoïdes d'hommes oligozoospermiques, nous ont conduit à émettre l'hypothèse de la survenue d'une dérégulation de l'empreinte dans les cellules germinales fœtales. Ainsi les résultats de l'analyse de méthylation au niveau de régions soumises à empreinte dans les spermatozoïdes d'hommes atteints de séminome constituent le corps du deuxième article qui vient d'être accepté dans le journal « clinical epigenetics ».

IV Travaux personnels :

**Analyse expérimentale du risque de transmission
d'une épimutation chez l'homme**

IV.A Evaluation du risque de transmission d'une épimutation liée à un défaut de méthylation chez l'homme

IV.A.1 Contexte scientifique et modèle expérimental

D'après le modèle murin, un effacement des marques épigénétiques, notamment au niveau de la méthylation de l'ADN, a lieu lors de deux périodes du développement, la première lors de la gamétogenèse et la seconde lors du développement embryonnaire précoce, juste après la fécondation. Cette reprogrammation épigénétique limiterait la transmission d'une épimutation, sous couvert que cette dernière ne soit pas génétiquement déterminée.

Chez l'Homme les possibilités d'étudier cette reprogrammation épigénétique sont très limitées, du fait de l'accessibilité des gamètes durant la période fœtale et des possibilités restreintes de réaliser des analyses au cours du développement embryonnaire. Néanmoins quelques données sont disponibles, obtenues à partir de gonades fœtales et d'embryons humains donnés à la recherche et convergent vers l'idée qu'une reprogrammation serait effective chez l'homme : diminution du niveau de méthylation de l'ADN dans l'embryon préimplantatoire ainsi qu'au niveau des cellules germinales fœtales (Kerjean et al., 2000 ; Wermann et al., 2010).

Cependant la publication, de 2 cas de transmission familiale de cancer colorectal sans polypose liés à une hyperméthylation du promoteur *MLH1* et *MSH2* a questionné la communauté scientifique et a largement contribué à alimenter le débat sur le risque de transmission d'une épimutation chez l'homme (Chan et al., 2006; Hitchins et al., 2007; Suter et al., 2004). Or depuis et grâce à l'avènement du pan-génomique, des mutations génétiques ont pu être identifiées et rattachées à ces défauts de méthylation : polymorphisme : c-27C>A et délétion du gène *EPCAM* impliqués respectivement dans l'hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* et *MSH2* (Hitchins et al., 2011; Ligtenberg et al., 2009).

Le cas tout à fait exceptionnel d'un patient présentant un syndrome de Silver-Russell (SRS) en désir de paternité nous a permis d'aborder la question de la reprogrammation épigénétique chez l'homme. En effet 60% des cas de SRS sont liés à une hypométhylation de la région contrôlant l'empreinte ICR1 du locus *H19/IGF2*, sans que des facteurs *cis* ou *trans* n'aient pu être rattachés à ce jour (Gicquel et al., 2005, Netchine et al., 2007). Cette demande constituait une opportunité

extraordinaire d'étudier le risque de transmission d'une épimutation primaire chez l'homme, du fait de la rareté des pathologies liées à l'empreinte paternelle (fréquence du SRS estimée à 1/100 000) et de la possibilité d'analyser les gamètes du patient.

Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés à caractériser cette épimutation : localisation, intensité, à déterminer son caractère primaire ou secondaire en recherchant des facteurs *trans* et *cis* associés (séquençage, exome). Il était important de réaliser ces analyses sur plusieurs types cellulaires, issus de dérivés embryologiques différents (sang, salive, peau, urine), afin d'évaluer la présence d'un mosaïcisme somatique.

Ainsi le statut hypométhylé de l'ICR1 du locus *H19/IGF2* et du promoteur *H19* localisé sur la région 11p15 mis en évidence par ASMM-RTqPCR (allele-specific methylated multiplex real-time quantitative PCR) (index de méthylation de 21 et 19 respectivement pour des valeurs normales : 47-54 moy+/- SD) a pu être confirmé par clonage séquençage après traitement de l'ADN au bisulfite (cellules sanguines): perte du niveau de méthylation de 50% en comparaison à un témoin apparié sur l'âge. Après analyse par pyroséquençage de l'ADN bisulfité, l'hypométhylation a été retrouvée sur les différents types cellulaires analysés suggérant une origine somatique de ce défaut de méthylation. De plus, cette hypométhylation s'est avérée être étendue à la région 5' de l'ICR1 touchant les DMR0 et DMR2 du gène *IGF2*, néanmoins moins prononcée sur ces sites distaux (notamment au niveau des cellules sanguines). De plus, nous avons pu éliminer une altération multiloci en testant par pyroséquençage le niveau de méthylation de 9 DMRs: 8 soumises à empreinte maternelle (*KCNQ1OT1- MEST -PEG3- SNRPN- IGF2R- ZAC1- GRB10*) et une à empreinte paternelle (*GTL2*). Toutes présentaient un niveau de méthylation normal.

Nous avons ensuite évalué le caractère primaire ou secondaire de cette épimutation. Tout d'abord nous avons exclu l'implication d'une isodisomie uniparentale maternelle des chromosomes 7 et 11 par analyse de marqueurs de microsatellites (D7S2201, D7S1824, D7S505, D7S513, D7S1870, D7S640, D7S820, D7S636, D7S1818) et éliminé une délétion ou duplication de la région 11p15 par CGH-array et par analyse

de CNV (copies number variation) grâce à la Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA).

Nous avons ensuite recherché des variations nucléotiques en *cis*: au niveau de l'ICR1, du promoteur, des exons 1 à 5 et des enhancers du gène *H19*, par séquençage sanger, en portant une attention particulière sur des motifs connus pour influencer le statut de méthylation de l'ADN : CTCF, *OCT4* et *OCT4/SOX2* et ZFP57. Aucune variation génétique en *cis* de la région 11p15 n'a été observée. Puis, nous avons étendu notre analyse à la recherche de potentiels facteurs en *trans* grâce à l'analyse de l'exome, en regardant particulièrement les facteurs impliqués dans l'établissement, le maintien et la lecture des marques épigénétiques ou encore ceux impliqués dans les pathologies liées à l'empreinte. Certaines variations ont été identifiées mais sans qu'elles soient reconnues comme pathologiques d'après les données publiques disponibles (SNP database).

Ces résultats nous ont conduit à conclure à la présence d'une probable épimutation primaire, partielle (perte de 50% du niveau de méthylation), localisée spécifiquement au niveau du locus *H19/IGF2* et probablement d'apparition précoce au cours du développement car présente sur l'ensemble des types cellulaires analysés.

Pour évaluer le risque de transmission à sa descendance, nous avons analysé le niveau de méthylation du locus *H19/IGF2* des spermatozoïdes du patient, et les spermatozoïdes d'un homme fertile apparié sur l'âge ont été utilisés comme contrôles. A noter que, pour s'assurer d'une absence de contamination par des cellules somatiques, les spermatozoïdes ont été sélectionnés sur gradient de densité, et la fraction sélectionnée (10µl) a été systématiquement vérifiée sous microscope. L'analyse de la méthylation de l'ADN a été réalisée par pyroséquençage après traitement de l'échantillon d'ADN par du bisulfite de sodium.

Un niveau de méthylation de plus de 90% a été détecté chez notre patient, niveau tout à fait comparable à celui du témoin. A noter que la mise en évidence d'un SNP (A/C, position chr11 :2021111) sur l'amplicon bisulfité a permis de démontrer que la méthylation était bien complète sur les deux allèles parentaux. De plus les analyses réalisées sur différentes DMRs retrouvaient un niveau équivalent à ceux observés sur les spermatozoïdes de notre témoin. Ces résultats révélaient pour la première fois l'efficacité de la reprogrammation de l'empreinte chez l'Homme.

De plus, la possibilité d'étudier les spermatozoïdes du père du patient, nous a permis de tester si cette épimutation avait pu être transmise via les gamètes. Rappelons que d'après le modèle murin, les ICRs échappent à la vague de reprogrammation qui a lieu durant le développement embryonnaire pré-implantatoire. Le niveau de méthylation des spermatozoïdes du père, tout à fait comparable à celui du témoin et de son fils, semble éliminer une origine spermatique dans la survenue du syndrome de Silver-Russell, néanmoins le doute persistera concernant le niveau de méthylation du spermatozoïde fécondant.

Ce premier article appuie l'idée selon laquelle il existerait chez l'Homme, comme chez la souris, une reprogrammation épigénétique au niveau de la méthylation de l'ADN durant la gamétogenèse, ce qui limiterait le risque de transmission d'une épimutation « primaire ».

Ainsi, nous avons pu proposer à ce couple une prise en charge en Assistance médicale à la procréation. L'analyse des paramètres spermatiques a justifié le recours à une fécondation *in vitro* avec ICSI. Une petite fille est née à 38 SA en bonne santé (2Kg600, 46.5cm, PC :31cm). L'examen clinique réalisé à 2 mois était normal, l'analyse de la méthylation de l'ADN du locus *H19/IGF2* sur cellules sanguines a été réalisé et s'est avéré normal. La comparaison du niveau de méthylation du locus *H19/IGF2* sur cellules sanguines avec son père (patient SRS) et son grand-père est présentée sur la figure 30 et le tableau 7. Une différence significative a pu être observée entre le père et sa fille, pour les séquences soumises à empreinte *H19-CTCF3* et *IGF2-DMR2*.

Risque de transmission d'une épimutation liée à un défaut de méthylation chez l'homme ?

Protocole exploratoire

Père du patient

Patient Silver-Russell
Hypométhylation du locus *H19-IGF2*
ASMM RT-qPCR

Témoin fertile
apparié sur l'âge

Mère du patient

- Absence de disomie uniparentale maternelle du chromosome 7
Marqueurs de microsatellites
- Méthylation normale du locus *KCNQ1*
ASMM RT-qPCR
- Absence de délétion ou duplication du locus 11p15
détection CNV/ MLPA

Prélèvements

Cell germinales :
spermatozoïdes
Cell somatiques : sang

Cell germinales : spermatozoïdes
Cell somatique : sang, salive,
biopsie peau, urine

Cell germinales :
spermatozoïdes
Cell somatiques : sang

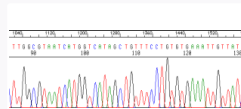
Traitement au bisulfite de l'ADN des échantillons avant analyse de la méthylation par pyroséquençage et clonage-séquençage

A/ Caractérisation de l'épimutation

1/ Origine génétique ?



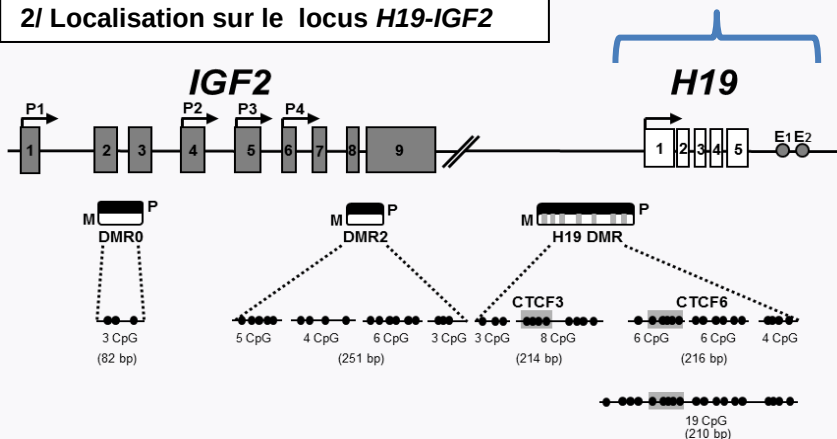
Facteurs TRANS
Exome
CGHarray



Eléments cis-régulateurs :

ICR1, promoteur, exons 1 à 5, enhancers

2/ Localisation sur le locus *H19-IGF2*



3/ Etendue à d'autres GSE ?

Niveau de méthylation de *GTL2- KCNQ1OT1- MEST -PEG3- SNRPN- IGF2R- ZAC1- GRB10*

Pyroséquençage

4/ Type cellulaire porteur de l'épimutation : mosaïcisme ?

Niveau de méthylation de CTCF3 et CTCF6 du locus *H19-IGF2* : Salive- peau-urine

Pyroséquençage

B/ Evaluation de l'origine et de la transmission de l'épimutation

1/ Évaluation de l'origine

Niveau de méthylation du locus *H19/IGF2* et *GSE* maternelle : *KCNQ1- KCNQ10T1- MEST*

des spermatozoïdes du père du patient SRS

Pyroséquençage

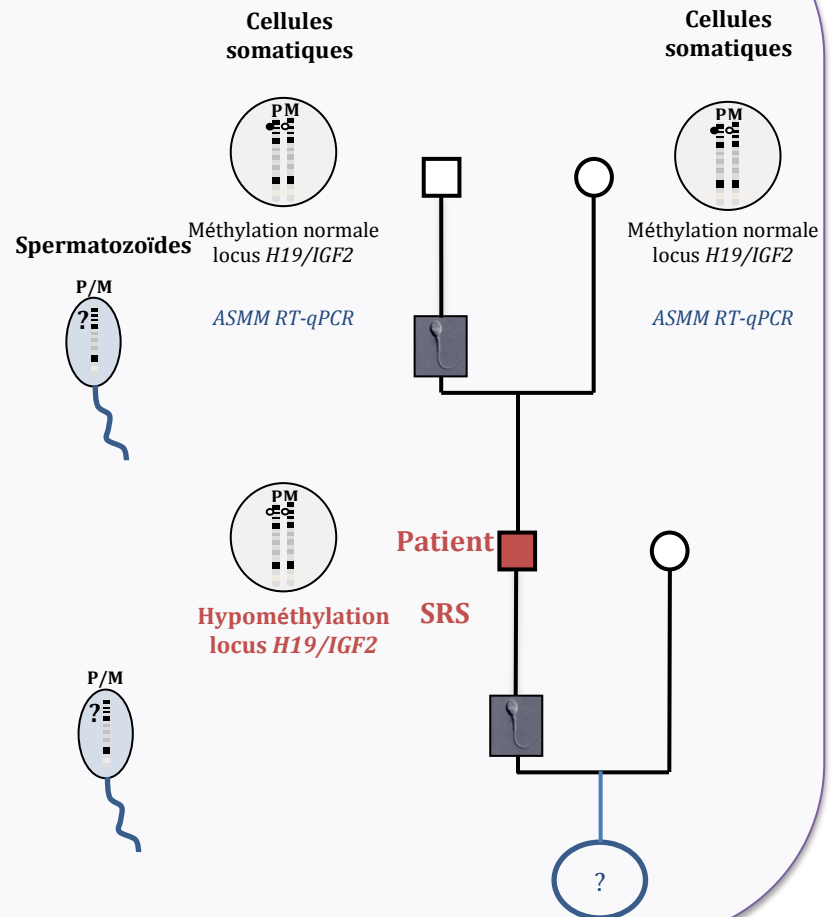
2/ Évaluation de la transmission

Niveau de méthylation de locus *H19/IGF2* + *GTL2-KCNQ1-KCNQ10T1-MEST-PEG3*

SNRPN-IGF2R-ZAC1-GRB10

des spermatozoïdes du patient SRS

Pyroséquençage



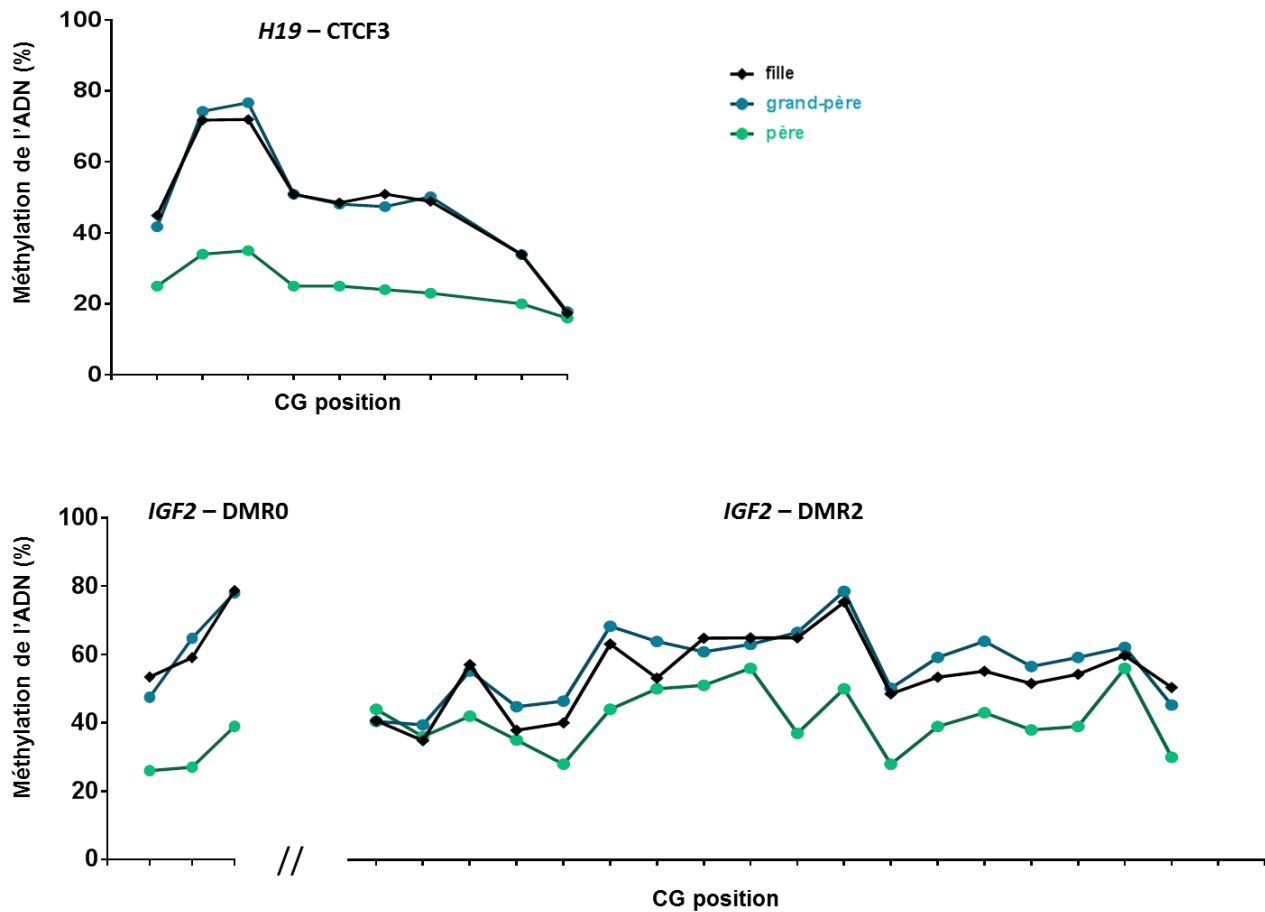


Figure 30 : Niveau de méthylation de l'ADN des cellules sanguines de la fille du patient SRS (rond noir), du patient SRS (rond vert) et du grand-père (rond bleu). Analyses réalisées sur cellules sanguines par pyroséquençage.

	Fille Moy+/-ET	Témoin Grand-père Moy+/-ET	<i>P</i> *	Patient SRS Père Moy+/-ET	<i>P</i> **
H19 – CTCF3	51.6 +/- 22.8	51.6 +/- 23.8	0.91	25.2 +/- 5.6	0.03
IGF2 – DMR0	63.7 +/- 13.3	63.4 +/- 15.3	0.44	30.7 +/- 7.2	0.01
IGF2 – DMR2	53.9 +/- 10.8	56.8 +/-10.5	0.99	41.4 +/- 8.2	0.1

Tableau 7 : Comparaison du niveau de méthylation de l'ADN de la région H19/IGF2 de la fille du patient SRS, du patient SRS et du grand-père (témoin).

Analyses réalisées sur cellules sanguines par pyroséquençage. test de Mann-Whitney.

* comparaison du niveau de méthylation de la fille vs le témoin

** comparaison du niveau de méthylation de la fille vs le père

Article I

ORIGINAL ARTICLE

Germline correction of an epimutation related to Silver–Russell syndrome

Céline Bruno^{1,2,†}, Virginie Carmignac^{1,†}, Irène Netchine^{5,6}, Cécile Choux¹, Yannis Duffourd¹, Laurence Faivre^{1,3}, Christel Thauvin-Robinet^{1,3}, Yves Le Bouc^{5,6}, Paul Sagot⁴, Déborah Bourc'his⁷ and Patricia Fauque^{1,2,*}

¹Equipe GAD, Génétique des Anomalies du Développement, EA 4271, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France, ²Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Maternité, ³Centre de Génétique et Centre de Référence Anomalies du Développement et Syndromes Malformatifs de l'Inter-région Est and ⁴Service de Gynécologie-Obstétrique, Maternité, Centre Hospitalier Universitaire, 21000 Dijon, France, ⁵Explorations fonctionnelles endocriniennes, hôpital d'Enfants Armand-Trousseau, AP-HP, 75571 Paris, France, ⁶Centre de Recherche St-Antoine UPMC-Inserm U938, 75571 Paris cedex 12, France and ⁷Institut Curie, Unité de Génétique et Biologie du Développement, CNRS UMR 3215/INSERM U934, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France

*To whom correspondence should be addressed at: Laboratoire de Biologie de la Reproduction, CHU Dijon, BP 77908, 14 rue gaffarel, 21079 Dijon Cedex, France. Tel: +33 380295031; Fax: +33 380295116; Email: patricia.fauque@chu-dijon.fr

Abstract

Like genetic mutations, DNA methylation anomalies or epimutations can disrupt gene expression and lead to human diseases. However, unlike genetic mutations, epimutations can in theory be reverted through developmental epigenetic reprogramming, which should limit their transmission across generations. Following the request for a parental project of a patient diagnosed with Silver–Russell syndrome (SRS), and the availability of both somatic and spermatozoa DNA from the proband and his father, we had the exceptional opportunity to evaluate the question of inheritance of an epimutation. We provide here for the first time evidence for efficient reversion of a constitutive epimutation in the spermatozoa of an SRS patient, which has important implication for genetic counseling.

Introduction

DNA methylation patterns are globally reset during two phases of development in mammals: during germline development and in the early embryo, following fertilization (1). This epigenetic reprogramming may reduce the possibility of hereditary transmission of acquired epimutations, provided that the methylation defects are not genetically determined. On this point, cases of intergenerational inheritance of pathological DNA hypermethylation at the DNA mismatch repair gene *MLH1* in familial cases of cancers have been recently disproved: these epimutations were

not epigenetic by nature but secondary to genetic mutations promoting aberrant DNA methylation gain (2). Interestingly, while methylation-prone *MLH1* genetic mutations are inherited, the epimutation itself is not passed across generations but reestablished on the mutant haplotype at each new generation. It is therefore still unknown whether primary epimutations present a risk of hereditary transmission (3).

Imprinting disorders can result from both genetic mutations and primary epimutations, often located in *cis*-regulatory regions known as imprinting control regions (ICRs). However, imprinting

[†] Authors contributed equally to this work.

Received: February 4, 2015. Revised and Accepted: February 26, 2015

© The Author 2015. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

disorders caused by an epimutation are rare and the difficulty and ethical restriction linked to oocyte availability constrain studies to spermatozoa and therefore to paternal inheritance of epimutations. The Silver–Russell syndrome (SRS; OMIM #180860) related to a loss of methylation on the ICR1 paternal allele at the *H19/IGF2* locus (11p15) (~60% of the SRS patients) could provide the ideal context to study multigenerational epigenetic inheritance and the potential for developmental epigenetic reprogramming to reset epigenetic errors (4–6). Only few cases of *cis*-defects including rearrangements or mutations affecting the 11p15 region have been linked to this methylation defect, and no *trans*-acting factor has been implicated (7–9). Furthermore, cases of discordant monozygotic twins provide strong evidence that SRS-associated primary epimutations can exist, without underlying sequence variation (10).

The potential for intergenerational inheritance of SRS paternal epimutations is usually not accessible owing to four main limitations: (1) the estimated frequency of SRS men is low (~1:200 000) (11), (2) the SRS patient needs to be in childbearing age, to get access to mature spermatozoa, (3) the SRS needs to be related to an isolated DNA methylation defect at ICR1 domain and (4) the father has to be alive and his sperm sample available. Following the exceptional request for a parental project in an SRS proband, we had the opportunity to investigate the heritability of epimutations in the context of human imprinting disorders.

Results

The 29-year-old proband, who presented with typical SRS features (Table 1), was diagnosed as an epimutation carrier based on the hypomethylated status of the *H19/IGF2* ICR1 and the *H19* promoter located in the 11p15 region assessed by allele-specific methylated multiplex real-time quantitative PCR (12), expecting 21 and 19 of methylation index, respectively (normal values: 47–54, mean ± 2 SD).

Using bisulfite cloning-sequencing, we confirmed the *H19/IGF2* ICR1 methylation loss and measured a 50% reduction in total *H19/IGF2* ICR1 methylation levels in blood DNA compared with his father and an unrelated control individual (Fig. 1B). Using pyrosequencing, the hypomethylation was detected in blood, skin biopsy, buccal mucosa and urine DNA (Tables 2 and 3), suggesting a soma-wide occurrence of the epigenetic defect in the proband. Moreover, the hypomethylation was found to span the 11p15 region toward two additional regions of differential methylation (DMRs) located in 5' to ICR1 and associated with the *IGF2* gene (DMR0 and DMR2), although the methylation defect was less pronounced at these distal sites (Fig. 1C and TABLE 2). Finally, we ruled out a multilocus alteration by demonstrating normal methylation at nine regions subject to genomic imprinting, of paternal (*DLK1/GTL2*) or maternal origin (*KCNQ1*, *MEST*, *KCNQ1OT1*, *PEG3*, *SNRPN*, *IGF2R*, *ZAC1* and *GRB10*) (Table 2 and Supplementary Material, Fig. S1). From these epigenetic studies, we concluded that the proband was a carrier of a soma-wide, partial 11p15-specific methylation loss, which spread locally over different DMRs.

To get insights into the molecular basis of the epimutation, we first excluded the involvement of uniparental isodisomy (UPiD) of chromosomes 7 and local deletion/duplication of the 11p15 region by haplotype analysis, comparative genomic hybridization (CGH) and copy number variant analysis (Table 1). Using targeted Sanger sequencing, we searched for potential nucleotide variations of *cis*-regulatory sequences in the 11p15 region, focusing on the promoter, exons or enhancers of the *H19* gene and the entire ICR1. In particular, we screened for

Table 1. Main clinical and genetic features found in the SRS proband

Clinical features	
Gestational age, weeks	39
ART/ovarian induction	No
Familial information	
Siblings	1 healthy sister
Gemilarity	No
Phenotype	
Intrauterine growth retardation	+
Birth weight (g)	2041 [–2.0 SD]
Birth length (cm)	41 [–2.0 SD]
Birth OFC (cm)	35
Body asymmetry (cm) ^a	2
Facial dysmorphism	Triangular face, frontal bossing/ high forehead, micrognathia/ retrognathia
Clinodactyly	No
Adult BMI (N: 18–25)	21
Genital abnormalities	Ectopic testis
Genetic features	
Microsatellite loci analysis confirming the paternity	+
Uniparental disomy chromosome 7	–
11p15 Deletion/duplication	
ICR1 duplication on maternal chromosome	–
Promoter deletion on paternal chromosome	–
<i>H19</i> sequencing	
Promoter	–
Exons	–
Enhancers E1 E2	–
Binding sites ZFP57, OCT4/ SOX2 and OCTA	–
Array-CGH	–
Whole-exome sequencing	–

–: without abnormality.
ART, assisted reproductive technologies; OFC, occipito-frontal circumference.
^a2 cm between left and right lower limbs.

mutations in binding motifs for transcription regulators, which influence DNA methylation states. Binding of CTCF, OCT4 and OCT4/SOX2 may entail protection of the unmethylated maternal allele of the *H19/IGF2* ICR1, as alteration of their sequence recognition sites at this locus is associated with a gain of methylation in Beckwith–Wiedemann patients (8,13). In contrast, ZFP57 is required for maintaining methylation at imprinted genes by recruiting the KAP1-centered heterochromatic complex (14,15). Although not formerly considered, genetic modification of one or more of all the ten ZFP57 binding sites (TGCCGC motifs) embedded in and around the *H19/IGF2* ICR1 could lead to methylation loss. Nevertheless, we could not link the methylation defect to any *cis* genetic variation in the 11p15 region. Furthermore, we carried out extensive mutation screening by whole-exome sequencing of factors involved in the establishment, maintenance or reading of DNA methylation marks and/or related to imprinting disorders (Table 4). Some sequence variations were detected, but considering their record in public SNP databases, they were very unlikely to be pathogenic mutations. From our genetic analysis, the 11p15 hypomethylation seemed to exist independently from mutations in *cis*- or *trans*-acting

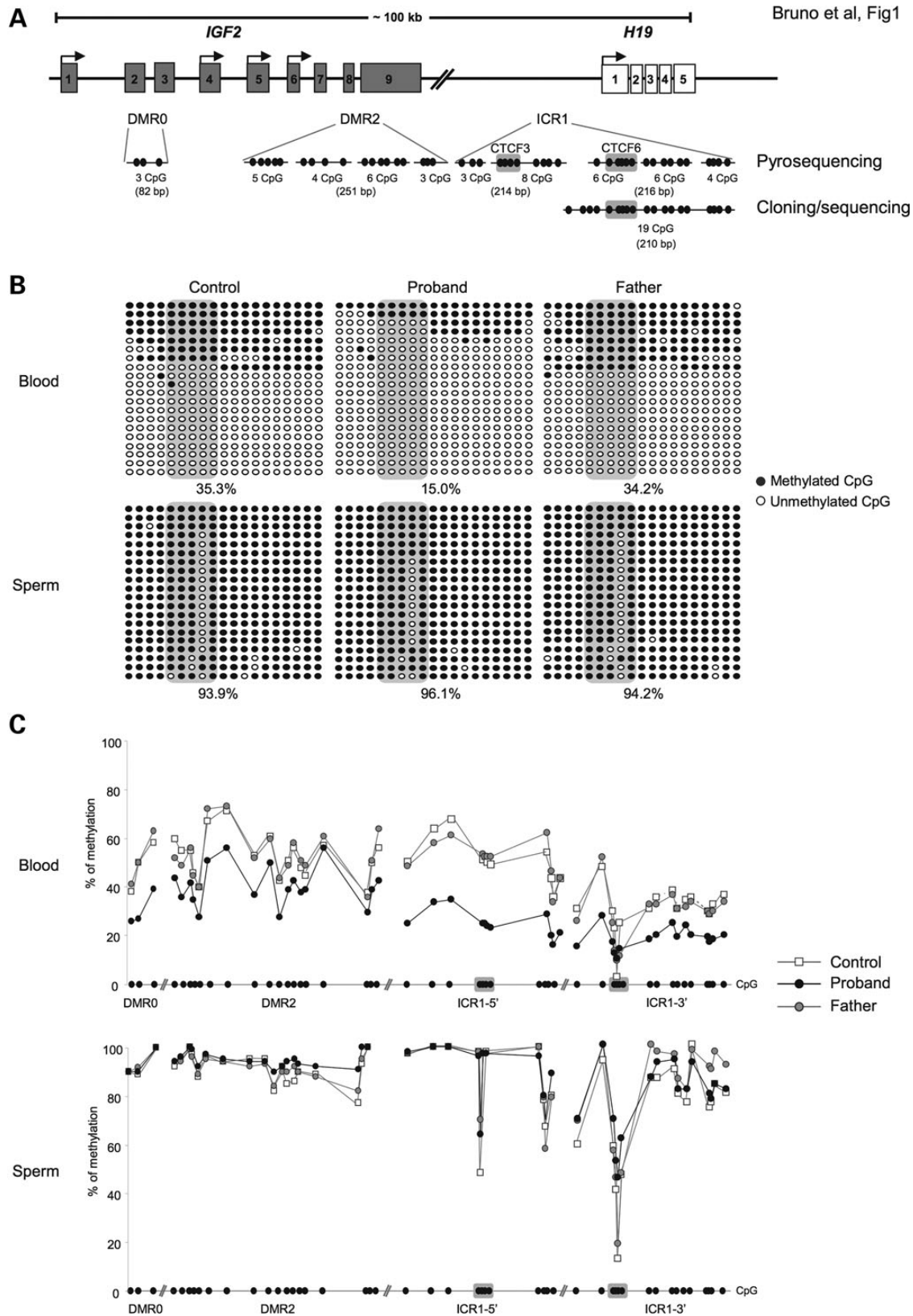


Figure 1. (A) Representation of regions analyzed by pyrosequencing and cloning-sequencing at the *H19/IGF2* locus. CTCF-binding sites (gray stripes), CpGs (black circles). (B and C) *H19/IGF2* methylation levels (%) in control, proband and father's blood and sperm samples. Cloning-sequencing analysis of *H19/IGF2* ICR1 (b). Pyrosequencing analysis of DMR0-DMR2 *IGF2* and *H19/IGF2* ICR1 (5'-3') (c).

Table 2. DNA methylation levels of main imprinted genes in blood and sperm samples from a control, the SRS proband and his father by using bisulfite pyrosequencing

Imprinted genes	Paternal (P) or maternal (M) methylation	Tissue Blood Control mean (%)	Father mean (%)	Proband Mean (%)	Sperm Control mean (%)	Father mean (%)	Proband mean (%)
H19/IGF2 ICR1	P						
CTCF3		51.8	51.9	25.2	87.5	88.6	89.7
CTCF6		35.4	33.8	21.0	85.4	88.8	84.2
IGF2	P						
DMR0		48.7	51.3	30.7	93.0	94.0	93.3
DMR2		53.3	54.0	41.4	92.0	92.5	95.1
GTL2	P	60.6	–	60.6	85.0	–	88.0
IGF2R	M	66.5	–	63.3	2.9	–	3.5
GRB10	M	38.2	–	43.0	1.7	–	1.3
KCNQ1	M	39.6	42.1	40.2	3.0	2.4	2.4
KNCQ1OT1	M	38.8	39.4	38.8	2.6	3.9	4.0
MEST	M	44.6	48.3	48.6	4.1	4.3	3.7
PEG3	M	46.0	–	45.8	4.2	–	3.0
SNRPN	M	36.6	–	36.1	2.0	–	2.3
ZAC1	M	46.0	–	43.1	1.5	–	2.5

Table 3. DNA methylation levels at the H19/IGF2 ICR1 in the buccal mucosa from controls, the father and the SRS proband and in the skin biopsy and urine from a control and the SRS proband by using bisulfite pyrosequencing

	Buccal mucosa Control Mean (%)	Father Mean (%)	Proband Mean (%)	Skin Control Mean (%)	Proband Mean (%)	Urine Control Mean (%)	Proband Mean (%)
H19/IGF2 ICR1							
CTCF3	52.3	50.5	28.8	59.8	46.9	61.3	44.3
CTCF6	33.5	34.9	22.0	37.6	22.3	56.5	37.5

Table 4. Gene list of DNA methylation inducers and regulators analyzed by whole-exome sequencing

Gene	Genomic coordinates ^a	Function	References
DNMT3A (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha)	Chr 2: 25455845–25565459	De novo DNA methyltransferase	(16)
DNMT3B (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta)	Chr 20: 31350191–31397162	De novo DNA methyltransferase	(16)
DNMT3L (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like)	Chr 21: 45666222–45682099	Cofactor of DNMT3A, and 3B	(17)
DNMT1 (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1)	Chr 19: 10244021–10341962	Maintenance DNA methyltransferase	(18,19)
KDM1B (LSD2; lysine (K)-specific demethylase 1B)	Chr 6: 18155560–18224084	H3K4 demethylase	(20)
ZFP57 (ZFP57 zinc finger protein)	Chr 6: 29640169–29648887	KRAB zinc finger protein	(14 ^b ,15,21)
KAP1 (TRIM 28; tripartite motif containing 28)	Chr 19: 59055458–59062089	Heterochromatin protein	(22)
NLRP2 (NALP2; NLR family, pyrin domain containing 2)	Chr 19: 55464498–55512510	Caterpillar protein	(23) ^b
NLRP7 (NALP7; NLR family, pyrin domain containing 7)	Chr 19: 55434877–55477680	Caterpillar protein	(24) ^b
C6ORF221 (KHDC3L; KH domain containing 3-like, subcortical maternal complex member)	Chr 6: 74072400–74073894	ND	(25) ^b
CTCF (CCCTC-binding factor)	Chr 16: 67596310–67673086	Zinc finger protein	(8)
MBD3 (methyl-CpG-binding domain protein 3)	Chr 19: 1576639–1592882	Methyl-CpG-binding protein	(26,27)
MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2)	Chr X: 153287024–153363212	Transcription repressor	(28 ^b ,29)
MTA2 (metastasis associated 1 family, member 2)	Chr 11: 62360686–62369312	Protein of the NuRD complex	(30)
CTCF/BORIS (CCCTC-binding factor (zinc finger protein)-like)	Chr 20: 56071035–56100708	Zinc finger protein	(31,32)
PGC7/STELLA (DPPA3; developmental pluripotency associated 3)	Chr 12: 7864050–7870155	Transcription factor	(33,34)
OCT4 (POU5F1, POU class 5 homeobox 1)	Chr 6: 31132119–31148508	Transcription factor	(35)
SOX2 (SRY: sex determining region Y-box 2)	Chr 3: 181429714–181432221	Transcription factor	(35)
TET1 (tet methylcytosine dioxygenase 1)	Chr 10: 70320413–70454239	5-methylcytosine oxidase	(33)
TET2 (tet methylcytosine dioxygenase 2)	Chr 4: 106067032–106200973	5-methylcytosine oxidase	(33)
TET3 (tet methylcytosine dioxygenase 3)	Chr 2: 74229840–74335303	5-methylcytosine oxidase	(16)

Chr, chromosome; ND, not documented.

^aAccording to GRCh37/hg19.^bFactors involved in pathogenesis of imprinting disorders.

elements, which probably classifies it as a putative primary epimutation.

Furthermore, to investigate the potential inheritance of this epimutation, we profiled DNA methylation in purified spermatozoa. In contrast to somatic tissues, where the hypomethylation was invariably detected, methylation levels were >90% in the proband's sperm, at the ICR1 and throughout the 11p15 region, at levels expected for a paternally imprinted locus (Fig. 1B and c). Although the parental sequence was not informative, the presence of a heterozygous SNP (A/C, position Chr11: 2021111) within the bisulfite amplicon demonstrated full methylation of the two parental alleles (Supplementary Material, Fig. S2). Importantly, the KCNQ1OT1 locus had a methylation level close to 0%, as expected for a maternally imprinted locus, which excluded somatic cell contamination in the proband's sperm sample (Supplementary Material, Fig. S1). Moreover, analysis of additional imprinted loci showed similar levels of methylation in the proband and the control, highlighting that imprinting settings were properly executed genome wide in the proband's germline. Of note, we also found normal methylation levels at the *H19/IGF2* ICR1 and at other imprinted loci in the proband's father's sperm (Fig. 1B and c).

Finally, the proband and his wife are expecting a child conceived after *in vitro* fertilization (by ICSI method: Intra Cytoplasmic Sperm Injection because of low-sperm parameters, Supplementary Material, Table S1). At the second trimester (17 weeks' gestational +6 days), all fetal growth data display normal values (Supplementary Material, Table S2), indicating a lack of SRS phenotype.

Discussion

We provide here for the first time a risk assessment for intergenerational inheritance of an epimutation in an SRS patient. At this stage, the molecular etiology of the epimutation we identified is still uncertain. However, our extensive genetic characterization tends to rule out the involvement of a genetic defect and rather favors the hypothesis of a sporadic, primary epimutation. Several lines of evidence suggest that the epimutation onset was linked to post-zygotic development: the methylation loss in the soma is partial, which probably reflects cellular mosaicism, and the methylation defect extends over the *IGF2* DMR0 and DMR2, whose paternal-specific methylation was shown in the mouse model to be somatically acquired in the early embryo (36). This is further reinforced by the normal methylation we found at the 11p15 region in the sperm of the proband's father, although we cannot formally exclude that the epimutation may have existed in the paternal gamete from which the proband was born and may have been corrected with varying efficiency from cell to cell after fertilization.

Importantly, hypomethylated paternally inherited alleles were observed in the proband's somatic tissues of different origins. This suggests an early developmental origin of the defect, probably upstream of the delineation of the different embryonic germ lineages including the germline. However, in the end-product of germline differentiation, i.e. spermatozoa, full methylation was restored. Two main possibilities could explain this observation. First, germ cells with decreased methylation could have been eliminated, and with a high efficiency considering the close to 100% methylation level in the proband's sperm. Alternatively, this could mean that the paternally inherited alleles were not intrinsically refractory to DNA methylation and that the *H19/IGF2* ICR1 epimutation was efficiently reprogrammed during the proband's spermatogenesis. In theory, correction of the epimutation must

have involved complete parental methylation erasure followed by efficient establishment and maintenance of DNA methylation on both alleles (1). Our findings are in line with a recent report in the mouse, where stochastic epimutations resulting from assisted reproductive technologies were no longer present in the germline of adult male mice produced from these procedures; furthermore, these epimutations were not reproduced in their progenies (37). Similarly, our preliminary clinical analyses of fetal development tend to rule out the existence of SRS-related growth retardation in the proband's child.

Collectively, these results indicate that the risk of transmission of primary methylation errors to subsequent generations is limited, in mice and men, either by selective or reprogramming processes taking place in the developing germline. Altogether, our single case report may have very important implications for future diagnostic strategies and for genetic counseling.

Materials and Methods

Subjects and samples

No previous history of infertility or genetic disease was reported in the proband's family. Peripheral blood, upper limb skin biopsies, buccal swabs and semen were obtained from the proband, his father (except for skin biopsy and urine) and control individuals after receiving their informed consent for research investigations. The research protocol was approved by local ethics committees (DC2011-1332). The control semen sample was obtained from a fertile age-matched man with normal semen parameters according to World Health Organization's criteria (38). Somatic samples were obtained from individuals with no imprinted disorder.

Sperm preparation

Spermatozoa were purified using a Percoll gradient with two concentration layers (90/45%, PureSperm, JCD) to remove lymphocytes, epithelial cells, cell debris, bacteria, abnormal spermatogenic cells and seminal fluid. Sperm purity was controlled by inverted light microscopy, and samples were then stored at -80°C until further use. Bisulfite pyrosequencing and cloning-sequencing of *H19/IGF2* and *KCNQ1OT1* ICR methylation patterns further confirmed the lack of somatic cell contamination.

DNA extraction

Sperm DNA was extracted according to the modified protocol described by Marques *et al.* (39). Briefly, sperm pellets were overlaid with 500 µl of lysis solution (LS) containing 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.2% SDS, 50 mM NaCl, 1 mM DTT and 0.2 mg/ml proteinase K (Fermentas) and incubated overnight at 55°C. Fresh urine (50 ml) was centrifuged 15 min at 3000 rpm and washed twice with PBS 1×. The urine pellet was resuspended in lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.2 mg/ml proteinase K (Fermentas)] and incubated overnight at 50°C. Sperm and urine's DNA was isolated by standard phenol chloroform extraction. Blood samples were processed by adding a hemolytic solution (20 mM Tris, pH 7.5; 5 mM MgCl₂) to 8 ml of blood followed by protein hydrolysis overnight at 55°C using a solution containing 20 mM Tris, pH 7.5; 400 mM NaCl, 2 mM EDTA; SDS 0.5%; 400 µg Proteinase K. DNA was precipitated using cold ethanol (Sigma-Aldrich), washed and solubilized in water. Skin biopsies were mechanically dilacerated in 1.5 ml of LS before being processed as blood samples. Buccal mucosa DNA was extracted using the Prep IT L2P kit (DNA Genotek, Inc.). All DNA

samples were quantified using a Nanodrop Spectrophotometer (Invitrogen).

Chromosome 7 uniparental disomy analysis

Haplotype analysis was performed using nine microsatellite polymorphic markers (D7S2201, D7S1824, D7S505, D7S513, D7S1870, D7S640, D7S820, D7S636 and D7S1818).

Copy number variant detection at the 11p15 locus

Deletion or duplication of the 11p15 locus was investigated by Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA) using the ME030 kit version C1 (MRC-Holland).

Array-comparative genomic hybridization

Array-CGH 4 × 180K analysis was performed according to the Agilent protocol with minor adjustments: DNA was labeled for 4 h by direct incorporation of Cya-5 and Cya-3 using an Oligo-array kit (Enzo) and purified using the QIAmp DNA Mini kit (Qiagen). A graphical overview was obtained using Genomic Workbench (v5.0), with the ADM-2 statistical algorithm (sensitivity threshold: 6.0; moving average window: 0.5 Mb). Mapping data were analyzed on the human genome sequence (version Hg19) using the Ensembl database (www.ensembl.org). Copy Number Variations were assessed in the Genomic Variants Database (<http://projects.tcag.ca/variation/>) (40).

DNA methylation analyses

Methylation status studies at the H19/IGF2 ICR1 (on CTCF3) and H19 promoter have been performed by methylated multiplex real-time quantitative PCR (ASMM RTQ-PCR) after sodium bisulfite DNA treatment as previously described (12,41).

To further characterize the extent of the somatic methylation defect by pyrosequencing and cloning-sequencing, we also relied on bisulfite conversion. Genomic DNA (500 ng) was modified by sodium bisulfite treatment using the EpiTect kit (Qiagen). Bisulfite-treated DNA (25 ng) was subsequently used as the template for PCR amplification prior to pyrosequencing or cloning-sequencing (primer sequences listed in Supplementary Material, Table S3).

Pyrosequencing

Pyrosequencing reactions were performed in the PyroMark Q24 System (Qiagen) with the PyroGold SQA reagent kit according to the manufacturer's instructions (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden). The biotinylated PCR products were purified and denatured using the Pyrosequencing Vacuum Prep Tool (Qiagen). Pyrosequencing was performed on a Pyrosequencer Q24 (Qiagen). The DNA methylation level was calculated as the ratio of the C to T peaks at a given CpG site in pyrograms using Pyromark Q24 Software v.2.0.6 (Qiagen). 3CpGs were excluded for the calculation of the mean methylation level of H19 CTCF6 as performed by Boissonnas et al. (42).

Cloning sequencing

A part of the H19/IGF2 ICR1 (19CpG) and KCNQ1OT1 (22 CpG) regions were amplified by two successive nested PCR reactions using HOT BIOAmp® DNA polymerase (Biofidal). PCR products were separated on a 1.5% agarose gel (Invitrogen) and purified using E.Z.N.A. Gel extraction kit (Omega Bio-tek) following the manufacturer protocol. The purified DNA was quantified using Nanodrop (Invitrogen), and 50 ng was cloned in pCR 2.1-TOPO

Vector using the TOPO-TA cloning kit (Invitrogen) transforming One Shot TOP10 Chemically Competent E. Coli (Invitrogen). Plasmid DNA was extracted from 20 individual colonies for blood and sperm samples using the E.Z.N.A. plasmid Miniprep kit (Omega Bio-tek) and sequenced by the Biofidal Company using M13 forward and reverse primers. Sequences were analyzed for CpG methylation status using BiQ Analyser (<http://biq-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>).

Sanger sequencing analysis

We sequenced the entire ICR1 (GRCh37/hg19 chr11: 2020201–2024487) including OCT4/SOX2-motifs: OSM2 (A2 repeat), OSM3 (A1 repeat) and the SOX2 binding site (B3 repeat) by standard Sanger sequencing methods, using the ABI PRISM Big Dye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit and an ABI 3100 Genetic Analyzer. The sequencing products were then analyzed with SeqScape v2.6 (Lifetechnologies, Courtaboeuf, France) (13). We also sequenced the promoter (5908 bp; –5578 to +29 bp around TSS), exons and enhancers 1 and 2 of H19 gene as well as ZFP57 binding sites within IGF2-H19 region (primers sequences listed in Supplementary Material, Table S4).

Whole-exome sequencing

Capture and sequencing were performed from 1.5 µg of genomic DNA at the Integragen DNA Sequencing Service. Exome capture was performed with the SureSelect Human All Exon V5 kit (Agilent). Generated libraries were sequenced on a HiSeq 2000 (Illumina) according to the manufacturer's recommendations for paired-end 100-bp reads. We generated ~4 Gb of mappable sequences, distributed at least in a 10× depth of coverage on 85% of the targets. Sequencing data were aligned with the Burrows Wheeler aligner (BWA 0.6.1) (43). Single-nucleotide variants and indels were identified with the Genome Analysis Toolkit (GATK v.2.1-10) Unified Genotyper tool with a variant quality score R 30 (44). Variants were then filtered with the GATK Variant Filtration tool and the following hard-filtering expressions: 'QD < 2.0' and 'FS > 200.0.' Filtered variants were annotated with SeattleSeq SNP Annotation (45). We focused on protein-altering and splice-site DNA changes not recorded in the National Heart, Lung, and Blood Institute Exome Sequencing Project, Exome Variant Server, supported by at least two reads and >20% of total reads in the sample.

Fetal growth data collection

Sonographic parameters were measured during the first and second trimesters at 9GA + 6 days, 13 GA + 1 day and 17 GA + 6 days by experienced sonographers and specially trained for these ultrasound examinations. The crown-rump length, biparietal diameter, femur length, abdominal circumference and head circumference were measured using standardized ultrasound procedures, practice on Voluson E8 Expert system (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA).

The concentration of maternal serum-free βhCG and PAPP-A were analyzed with commercially PerkinElmer kit and the DELFIA Xpress analyzer. The values of free βhCG and PAPP-A were expressed as multiples of the median (MoM) for GA according to the annual PerkinElmer guidelines.

Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

Acknowledgements

The authors thank the patient and his family for their contributions to the study and the technicians from the assisted reproductive technologies unit of Dijon's Hospital for their help.

Conflict of Interest statement. None declared.

Funding

This work was funded by grants from the Inserm/DGOS (Recherche Clinique Translationnelle), the Conseil Régional Bourgogne-Franche Comté and the Dijon's Hospital (Appel d'Offres Interne 2013). V.C. is the recipient of a Conseil Regional postdoctoral Fellowship.

References

- Reik, W., Dean, W. and Walter, J. (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, **293**, 1089–1093.
- Hitchins, M.P., Rapkins, R.W., Kwok, C.T., Srivastava, S., Wong, J.J., Khachigian, L.M., Polly, P., Goldblatt, J. and Ward, R.L. (2011) Dominantly inherited constitutional epigenetic silencing of MLH1 in a cancer-affected family is linked to a single nucleotide variant within the 5'UTR. *Cancer Cell*, **20**, 200–213.
- Horsthemke, B. (2007) Heritable germline epimutations in humans. *Nat. Genet.*, **39**, 573–574.
- Gicquel, C., Rossignol, S., Cabrol, S., Houang, M., Steunou, V., Barbu, V., Danton, F., Thibaud, N., Le Merrer, M., Burglen, L. et al. (2005) Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat. Genet.*, **37**, 1003–1007.
- Netchine, I., Rossignol, S., Dufourg, M.N., Azzi, S., Rousseau, A., Perin, L., Houang, M., Steunou, V., Esteva, B., Thibaud, N. et al. (2007) 11p15 imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **92**, 3148–3154.
- Demars, J. and Gicquel, C. (2012) Epigenetic and genetic disturbance of the imprinted 11p15 region in Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes. *Clin. Genet.*, **81**, 350–361.
- Demars, J., Le Bouc, Y., El-Osta, A. and Gicquel, C. (2011) Epigenetic and genetic mechanisms of abnormal 11p15 genomic imprinting in Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndromes. *Curr. Med. Chem.*, **18**, 1740–1750.
- Demars, J., Shmela, M.E., Rossignol, S., Okabe, J., Netchine, I., Azzi, S., Cabrol, S., Le Caignec, C., David, A., Le Bouc, Y. et al. (2010) Analysis of the IGF2/H19 imprinting control region uncovers new genetic defects, including mutations of OCT-binding sequences, in patients with 11p15 fetal growth disorders. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 803–814.
- Gronskov, K., Poole, R.L., Hahneemann, J.M., Thomson, J., Tumer, Z., Brondum-Nielsen, K., Murphy, R., Ravn, K., Melchior, L., Dedic, A. et al. (2011) Deletions and rearrangements of the H19/IGF2 enhancer region in patients with Silver-Russell syndrome and growth retardation. *J. Med. Genet.*, **48**, 308–311.
- Yamazawa, K., Kagami, M., Fukami, M., Matsubara, K. and Ogata, T. (2008) Monozygotic female twins discordant for Silver-Russell syndrome and hypomethylation of the H19-DMR. *J. Hum. Genet.*, **53**, 950–955.
- Vermeiden, J.P. and Bernardus, R.E. (2013) Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection? *Fertil. Steril.*, **99**, 642–651.
- Azzi, S., Steunou, V., Rousseau, A., Rossignol, S., Thibaud, N., Danton, F., Le Jule, M., Gicquel, C., Le Bouc, Y. and Netchine, I. (2011) Allele-specific methylated multiplex real-time quantitative PCR (ASMM RTQ-PCR), a powerful method for diagnosing loss of imprinting of the 11p15 region in Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes. *Hum. Mutat.*, **32**, 249–258.
- Abi Habib, W., Azzi, S., Brioude, F., Steunou, V., Thibaud, N., Neves, C.D., Le Jule, M., Chantot-Bastaraud, S., Keren, B., Lyonnet, S. et al. (2014) Extensive investigation of the IGF2/H19 imprinting control region reveals novel OCT4/SOX2 binding site defects associated with specific methylation patterns in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 5763–5773.
- Li, X., Ito, M., Zhou, F., Youngson, N., Zuo, X., Leder, P. and Ferguson-Smith, A.C. (2008) A maternal-zygotic effect gene, *Zfp57*, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev. Cell*, **15**, 547–557.
- Quenneville, S., Verde, G., Corsinotti, A., Kapopoulou, A., Jakobsson, J., Offner, S., Baglivo, I., Pedone, P.V., Grimaldi, G., Riccio, A. et al. (2011) In embryonic stem cells, *ZFP57/KAP1* recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Mol. Cell*, **44**, 361–372.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. and Li, E. (1999) DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, **99**, 247–257.
- Bliek, J., Snijder, S., Maas, S.M., Polstra, A., van der Lip, K., Alders, M., Knecht, A.C. and Mannens, M.M. (2009) Phenotypic discordance upon paternal or maternal transmission of duplications of the 11p15 imprinted regions. *Eur. J. Med. Genet.*, **52**, 404–408.
- Hirasawa, R., Chiba, H., Kaneda, M., Tajima, S., Li, E., Jaenisch, R. and Sasaki, H. (2008) Maternal and zygotic *Dnmt1* are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev.*, **22**, 1607–1616.
- Saferali, A., Moussette, S., Chan, D., Trasler, J., Chen, T., Rozen, R. and Naumova, A.K. (2012) DNA methyltransferase 1 (*Dnmt1*) mutation affects *Snrpn* imprinting in the mouse male germ line. *Genome*, **55**, 673–682.
- Fang, R., Barbera, A.J., Xu, Y., Rutenberg, M., Leonor, T., Bi, Q., Lan, F., Mei, P., Yuan, G.C., Lian, C. et al. (2010) Human *LSD2/KDM1b/AOF1* regulates gene transcription by modulating intragenic H3K4me2 methylation. *Mol. Cell*, **39**, 222–233.
- Mackay, D.J., Callaway, J.L., Marks, S.M., White, H.E., Acerini, C.L., Boonen, S.E., Dayanikli, P., Firth, H.V., Goodship, J.A., Haemers, A.P. et al. (2008) Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in *ZFP57*. *Nat. Genet.*, **40**, 949–951.
- Kacem, S. and Feil, R. (2009) Chromatin mechanisms in genomic imprinting. *Mamm. Genome*, **20**, 544–556.
- Meyer, E., Lim, D., Pasha, S., Tee, L.J., Rahman, F., Yates, J.R., Woods, C.G., Reik, W. and Maher, E.R. (2009) Germline mutation in *NLRP2* (*NALP2*) in a familial imprinting disorder (Beckwith-Wiedemann Syndrome). *PLoS Genet.*, **5**, e1000423.
- Murdoch, S., Djuric, U., Mazhar, B., Seoud, M., Khan, R., Kuick, R., Bagga, R., Kircheisen, R., Ao, A., Ratti, B. et al. (2006) Mutations in *NALP7* cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nat. Genet.*, **38**, 300–302.
- Parry, D.A., Logan, C.V., Hayward, B.E., Shires, M., Landolsi, H., Diggle, C., Carr, I., Rittore, C., Touitou, I., Philibert, L. et al. (2011) Mutations causing familial biparental hydatidiform

- mole implicate c6orf221 as a possible regulator of genomic imprinting in the human oocyte. *Am. J. Hum. Genet.*, **89**, 451–458.
26. Bachmann, N., Spengler, S., Binder, G. and Eggermann, T. (2010) MBD3 mutations are not responsible for ICR1 hypomethylation in Silver-Russell syndrome. *Eur. J. Med. Genet.*, **53**, 23–24.
 27. Reese, K.J., Lin, S., Verona, R.I., Schultz, R.M. and Bartolomei, M.S. (2007) Maintenance of paternal methylation and repression of the imprinted H19 gene requires MBD3. *PLoS Genet.*, **3**, e137.
 28. Drewell, R.A., Goddard, C.J., Thomas, J.O. and Surani, M.A. (2002) Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2. *Nucl. Acids Res.*, **30**, 1139–1144.
 29. Makedonski, K., Abuhatzira, L., Kaufman, Y., Razin, A. and Shemer, R. (2005) MeCP2 deficiency in Rett syndrome causes epigenetic aberrations at the PWS/AS imprinting center that affects UBE3A expression. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 1049–1058.
 30. Ma, P., Lin, S., Bartolomei, M.S. and Schultz, R.M. (2010) Metastasis tumor antigen 2 (MTA2) is involved in proper imprinted expression of H19 and Peg3 during mouse preimplantation development. *Biol. Reprod.*, **83**, 1027–1035.
 31. Bernier-Latmani, J., Baumer, A. and Shaw, P. (2009) No evidence for mutations of CTCFL/BORIS in Silver-Russell syndrome patients with IGF2/H19 imprinting control region 1 hypomethylation. *PLoS One*, **4**, e6631.
 32. Loukinov, D.I., Pugacheva, E., Vatolin, S., Pack, S.D., Moon, H., Chernukhin, I., Mannan, P., Larsson, E., Kanduri, C., Vostrov, A.A. et al. (2002) BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 6806–6811.
 33. Bian, C. and Yu, X. (2014) PGC7 suppresses TET3 for protecting DNA methylation. *Nucl. Acids Res.*, **42**, 2893–2905.
 34. Nakamura, T., Liu, Y.J., Nakashima, H., Umehara, H., Inoue, K., Matoba, S., Tachibana, M., Ogura, A., Shinkai, Y. and Nakano, T. (2012) PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature*, **486**, 415–419.
 35. Hori, N., Yamane, M., Kouno, K. and Sato, K. (2012) Induction of DNA demethylation depending on two sets of Sox2 and adjacent Oct3/4 binding sites (Sox-Oct motifs) within the mouse H19/insulin-like growth factor 2 (Igf2) imprinted control region. *J. Biol. Chem.*, **287**, 44006–44016.
 36. Lopes, S., Lewis, A., Hajkova, P., Dean, W., Oswald, J., Forne, T., Murrell, A., Constancia, M., Bartolomei, M., Walter, J. et al. (2003) Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 295–305.
 37. de Waal, E., Yamazaki, Y., Ingale, P., Bartolomei, M., Yanagimachi, R. and McCarrey, J.R. (2012) Primary epimutations introduced during intracytoplasmic sperm injection (ICSI) are corrected by germline-specific epigenetic reprogramming. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **109**, 4163–4168.
 38. Cooper, T.G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H.W., Behre, H.M., Haugen, T.B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M.T. et al. (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum. Reprod. Update*, **16**, 231–245.
 39. Marques, C.J., Costa, P., Vaz, B., Carvalho, F., Fernandes, S., Barros, A. and Sousa, M. (2008) Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol. Hum. Reprod.*, **14**, 67–74.
 40. Callier, P., Aral, B., Hanna, N., Lambert, S., Dindy, H., Ragon, C., Payet, M., Collod-Beroud, G., Carmignac, V., Delrue, M. et al. (2013) Systematic molecular and cytogenetic screening of 100 patients with marfanoid syndromes and intellectual disability. *Clin. Genet.*, **84**, 507–521.
 41. Azzi, S., Rossignol, S., Steunou, V., Sas, T., Thibaud, N., Danton, F., Le Jule, M., Heinrichs, C., Cabrol, S., Gicquel, C. et al. (2009) Multilocus methylation analysis in a large cohort of 11p15-related foetal growth disorders (Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes) reveals simultaneous loss of methylation at paternal and maternal imprinted loci. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 4724–4733.
 42. Boissonnas, C.C., Abdalaoui, H.E., Haelewyn, V., Fauque, P., Dupont, J.M., Gut, I., Vaiman, D., Jouannet, P., Tost, J. and Jammes, H. (2010) Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur. J. Hum. Genet.*, **18**, 73–80.
 43. Li, H. and Homer, N. (2010) A survey of sequence alignment algorithms for next-generation sequencing. *Brief. Bioinform.*, **11**, 473–483.
 44. DePristo, M.A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K.V., Maguire, J.R., Hartl, C., Philippakis, A.A., del Angel, G., Rivas, M.A., Hanna, M. et al. (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.*, **43**, 491–498.
 45. Ng, S.B., Turner, E.H., Robertson, P.D., Flygare, S.D., Bigham, A.W., Lee, C., Shaffer, T., Wong, M., Bhattacharjee, A., Eichler, E.E. et al. (2009) Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*, **461**, 272–276.

IV.B Analyse des profils de méthylation des spermatozoïdes de pères d'enfant atteint de syndromes liés à l'empreinte parentale

IV.B.1 Contexte scientifique et modèle expérimental

La gamétogenèse et la période précoce post-fécondation représentent respectivement des fenêtres critiques de perturbation de la mise en place et du maintien de l'empreinte par des facteurs environnementaux. Une fréquence plus élevée d'AMP a été notée dans les séries de SBW et de SRS, suggérant que celle-ci puisse avoir une incidence sur les anomalies de l'empreinte (DeBaun et al., 2003; Gicquel et al., 2003; Johnson et al., 2018; Kagami et al., 2007; Maher et al., 2003). En effet, le risque de SBW est 6 à 9 fois plus élevé chez les enfants issus d'AMP que ceux issus de grossesse spontanée (Soejima and Higashimoto, 2013). Un fait particulier est que dans les désordres de l'empreinte parentale décrits après AMP, l'épimutation implique majoritairement une perte de méthylation, qu'il s'agisse de l'allèle maternel ou paternel. Dans les SBW, il s'agit d'une perte de méthylation de l'allèle maternel au niveau du centre d'empreinte ICR2 (*KCNQ1OT*). En revanche, c'est une déméthylation de l'ICR1 paternel qui a été montrée dans le miroir clinique qu'est le SRS. Chez les animaux (ovins et bovins) une autre pathologie d'empreinte associée à l'AMP a été décrite : le « Large Offspring Syndrome » (LOS) caractérisé par une croissance excessive et lié à une perte de méthylation de l'ICR2 (locus *KCNQ1OT1*) (Chen et al., 2013; Sinclair et al., 2000). Les causes à l'origine de ces anomalies d'empreinte ne sont pas connues. Il peut s'agir d'une des procédures de l'AMP aussi bien que de la stimulation ovarienne (la fin de la mise en place de l'empreinte de l'ovocyte se réalise lors de la période qui précède l'ovulation) ou de la cause de l'infertilité. Pour l'instant, les premières études n'ont pas pu imputer ces anomalies à une technique d'AMP particulière puisque ces anomalies d'empreinte ont été mises en évidence dans chacune.

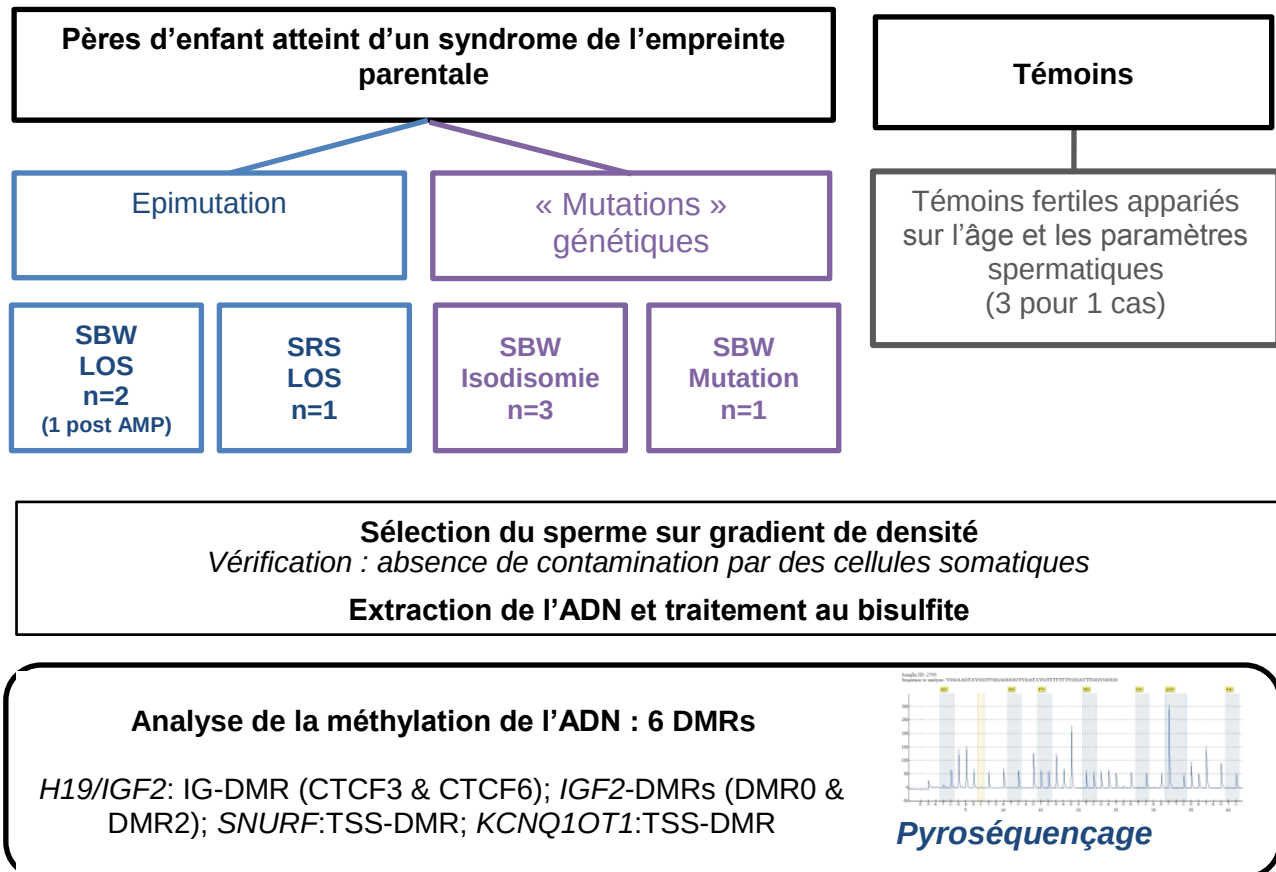
Ainsi, il se pourrait que la survenue de défauts de marquage de l'empreinte durant la gamétogenèse puisse être à l'origine de l'apparition de ces syndromes chez les enfants. En effet, l'empreinte parentale se met en place durant la gamétogenèse, de manière opposée en fonction du sexe de l'individu (chapitre II.1.B.2) et se maintient après la fécondation lors de la reprogrammation du génome embryonnaire. De plus d'après des études réalisées chez des hommes pris en charge en AMP, il existerait

une association entre infertilité masculine, principalement pour les hommes oligozoospermiques, et des défauts de méthylation de l'ADN spermatique notamment au niveau des GSE (Boissonnas et al., 2010; Hammoud et al., 2010; Houshdaran et al., 2007; Kobayashi et al., 2007; Laurentino et al., 2015; Marques et al., 2004, 2008; Montjean et al., 2013, 2015; Poplinski et al., 2010; Santi et al., 2017; Sato et al., 2011).

Afin d'évaluer cette hypothèse, nous avons analysé le statut de méthylation des spermatozoïdes de pères d'enfant présentant une pathologie liée à l'empreinte parentale : SRS ou SBW. Sept pères ont accepté de participer à l'étude, dont un père qui avait eu recours à une FIV dans le cadre d'une endométriose et pour un second sa femme avait bénéficié d'une stimulation simple de l'ovulation. L'analyse de la méthylation de l'ADN spermatique a été réalisée sur 6 DMRs, impliquées dans les SBW et les SRS, et connus pour être fréquemment associées à l'oligozoospermie. Compte tenu du nombre limité d'échantillons analysés nous nous sommes restreint à réaliser des analyses descriptives qui n'ont pas mis en évidence de différence notable notamment entre les syndromes d'origine génétique et épigénétique.

Analyse des profils de méthylation des spermatozoïdes de pères d'enfant atteint de pathologies liées à l'empreinte parentale

Protocole exploratoire



Matériels et méthodes

Inclusion des pères d'enfant atteint de pathologie à l'empreinte

A partir, du registre des enfants pris en charge par le service de génétique du CHU de Dijon, 15 enfants atteints de pathologies liées à l'empreinte (SBW et SRS) ont été recensés. Seuls 7 pères ont souhaité participer à l'étude, trois pères ont exprimé leur refus (problème de distance, vécu difficile de la maladie), trois pères sont restés injoignables ou ne sont pas venus pour réaliser le recueil et un enfant est né de père inconnu.

Nous avons pu inclure trois pères d'enfant présentant un syndrome lié à l'empreinte parentale par Loss Of Methylation (LOM) : 2 cas de SBW liés à une hypométhylation de l'ICR2 (locus *KCNQ1OT1*) et 1 cas de SRS lié à une hypométhylation de l'ICR1 (locus *H19-IGF2*) ainsi que trois cas de SBW liés à une isodisomie paternelle de la région 11p15 (gain méthylation ICR1 et perte méthylation ICR2) et 1 cas de SBW par mutation *CBKN1C* héritée de la mère (niveau de méthylation normale de la région 11p15).

Pour chaque père, nous avons inclus 3 témoins fertiles appariés sur l'âge et les paramètres spermatiques (numération et mobilité spermatique).

Analyse et sélection du sperme

Après 30 minutes de liquéfaction les paramètres spermatiques (numération, mobilité, vitalité et morphologie, présence de cellules rondes) ont été analysés selon les recommandations de l'OMS. Les spermatozoïdes ont été sélectionnés sur gradient de densité (90/45% de puresperm (JCD)) afin d'éliminer toute contamination par des cellules rondes, leucocytes, cellules épithéliales, débris cellulaire. La pureté de la fraction sélectionnée (10µl) a été vérifiée sous microscope. Les échantillons ont été conservés à -80°C avant de réaliser l'extraction de l'ADN.

Extraction de l'ADN spermatique

L'extraction de l'ADN a été réalisée selon le protocole modifié de Marques (Marques et al, 2004). Brièvement, 500 µl de solution de lyse, contenant 10mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.2% SDS, 50 mM NaCl, 1 mM DTT and 0.2 mg/ml proteinase K (Fermentas), a été ajoutée aux échantillons de sperme suivi d'une incubation à 55°C durant une nuit. L'ADN spermatique a ensuite été isolée par un protocole d'extraction standard phénol chloroforme. Puis l'ADN a été précipité à

l'aide d'éthanol froid (Sigma Aldrich), rincé et solubilisé dans de l'eau purifiée. La quantité et la qualité de l'ADN ont été évaluées à l'aide du spectromètre nanodrop (Invitrogen).

Analyses de la méthylation de l'ADN spermatique

Le niveau de méthylation de l'ADN spermatique a été analysé sur 6 DMRs : *H19/IGF2*: IG-DMR (CTCF3 & CTCF6); *IGF2*-DMRs (DMR0 & DMR2); *SNURF*:TSS-DMR; *KCNQ1OT1*:TSS-DMR par pyroséquençage après traitement de l'ADN au bisulfite de sodium. L'ADN génomique (500 ng) a été modifié après traitement au bisulfite de sodium à l'aide du kit EpiTect (Qiagen). Préalablement au pyroséquençage, l'ADN bisulfité (25 ng) a été amplifié par PCR. Les primers utilisés sont disponibles dans l'article I (Bruno et al., 2015). Les réactions ont été réalisées à l'aide du PyroMark Q24 System (Qiagen) avec le kit PyroGold SQA reagent kit selon les instructions du fournisseur (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden). Les produits de PCR biotinylés ont été purifiés et dénaturés à l'aide de Pyrosequencing Vacuum Prep Tool (Qiagen). Le pyroséquençage a été réalisé sur le Pyroséquenceur Q24 (Qiagen). Le niveau de méthylation a été calculé en fonction du ratio des pics de C et T au niveau de chaque dinucléotide CpG inscrit dans le pyrogramme à l'aide du logiciel: Pyromark Q24 Software v.2.0.6 (Qiagen).

Analyse de la méthylation de l'ADN des enfants

L'analyse de la méthylation de l'ADN avait été réalisée par la méthode décrite par Gicquel et co, (Gicquel et al, 2005) au niveau de l'ICR1 et l'ICR2 (Tableau 8).

Techniques	Analyse de la méthylation du locus 11p15			Analyse génétique	
	Région ICR1	Région promoteur <i>H19</i>	Région ICR2	SNP /puce ADN CGHarray	séquençage gène CDKN1C (exons codants et des jonctions intron-exon)
	<i>SB</i>	<i>SB</i>	<i>MSqPCR</i>	<i>illumina</i> <i>HumanCytoSNP-12v2</i>	<i>Séquençage</i>
cas 1	N	N	perte de méthylation isolée	NR	NR
cas 2	N	N	perte de méthylation isolée	NR	NR
cas 3	perte de méthylation isolée	perte de méthylation isolée	N	N	NR
cas 4	gain de méthylation	NR	perte de méthylation	perte hétérozygotie segmentaire de la région 11p15.2ptel en mosaïque	NR
cas 5	gain de méthylation	NR	perte de méthylation	perte hétérozygotie segmentaire de la région 11p15	NR
cas 6	gain de méthylation	NR	perte de méthylation	NR	NR
cas 7	N	NR	N	N	délétion dans l'exon 2 c,641delC/p,P214RfsX58

Tableau 8 : Analyses de la méthylation de l'ADN et moléculaires réalisées chez les enfants atteints de pathologies liées à l'empreinte

Aucune anomalie de la méthylation de l'ADN n'a été détectée chez les parents de ces enfants (analyse de la région ICR1 et ICR2)

N : normal, NR : non réalisé ; SB : southern blot

IV.B.2 Résultats

IV.B.2.a Caractéristiques de la population

Les caractéristiques démographiques et les paramètres spermatiques des sept pères et des 15 témoins appariés sont présentés dans le tableau 9. Compte tenu d'un possible effet de l'âge, de la fertilité et des caractéristiques spermatiques (numération, mobilité et vitalité) sur le niveau de méthylation de l'ADN spermatique, ces paramètres ont été pris en compte lors de l'appariement des témoins. Ainsi, trois témoins fertiles par père ont été inclus dans cette étude.

Pères d'enfants atteints de pathologies liées à l'empreinte dues à une épimutation : cas 1 à 3

Parmi les pères d'enfant atteint de pathologie liée à l'empreinte, trois sont liés à une épimutation. Pour les cas 1 et cas 2 il s'agit d'une déméthylation isolée de l'ICR2 à l'origine d'un syndrome de SBW chez leurs enfants.

Le cas 1 est particulier car l'enfant présentant un SBW est issu d'une FIV indiquée dans le cadre d'une endométriose. Aucun antécédent n'avait été retrouvé chez ses parents lors de la prise en charge de ce couple. Les paramètres spermatiques ne présentaient pas d'altération notable, si ce n'est une légère tératozoospermie. La FIV « classique » réalisée chez ce couple avait permis d'obtenir 5 embryons, un embryon avait été transféré et 4 congelés deux jours après la fécondation. Le transfert intra utérin de cet embryon s'est suivi d'une grossesse gémellaire monochoriale biamniotique. A l'échographie du premier trimestre (12SA), un des jumeaux présentait un omphalocèle. Une césarienne a été pratiquée en urgence à 28 SA devant une menace d'accouchement prématurée (MAP). A la naissance, un jumeau présentait les signes du syndrome de SBW (macroglossie et omphalocèle) et a été opéré immédiatement (poids de naissance 28SA : 1320g). Il est décédé 9 mois plus tard de complications digestives postopératoires. Les analyses de la méthylation de l'ADN des cellules sanguines de cet enfant ont révélé la présence d'une épimutation caractéristique du SBW : une déméthylation isolée de l'ICR2 du locus *H19/IGF2*. Aucune anomalie de la méthylation n'a été détectée chez ses parents. Concernant le frère jumeau, il ne présentait pas les signes cliniques de SBW, néanmoins la même épimutation a été détectée dans ses cellules sanguines.

Tableau 9 : Caractéristiques de la population étudiée
A/ Caractéristiques des pères d'enfant atteint de pathologies liées à l'empreinte

Pères d'enfant PE		Age	Mode conception	Anomalie moléculaire détectée chez leur enfant	Paramètres spermatiques				
					Num. M	Mob. (a+b) %	Vit. %	Morpho. (FT) %	
Origine épimutation	BWE	cas 1	39	FIV	Déméthylation isolée ICR2	110,4	48	66	23
		cas 2	33	Nat	Déméthylation isolée ICR2	530	68	82	16
	SRS	cas 3	55	STIM	Déméthylation isolée ICR1	54	51	58	9
Origine « mutation » génétique	BWI	cas 4	36	Nat	Isodisomie paternelle de la région 11p15	303,6	58	65	23
		cas 5	36	Nat	Isodisomie paternelle de la région 11p15	53	40	60	10
		cas 6	54	Nat	Isodisomie paternelle de la région 11p15	44	35	60	10
	BWM	cas 7	37	Nat	Mutation CBKN1C héritée de la mère	44	35	60	8

B/ Caractéristiques des témoins fertiles appariés pour chaque cas

			Caractéristiques des témoins fertiles appariés				
			Age (années)	Numération (M)	Mobilité (a+b) %	Vitalité %	Morphologie (FT) %
			(moy+/-ET)	(moy+/-ET)	(moy+/-ET)	(moy+/-ET)	(moy+/-ET)
<i>Origine épimutation</i>	BWE	cas 1	38,4 +/- 1,2	185,0 +/- 56,3	45,7 +/- 15,4	62,0 +/- 11,0	15,0 +/- 8,7
		cas 2	34,4 +/- 0,9	211,6 +/- 191,4	43,7 +/- 17,6	74,3 +/- 6,1	21 +/- 1,7
	SRS	cas 3	53,7 +/- 2,2	145,7 +/- 115,4	46,0 +/- 9,3	65,7 +/- 9,3	14,5 +/- 19,1
<i>Origine « mutation » génétique</i>	BWI	cas 4	36,4 +/- 1,0	244,7 +/- 169,3	56,0 +/- 4,0	68,3 +/- 10,1	11,3 +/- 12,3
		cas 5	37,6 +/- 2,1	181 +/- 59,9	56,3 +/- 3,5	71,7 +/- 9,1	14,7 +/- 9,1
		cas 6	53,7 +/- 2,2	145,7 +/- 115,4	46,0 +/- 9,3	65,7 +/- 9,3	14,5 +/- 19,1
	BWM	Cas 7	37,6 +/- 2,1	181 +/- 59,9	56,3 +/- 3,5	71,7 +/- 9,1	14,7 +/- 9,1

BWE : syndrome de Beckwith-Wiedman d'origine épigénétique ; BWI : syndrome de Beckwith-Wiedman lié à une isodisomie de la région 11p15 ; BWM : syndrome de Beckwith-Wiedman lié à une mutation ; N : témoins normozoospermiques ; SE : syndrome d'empreinte parentale ; T : témoins tératozoospermiques
Normes paramètres spermatiques : Numération >39M, Mobilité (a+b) >32% ; Vitalité >58% ; Morphologie (David modifiée) : 23%

Le cas 2 est celui d'un père d'enfant atteint de SBW lié à une déméthylation isolée de l'ICR2 du locus *H19/IGF2*. Dans ce cas, il s'agit d'une grossesse spontanée sans notion d'infertilité avec un délai pour concevoir inférieur à 1 an. L'enfant est né à terme 40 SA, et présentait une macrosomie (poids : 4750g, taille 56cm, PC : 37cm) associée à une organomégalie. Le suivi de l'enfant n'a détecté aucun autre signe du SBW ni de complication tumorale. Une légère tératozoospermie de caractère polymorphe (anomalies variées) a été observée sur le spermogramme lors de l'inclusion du père. Les analyses réalisées chez les parents n'ont pas montré de défaut de méthylation de la région 11p15.

Le cas 3 est celui d'un père d'un enfant atteint de SRS lié à une déméthylation isolée de l'ICR1 (locus *H19/IGF2*). A noter que la grossesse a été obtenue suite à une stimulation de l'ovulation. Aucun antécédent personnel ou familial n'a été détecté chez ce père, la mère présente une surdité de perception apparue à l'adolescence. Un RCIU avait été détecté à l'échographie de 22SA. Leurs fils est né à terme (41SA) et présentait un sévère retard de croissance (poids : 2000g, taille : 42cm) un visage triangulaire caractéristique avec le front bombé. Une asymétrie corporelle est apparue durant la croissance, associée à de sévères troubles de l'alimentation. Les analyses moléculaires ont permis d'écarter l'implication d'une isodisomie uniparentale maternelle du chromosome 7 et d'une délétion ou duplication de la région 11p15.

Pères d'enfants atteints de pathologies liées à l'empreinte dues à une « mutation » génétique : cas 4 à 7.

Les cas 4 à 6 sont liés à une isodisomie paternelle de la région 11p15 conduisant à l'apparition du syndrome de SBW.

La fille du **cas 4** présentait une perte d'hétérozygotie segmentaire en mosaïque de la région (11)(p15.2ptel) concernant environ 40% des cellules dans le sang. Elle est née à terme pesant 3Kg720, mesurant 48cm pour un PC de 34cm. Les symptômes du SBW comportaient un omphalocèle, quelques épisodes d'hypoglycémie néonatale, une hémihypertrophie corporelle gauche sans macroglossie ni organomégalie clinique, ni complications tumorales dans l'enfance.

Le fils du **cas 5** présente d'une disomie uniparentale de la région 11p15 d'origine paternelle. Il est né à 34SA, présentant une macrosomie (3110g) associé à des épisodes d'hypoglycémie néonatale et une hémihypertrophie droite est apparue très rapidement.

La fille du **cas 6** présente une disomie uniparentale de la région 11p15 d'origine paternelle. A la naissance (poids : 3Kg750), elle présentait l'association d'une macrosomie, hépatomégalie, néphromégalie, hernie ombilicale, épisodes d'hypoglycémies néonatales. Elle a été opérée à l'âge d'un an et deux ans d'adénomes cortico-surrénaux respectivement à droite puis à gauche.

Ces 3 enfants sont issus d'une conception naturelle, avec un délai de conception inférieur à 1 an. Aucun antécédent familial particulier, ni consanguinité n'a été rapporté. Une tératozoospermie a été observée chez ces 3 pères, plus marquée pour les cas 6 et 7. Les analyses de méthylation de l'ADN de l'ICR1 et 2 sur cellules sanguines réalisées chez les parents étaient sans particularité. Un événement accidentel post zygotique lié à un défaut de ségrégation mitotique semble très probable dans ces cas.

La fille du **cas 7**, atteinte d'un SBW, présente une mutation du gène CDKN1C héritée de sa mère à l'origine du SBW. L'accouchement a eu lieu à 36SA, un diagnostic anténatal de ventriculomégalie bilatérale avait été posé durant le suivi échographique de la grossesse. A la naissance elle présentait une macrosomie (3100g, 48cm, PC à 31,5cm), un omphalocèle (opéré), une viscéralomégalie, une agénésie du corps calleux ainsi que des épisodes d'hypoglycémies néonatales. Sa mère présente également des signes cliniques de SBW ainsi que la même délétion de l'exon 2 du gène CDKN1C. Cette délétion entraîne un codon stop et donc la synthèse d'une protéine tronquée CKN1C expliquant les signes cliniques observés. Dans ce cas aucun défaut de méthylation n'a été détecté sur le locus *H19/IGF2* chez cette enfant et sa mère.

Tableau 10 : Analyse de la méthylation de spermatozoïdes de pères d'enfants atteints de pathologies liées à l'empreinte parentale

	<i>H19/IGF2-CTCF3</i>		<i>H19/IGF2-CTCF6</i>		<i>IGF2-DMR0</i>		<i>IGF2-DMR2</i>		<i>KCNQ1OT1</i>		<i>SNURF</i>	
	cas	T (moy+/-ET)	cas	T moy+/-ET	cas	T moy+/-ET	cas	T moy+/-ET	cas	T moy+/-ET	cas	T moy+/-ET
Cas 1	85,6	84,8 +/- 1,3	93,9	93,8 +/- 2,2	98,7	98,8 +/- 0,02	91,5	93,5 +/- 1,7	6,2	6,3 +/- 1,6	5,5	6,7 +/- 1,4
Cas 2	80,6	83,1 +/- 1,6	94,3	93,6 +/- 1,0	99,0	98,2 +/- 0,7	93,2	93,4 +/- 1,0	8,4	6,4 +/-1,8	4,2	5,4+/- 2,0
Cas 3	81,1	84,2 +/- 3,5	96,0	94,6 +/- 1,2	98,6	98,9 +/- 0,9	91,9	92,5 +/- 1,0	10,1	8,4 +/- 4,7	9,7	9,2 +/- 4,5
Cas 4	86,4	84,5 +/- 2,5	95,3	93,4+/- 2,2	98,8	98,4 +/- 0,6	94,1	92,7 +/- 1,4	5,6	4,9 +/- 1,5	7,4	6,1 +/- 1,2
Cas 5	85,4	83,6 +/- 2,0	94,5	93,4 +/- 2,3	98,1	98,8 +/- 0,08	92,1	93,1 +/- 1,3	4,4	5,5 +/- 1,1	5,0	4,8 +/- 1,9
Cas 6	87,3	84,2 +/- 3,5	95,5	94,6 +/- 1,2	98,9	98,9 +/- 0,9	94,3	92,5 +/- 1,0	5,0	8,4 +/- 4,7	5,8	9,2 +/- 4,5
Cas 7	87,2	85,4 +/- 1,5	95,3	93,4 +/- 2,3	98,0	98,8 +/- 0,08	94,5	93,1 +/- 1,3	4,2	5,5 +/- 1,1	5,0	6,3 +/- 0,9

T : moyenne des 3 témoins appariés sur l'âge et les paramètres spermatiques

IV.B.2.b Analyse de la méthylation de l'ADN spermatique

Les résultats de l'analyse de la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes des sept pères d'enfant atteint de syndromes liés à l'empreinte et de la moyenne des témoins appariés sont présentés dans le tableau 10. Six DMRs, dont 4 soumises à empreinte paternelle sur le locus *H19/IGF2* : IG-DMR (CTCF3 & CTCF6); *IGF2*-DMRs (DMR0 & DMR2); et 2 d'origine maternelle : *SNURF*:TSS-DMR; *KCNQ1OT1*:TSS-DMR ont été analysées par pyroséquençage. Respectivement un haut et un bas niveau de méthylation sont observés sur les DMRs paternelles et maternelles et comparable aux témoins. On peut noter une légère hypométhylation de la DMR *H19/IGF2*-CTCF3 ainsi qu'une augmentation du niveau de méthylation sur la DMR *KCNQ1OT1* pour les cas 2 et 3.

IV.B.3 Discussion

Quelque soit la DMR analysée, il n'existe aucune différence importante du niveau de méthylation entre les spermatozoïdes de pères d'enfant atteint de pathologies liées à l'empreinte parentale, qu'elles soient liées à une épimutation ou à une « mutation » génétique, et ceux des témoins fertiles. Néanmoins deux pères présentent un niveau de méthylation spermatique légèrement plus bas sur la DMR *H19/IGF2*-CTCF3 et plus élevé sur la DMR *KCNQ1OT1* et, pour ces deux pères une épimutation est à l'origine de la pathologie de l'empreinte de leurs enfants. Dans un cas (cas 3), l'âge paternel (55 ans) pourrait être en cause. Jenkins et coll. ont mis en évidence une association entre l'âge paternel et des défauts de méthylation de l'ADN spermatique (Jenkins et al., 2014). Nous observons en effet, une variabilité plus importante du niveau de méthylation dans le groupe de témoins âgés de plus de 50 ans.

Toutefois, cette approche purement descriptive, compte tenu du très faible nombre de pères inclus, permet nullement de conclure. Elle constitue néanmoins la première analyse du profil de méthylation de l'ADN sur les principales régions soumises à empreinte des spermatozoïdes de père d'enfant atteint d'une pathologie liée à l'empreinte. Il est donc important de poursuivre cette étude sur de plus larges cohortes pour mieux définir les mécanismes en cause. La principale limite réside dans la fréquence des pathologies liées à l'empreinte parentale 1/100 000 pour le SRS, 1/13 700 pour le SBW et à cela s'ajoute la nécessité d'obtenir les gamètes des parents. Dans notre étude, seul 50% des pères ont accepté de participer à l'étude, au delà de certaines contraintes liées à des problèmes de distance ou de

disponibilité, cela masque bien souvent une difficulté à devoir réaliser un recueil de sperme quand cela n'est pas nécessaire. Pourtant, obtenir des ovocytes est nettement plus délicat, et éthiquement difficilement réalisable. Cette contrainte nous limite à étudier un seul versant du marquage de l'empreinte : du côté paternel.

Si chez la majorité des patients, l'atteinte épigénétique est localisée à un seul locus soumis à empreinte, certains patients présentent des anomalies de méthylation sur plusieurs loci (Azzi et al., 2009; Blik et al., 2009). Ces données suggèrent que un (des) facteur(s) contrôlant en *trans* la régulation des marques de méthylation puissent être impliqué(s) (Demars et Gicquel et al, 2011). Il est donc nécessaire d'explorer totalement l'épigénome de ces enfants, à la recherche d'autres dérégulations associées et d'explorer également la possibilité de facteurs *trans* ou *cis* associés. Dans ce cas, il faudrait poursuivre l'analyse du profil des spermatozoïdes des pères à la recherche de facteurs *trans* qui pourraient être transmis ou qui pourraient potentiellement déréguler le maintien de l'empreinte durant le développement de l'embryon juste après la fécondation. Une analyse de la méthylation globale du génome spermatique couplée à un séquençage seraient dans cette hypothèse très informatif pour évaluer ce risque de transmission.

Parmi les pathologies épigénétiques d'empreinte telles que celles rencontrées chez les patients SBW et SRS, la prévalence de l'AMP est plus élevée que dans la population générale (DeBaun et al., 2003, Gicquel et al., 2003, Maher et al., 2003 ; Kagami et al., 2007). Dans notre étude, les 2 cas où la conception a nécessité le recours à une AMP (ou une stimulation simple de l'ovulation), aucune anomalie majeure n'a été révélée sur le spermogramme, ni par l'analyse de la méthylation de l'ADN spermatique. Une inclusion plus importante de pères ayant eu recours à l'AMP est nécessaire enfin d'évaluer plus spécifiquement et de manière statistique l'impact de l'environnement sur l'apparition de ces défauts d'empreintes.

Ces résultats préliminaires sont plutôt rassurants quant à l'intégrité épigénétique des spermatozoïdes des pères d'enfant atteint de pathologies liées à l'empreinte parentale, et rendent peu probable l'implication d'un défaut d'établissement de l'empreinte survenue durant la gamétogenèse sur la DMR concernée. Néanmoins ces résultats ne préfigurent pas des marques d'empreinte du spermatozoïde fécondant et nécessitent d'être confirmés sur des effectifs plus importants.

IV.C Intégrité épigénétique des spermatozoïdes chez des patients atteints de séminome : Evaluation des risques et conséquences potentielles pour la descendance

IV.C.1 Contexte scientifique et modèle expérimental

L'incidence des cancers testiculaires n'a cessé de croître durant ces dernières décennies et pourrait être la conséquence directe des perturbations environnementales constatées dans les pays développés (Le Cornet et al., 2014; McGlynn et al., 2003; Purdue et al., 2005; Znaor et al., 2014). Ceci pourrait constituer un problème majeur car le cancer testiculaire touche principalement des hommes jeunes en âge de procréer (Le Cornet et al., 2014). De plus il existe une forte association entre tumeur testiculaire et des troubles de la reproduction tels que la cryptorchidie, l'hypospadias, des troubles de la différenciation sexuelle, diminution du taux de testostérone et une altération des paramètres spermatiques (Jørgensen et al., 2015; MacKenna et al., 2017; Serrano et al., 2013; Skakkebaek et al., 2001, 2016). Ainsi, l'association de ces différents troubles, définie comme le syndrome de dysgénésie testiculaire, pourrait selon Skakkebaek et al, avoir une origine fœtale commune (Skakkebaek et al., 2016).

Autre fait intéressant, est l'identification d'un profil de méthylation caractéristique des cellules séminomateuses (hypométhylation de l'ADN) proche de ceux constatés sur les précurseurs cancéreux des cellules germinales ((Germ Cell Neoplasia In Situ (GCNIS)) et des gonocytes fœtaux (Korkola et al., 2005; Oosterhuis and Looijenga, 2005b; Sonne et al., 2009; Sperger et al., 2003).

De plus, il existe une fréquence plus élevée d'altérations spermatiques chez les patients atteints de cancer testiculaire. Or comme déjà évoqué, plusieurs études ont mis en évidence une association entre infertilité masculine notamment les hommes oligozoospermiques et des défauts de méthylation de l'ADN spermatique (Boissonnas et al., 2010; Hammoud et al., 2010; Houshdaran et al., 2007; Kobayashi et al., 2007; Laurentino et al., 2015; Marques et al., 2004, 2008; Montjean et al., 2013, 2015; Poplinski et al., 2010; Santi et al., 2017; Sato et al., 2011). Ces défauts de méthylation ont été mis en évidence au niveau des GSE, des promoteurs des gènes ainsi qu'au niveau global sur des analyses pan-génomiques (Du et al., 2016; Houshdaran et al., 2007; Jenkins et al., 2016, Li et al., 2013; Pacheco et al., 2011; Urdinguio et al., 2015; Wu et al., 2010).

Ce contexte nous a conduits à émettre l'hypothèse que ces altérations constatées au niveau des cellules germinales (GCNIS, défauts de méthylation de l'ADN au niveau

des spermatozoïdes d'hommes oligozoospermiques) puissent être liés à des défauts de mise en place de l'empreinte durant la vie fœtale.

Ainsi, pour la première fois, nous avons pu analyser le niveau de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes d'hommes atteints de séminome et pour une première approche, nous nous sommes orientés vers l'étude des DMRs les plus fréquemment altérées en cas d'oligozoospermie. Ainsi, nous avons analysé 7 DMRs : 5 soumis à empreinte paternelle : *H19/IGF2*: IG-DMR (CTCF3 et CTCF6); *IGF2*-DMRs (DMR0 & DMR2); *MEG3/DLK1*:IG-DMR; et 2 DMRs soumises à empreinte maternelle : *SNURF*:TSS-DMR; *KCNQ1OT1*:TSS-DMR. Pour cela, nous avons analysé par pyroséquençage, après traitement de l'ADN au bisulfite, 92 échantillons de sperme congelé: 31 d'hommes atteints de séminome (S), 62 contrôles sélectionnés en fonction de leur paramètres spermatiques, 31 normozoospermiques (N) et 30 oligozoospermiques (O). Les échantillons de sperme décongelé ont été sélectionnés sur gradient de densité, et la fraction sélectionnée a été systématiquement vérifiée sous microscope (10µl) afin d'éliminer toute contamination par des cellules somatiques.

Afin de tenir compte du lien entre la numération spermatique et le niveau de méthylation de l'ADN, le groupe séminome a également été étudié en sous-groupes : patients atteints de séminome normozoospermiques (SN, n=23) et patients atteints de séminome oligozoospermiques (SO, n=8). Les analyses statistiques ont été effectuées après ajustement sur l'âge.

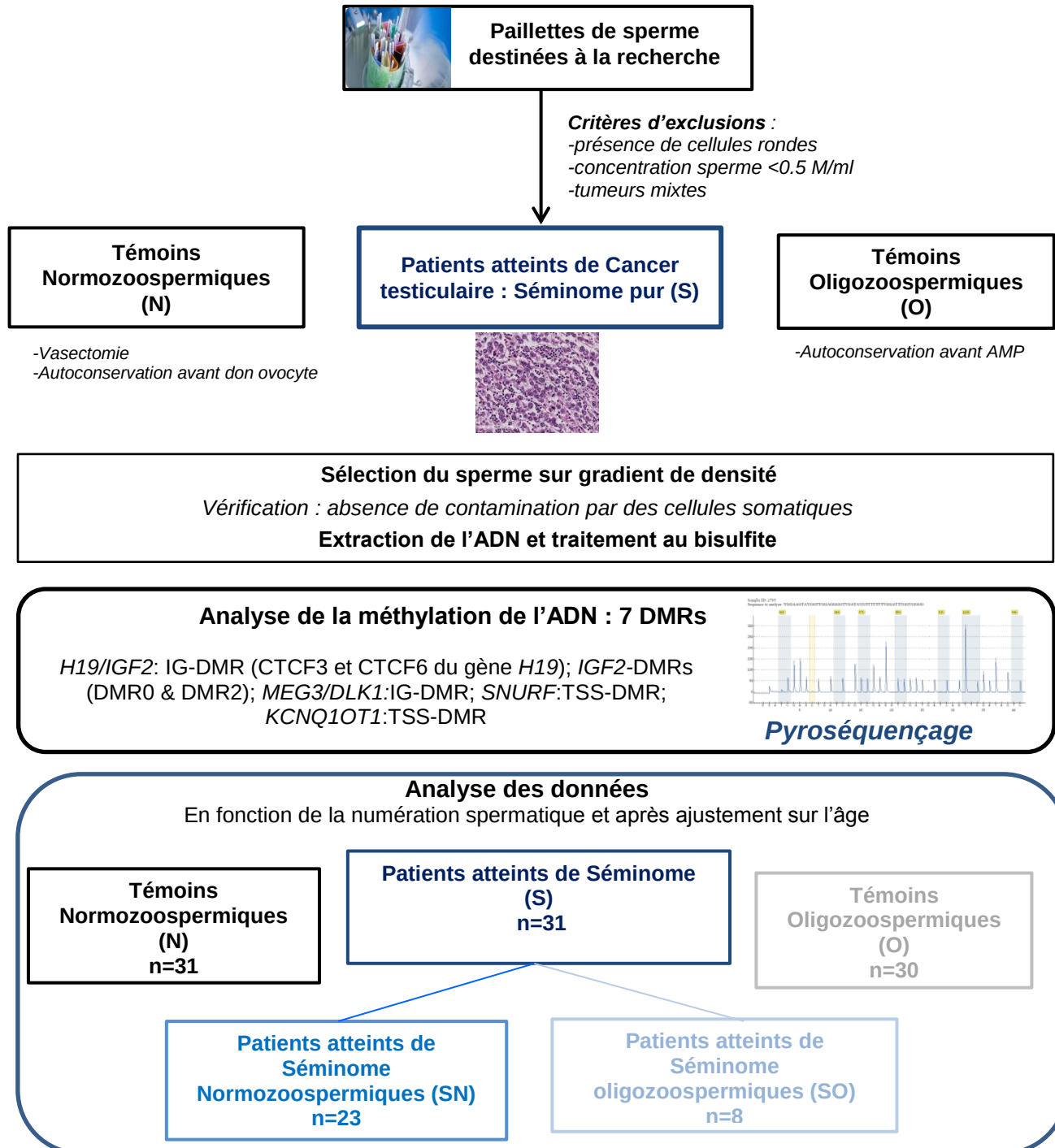
En ce qui concerne la méthylation de l'ADN spermatique d'hommes normozoospermiques, nous avons retrouvé un haut et un bas niveau de méthylation pour les DMRs soumises à empreinte paternelles et maternelles, respectivement. Une variabilité plus importante du niveau de méthylation a été observée dans le groupe oligozoospermique, et après ajustement sur l'âge, des différences significatives ont été constatées entre les groupes N et O pour les DMRs : *H19/IGF2*-CTCF6 ($p=0.001$), *MEG3/DLK1* ($p=0.017$), *IGF2*-DMR2 ($p=0.022$) et *SNURF* ($p=0.032$). Ces résultats concordants avec les données de la littérature (Boissonnas et al, 2010 ; Santi et al, 2017) nous ont permis de confirmer le lien entre des défauts d'empreinte et la diminution du nombre de spermatozoïdes.

Concernant les patients atteints de séminome, après ajustement sur l'âge et en tenant compte de la numération spermatique, les résultats des comparaisons du niveau de méthylation des spermatozoïdes entre les groupes SN et N et les groupes SO et O n'ont pas montré de différence significative. De plus et malgré le faible effectif du groupe SO (n=8) des différences significatives entre le groupe SO (patients atteints de séminome présentant une oligozoospermie) et le groupe N ont été détecté sur 3 DMRs : *H19/IGF2-CTCF6* (p=0.013), *SNURF* (p=0.001) and *IGF2-DMR2* (p=0.019).

Ces données suggèrent que les patients atteints de séminome préservant une spermatogenèse correcte présentent une intégrité de l'empreinte spermatique. Au contraire, et comme pour les patients oligozoospermiques, les hommes atteints de séminome présentant une hypospermatogenèse (oligozoospermie) ont un risque plus élevé de présenter des défauts d'empreinte sur leurs spermatozoïdes. Ces données soulèvent la question du risque de transmission à leurs enfants et soulève la question du dépistage de ces anomalies d'empreinte avant tout projet parental chez ces hommes à risque.

Intégrité épigénétique des spermatozoïdes chez des patients atteints de séminome : Evaluation des risques et conséquences potentielles pour la descendance

Protocole exploratoire



Article II

RESEARCH

Open Access



Sperm imprinting integrity in seminoma patients?

Céline Bruno^{1,2}, Oxana Blagoskonov³, Julie Barberet^{1,2}, Magali Guilleman², Sandrine Daniel^{4,5}, Benjamin Tournier⁶, Christine Binquet^{4,5}, Cécile Choux^{1,7} and Patricia Fauque^{1,2*} 

Abstract

Background: Testicular germ cell tumor such as seminoma is strongly associated with male reproductive problems commonly associated with the alteration of sperm parameters as described in testicular dysgenesis syndrome. Interestingly, numerous studies have reported that the precursor of germ cell cancer, germ cell neoplasia in situ (GCNIS), present similarities to fetal gonocytes, specifically characterized by global DNA hypomethylation particularly on imprinting sequences. These disorders may have a common origin derived from perturbations of embryonal programming during fetal development. Presently, there is no available information concerning the sperm DNA methylation patterns of testicular cancer patients. For the first time, we evaluated the sperm imprinting of seminoma patients.

A total of 92 cryopreserved sperm samples were included, 31 before seminoma treatment (S): 23 normozoospermic (SN) and 8 oligozoospermic (SO) and 61 sperm controls samples: 31 normozoospermic (N) and 30 oligozoospermic (O). DNA methylation levels of seven differentially methylated regions (DMRs) of imprinted genes [*H19/IGF2*: IG-DMR (CTCF3 and CTCF6 of *H19* gene); *IGF2*-DMRs (DMR0 and DMR2); *MEG3/DLK1*:IG-DMR; *SNURF*:TSS-DMR; *KCNQ1OT1*:TSS-DMR] were assessed by pyrosequencing. All comparative analyses were adjusted for age.

Results: Comparisons of sperm DNA methylation levels between seminoma (S) and normozoospermic (N) samples showed a significant difference for the *SNURF* sequence ($p = 0.017$), but after taking into account the sperm parameters, no difference was observed. However, we confirmed a significant association between oligozoospermia (O) and imprinting defects for *H19/IGF2*-CTCF6 ($p = 0.001$), *MEG3/DLK1* ($p = 0.017$), *IGF2*-DMR2 ($p = 0.022$), and *SNURF* ($p = 0.032$) in comparison with control groups (N).

Conclusions: This study highlights the high risk of sperm imprinting defects in cases of oligozoospermia and shows for the first time that seminoma patients with normal spermatogenesis present sperm imprinting integrity. These data suggest a low probability of the involvement of a common imprinting defect in fetal cells leading to both TGCT and subfertility.

Keywords: Testicular germ cell tumor (TGCT), Seminoma, Imprinted genes, Sperm DNA methylation, Testicular dysgenesis syndrome (TDS), Oligozoospermia

Background

It is now well documented that the incidence of testicular germ cell tumor (TGCT) has been increasing over the past decades, particularly in developed countries [1–4]. It could become a real sanitary problem as recent estimations have predicted that in 2025 around one in 100 men

will be diagnosed with TGCT [3]. Moreover, the risk of TGCT is strongly associated with several male reproductive problems such as cryptorchidism, hypospadias, disorders of sex development, low testosterone levels, and the alteration of sperm parameters [5–9]. The association of various disorders, defined by Skakkebaeck and colleagues as testicular dysgenesis syndrome (TDS) [8], may have a common origin derived from perturbations of fetal programming [9]. Moreover, the unconventional inheritance for TGCT risk both in humans and mice suggest the involvement of epigenetic mechanisms probably through environmental effects [10].

* Correspondence: patricia.fauque@chu-dijon.fr

¹Université Bourgogne Franche-Comté-Equipe Génétique des Anomalies du Développement (GAD) INSERM UMR1231, 2 Rue Angélique Ducoudray, F-21000 Dijon, France

²CHU Dijon Bourgogne, Laboratoire de Biologie de la Reproduction–CECOS, 14 rue Gaffarel, F-21000 Dijon, France

Full list of author information is available at the end of the article



Numerous studies have reported that the precursor of germ cell cancer, i.e., germ cell neoplasia in situ (GCNIS) [11], presents similarities to fetal gonocytes, such as cellular, epigenetic, and transcriptomic patterns [12–15]. New insights to epigenetics have showed different genome methylation patterns depending on the types of TGCT [16]. Indeed, contrary to non-seminoma, seminoma cells are characterized by low DNA methylation levels, as found for GCNIS [17–21].

Moreover, TGCT patients present more frequently with subfertility and abnormal spermatogenesis [22]. Interestingly, during the last decade numerous studies have reported abnormal sperm DNA methylation in infertile patients especially for oligozoospermic men [23–34]. These methylation defects occur at imprinted loci (mostly for *IGF2* and *H19* genes), and promoters regions as well as genome-wide [25, 35–40].

All of these raise the issue of the reproductive health in TGCT context, especially on the imprinting process which takes place in the germline during fetal development.

For the first time, we have addressed the question of sperm DNA methylation patterns in TGCT patients. We chose to specifically investigate seminoma for its epigenetic pattern similar to GCNIS by performing sperm DNA methylation analyses using pyrosequencing technology on seven imprinted genes. From a total of 92 men included in this study, we showed major sperm imprinting defects in seminoma patients with oligozoospermia as well of those observed for oligozoospermic men.

Results

Our study included 92 sperm samples from men who had cryopreserved sperm: 31 before seminoma treatments (S), and 61 in the context of ART procedures who served as controls [31 normozoospermic (N) and 30 oligozoospermic (O)]. Among seminoma patients, 23 (74%) were normozoospermic (SN) and 8 (26%) were oligozoospermic (SO). Patient characteristics and sperm parameters in each group are reported in Table 1. Twelve seminoma patients (38%) were known to have had fathered before cryopreservation and 21 (81%) at the time of inclusion, 4 patients had a history of retractile testicles (without cryptorchidism) and 1 presented history of testicular trauma. Concerning N group patients, 81% had at least one child at inclusion and none of them presented uro-genital conditions. For oligozoospermic control men (O group), 68% were known to have fathered at inclusion following ART, 15 (50%) had urogenital issues including cryptorchidism ($n = 6$ patients), retractile testicles ($n = 2$), varicoceles ($n = 1$), testicular torsion or trauma ($n = 3$), mumps orchitis ($n = 1$), inguinal hernia ($n = 2$). No statistical difference was found between SN vs N groups concerning sperm parameters and fertility status (minimum $p = 0.135$; Table 1).

As expected, in the N group, high and low sperm DNA methylation levels were observed for paternal and maternal imprinted genes, respectively (Additional file 1: Table S1A). After adjusting for age, significant differences were found between N vs O groups for *H19/IGF2-CTCF6* ($p = 0.001$), *MEG3/DLK1* ($p = 0.017$), *IGF2-DMR2* ($p = 0.022$),

Table 1 Characteristics of study participants

	Control normozoospermic	Seminoma Total	Seminoma normozoospermic	Seminoma oligozoospermic	Control oligozoospermic
	N	S	SN	SO	O
Number of men	31	31	23	8	30
Age (y)	37.1 $\pm$ 5.7 ^{a,b,e}	32.2 $\pm$ 6.5 ^{a,d}	32.2 $\pm$ 6.2 ^b	32.4 $\pm$ 7.8	32.9 $\pm$ 4.1 ^{d,e}
Urogenital conditions (no., %)	0	5 (16%)	2 (8%)	3 (37%)	15 (50%)
Cryptorchidism	0	0	0	0	6
Others*	0	5	2	3	9
Concentration (million/ml, $\pm$ SD)	66.0 $\pm$ 72.3 ^{a,e}	35.9 $\pm$ 33.7 ^{a,d}	46.3 $\pm$ 33.3	6.1 $\pm$ 4.9	4.5 $\pm$ 6.4 ^{d,e}
Count (million, $\pm$ SD)	257.4 $\pm$ 335.3 ^{a,e}	129.8 $\pm$ 177.4 ^{a,d}	169.8 $\pm$ 190.7	14.9 $\pm$ 12.3	11.6 $\pm$ 10.2 ^{d,e}
Progressive motility (% $\pm$ SD)	46.3 $\pm$ 13.4 ^e	44.4 $\pm$ 20.1 ^d	50.3 $\pm$ 15.9	27.5 $\pm$ 22.3	27.9 $\pm$ 15.3 ^{d,e}
Normal morphology (% $\pm$ SD)	31.2 $\pm$ 17.7 ^e	32.1 $\pm$ 18.3 ^d	31.1 $\pm$ 17.7	36.0 $\pm$ 21.9 ^c	6.3 $\pm$ 6.9 ^{c,d,e}
Father at inclusion (%) ^f	81	81	89	50	68

SD standard deviation, y years

Significant difference between N and S^a; N and SN^b; SO and O^c; O and S^d; N and O^e ($p < 0.05$)

*Retractile testicles, varicocele, testicular torsion, mumps orchitis, and inguinal hernia

^fPercentage according to available data

and *SNURF* ($p = 0.032$) (Figs. 1 and 2, Additional file 1: Table S1B and Additional file 2: Table S2, Additional file 3: Figure S1). The variability of DNA methylation levels was high in the O group (Fig. 1, Additional file 4: Table S3). Moreover, sperm methylation levels of all O group

patients with history of cryptorchidism were identified as outliers for at least one sequence (Fig. 1).

Concerning seminoma patients (S), after adjusting for age, comparisons of sperm DNA methylation levels between the S and N groups showed a significant difference

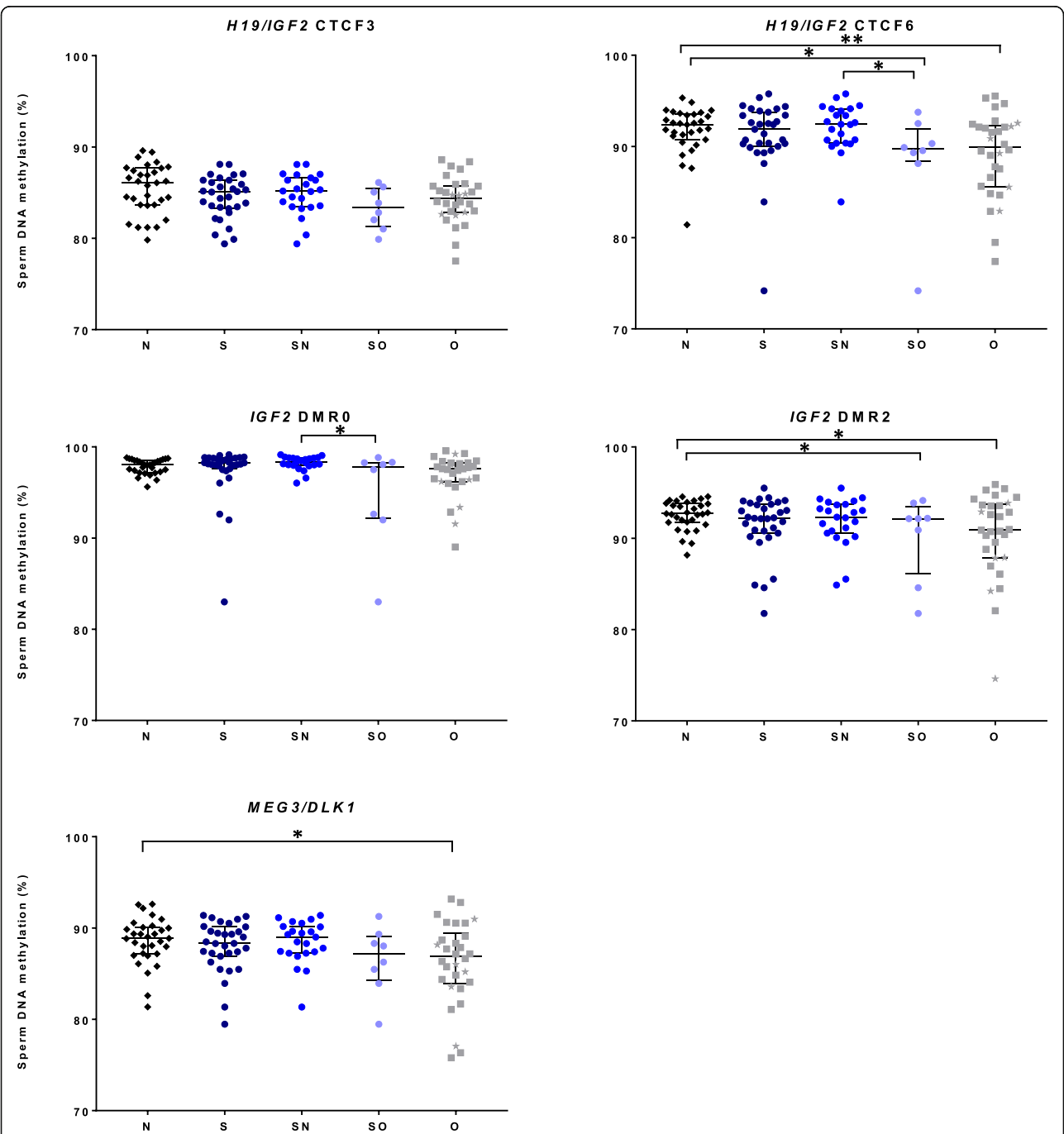
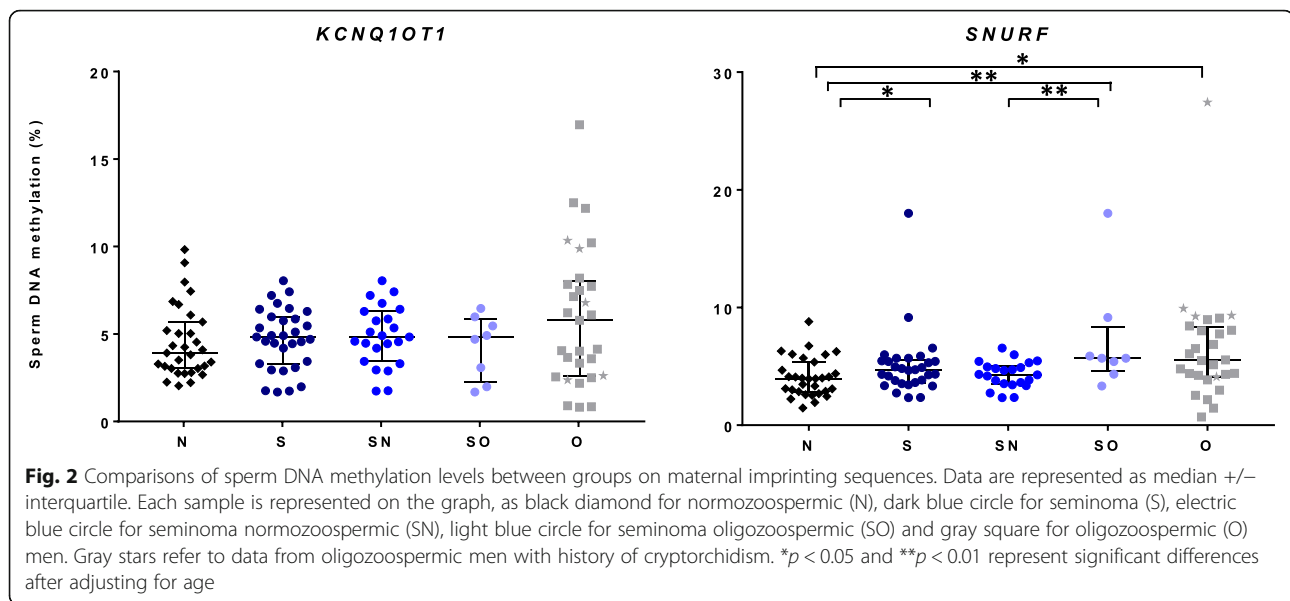


Fig. 1 Comparisons of sperm DNA methylation levels between groups on paternal imprinting sequences. Data are represented as median $\pm$ interquartile. Each sample is represented on the graph, as black diamond for normozoospermic (N), dark blue circle for seminoma (S), electric blue circle for seminoma normozoospermic (SN), light blue circle for seminoma oligozoospermic (SO), and gray square for oligozoospermic (O) men. Gray stars refer to data from oligozoospermic men with history of cryptorchidism. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ represent significant differences after adjusting for age



for the *SNURF* sequence ($p = 0.017$). However, after taking into account the sperm parameters, no difference was observed for both SN (seminoma normozoospermic men) vs N and SO (seminoma oligozoospermic men) vs O (Fig. 2, Additional file 1: Table S1B). In contrast, in the SO group, specific imprinting defects were detected for *H19/IGF2-CTCF6* ($p = 0.013$), *SNURF* ($p = 0.001$) and *IGF2-DMR2* ($p = 0.019$) compared to N group (Figs. 1 and 2, Additional file 1: Table S1B).

Discussion

To our knowledge, this is the first study to report the analyses of sperm DNA methylation in patients with seminoma. After adjusting for age, imprinting defects on *SNURF* were detected in the seminoma group in comparison with the normozoospermic controls, but after taking into account sperm parameters, we did not observe any significant difference. Therefore, seminoma patients with normal spermatogenesis appear to maintain sperm imprinting integrity. Moreover, our findings confirmed a strong association between oligozoospermia and imprinting defects (herein, on *H19/IGF2*, *MEG3/DLK1*, and *SNURF* DMRs for oligozoospermic patients with or without seminoma).

In this study, we chose to compare normozoospermic and oligozoospermic controls because seminoma patients could have altered sperm parameters. Moreover, 40–50% of TGCT patients present low sperm concentration before cryopreservation [6, 41, 42]. However, in the present study, only 26% of seminoma patients showed signs of oligozoospermia. This difference could be explained by a drastic selection of samples. Herein, we excluded (1) samples with somatic cell contamination at systematic microscopic control of the preparation of purified spermatozoa,

(2) samples with altered quality of extracted sperm DNA, (3) patients with extreme oligozoospermia.

Our analyses on controls allowed us to confirm imprinted defects in samples with low sperm concentration [33]. As previously reported, we observed altered sperm DNA methylation for oligozoospermic controls in the *H19-IGF2*, *IGF2-DMR2*, *SNURF*, and *MEG3/DLK1* DMRs [23, 26].

All these alterations both on maternal and paternal imprinted genes (hyper- and hypomethylation, respectively) observed in “control” cases of deficient spermatogenesis, could be due to failures in erasure/gain of DNA methylation during germ cell development [23]. Moreover, the association of cryptorchidism with sperm imprinting defects observed in the present study may be in favor of the hypothesis of a fetal origin to these defects.

Since the 1990s, most epidemiological trends have reported a decrease of semen parameters in developed countries [43], associated with an increased risk of male reproductive disorders like cryptorchidism, hypospadias, disorders of sex development, and TGCT [9, 44]. Moreover, given these observations and based on epigenetic findings, environmental influences during fetal life are largely suspected in the occurrence of testicular dysgenesis syndrome (TDS). Indeed, it has been reported in animal models that the exposition to endocrine disruptors during fetal life lead to testicular diseases, sperm parameter alterations, obesity, and sperm epigenetic defects on imprinted genes [45–51]. However, at present, there is no available information about the epigenetic status of the human germ cells in the TDS environment and particularly in TGCT. To address this issue, we performed analyses on sperm both in subfertile patients and in seminoma patients. Notably, seminoma cells presented epigenetic patterns close to GCNIS and were

characterized by a global DNA hypomethylation, particularly on imprinting sequences [18, 20, 21].

We found that seminoma patients with oligozoospermia also presented sperm DNA methylation alterations on imprinted genes. The alterations were quite similar to those observed in oligozoospermic controls.

These observations suggest (1) that spermatozoa in the seminoma environment are not systematically associated with imprinting defects and, (2) a low probability of the involvement of a common imprinting defect in fetal germ cells leading to both TCGT and subfertility.

One hypothesis is that two independent fetal processes could be involved; one in germ cells dedifferentiation leading to GCNIS formation and the second leading to imprinting defects in germ cells. The occurrence of one or the other or both may depend on the time, intensity, and the period of exposition to an inappropriate fetal environment. Another explanation of the increase in sperm parameters alterations in the TGCT context could be the consequences of tumor proliferation and local inflammation.

Indeed, presently emerging evidence highlight the influence of environmental factors on human sperm DNA methylation, notably lifestyle factors [52–56]. As hypothesized by Kobayashi et al., the relation between paternal age and sperm DNA methylation abnormalities could be the memory of cumulative environmental influences over the years [55]. Interestingly, Jenkins and al. used microarray analyses to identify regions which were significantly hypomethylated ($n = 139$) and hypermethylated ($n = 8$) in advanced-age paternal sperm [53]. However, none of the imprinted genes analyzed in our study was identified to be age-susceptible.

Altogether, these results are rather reassuring in regards to the sperm imprinting integrity of seminoma patients as well as their fertility. Indeed, in the present study, 84% of seminoma patients were known to have fathered at the time of inclusion, in accordance with the few clinical reports [22, 57]. However, there may be epigenetic risks linked to sperm alterations [6, 41, 42]. As most seminoma patients are young and have not fathered at the time of sperm cryopreservation (herein 62%), the question on the association with potential imprinting defects and their consequences for the conceptus is particularly crucial. Indeed, it is already known that assisted reproductive technologies (IVF or ICSI), widely used for men with oligozoospermia, are associated with increased incidences of rare imprinting disorders, especially Beckwith-Widemann syndrome, Angelman syndrome and Silver-Russell syndrome. The technique itself could be involved [58], but the use of sperm with preexisting imprinting defects is not excluded. Moreover, a correlation between sperm methylation alterations and adverse pregnancy outcomes have also been reported [26, 55, 59, 60]. However, these germ cell DNA methylation defects could have consequences later in life, leading to

various diseases in adulthood such as cardiovascular diseases or cancers [61, 62].

There are some limitations in this study. First, although somatic cells were not observed during microscopic control of all sperm preparations, an improbable somatic cell contamination cannot be fully excluded. Nevertheless, we reported comparable sperm DNA methylation levels for oligozoospermic men as observed in previous studies [23, 56]. Second, the pyrosequencing method allowed us to analyze DNA methylation at only a few CpGs per DMR (between 3 and 18). Even though it would have been interesting to perform analyses at larger scale, the resolution in imprinted regions would have been lower. And third, as previously discussed, a lack of information concerning the potential confounding factors could modify the results, though the adjustment for age limited this effect.

Overall, it still remains to be determined whether seminoma patients with alterations to spermatogenesis can return to spermatogenesis and DNA methylation levels comparable to the normozoospermic and fertile control population on the tested sequences and also on large scale.

Conclusions

This study highlights the high risk of sperm imprinting defects (both in paternal and maternal DMRs) in cases of oligozoospermia and shows that seminoma patients with normal spermatogenesis presented sperm imprinting integrity. These novel data disprove the idea of a common fetal imprinting defect in germ cells leading to both CGNIS and subfertility. Environmental factors are strongly suspected and could act throughout life, even if the fetal period is presumptively more at risk for the development of severe chronic diseases.

Our findings shed light onto the need to set up epigenetic explorations for men with spermatogenesis deficiencies.

Methods

Aim, design, and setting of the study

To assess the sperm imprinted pattern of seminoma patients, a total of 92 sperm samples were included 31 before seminoma treatment (S) and 61 in the context of ART procedures who served as controls: 31 normozoospermic (N) and 30 oligozoospermic (O). Among seminoma patients (S) ($n = 31$), we established two subgroups according to their sperm parameters: normozoospermic seminoma patients (SN) ($n = 23$) and oligozoospermic seminoma patients (SO) ($n = 8$). Seminoma samples were selected according to the histology analyses, and only cryopreserved sperm from pure seminoma patients were included in the study.

We specifically selected imprinted genes which are known to be perturbed in altered spermatogenesis [23, 33] and/or in a context of infertility [24, 27, 33]. DNA methylation levels of seven differentially methylated regions (DMRs) of imprinted genes (*H19/IGF2*:IG-DMR: CTCF3 and CTCF6 of *H19* gene and the DMR0 and DMR2 of *IGF2* gene; *GTL2*-DMR; *SNURF*:TSS-DMR; *KCNQ1OT1*:TSS-DMR) were assessed by pyrosequencing. All analyses were performed after adjusting for age and compared according to the sperm parameters.

Subjects and samples

Cryopreserved sperm samples from 92 patients were collected from two CECOS centers (Centre d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperm) in Dijon and Besançon, France. According to French law, patients who have cryopreserved sperm and want to dispose of it can choose to donate their sperm straws to research programs. All volunteer patients provided written informed consent as approved by the Ethics Committee of the University and the state medical board (2016 PHRCI-16-046, NCT03262207). Thirty-one samples were obtained from patients who cryopreserved their sperm before seminoma treatments (S), 30 from oligozoospermic (O) patients who underwent fertility treatments, and 31 from normozoospermic patients (N) who cryopreserved before vasectomy or egg donation attempts. In all groups, samples were selected according to sperm parameters with at least 0.5 M/ml for sperm concentration, and no leucocytes or others cells identified before cryopreservation in order to limit diploid cell contamination.

Sperm cryopreservation protocol

After 30 min of liquefaction, fresh ejaculate was diluted 1:1 in sperm cryoprotector medium (Spermfreeze™, Vitrolife) and filled in straws. Samples were frozen using programming controlled rate freezer (Minicool LC40 Air liquid or Kryo 560-Planer PLC) and cooled from 4 °C to −8 °C at a rate of −5 °C/min, then at a rate of −10 °C/min to −25 °C and finally at rate of −25 °C/min to −140 °C. Samples were then plunged into nitrogen for storage.

Thawing procedure and sperm preparation

Thawing was performed in an incubator system at 37 °C during 7 min. Spermatozoa were purified using a Percoll gradient with two concentration layers (90/45%, Pure-Sperm, JCD) to remove lymphocytes, epithelial cells, cell debris, bacteria, abnormal spermatogenic cells, and seminal fluid. Sperm purity was controlled by inverted light microscopy and samples were then stored at −80 °C until further use.

Measurements of sperm count, sperm motility, and sperm morphology were assessed in accordance with the World Health organization (WHO) guidelines both before and after freezing.

DNA extraction

Sperm DNA was extracted according to the modified protocol described by Marques et al. [28]. Briefly, sperm pellets were overlaid with 500 µl of lysis solution (LS) containing 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.2% SDS, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, and 0.2 mg/ml proteinase K (Fermentas) and incubated overnight at 55 °C. Sperm DNA was isolated by standard phenol chloroform extraction. DNA was precipitated using cold ethanol (Sigma-Aldrich), washed, and solubilized in water. All DNA samples were quantified/qualified using a Nanodrop Spectrophotometer (Invitrogen). Sperm DNA samples were included in the study if the ratio DO260/280 was between 1.8 and 2 and the DNA concentration above 50 ng/µl.

DNA methylation analyses

DNA methylation levels of seven differentially methylated regions (DMRs) of imprinted genes [*H19/IGF2*: IG-DMR (CTCF3 and CTCF6 of *H19* gene); *IGF2*-DMRs (DMR0 and DMR2); *MEG3/DLK1*: IG-DMR; *SNURF*:TSS-DMR; *KCNQ1OT1*:TSS-DMR] were assessed by pyrosequencing after sodium bisulfite DNA treatment. Genomic DNA (500 ng) was modified by sodium bisulfite treatment using the EpiTect kit (Qiagen). Bisulfite-treated DNA (25 ng) was subsequently used as the template for PCR amplification prior to pyrosequencing as previously described in Bruno et al., 2015 [63]. Primers are available in Additional file 5: Table S4. Pyrosequencing reactions were performed in the PyroMark Q24 System (Qiagen) with the PyroGold SQA reagent kit according to the manufacturer's instructions (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden). The biotinylated PCR products were purified and denatured using the Pyrosequencing Vacuum Prep Tool (Qiagen). Pyrosequencing was performed on a Pyrosequencer Q24 (Qiagen). The DNA methylation level was calculated as the ratio of the C to T peaks at a given CpG site in pyrograms using Pyromark Q24 Software v.2.0.6 (Qiagen). Considering the presence of SNPs and high variability on one CpG of *H19/IGF2*-CTCF6 (no. 5) and two CpGs of *IGF2*-DMR2 (no. 8 and 9), these CpGs were not considered for quantitative methylation analysis.

Statistical analyses

Continuous variables are described as median and interquartile range (IQR) or mean ± standard error of the mean (SEM) according to their distribution. Categorical variables are described using percentages. Baseline demographic and clinical characteristics were compared among the five groups depending on cryopreservation indication

and sperm parameters. The distribution of continuous variables were compared using Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests and the ones of categorical variables using chi-square test or Fisher exact test when appropriate. Values that did not lie within the interquartile range and above 75th percentile for paternal imprinted genes or below the 25th percentile for the maternal imprinted genes were defined as outliers. Multivariate linear regression analyses were used to adjust all estimated for age. A log transformation of DNA methylation levels was applied to normalize their distribution. All statistical analyses were performed with SAS software, v9.4 (SAS Institute Inc., USA). A two-tailed $p < 0.05$ was considered significant.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Sperm DNA methylation analyses on imprinted genes for each analyzed group. (DOCX 28 kb)

Additional file 2: Table S2. Comparison of sperm DNA methylation between oligozoospermic controls (O) and normozoospermic controls (N), after adjusting for age, for each CpG site of the deregulated imprinted genes. (DOCX 29 kb)

Additional file 3: Figure S1. Comparisons of sperm DNA methylation levels between normozoospermic and oligozoospermic controls at each CpG of the specific altered imprinted sequences detected in the study. Methylation levels at each CpG position are expressed in percentage as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ significant differences after adjusting for age. N: normozoospermic (black square), O oligozoospermic (gray circle). (DOCX 346 kb)

Additional file 4: Table S3. Relative standard deviation (RSD) of sperm DNA methylation on imprinted genes for control groups (normozoospermic and oligozoospermic). (DOCX 15 kb)

Additional file 5: Table S4. Primers for pyrosequencing [23, 63, 64]. (DOCX 28 kb)

Abbreviations

ART: Assisted reproductive technology; DMR: Differentially methylated regions; GCNIS: Germ cell neoplasia in situ; ICSI: Intracytoplasmic sperm injection; IVF: In vitro fertilization; N: Normozoospermic control; O: Oligozoospermic control; S: Seminoma patient; SN: Normozoospermic seminoma patient; SO: Oligozoospermic seminoma patient; TDS: Testicular dysgenesis syndrome; TGCT: Testicular germ cell tumor

Acknowledgements

The authors thank the technicians from the assisted reproductive technologies unit of Dijon Hospital for their implication in this project. We thank Maud Carpentier of the "Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation" of Dijon University Hospital for the promotion and the management of the study. We thank Suzanne Rankin for her help in writing the manuscript.

Funding

The independent study was supported by a grant from the French Ministry of Health (2016, PHRCI-16-046) and a grant from the "Conseil Régional de Bourgogne Franche-Comté" and the "CHU Dijon Bourgogne" (2016, AOI).

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Authors' contributions

CB, CBI, and PF contributed to the design of the study and to the analysis and interpretation of data. CBr, MG, and OB recruited the patients and contributed to the acquisition of the data. CBr, MG, JB, TB, and CC were involved in experiments.

CBI and SD performed statistical analyses. CBr and PF drafted the manuscript. All authors give their final approval of the version to be published.

Ethics approval and consent to participate

All volunteer patients provided written informed consent as approved by the Ethics Committee of the University and the state medical board (2016 PHRCI-16-046, NCT03262207).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Université Bourgogne Franche-Comté-Equipe Génétique des Anomalies du Développement (GAD) INSERM UMR1231, 2 Rue Angélique Ducoudray, F-21000 Dijon, France. ²CHU Dijon Bourgogne, Laboratoire de Biologie de la Reproduction-CECOS, 14 rue Gaffarel, F-21000 Dijon, France. ³CHRU Besançon, Service de Biologie et de Médecine de la Reproduction-CECOS, 3 Boulevard Fleming, F-25030 Besançon, France. ⁴CHU Dijon Bourgogne, Centre d'Investigation Clinique, Module Épidémiologie Clinique/Essais Cliniques (CIC-EC), 7 boulevard Jeanne d'Arc, F-21000 Dijon, France. ⁵Université Bourgogne Franche-Comté-INSERM, CIC1432, Module Épidémiologie Clinique, 7 boulevard Jeanne d'Arc, F-21000 Dijon, France. ⁶CHU Dijon Bourgogne, Service de Pathologie, 14 rue Gaffarel, F-21000 Dijon, France. ⁷CHU Dijon Bourgogne, Service de Gynécologie-Obstétrique, 14 rue Gaffarel, F-21000 Dijon, France.

Received: 5 June 2018 Accepted: 4 October 2018

Published online: 19 October 2018

References

- McGlynn KA, Devesa SS, Sigurdson AJ, Brown LM, Tsao L, Tarone RE. Trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States. *Cancer*. 2003;97:63–70.
- Purdue MP, Devesa SS, Sigurdson AJ, McGlynn KA. International patterns and trends in testis cancer incidence. *Int J Cancer*. 2005;115:822–7.
- Le Cornet C, Lortet-Tieulent J, Forman D, Béranger R, Flechon A, Fervers B, et al. Testicular cancer incidence to rise by 25% by 2025 in Europe? Model-based predictions in 40 countries using population-based registry data. *Eur J Cancer Oxf Engl*. 1990. 2014;50:831–9.
- Znaor A, Lortet-Tieulent J, Jemal A, Bray F. International variations and trends in testicular cancer incidence and mortality. *Eur Urol*. 2014;65:1095–106.
- Jørgensen A, Lindhardt Johansen M, Juul A, Skakkebaek NE, Main KM, Rajpert-De ME. Pathogenesis of germ cell neoplasia in testicular dysgenesis and disorders of sex development. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;45:124–37.
- MacKenna A, Crosby J, Huidobro C, Correa E, Duque G. Semen quality before cryopreservation and after thawing in 543 patients with testicular cancer. *JBRA Assist Reprod*. 2017;21:31–4.
- Serrano T, Chevrier C, Multigner L, Cordier S, Jégou B. International geographic correlation study of the prevalence of disorders of male reproductive health. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2013;28:1974–86.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2001;16:972–8.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Buck Louis GM, Toppari J, Andersson A-M, Eisenberg ML, et al. Male reproductive disorders and fertility trends: influences of environment and genetic susceptibility. *Physiol Rev*. 2016;96:55–97.
- Carouge D, Blanc V, Knoblaugh SE, Hunter RJ, Davidson NO, Nadeau JH. Parent-of-origin effects of A1CF and AGO2 on testicular germ-cell tumors, testicular abnormalities, and fertilization bias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113:E5425–33.
- Rajpert-De Meyts E, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Almstrup K. Diagnostic markers for germ cell neoplasms: from placental-like alkaline phosphatase to micro-RNAs. *Folia Histochem Cytobiol*. 2015;53:177–88.

12. Korkola JE, Houldsworth J, Dobrzynski D, Olshen AB, Reuter VE, Bosl GJ, et al. Gene expression-based classification of nonseminomatous male germ cell tumors. *Oncogene*. 2005;24:5101–7.
13. Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:210–22.
14. Sonne SB, Almstrup K, Dalgaard M, Juncker AS, Edsgard D, Ruban L, et al. Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. *Cancer Res*. 2009;69:5241–50.
15. Sperger JM, Chen X, Draper JS, Antosiewicz JE, Chon CH, Jones SB, et al. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:13350–5.
16. Kristensen DG, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Almstrup K. Epigenetic features of testicular germ cell tumours in relation to epigenetic characteristics of foetal germ cells. *Int J Dev Biol*. 2013;57:309–17.
17. Almstrup K, Nielsen JE, Mlynarska O, Jansen MT, Jørgensen A, Skakkebaek NE, et al. Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. *Br J Cancer*. 2010;103:1269–76.
18. Brait M, Maldonado L, Begum S, Loyo M, Wehle D, Tavora FF, et al. DNA methylation profiles delineate epigenetic heterogeneity in seminoma and non-seminoma. *Br J Cancer*. 2012;106:414–23.
19. Netto GJ, Nakai Y, Nakayama M, Jadallah S, Toubaji A, Nonomura N, et al. Global DNA hypomethylation in intratubular germ cell neoplasia and seminoma, but not in nonseminomatous male germ cell tumors. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2008;21:1337–44.
20. Smiraglia DJ, Szymanska J, Kraggerud SM, Lothe RA, Peltomäki P, Plass C. Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Oncogene*. 2002;21:3909–16.
21. van der Zwan YG, Rijlaarsdam MA, Rossello FJ, Notini AJ, de Boer S, Watkins DN, et al. Seminoma and embryonal carcinoma footprints identified by analysis of integrated genome-wide epigenetic and expression profiles of germ cell cancer cell lines. *PLoS One*. 2014;9:e98330.
22. Depalo R, Falagario D, Masciandaro P, Nardelli C, Vacca MP, Capuano P, et al. Fertility preservation in males with cancer: 16-year monocentric experience of sperm banking and post-thaw reproductive outcomes. *Ther Adv Med Oncol*. 2016;8:412–20.
23. 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*. 2010;18:73–80.
24. 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*. 2010;94:1278–33.
25. 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:e1289.
26. 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*. 2007;16:2542–51.
27. Laurentino S, Beygo J, Nordhoff V, Klesch S, Wistuba J, Borgmann J, et al. Epigenetic germline mosaicism in infertile men. *Hum Mol Genet*. 2015;24:1295–304.
28. Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet Lond Engl*. 2004;363:1700–2.
29. 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*. 2008;14:67–74.
30. Montjean D, Ravel C, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie P, Berthaut I, Bashamboo A, et al. Methylation changes in mature sperm deoxyribonucleic acid from oligozoospermic men: assessment of genetic variants and assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*. 2013;100:1241–7.
31. 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*. 2015;3:235–40.
32. 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*. 2010;33:642–9.
33. Santi D, De Vincentis S, Magnani E, Spaggiari G. Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: a meta-analytic study. *Andrology*. 2017;5:695–703.
34. Sato A, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Abe Y, Utsunomiya T, et al. Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation polymerase chain reaction Luminex analysis. *Fertil Steril*. 2011;95:129–34.e1–4.
35. Du Y, Li M, Chen J, Duan Y, Wang X, Qiu Y, et al. Promoter targeted bisulfite sequencing reveals DNA methylation profiles associated with low sperm motility in asthenozoospermia. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2016;31:24–33.
36. Jenkins TG, Aston KI, Meyer TD, Hotaling JM, Shamsi MB, Johnstone EB, et al. Decreased fecundity and sperm DNA methylation patterns. *Fertil Steril*. 2016;105:51–57.e1–3.
37. 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:e71215.
38. 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:e20280.
39. Urdinguio RG, Bayón GF, Dmitrijeva M, Torano EG, Bravo C, Fraga MF, et al. Aberrant DNA methylation patterns of spermatozoa in men with unexplained infertility. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2015;30:1014–28.
40. 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:e13884.
41. Auger J, Sermondade N, Eustache F. Semen quality of 4480 young cancer and systemic disease patients: baseline data and clinical considerations. *Basic Clin Androl*. 2016;26:3.
42. Rives N, Walschaerts M, Setif V, Hennebicq S, Saïas J, Brugnon F, et al. Sperm aneuploidy after testicular cancer treatment: data from a prospective multicenter study performed within the French Centre d'Étude et de Conservation des Oeufs et du Sperme network. *Fertil Steril*. 2017;107:580–588.e1.
43. Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update*. 2017;23:646–59.
44. Tvrdá E, Agarwal A, Alkuhaimi N. Male reproductive cancers and infertility: a mutual relationship. *Int J Mol Sci*. 2015;16:7230–60.
45. Guerrero-Bosagna C, Covert TR, Haque MM, Settles M, Nilsson EE, Anway MD, et al. Epigenetic transgenerational inheritance of vinclozolin induced mouse adult onset disease and associated sperm epigenome biomarkers. *Reprod Toxicol*. 2012;34:694–707.
46. Kläver R, Sánchez V, Damm OS, Redmann K, Lahrmann E, Sandhowe-Klaverkamp R, et al. Direct but no transgenerational effects of Decitabine and Vorinostat on male fertility. Ward WS, editor. *PLoS One*. 2015;10:e0117839.
47. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Dioxin (TCDD) induces epigenetic transgenerational inheritance of adult onset disease and sperm epimutations. *PLoS One*. 2012;7:e46249.
48. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PLoS One*. 2013;8:e55387.
49. Manikkam M, Haque MM, Guerrero-Bosagna C, Nilsson EE, Skinner MK. Pesticide Methoxychlor promotes the epigenetic transgenerational inheritance of adult-onset disease through the female germline. Ward WS, editor. *PLoS One*. 2014;9:e102091.
50. Skinner MK, Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Haque M, Nilsson EE. Ancestral dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) exposure promotes epigenetic transgenerational inheritance of obesity. *BMC Med*. 2013;11:228. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-228>.
51. Stouder C, Paoloni-Giacobino A. Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the methylation pattern of imprinted genes in the mouse sperm. *Reprod Camb Engl*. 2010;139:373–9.
52. Finegersh A, Rompala GR, Martin DIK, Homanics GE. Drinking beyond a lifetime: new and emerging insights into paternal alcohol exposure on subsequent generations. *Alcohol*. 2015;49:461–70.
53. Jenkins TG, Aston KI, Pflueger C, Cairns BR, Carrell DT. Age-associated sperm DNA methylation alterations: possible implications in offspring disease susceptibility. *PLoS Genet*. 2014;10:e1004458.
54. Jenkins TG, James ER, Alonso DF, Hoidal JR, Murphy PJ, Hotaling JM, et al. Cigarette smoking significantly alters sperm DNA methylation patterns. *Andrology*. 2017;5:1089–99.
55. Kobayashi N, Miyauchi N, Tatsuta N, Kitamura A, Okae H, Hiura H, et al. Factors associated with aberrant imprint methylation and oligozoospermia. *Sci Rep*. 2017;7:42336.

56. Soubry A, Guo L, Huang Z, Hoyo C, Romanus S, Price T, et al. Obesity-related DNA methylation at imprinted genes in human sperm: results from the TIEGER study. *Clin Epigenetics*. 2016;8:51.
57. Gunnes MW, Lie RT, Bjørge T, Ghaderi S, Ruud E, Syse A, et al. Reproduction and marriage among male survivors of cancer in childhood, adolescence and young adulthood: a national cohort study. *Br J Cancer*. 2016;114:348–56.
58. Choux C, Binquet C, Carmignac V, Bruno C, Chapusot C, Barberet J, et al. The epigenetic control of transposable elements and imprinted genes in newborns is affected by the mode of conception: ART versus spontaneous conception without underlying infertility. *Hum Reprod*. 2018;33:331–40.
59. Ankolkar M, Patil A, Warke H, Salvi V, Kedia Mokashi N, Pathak S, et al. Methylation analysis of idiopathic recurrent spontaneous miscarriage cases reveals aberrant imprinting at H19 ICR in normozoospermic individuals. *Fertil Steril*. 2012;98:1186–92.
60. Benchaib M, Braun V, Ressenkoff D, Lornage J, Durand P, Niveleau A, et al. Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2005;20:768–73.
61. Elia L, Condorelli G. RNA (Epi)genetics in cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;89:11–6.
62. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*. 2004;305:1733–6.
63. Bruno C, Carmignac V, Netchine I, Choux C, Duffourd Y, Faivre L, et al. Germline correction of an epimutation related to Silver-Russell syndrome. *Hum Mol Genet*. 2015;24:3314–21.
64. Rancourt RC, Harris HR, Michels KB. Methylation levels at imprinting control regions are not altered with ovulation induction or in vitro fertilization in a birth cohort. *Hum Reprod*. 2012;27:2208–16.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



V Résultats et Discussion

Afin de répondre à la question du risque de transmission de dérégulation épigénétique (épimutation) chez l'Homme, nous l'avons abordé selon deux axes, le premier nous a permis d'évaluer le risque de transmission intergénérationnelle chez un patient SRS. Et le second nous a conduit à dépister des épimutations spermatiques (évaluation de l'intégrité de la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes par pyroséquençage) à partir de deux modèles : 1/ de pères d'enfants atteints de pathologies liées à l'empreinte parentale et 2/ de patients atteints de cancer testiculaire.

Nous avons pu évaluer pour la première fois le risque de transmission intergénérationnelle d'une épimutation chez un patient SRS et montré l'efficacité de la reprogrammation épigénétique chez l'Homme pour des régions soumises à la reprogrammation. Ainsi comme montré chez la souris (de Waal et al., 2012), ou dans le cas d'animaux clonés (Yamanaka et al., 2018) une épimutation primaire est reprogrammée durant la gamétogenèse, ce qui limiterait le risque de transmission aux générations suivantes.

L'origine de cette épimutation demeure néanmoins inconnue, mais les éléments semblent indiquer qu'il s'agit d'une épimutation apparue *de novo* probablement précocement au cours du développement. En effet, l'absence de facteur génétique associé, le caractère partiel et d'autant plus qu'elle soit retrouvée sur l'ensemble des tissus analysés suggèrent qu'elle ait pu apparaître au cours du développement embryonnaire précoce, avant la différenciation des lignées embryonnaires. L'analyse de notre série de père d'enfants atteints de pathologies liées à l'empreinte étaye cette hypothèse. En effet, aucune anomalie de méthylation n'a pu être identifiée au niveau des spermatozoïdes des pères. De plus, le cas particulier des jumeaux monozygotes (cas 1) où les deux jumeaux présentaient une perte de méthylation de l'ICR2 sur leurs cellules sanguines alors qu'un seul présentait les signes cliniques du SBW, indique qu'une origine post-zygotique est très probable dans l'apparition de ces épimutations.

Dans un deuxième axe nous nous sommes intéressés à évaluer le risque d'apparition d'une épimutation dans un contexte du cancer testiculaire, notamment des séminomes (cellules cancéreuses dérivant spécifiquement des cellules germinales). Les résultats ont montré que les patients atteints de séminome préservant une spermatogenèse correcte présentent une intégrité de l'empreinte spermatique. Au contraire, et comme pour les patients oligozoospermiques, les hommes atteints de séminome présentant une hypospermatogenèse

(oligozoospermie) ont un risque plus élevé de présenter des défauts d'empreinte sur leurs spermatozoïdes. Si une dérégulation durant la vie fœtale est largement suspectée dans l'origine des cancers testiculaire, la spermatogenèse semble quand à elle préservée d'un impact durable sur la lignée germinale. L'apparition de défaut de méthylation sur les spermatozoïdes d'hommes oligozoospermiques serait plutôt en lien avec des perturbateurs environnementaux pouvant survenir tout au long du développement ainsi que durant la vie adulte. Néanmoins cette étude préliminaire porte sur seulement 7 DMRs et il est important de poursuivre par une analyse plus étendue du génome et en établissant un suivi prospectif.

Rien ne prouve aujourd'hui qu'une épimutation puisse échapper à la reprogrammation chez les mammifères. Les données actuellement disponibles laissent plutôt supposer l'implication de cascades d'événements épigénétiques pour expliquer la persistance d'un phénotype à cours des générations. En effet on peut supposer qu'une épimutation induite par un environnement défavorable puisse, par des mécanismes d'adaptation, entraîner des désordres moléculaires, cellulaires et physiologiques eux-mêmes susceptibles de modifier l'épigénome des cellules/tissus cibles dont potentiellement les cellules germinales. Cet « effet papillon-épigénétique » pourrait à lui seul expliquer les cas de transmission transgénérationnelle observés dans l'expérimentation animale. La reprogrammation atténuerait l'impact environnemental initial par reprogrammation de l'épimutation primaire, seules les conséquences de cet effet perdureraient (conséquences de l'épigénome secondaire).

Tout laisse à penser qu'une épimutation induite par l'environnement (au sens large) puisse entraîner une vague de dérégulations épigénétiques susceptible d'être transmise aux générations suivantes, voir même être à l'origine d'une fragilité de la chromatine propice à l'apparition de mutation génétique. On n'est pas loin de la vision lamarckienne selon laquelle « tout ce qui a été acquis, tracé ou changé, dans l'organisation des individus, pendant le cours de leur vie, est conservé par la génération, et transmis aux nouveaux individus qui proviennent de ceux qui ont éprouvé ces changements ». Néanmoins, la reprogrammation agirait comme un verrou à la transmission indéfinie de dérégulations épigénétiques.

Le principal défi des études à venir est d'identifier les mécanismes intervenant dans l'apparition de ces épimutations. Les principales pistes convergent vers certaines

régions de l'ADN (gènes impliqués dans le développement, GSE, séquences répétées..) dont les marques épigénétiques pourraient (au moins partiellement) échapper aux phases successives de la reprogrammation. Le rôle des petits ARNs non codants est également fortement suspecté ainsi que l'incorporation des protamines lors de la compaction finale des spermatozoïdes, où le maintien de certaines histones en regard de séquences régulatrices, promoteurs, enhancers régulant des gènes critiques pour le développement, que l'on retrouverait également au niveau de séquences répétées.

Les moyens actuels de séquençage à haut débit et d'analyse à grande échelle de la méthylation de l'ADN ne pourront que renforcer l'analyse de ces phénomènes. En effet, avant de conclure au caractère épigénétique d'un effet transgénérationnel, et en raison de relations bidirectionnelles entre génétique et épigénétique, il faudrait par séquençage, vérifier l'absence de mutation dans la séquence de l'ADN. Il devient en effet nécessaire de mieux comprendre les relations entre génétiques et épigénétiques, de les associer plutôt que de les opposer ou d'ignorer l'une ou l'autre. De plus, ces analyses devront tenir compte des phénomènes d'épi-variation, des études complémentaires sont donc nécessaires afin d'évaluer la stabilité des marques épigénétiques au cours du développement (Tillo et al., 2016, Nadeau 2015 et al., 2015).

Une autre limite à l'interprétation des résultats réside dans la nature des types cellulaires étudiés. En effet, chaque cellule présente un épigénome spécifique et les analyses réalisées sur le sang, font état d'un mixte cellulaire (monocyte, polynucléaires..) (Skinner et al., 2016). La voie de l'analyse sur tri cellulaire ou « single cell » devient incontournable pour mieux appréhender les futurs résultats (Yamanaka et al., 2018).

Comme nous l'avons vu, étudier le risque de transmission d'une épimutation chez l'Homme demande beaucoup d'ingéniosité (et/ou de chance) tant les périodes clefs de la reprogrammation (la gamétogenèse et la période de développement embryonnaire) sont difficilement accessibles. En effet, ce sont des périodes critiques et très vulnérables aux modifications environnementales, périodes extrêmement courtes mais dont les perturbations pourraient conditionner le développement des générations suivantes. Encore une fois l'expérimentation animale à toute sa place dans cette thématique de recherche, et une voie tout à fait intéressante, dans la détermination de l'origine des épimutations, pourrait venir de la spermatogenèse *in vitro*. En effet, dans une étude récente réalisée chez le singe, Langenstroth-Rower (Langenstroth-Rower et al., 2017) a rapporté que des cellules germinales cultivées *in*

vitro préservait l'intégrité de leurs marques épigénétiques au niveau de 2 GSE : *H19* et *MEST* ainsi que sur les gènes *DDX-4* et *MAGE-A4*. A noter que des données contradictoires ont été précédemment publiées (Nickkholgh et al., 2014) mais seraient selon l'équipe de Langenstroth-Rower dues à des contaminations des cellules germinales par des cellules somatiques. Ces résultats pourraient en effet ouvrir la voie à des expérimentations sur cellules germinales cultivées *in vitro* exposées à divers environnements ce qui permettraient de mieux comprendre les mécanismes d'apparition des épimutations.

VI Perspectives

Les résultats du premier article conforte l'idée selon laquelle une reprogrammation est bien effective chez l'homme durant la spermatogenèse. Néanmoins, la caractérisation de l'épimutation causale se limite à une séquence donnée et restreinte du génome. Pour approfondir ces résultats, une analyse pan-génomique de la méthylation pourrait être proposée afin d'éliminer un caractère secondaire.

Dans ce travail de thèse, nous avons souhaité intégrer les résultats préliminaires concernant le statut de méthylation du sperme des 7 pères d'enfants atteints de pathologies liées à l'empreinte. Ces résultats bien que très rassurants sur l'intégrité épigénétique de leurs spermatozoïdes, demeurent parcellaires et nous souhaitons poursuivre notre investigation en réalisant une analyse pan-génomique de la méthylation à l'aide de puces dédiées. Nous utiliserons des algorithmes d'analyse innovants développés par une équipe collaboratrice du Dr Vaiman afin d'évaluer l'état de méthylation des gènes et des régions intergéniques.

De plus, parmi les cas inclus dans notre série, un couple avait bénéficié d'une prise en charge en ICSI (cas 1). Quatre embryons sont actuellement conservés au laboratoire et le couple a souhaité les céder à la recherche et spécifiquement dans le cadre de cette thématique. C'est une opportunité unique d'évaluer l'impact de l'environnement *in vitro* sur l'origine d'une épimutation. La principale limite réside dans le caractère précieux de tels échantillons et de la quantité d'ADN disponible ce qui nécessite une maîtrise des techniques d'analyse sur single cell, ce qui est en cours de mise au point au laboratoire par le Pr Fauque.

Nous souhaitons également compléter les analyses du statut épigénétique des gamètes d'hommes atteints de tumeurs testiculaires en analysant de manière ciblée les niveaux de méthylation des éléments transposables et également en réalisant des analyses globales de la méthylation de l'ensemble du génome par des approches « haut débit » ce qui permettra de quantifier l'état de méthylation des gènes mais aussi des régions intergéniques. L'analyse du méthylome sera réalisée à l'aide 1) de puce à ADN dédiée (interrogation de 850,000 CpGs simultanément- puce MethEPIC) et 2) de séquençage haut-débit (RRBS). Cette dernière méthode permet d'avoir une bonne représentation du génome intergénique. Ces analyses nous permettront de mettre en évidence des

séquences sensibles ou résistantes et d'identifier les éléments potentiellement dérégulateurs en contexte de tumeurs testiculaires.

Nous avons également prévu d'analyser secondairement, et à distance de l'exposition cancéreuse, soit un an après l'orchidectomie seule ou deux ans après dans le cas de traitement adjuvant tel que radio/chimiothérapie, l'état de la méthylation des spermatozoïdes. Cette étude prospective permettra de déterminer si les dérégulations épigénétiques gamétiques sont réversibles après restauration d'un environnement « sain ».

De plus, en lien avec l'impact des facteurs environnementaux sur la qualité des spermatozoïdes et afin d'évaluer les risques à court terme des épimutations spermatiques sur le développement embryonnaire nous pourrions grâce à notre accès direct avec le laboratoire de fécondation *in vitro* du CHU de Dijon, évaluer de manière globale le niveau de méthylation d'ADN de spermatozoïdes d'hommes pris en charge au laboratoire et ainsi évaluer l'impact de défauts de méthylation de l'ADN sur 1/ sur le développement embryonnaire grâce au time lapse et 2/sur les issues de grossesses. Ce travail pourrait contribuer à la discussion autour du concept de la POHaD avancé par Soubry et ses collaborateurs (Soubry, 2018).

Une dernière piste prometteuse pourrait être l'analyse du niveau globale de méthylation de spermatozoïdes exposés *in vitro* à des perturbateurs endocriniens.

Références Bibliographiques

- Aarabi, M., San Gabriel, M.C., Chan, D., Behan, N.A., Caron, M., Pastinen, T., Bourque, G., MacFarlane, A.J., Zini, A., and Trasler, J. (2015). High-dose folic acid supplementation alters the human sperm methylome and is influenced by the MTHFR C677T polymorphism. *Hum. Mol. Genet.* 24, 6301–6313.
- Abu-Halima, M., Hammadeh, M., Schmitt, J., Leidinger, P., Keller, A., Meese, E., and Backes, C. (2013). Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertil. Steril.* 99, 1249-1255.e16.
- Almstrup, K., Nielsen, J.E., Mlynarska, O., Jansen, M.T., Jørgensen, A., Skakkebaek, N.E., and Rajpert-De Meyts, E. (2010). Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. *Br. J. Cancer* 103, 1269–1276.
- Angermueller, C., Clark, S.J., Lee, H.J., Macaulay, I.C., Teng, M.J., Hu, T.X., Krueger, F., Smallwood, S., Ponting, C.P., Voet, T., et al. (2016). Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity. *Nat. Methods* 13, 229–232.
- Ankolkar, M., Salvi, V., Warke, H., Vundinti, B.R., and Balasinor, N.H. (2013). Methylation status of imprinted genes DLK1-GTL2, MEST (PEG1), ZAC (PLAGL1), and LINE-1 elements in spermatozoa of normozoospermic men, unlike H19 imprinting control regions, is not associated with idiopathic recurrent spontaneous miscarriages. *Fertil. Steril.* 99, 1668–1673.
- Ankolkar, M., Patil, A., Warke, H., Salvi, V., Kedia Mokashi, N., Pathak, S., and Balasinor, N.H. (2012). Methylation analysis of idiopathic recurrent spontaneous miscarriage cases reveals aberrant imprinting at H19 ICR in normozoospermic individuals. *Fertil. Steril.* 98, 1186–1192.
- Anway, M.D., and Skinner, M.K. (2006). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology* 147, S43-49.
- Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M., and Skinner, M.K. (2005). Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. 308, 6.
- Aoki, V.W., Moskovtsev, S.I., Willis, J., Liu, L., Mullen, J.B.M., and Carrell, D.T. (2005). DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J. Androl.* 26, 741–748.
- Aoki, V.W., Emery, B.R., Liu, L., and Carrell, D.T. (2006a). Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J. Androl.* 27, 890–898.
- Aoki, V.W., Liu, L., Jones, K.P., Hatasaka, H.H., Gibson, M., Peterson, C.M., and Carrell, D.T. (2006b). Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil. Steril.* 86, 1408–1415.
- Aston, K.I., Uren, P.J., Jenkins, T.G., Horsager, A., Cairns, B.R., Smith, A.D., and Carrell, D.T. (2015). Aberrant sperm DNA methylation predicts male fertility status and embryo quality. *Fertil. Steril.* 104, 1388-1397.e1-5.
- Auger, J., Eustache, F., Andersen, A.G., Irvine, D.S., Jørgensen, N., Skakkebaek, N.E., Suominen, J., Toppari, J., Vierula, M., and Jouannet, P. (2001). Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 16, 2710–2717.
- Azzi, S., Rossignol, S., Steunou, V., Sas, T., Thibaud, N., Danton, F., Le Jule, M., Heinrichs, C., Cabrol, S., Gicquel, C., et al. (2009). Multilocus methylation analysis in a large cohort of 11p15-related foetal growth disorders (Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes) reveals simultaneous loss of methylation at paternal and maternal imprinted loci. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4724–4733.
- Babak, T., DeVeale, B., Tsang, E.K., Zhou, Y., Li, X., Smith, K.S., Kukurba, K.R., Zhang, R., Li, J.B., van der Kooy, D., et al. (2015). Genetic conflict reflected in tissue-specific maps of genomic imprinting in human and mouse. *Nat. Genet.* 47, 544–549.
- Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* 22, 2773–2785.

- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 8, 227.
- Bao, J., and Bedford, M.T. (2016). Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reprod. Camb. Engl.* 151, R55-70.
- Barau, J., Teissandier, A., Zamudio, N., Roy, S., Nalesso, V., Hérault, Y., Guillou, F., and Bourc'his, D. (2016). The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science* 354, 909–912.
- Barker, D.J.P. (2007). The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 261, 412–417.
- Barlow, D.P., and Bartolomei, M.S. (2014). Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6.
- Barral, S., Morozumi, Y., Tanaka, H., Montellier, E., Govin, J., de Dieuleveult, M., Charbonnier, G., Couté, Y., Puthier, D., Buchou, T., et al. (2017). Histone Variant H2A.L.2 Guides Transition Protein-Dependent Protamine Assembly in Male Germ Cells. *Mol. Cell* 66, 89-101.e8.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Barton, S.C., Surani, M.A., and Norris, M.L. (1984). Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* 311, 374–376.
- Benchabib, M., Braun, V., Ressenkoff, D., Lornage, J., Durand, P., Niveleau, A., and Guérin, J.F. (2005). Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 20, 768–773.
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., et al. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat. Genet.* 37, 766–770.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21.
- Bliek, J., Verde, G., Callaway, J., Maas, S.M., De Crescenzo, A., Sparago, A., Cerrato, F., Russo, S., Ferraiuolo, S., Rinaldi, M.M., et al. (2009). Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including PLAGL1 and GNAS loci in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 17, 611–619.
- Boissonnas, C.C., Abdalaoui, H.E., Haelewyn, V., Fauque, P., Dupont, J.M., Gut, I., Vaiman, D., Jouannet, P., Tost, J., and Jammes, H. (2010). Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 18, 73–80.
- Boissonnas, C.C., Jouannet, P., and Jammes, H. (2013). Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertil. Steril.* 99, 624–631.
- Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B., and Bestor, T.H. (2001). Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294, 2536–2539.
- Bourc'his (2015) Cartographie des profils de méthylation de l'ADN : quelles méthodes, pour quelle résolution et quel coût ? Correspondance en Onco-theranostic Vol IV n°1 janv, fev, mars p29-32
- Brieno-Enríquez, M.A., García-López, J., Cárdenas, D.B., Guibert, S., Cleroux, E., Déd, L., Hourcade, J. de D., Pěkníková, J., Weber, M., and del Mazo, J. (2015). Exposure to Endocrine Disruptor Induces Transgenerational Epigenetic Deregulation of MicroRNAs in Primordial Germ Cells. *PLOS ONE* 10, e0124296.
- Brioude, F., Kalish, J.M., Mussa, A., Foster, A.C., Bliek, J., Ferrero, G.B., Boonen, S.E., Cole, T., Baker, R., Bertolotti, M., et al. (2018). Expert consensus document: Clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith-Wiedemann syndrome: an international consensus statement. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 229–249.

- Bruner-Tran, K.L., and Osteen, K.G. (2011). Developmental exposure to TCDD reduces fertility and negatively affects pregnancy outcomes across multiple generations. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 31, 344–350.
- Bruno, C., Carmignac, V., Netchine, I., Choux, C., Duffourd, Y., Faivre, L., Thauvin-Robinet, C., Le Bouc, Y., Sagot, P., Bourc'his, D., et al. (2015). Germline correction of an epimutation related to Silver-Russell syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 24, 3314–3321.
- Burgio, E., Piscitelli, P., and Colao, A. (2018). Environmental Carcinogenesis and Transgenerational Transmission of Carcinogenic Risk: From Genetics to Epigenetics. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 15.
- Camprubí, C., Cigliano, R.A., Salas-Huetos, A., Garrido, N., and Blanco, J. (2017). What the human sperm methylome tells us. *Epigenomics* 9, 1299–1315.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., and Skakkebaek, N.E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 305, 609–613.
- Carone, B.R., Fauquier, L., Habib, N., Shea, J.M., Hart, C.E., Li, R., Bock, C., Li, C., Gu, H., Zamore, P.D., et al. (2010). Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 143, 1084–1096.
- Carone, B.R., Hung, J.-H., Hainer, S.J., Chou, M.-T., Carone, D.M., Weng, Z., Fazzio, T.G., and Rando, O.J. (2014). High-resolution mapping of chromatin packaging in mouse embryonic stem cells and sperm. *Dev. Cell* 30, 11–22.
- Carrell, D.T. (2012). Epigenetics of the male gamete. *Fertil. Steril.* 97, 267–274.
- Carrell, D.T., and Liu, L. (2001). Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J. Androl.* 22, 604–610.
- Casas, E., and Vavouri, T. (2014). Sperm epigenomics: challenges and opportunities. *Front. Genet.* 5, 330.
- de Castro Barbosa, T., Ingerslev, L.R., Alm, P.S., Versteyhe, S., Massart, J., Rasmussen, M., Donkin, I., Sjögren, R., Mudry, J.M., Vetterli, L., et al. (2015). High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Mol. Metab.* 5, 184–197.
- Chamorro-García, R., Sahu, M., Abbey, R.J., Laude, J., Pham, N., and Blumberg, B. (2013). Transgenerational inheritance of increased fat depot size, stem cell reprogramming, and hepatic steatosis elicited by prenatal exposure to the obesogen tributyltin in mice. *Environ. Health Perspect.* 121, 359–366.
- Champroux, A., Cocquet, J., Henry-Berger, J., Drevet, J.R., and Kocer, A. (2018). A Decade of Exploring the Mammalian Sperm Epigenome: Paternal Epigenetic and Transgenerational Inheritance. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 50.
- Chan, D., McGraw, S., Klein, K., Wallock, L.M., Konermann, C., Plass, C., Chan, P., Robaire, B., Jacob, R.A., Greenwood, C.M.T., et al. (2017). Stability of the human sperm DNA methylome to folic acid fortification and short-term supplementation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 32, 272–283.
- Chan, T.L., Yuen, S.T., Kong, C.K., Chan, Y.W., Chan, A.S., Ng, W.F., Tsui, W.Y., Lo, M.W., Tam, W.Y., Li, V.S., et al. (2006). Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat. Genet.* 38, 1178–1183.
- Chen, Q., Yan, M., Cao, Z., Li, X., Zhang, Y., Shi, J., Feng, G., Peng, H., Zhang, X., Zhang, Y., et al. (2016a). Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science* 351, 397–400.
- Chen, Q., Yan, W., and Duan, E. (2016b). Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. *Nat. Rev. Genet.* 17, 733–743.
- Chen, Z., Robbins, K.M., Wells, K.D., and Rivera, R.M. (2013). Large offspring syndrome: a bovine

model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. *Epigenetics* 8, 591–601.

Consales, C., Leter, G., Bonde, J.P.E., Toft, G., Eleuteri, P., Moccia, T., Budillon, A., Jönsson, B. a. G., Giwerzman, A., Pedersen, H.S., et al. (2014). Indices of methylation in sperm DNA from fertile men differ between distinct geographical regions. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 29, 2065–2072.

Cree, L.H., Balhorn, R., and Brewer, L.R. (2011). Single molecule studies of DNA-protamine interactions. *Protein Pept. Lett.* 18, 802–810.

Cui, L., Fang, L., Shi, B., Qiu, S., and Ye, Y. (2015). Spermatozoa micro ribonucleic acid-34c level is correlated with intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertil. Steril.* 104, 312–317.e1.

Dall'Aglio, L., Muka, T., Cecil, C.A.M., Bramer, W.M., Verbiest, M.M.P.J., Nano, J., Hidalgo, A.C., Franco, O.H., and Tiemeier, H. (2018). The role of epigenetic modifications in neurodevelopmental disorders: A systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 94, 17–30.

Davegårdh, C., García-Calzón, S., Bacos, K., and Ling, C. (2018). DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes in humans. *Mol. Metab.*

DeBaun, M.R., Niemitz, E.L., and Feinberg, A.P. (2003). Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 156–160.

Demars, J., Rossignol, S., Netchine, I., Lee, K.S., Shmela, M., Faivre, L., Weill, J., Odent, S., Azzi, S., Callier, P., et al. (2011). New insights into the pathogenesis of Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: contribution of small copy number variations to 11p15 imprinting defects. *Hum. Mutat.* 32, 1171–1182.

Denomme, M.M., McCallie, B.R., Parks, J.C., Schoolcraft, W.B., and Katz-Jaffe, M.G. (2017). Alterations in the sperm histone-retained epigenome are associated with unexplained male factor infertility and poor blastocyst development in donor oocyte IVF cycles. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 32, 2443–2455.

Dere, E., Huse, S., Hwang, K., Sigman, M., and Boekelheide, K. (2016). Intra- and inter-individual differences in human sperm DNA methylation. *Andrology* 4, 832–842.

Dieckmann, K.P., and Skakkebaek, N.E. (1999). Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features. *Int. J. Cancer* 83, 815–822.

Docherty, L.E., Rezwani, F.I., Poole, R.L., Turner, C.L.S., Kivuva, E., Maher, E.R., Smithson, S.F., Hamilton-Shield, J.P., Patalan, M., Gizewska, M., et al. (2015). Mutations in NLRP5 are associated with reproductive wastage and multilocus imprinting disorders in humans. *Nat. Commun.* 6, 8086.

Dominguez-Salas, P., Moore, S.E., Baker, M.S., Bergen, A.W., Cox, S.E., Dyer, R.A., Fulford, A.J., Guan, Y., Laritsky, E., Silver, M.J., et al. (2014). Maternal nutrition at conception modulates DNA methylation of human metastable epialleles. *Nat. Commun.* 5, 3746.

Doyle, T.J., Bowman, J.L., Windell, V.L., McLean, D.J., and Kim, K.H. (2013). Transgenerational effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on testicular germ cell associations and spermatogonial stem cells in mice. *Biol. Reprod.* 88, 112.

Du, Y., Li, M., Chen, J., Duan, Y., Wang, X., Qiu, Y., Cai, Z., Gui, Y., and Jiang, H. (2016). Promoter targeted bisulfite sequencing reveals DNA methylation profiles associated with low sperm motility in asthenozoospermia. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 31, 24–33.

Du, Z., Zheng, H., Huang, B., Ma, R., Wu, J., Zhang, X., He, J., Xiang, Y., Wang, Q., Li, Y., et al. (2017). Allelic reprogramming of 3D chromatin architecture during early mammalian development. *Nature* 547, 232–235.

Ekram, M.B., Kang, K., Kim, H., and Kim, J. (2012). Retrotransposons as a major source of epigenetic variations in the mammalian genome. *Epigenetics* 7, 370–382.

- El Hajj, N., Zechner, U., Schneider, E., Tresch, A., Gromoll, J., Hahn, T., Schorsch, M., and Haaf, T. (2011). Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determin. Differ.* 5, 60–69.
- Erkek, S., Hisano, M., Liang, C.-Y., Gill, M., Murr, R., Dieker, J., Schübeler, D., van der Vlag, J., Stadler, M.B., and Peters, A.H.F.M. (2013). Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 868–875.
- Feki, N.C., Abid, N., Rebai, A., Sellami, A., Ayed, B.B., Guermazi, M., Bahloul, A., Rebai, T., and Ammar, L.K. (2009). Semen quality decline among men in infertile relationships: experience over 12 years in the South of Tunisia. *J. Androl.* 30, 541–547.
- Fenic, I., Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M., and Steger, K. (2004). In vivo effects of histone-deacetylase inhibitor trichostatin-A on murine spermatogenesis. *J. Androl.* 25, 811–818.
- Filippova, G.N. (2008). Genetics and epigenetics of the multifunctional protein CTCF. *Curr. Top. Dev. Biol.* 80, 337–360.
- Finegersh, A., Rompala, G.R., Martin, D.I.K., and Homanics, G.E. (2015). Drinking beyond a lifetime: New and emerging insights into paternal alcohol exposure on subsequent generations. *Alcohol* 49, 461–470.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.
- Fullston, T., Ohlsson Teague, E.M.C., Palmer, N.O., DeBlasio, M.J., Mitchell, M., Corbett, M., Print, C.G., Owens, J.A., and Lane, M. (2013). Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 4226–4243.
- Fullston, T., Ohlsson-Teague, E.M.C., Print, C.G., Sandeman, L.Y., and Lane, M. (2016). Sperm microRNA Content Is Altered in a Mouse Model of Male Obesity, but the Same Suite of microRNAs Are Not Altered in Offspring's Sperm. *PLOS ONE* 11, e0166076.
- Gapp, K., Jawaid, A., Sarkies, P., Bohacek, J., Pelczar, P., Prados, J., Farinelli, L., Miska, E., and Mansuy, I.M. (2014). Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat. Neurosci.* 17, 667–669.
- Gardiner-Garden, M., and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196, 261–282.
- Gassler, J., Brandão, H.B., Imakaev, M., Flyamer, I.M., Ladstätter, S., Bickmore, W.A., Peters, J.-M., Mirny, L.A., and Tachibana, K. (2017). A mechanism of cohesin-dependent loop extrusion organizes zygotic genome architecture. *EMBO J.* 36, 3600–3618.
- Ge, S.-Q., Lin, S.-L., Zhao, Z.-H., and Sun, Q.-Y. (2017). Epigenetic dynamics and interplay during spermatogenesis and embryogenesis: implications for male fertility and offspring health. *Oncotarget* 8, 53804–53818.
- Gicquel, C., Gaston, V., Mandelbaum, J., Siffroi, J.-P., Flahault, A., and Le Bouc, Y. (2003). In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN1OT gene. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1338–1341.
- Gicquel, C., Rossignol, S., Cabrol, S., Houang, M., Steunou, V., Barbu, V., Danton, F., Thibaud, N., Le Merrer, M., Burglen, L., et al. (2005). Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat. Genet.* 37, 1003–1007.
- Gilbert, D., Rapley, E., and Shipley, J. (2011). Testicular germ cell tumours: predisposition genes and the male germ cell niche. *Nat. Rev. Cancer* 11, 278–288.
- Gkountela, S., Li, Z., Vincent, J.J., Zhang, K.X., Chen, A., Pellegrini, M., and Clark, A.T. (2013). The ontogeny of cKIT⁺ human primordial germ cells proves to be a resource for human germ line reprogramming, imprint erasure and in vitro differentiation. *Nat. Cell Biol.* 15, 113–122.

- Gkountela, S., Zhang, K.X., Shafiq, T.A., Liao, W.-W., Hargan-Calvopiña, J., Chen, P.-Y., and Clark, A.T. (2015). DNA Demethylation Dynamics in the Human Prenatal Germline. *Cell* 161, 1425–1436.
- Glaser, S., Lubitz, S., Loveland, K.L., Ohbo, K., Robb, L., Schwenk, F., Seibler, J., Roellig, D., Kranz, A., Anastassiadis, K., et al. (2009). The histone 3 lysine 4 methyltransferase, Mll2, is only required briefly in development and spermatogenesis. *Epigenetics Chromatin* 2, 5.
- Goll, M.G., and Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 481–514.
- Gräff, J., and Mansuy, I.M. (2008). Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav. Brain Res.* 192, 70–87.
- Gravina, S., Ganapathi, S., and Vijg, J. (2015). Single-cell, locus-specific bisulfite sequencing (SLBS) for direct detection of epimutations in DNA methylation patterns. *Nucleic Acids Res.* 43, e93.
- Grimes, S.R., and Henderson, N. (1984). Hyperacetylation of histone H4 in rat testis spermatids. *Exp. Cell Res.* 152, 91–97.
- Guerrero-Bosagna, C. (2016). High type II error and interpretation inconsistencies when attempting to refute transgenerational epigenetic inheritance. *Genome Biol.* 17, 153.
- Guerrero-Bosagna, C., Settles, M., Luckner, B., and Skinner, M.K. (2010). Epigenetic Transgenerational Actions of Vinclozolin on Promoter Regions of the Sperm Epigenome. *PLoS ONE* 5, e13100.
- Guerrero-Bosagna, C., Covert, T.R., Haque, M.M., Settles, M., Nilsson, E.E., Anway, M.D., and Skinner, M.K. (2012). Epigenetic transgenerational inheritance of vinclozolin induced mouse adult onset disease and associated sperm epigenome biomarkers. *Reprod. Toxicol.* 34, 694–707.
- Guo, F., Yan, L., Guo, H., Li, L., Hu, B., Zhao, Y., Yong, J., Hu, Y., Wang, X., Wei, Y., et al. (2015). The Transcriptome and DNA Methylome Landscapes of Human Primordial Germ Cells. *Cell* 161, 1437–1452.
- Guo, H., Hu, B., Yan, L., Yong, J., Wu, Y., Gao, Y., Guo, F., Hou, Y., Fan, X., Dong, J., et al. (2017). DNA methylation and chromatin accessibility profiling of mouse and human fetal germ cells. *Cell Res.* 27, 165–183.
- Hackett, J.A., Sengupta, R., Zylitz, J.J., Murakami, K., Lee, C., Down, T.A., and Surani, M.A. (2013). Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science* 339, 448–452.
- Haimov-Kochman, R., Har-Nir, R., Ein-Mor, E., Ben-Shoshan, V., Greenfield, C., Eldar, I., Bdolah, Y., and Hurwitz, A. (2012). Is the quality of donated semen deteriorating? Findings from a 15 year longitudinal analysis of weekly sperm samples. *Isr. Med. Assoc. J. IMAJ* 14, 372–377.
- Hajkova, P., Jeffries, S.J., Lee, C., Miller, N., Jackson, S.P., and Surani, M.A. (2010). Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. *Science* 329, 78–82.
- Hammoud, S.S., Nix, D.A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D.T., and Cairns, B.R. (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460, 473–478.
- Hammoud, S.S., Purwar, J., Pflueger, C., Cairns, B.R., and Carrell, D.T. (2010). Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertil. Steril.* 94, 1728–1733.
- Hanna, C.W., Demond, H., and Kelsey, G. (2018). Epigenetic regulation in development: is the mouse a good model for the human? *Hum. Reprod. Update* 24, 556–576.
- Heard, E., and Martienssen, R.A. (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* 157, 95–109.
- Heijmans, B.T., Tobi, E.W., Lumey, L.H., and Slagboom, P.E. (2009). The epigenome: archive of the

prenatal environment. *Epigenetics* 4, 526–531.

Hitchins, M.P., Suter, C.M., and Ward, R.L. (2007). Inheritance of a Cancer-Associated MLH1 Germ-Line Epimutation. *N. Engl. J. Med.* 9.

Hitchins, M.P., Rapkins, R.W., Kwok, C.-T., Srivastava, S., Wong, J.J.L., Khachigian, L.M., Polly, P., Goldblatt, J., and Ward, R.L. (2011). Dominantly Inherited Constitutional Epigenetic Silencing of MLH1 in a Cancer-Affected Family Is Linked to a Single Nucleotide Variant within the 5'UTR. *Cancer Cell* 20, 200–213.

Hoghoughi, N., Barral, S., Vargas, A., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2018). Histone variants: essential actors in male genome programming. *J. Biochem. (Tokyo)* 163, 97–103.

Holliday, R. (2006). Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* 1, 76–80.

Houshdaran, S., Cortessis, V.K., Siegmund, K., Yang, A., Laird, P.W., and Sokol, R.Z. (2007). Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS One* 2, e1289.

Huszar, J.M., and Payne, C.J. (2013). MicroRNA 146 (Mir146) modulates spermatogonial differentiation by retinoic acid in mice. *Biol. Reprod.* 88, 15.

Iqbal, K., Tran, D.A., Li, A.X., Warden, C., Bai, A.Y., Singh, P., Wu, X., Pfeifer, G.P., and Szabó, P.E. (2015). Deleterious effects of endocrine disruptors are corrected in the mammalian germline by epigenome reprogramming. *Genome Biol.* 16.

Iqbal, K., Tran, D.A., Li, A.X., Warden, C., Bai, A.Y., Singh, P., Madaj, Z.B., Winn, M.E., Wu, X., Pfeifer, G.P., et al. (2016). High type I error and misrepresentations in search for transgenerational epigenetic inheritance: response to Guerrero-Bosagna. *Genome Biol.* 17.

Jammes, H., Junien, C., and Chavatte-Palmer, P. (2011). Epigenetic control of development and expression of quantitative traits. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 64–74.

Jenkins, T.G., Aston, K.I., Pflueger, C., Cairns, B.R., and Carrell, D.T. (2014). Age-associated sperm DNA methylation alterations: possible implications in offspring disease susceptibility. *PLoS Genet.* 10, e1004458.

Jenkins, T.G., Aston, K.I., Meyer, T.D., Hotaling, J.M., Shamsi, M.B., Johnstone, E.B., Cox, K.J., Stanford, J.B., Porucznik, C.A., and Carrell, D.T. (2016). Decreased fecundity and sperm DNA methylation patterns. *Fertil. Steril.* 105, 51-57.e1-3.

Jenkins, T.G., James, E.R., Alonso, D.F., Hoidal, J.R., Murphy, P.J., Hotaling, J.M., Cairns, B.R., Carrell, D.T., and Aston, K.I. (2017). Cigarette smoking significantly alters sperm DNA methylation patterns. *Andrology* 5, 1089–1099.

Jirtle, R.L., and Skinner, M.K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.* 8, 253–262.

Jodar, M., Selvaraju, S., Sendler, E., Diamond, M.P., Krawetz, S.A., and Reproductive Medicine Network (2013). The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Hum. Reprod. Update* 19, 604–624.

Johnson, L.M., Jacobsen, S.E., and Patel, D.J. (2015). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 519–532.

Johnson, J.P., Beischel, L., Schwanke, C., Styren, K., Crunk, A., Schoof, J., and Elias, A.F. (2018). Overrepresentation of pregnancies conceived by artificial reproductive technology in prenatally identified fetuses with Beckwith-Wiedemann syndrome. *J. Assist. Reprod. Genet.*

Jørgensen, A., Lindhardt Johansen, M., Juul, A., Skakkebaek, N.E., Main, K.M., and Rajpert-De Meyts, E. (2015). Pathogenesis of germ cell neoplasia in testicular dysgenesis and disorders of sex development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 45, 124–137.

Jørgensen, N., Andersen, A.G., Eustache, F., Irvine, D.S., Suominen, J., Petersen, J.H., Andersen,

A.N., Auger, J., Cawood, E.H., Horte, A., et al. (2001). Regional differences in semen quality in Europe. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 16, 1012–1019.

Jouannet, P., Wang, C., Eustache, F., Kold-Jensen, T., and Auger, J. (2001). Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 109, 333–344.

Kaati, G., Bygren, L.O., and Edvinsson, S. (2002). Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 10, 682–688.

Kagami, M., Nagai, T., Fukami, M., Yamazawa, K., and Ogata, T. (2007). Silver-Russell syndrome in a girl born after in vitro fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of PEG1/MEST. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24, 131–136.

Kagiwada, S., Kurimoto, K., Hirota, T., Yamaji, M., and Saitou, M. (2013). Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *EMBO J.* 32, 340–353.

Ke, Y., Xu, Y., Chen, X., Feng, S., Liu, Z., Sun, Y., Yao, X., Li, F., Zhu, W., Gao, L., et al. (2017). 3D Chromatin Structures of Mature Gametes and Structural Reprogramming during Mammalian Embryogenesis. *Cell* 170, 367–381.e20.

Kerjean, A., Dupont, J.M., Vasseur, C., Le Tessier, D., Cuisset, L., Pàldi, A., Jouannet, P., and Jeanpierre, M. (2000). Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2183–2187.

Khazamipour, N., Noruzinia, M., Fatehmanesh, P., Keyhanee, M., and Pujol, P. (2009). MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 24, 2361–2364.

Kläver, R., Sánchez, V., Damm, O.S., Redmann, K., Lahrmann, E., Sandhowe-Klaverkamp, R., Rohde, C., Wistuba, J., Ehmkcke, J., Schlatt, S., et al. (2015). Direct but No Transgenerational Effects of Decitabine and Vorinostat on Male Fertility. *PLOS ONE* 10, e0117839.

Kobayashi, H., Suda, C., Abe, T., Kohara, Y., Ikemura, T., and Sasaki, H. (2006). Bisulfite sequencing and dinucleotide content analysis of 15 imprinted mouse differentially methylated regions (DMRs): paternally methylated DMRs contain less CpGs than maternally methylated DMRs. *Cytogenet. Genome Res.* 113, 130–137.

Kobayashi, H., Sato, A., Otsu, E., Hiura, H., Tomatsu, C., Utsunomiya, T., Sasaki, H., Yaegashi, N., and Arima, T. (2007). Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum. Mol. Genet.* 16, 2542–2551.

Kobayashi, N., Miyauchi, N., Tatsuta, N., Kitamura, A., Okae, H., Hiura, H., Sato, A., Utsunomiya, T., Yaegashi, N., Nakai, K., et al. (2017). Factors associated with aberrant imprint methylation and oligozoospermia. *Sci. Rep.* 7, 42336.

Koerner, M.V., Pauler, F.M., Huang, R., and Barlow, D.P. (2009). The function of non-coding RNAs in genomic imprinting. *Dev. Camb. Engl.* 136, 1771–1783.

Korkola, J.E., Houldsworth, J., Dobrzynski, D., Olshen, A.B., Reuter, V.E., Bosl, G.J., and Chaganti, R.S.K. (2005). Gene expression-based classification of nonseminomatous male germ cell tumors. *Oncogene* 24, 5101–5107.

Kotaja, N. (2014). MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertil. Steril.* 101, 1552–1562.

Kowalski, A., and Pałyga, J. (2012). Linker histone subtypes and their allelic variants. *Cell Biol. Int.* 36, 981–996.

Krausz, C., Sandoval, J., Sayols, S., Chianese, C., Giachini, C., Heyn, H., and Esteller, M. (2012). Novel insights into DNA methylation features in spermatozoa: stability and peculiarities. *PloS One* 7, e44479.

Krawetz, S.A., Kruger, A., Lalancette, C., Tagett, R., Anton, E., Draghici, S., and Diamond, M.P.

(2011). A survey of small RNAs in human sperm. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 26, 3401–3412.

Kuhtz, J., Schneider, E., El Hajj, N., Zimmermann, L., Fust, O., Linek, B., Seufert, R., Hahn, T., Schorsch, M., and Haaf, T. (2014). Epigenetic heterogeneity of developmentally important genes in human sperm: implications for assisted reproduction outcome. *Epigenetics* 9, 1648–1658.

Lambrot, R., Xu, C., Saint-Phar, S., Chountalos, G., Cohen, T., Paquet, M., Suderman, M., Hallett, M., and Kimmins, S. (2013). Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nat. Commun.* 4, 2889.

Lan, L., Harrison, C.L., Misso, M., Hill, B., Teede, H.J., Mol, B.W., and Moran, L.J. (2017). Systematic review and meta-analysis of the impact of preconception lifestyle interventions on fertility, obstetric, fetal, anthropometric and metabolic outcomes in men and women. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 32, 1925–1940.

Langenstroth-Röwer, D., Gromoll, J., Wistuba, J., Tröndle, I., Laurentino, S., Schlatt, S., and Neuhaus, N. (2017). De novo methylation in male germ cells of the common marmoset monkey occurs during postnatal development and is maintained in vitro. *Epigenetics* 12, 527–539.

Latini, G., Knipp, G., Mantovani, A., Marcovecchio, M.L., Chiarelli, F., and Söder, O. (2010). Endocrine disruptors and human health. *Mini Rev. Med. Chem.* 10, 846–855.

Laurentino, S., Beygo, J., Nordhoff, V., Kliesch, S., Wistuba, J., Borgmann, J., Buiting, K., Horsthemke, B., and Gromoll, J. (2015). Epigenetic germline mosaicism in infertile men. *Hum. Mol. Genet.* 24, 1295–1304.

Le Bouc, Y., Rossignol, S., Azzi, S., Steunou, V., Netchine, I., and Gicquel, C. (2010). Epigenetics, genomic imprinting and assisted reproductive technology. *Ann. Endocrinol.* 71, 237–238.

Le Cornet, C., Lortet-Tieulent, J., Forman, D., Béranger, R., Flechon, A., Fervers, B., Schüz, J., and Bray, F. (2014). Testicular cancer incidence to rise by 25% by 2025 in Europe? Model-based predictions in 40 countries using population-based registry data. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 50, 831–839.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.

Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Mindlis, I., Pinotti, R., and Swan, S.H. (2017). Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Hum. Reprod. Update* 23, 646–659.

Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.

Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707–719.

Li, B., Li, J., Xiao, X., Ma, Y., Wang, J., Liang, X., Zhao, H., Jiang, F., Yao, Y., and Wang, X. (2013). Altered DNA methylation patterns of the H19 differentially methylated region and the DAZL gene promoter are associated with defective human sperm. *PloS One* 8, e71215.

Li, J.-Y., Lees-Murdock, D.J., Xu, G.-L., and Walsh, C.P. (2004). Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics* 84, 952–960.

Ligtenberg, M.J.L., Kuiper, R.P., Chan, T.L., Goossens, M., Hebeda, K.M., Voorendt, M., Lee, T.Y.H., Bodmer, D., Hoenselaar, E., Hendriks-Cornelissen, S.J.B., et al. (2009). Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat. Genet.* 41, 112–117.

Liu, W.-M., Pang, R.T.K., Chiu, P.C.N., Wong, B.P.C., Lao, K., Lee, K.-F., and Yeung, W.S.B. (2012). Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 490–494.

Lombó, M., Fernández-Díez, C., González-Rojo, S., Navarro, C., Robles, V., and Herráez, M.P. (2015). Transgenerational inheritance of heart disorders caused by paternal bisphenol A exposure. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 206, 667–678.

Lucifero, D., Mann, M.R.W., Bartolomei, M.S., and Trasler, J.M. (2004). Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum. Mol. Genet.* 13, 839–849.

MacKenna, A., Crosby, J., Huidobro, C., Correa, E., and Duque, G. (2017). Semen quality before cryopreservation and after thawing in 543 patients with testicular cancer. *JBRA Assist. Reprod.* 21, 31–34.

Magnúsdóttir, E., Dietmann, S., Murakami, K., Günesdogan, U., Tang, F., Bao, S., Diamanti, E., Lao, K., Gottgens, B., and Azim Surani, M. (2013). A tripartite transcription factor network regulates primordial germ cell specification in mice. *Nat. Cell Biol.* 15, 905–915.

Maher, E.R., Afnan, M., and Barratt, C.L. (2003). Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: epigenetics, imprinting, ART and icebergs? *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 18, 2508–2511.

Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., and Skinner, M.K. (2012). Dioxin (TCDD) induces epigenetic transgenerational inheritance of adult onset disease and sperm epimutations. *PLoS One* 7, e46249.

Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., and Skinner, M.K. (2013). Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PLoS One* 8, e55387.

Manikkam, M., Haque, M.M., Guerrero-Bosagna, C., Nilsson, E.E., and Skinner, M.K. (2014). Pesticide Methoxychlor Promotes the Epigenetic Transgenerational Inheritance of Adult-Onset Disease through the Female Germline. *PLoS ONE* 9, e102091.

Manzo, M., Wirz, J., Ambrosi, C., Villaseñor, R., Roschitzki, B., and Baubec, T. (2017). Isoform-specific localization of DNMT3A regulates DNA methylation fidelity at bivalent CpG islands. *EMBO J.* 36, 3421–3434.

Marques, C.J., Carvalho, F., Sousa, M., and Barros, A. (2004). Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet Lond. Engl.* 363, 1700–1702.

Marques, C.J., Costa, P., Vaz, B., Carvalho, F., Fernandes, S., Barros, A., and Sousa, M. (2008). Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol. Hum. Reprod.* 14, 67–74.

McGlynn, K.A., Devesa, S.S., Sigurdson, A.J., Brown, L.M., Tsao, L., and Tarone, R.E. (2003). Trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States. *Cancer* 97, 63–70.

Messerlian, C., Braun, J.M., Mínguez-Alarcón, L., Williams, P.L., Ford, J.B., Mustieles, V., Calafat, A.M., Souter, I., Toth, T., Hauser, R., et al. (2017). Paternal and maternal urinary phthalate metabolite concentrations and birth weight of singletons conceived by subfertile couples. *Environ. Int.* 107, 55–64.

Messerschmidt, D.M., Knowles, B.B., and Solter, D. (2014). DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev.* 28, 812–828.

Molaro, A., Hodges, E., Fang, F., Song, Q., McCombie, W.R., Hannon, G.J., and Smith, A.D. (2011). Sperm methylation profiles reveal features of epigenetic inheritance and evolution in primates. *Cell* 146, 1029–1041.

Monk, D. (2015). Germline-derived DNA methylation and early embryo epigenetic reprogramming: The selected survival of imprints. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*

Monk, D., Sanchez-Delgado, M., and Fisher, R. (2017). NLRPs, the subcortical maternal complex and genomic imprinting. *Reprod. Camb. Engl.* 154, R161–R170.

Montjean, D., Ravel, C., Benkhalifa, M., Cohen-Bacrie, P., Berthaut, I., Bashamboo, A., and

- McElreavey, K. (2013). Methylation changes in mature sperm deoxyribonucleic acid from oligozoospermic men: assessment of genetic variants and assisted reproductive technology outcome. *Fertil. Steril.* 100, 1241–1247.
- Montjean, D., Zini, A., Ravel, C., Belloc, S., Dalleac, A., Copin, H., Boyer, P., McElreavey, K., and Benkhalifa, M. (2015). Sperm global DNA methylation level: association with semen parameters and genome integrity. *Andrology* 3, 235–240.
- Moore-Morris, T., van Vliet, P.P., Andelfinger, G., and Puceat, M. (2018). Role of Epigenetics in Cardiac Development and Congenital Diseases. *Physiol. Rev.* 98, 2453–2475.
- Morgan, H.D., Sutherland, H.G., Martin, D.I., and Whitelaw, E. (1999). Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat. Genet.* 23, 314–318.
- Mustieles, V., Williams, P.L., Fernandez, M.F., Mínguez-Alarcón, L., Ford, J.B., Calafat, A.M., Hauser, R., Messerlian, C., and Environment and Reproductive Health (EARTH) Study Team (2018). Maternal and paternal preconception exposure to bisphenols and size at birth. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.*
- Nadeau, J.H. (2015). The nature of evidence for and against epigenetic inheritance. *Genome Biol.* 16.
- Nanassy, L., and Carrell, D.T. (2011). 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.* 95, 2310–2314.
- Netchine, I., Rossignol, S., Dufourg, M.-N., Azzi, S., Rousseau, A., Perin, L., Houang, M., Steunou, V., Esteva, B., Thibaud, N., et al. (2007). 11p15 imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 3148–3154.
- Ng, S.-F., Lin, R.C.Y., Laybutt, D.R., Barres, R., Owens, J.A., and Morris, M.J. (2010). Chronic high-fat diet in fathers programs β -cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 467, 963–966.
- Ng, S.-F., Lin, R.C.Y., Maloney, C.A., Youngson, N.A., Owens, J.A., and Morris, M.J. (2014). Paternal high-fat diet consumption induces common changes in the transcriptomes of retroperitoneal adipose and pancreatic islet tissues in female rat offspring. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28, 1830–1841.
- Nickkholgh, B., Mizrak, S.C., van Daalen, S.K.M., Korver, C.M., Sadri-Ardekani, H., Repping, S., and van Pelt, A.M.M. (2014). Genetic and epigenetic stability of human spermatogonial stem cells during long-term culture. *Fertil. Steril.* 102, 1700-1707.e1.
- Nilsson, E.E., Sadler-Riggelman, I., and Skinner, M.K. (2018). Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environ. Epigenetics* 4, dvy016.
- Oakes, C.C., La Salle, S., Smiraglia, D.J., Robaire, B., and Trasler, J.M. (2007). Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev. Biol.* 307, 368–379.
- Oosterhuis, J.W., and Looijenga, L.H.J. (2005). Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat. Rev. Cancer* 5, 210–222.
- Öst, A., Lempradl, A., Casas, E., Weigert, M., Tiko, T., Deniz, M., Pantano, L., Boenisch, U., Itskov, P.M., Stoeckius, M., et al. (2014). Paternal diet defines offspring chromatin state and intergenerational obesity. *Cell* 159, 1352–1364.
- Pacheco, S.E., Houseman, E.A., Christensen, B.C., Marsit, C.J., Kelsey, K.T., Sigman, M., and Boekelheide, K. (2011). Integrative DNA methylation and gene expression analyses identify DNA packaging and epigenetic regulatory genes associated with low motility sperm. *PloS One* 6, e20280.
- Palma-Gudiel, H., Córdova-Palomera, A., Eixarch, E., Deuschle, M., and Fañanás, L. (2015). Maternal psychosocial stress during pregnancy alters the epigenetic signature of the glucocorticoid receptor gene promoter in their offspring: a meta-analysis. *Epigenetics* 10, 893–902.
- Pandey, R.R., Mondal, T., Mohammad, F., Enroth, S., Redrup, L., Komorowski, J., Nagano, T.,

- Mancini-Dinardo, D., and Kanduri, C. (2008). Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol. Cell* 32, 232–246.
- Papaioannou, M.D., Pitetti, J.-L., Ro, S., Park, C., Aubry, F., Schaad, O., Vejnar, C.E., Kühne, F., Descombes, P., Zdobnov, E.M., et al. (2009). Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Dev. Biol.* 326, 250–259.
- Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Leleu, M., Sauer, S., Gregson, H.C., Jarmuz, A., Canzonetta, C., Webster, Z., Nesterova, T., et al. (2008). Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell* 132, 422–433.
- Parks, L.G., Ostby, J.S., Lambright, C.R., Abbott, B.D., Klinefelter, G.R., Barlow, N.J., and Gray, L.E. (2000). The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 58, 339–349.
- Pedrazzini, T. (2015). [In the heart of noncoding RNA: a long way to go]. *Med. Sci. MS* 31, 261–267.
- Pembrey, M.E., Bygren, L.O., Kaati, G., Edvinsson, S., Northstone, K., Sjöström, M., Golding, J., and ALSPAC Study Team (2006). Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 14, 159–166.
- Peng, H., Shi, J., Zhang, Y., Zhang, H., Liao, S., Li, W., Lei, L., Han, C., Ning, L., Cao, Y., et al. (2012). A novel class of tRNA-derived small RNAs extremely enriched in mature mouse sperm. *Cell Res.* 22, 1609–1612.
- Poplinski, A., Tüttelmann, F., Kanber, D., Horsthemke, B., and Gromoll, J. (2010). Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. *Int. J. Androl.* 33, 642–649.
- Proudhon, C., Duffié, R., Ajjan, S., Cowley, M., Iranzo, J., Carbajosa, G., Saadeh, H., Holland, M.L., Oakey, R.J., Rakan, V.K., et al. (2012). Protection against de novo methylation is instrumental in maintaining parent-of-origin methylation inherited from the gametes. *Mol. Cell* 47, 909–920.
- Purdue, M.P., Devesa, S.S., Sigurdson, A.J., and McGlynn, K.A. (2005). International patterns and trends in testis cancer incidence. *Int. J. Cancer* 115, 822–827.
- Quadrana, L., and Colot, V. (2016). Plant Transgenerational Epigenetics. *Annu. Rev. Genet.* 50, 467–491.
- Quenneville, S., Verde, G., Corsinotti, A., Kapopoulou, A., Jakobsson, J., Offner, S., Baglivo, I., Pedone, P.V., Grimaldi, G., Riccio, A., et al. (2011). In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Mol. Cell* 44, 361–372.
- Radford, E.J., Isganaitis, E., Jimenez-Chillaron, J., Schroeder, J., Molla, M., Andrews, S., Didier, N., Charalambous, M., McEwen, K., Marazzi, G., et al. (2012). An Unbiased Assessment of the Role of Imprinted Genes in an Intergenerational Model of Developmental Programming. *PLoS Genet.* 8, e1002605.
- Radford, E.J., Ito, M., Shi, H., Corish, J.A., Yamazawa, K., Isganaitis, E., Seisenberger, S., Hore, T.A., Reik, W., Erkek, S., et al. (2014). In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. *Science* 345, 1255903–1255903.
- Rajpert-De Meyts, E., Jørgensen, N., Brøndum-Nielsen, K., Müller, J., and Skakkebaek, N.E. (1998). Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 106, 198–204; discussion 204–206.
- Rajpert-De Meyts, E., Nielsen, J.E., Skakkebaek, N.E., and Almstrup, K. (2015). Diagnostic markers for germ cell neoplasms: from placental-like alkaline phosphatase to micro-RNAs. *Folia Histochem. Cytobiol.* 53, 177–188.
- Rakan, V.K., Chong, S., Champ, M.E., Cuthbert, P.C., Morgan, H.D., Luu, K.V.K., and Whitelaw, E. (2003). Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after

maternal and paternal transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2538–2543.

Rando, O.J., and Simmons, R.A. (2015). I'm eating for two: parental dietary effects on offspring metabolism. *Cell* 161, 93–105.

Rathke, C., Baarends, W.M., Awe, S., and Renkawitz-Pohl, R. (2014). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 155–168.

Redmon, J.B., Thomas, W., Ma, W., Drobnis, E.Z., Sparks, A., Wang, C., Brazil, C., Overstreet, J.W., Liu, F., Swan, S.H., et al. (2013). Semen parameters in fertile US men: the Study for Future Families. *Andrology* 1, 806–814.

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

Rodgers, A.B., Morgan, C.P., Leu, N.A., and Bale, T.L. (2015). Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 13699–13704.

Romero, Y., Calvel, P., and Nef, S. (2012). [Non-coding small RNAs and spermatogenesis]. *Med. Sci. MS* 28, 490–496.

Roseboom, T., de Rooij, S., and Painter, R. (2006). The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum. Dev.* 82, 485–491.

Rossignol, S., Steunou, V., Chalas, C., Kerjean, A., Rigolet, M., Viegas-Pequignot, E., Jouannet, P., Le Bouc, Y., and Gicquel, C. (2006). The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region. *J. Med. Genet.* 43, 902–907.

Sales, V.M., Ferguson-Smith, A.C., and Patti, M.-E. (2017). Epigenetic Mechanisms of Transmission of Metabolic Disease across Generations. *Cell Metab.* 25, 559–571.

Samans, B., Yang, Y., Krebs, S., Sarode, G.V., Blum, H., Reichenbach, M., Wolf, E., Steger, K., Dansranjav, T., and Schagdarsurengin, U. (2014). Uniformity of nucleosome preservation pattern in Mammalian sperm and its connection to repetitive DNA elements. *Dev. Cell* 30, 23–35.

Santi, D., De Vincentis, S., Magnani, E., and Spaggiari, G. (2017). Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: a meta-analytic study. *Andrology* 5, 695–703.

Santos-Rosa, H., and Caldas, C. (2005). Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 41, 2381–2402.

Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 296, 2176–2178.

Sato, A., Hiura, H., Okae, H., Miyauchi, N., Abe, Y., Utsunomiya, T., Yaegashi, N., and Arima, T. (2011a). Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation polymerase chain reaction Luminex analysis. *Fertil. Steril.* 95, 129–134, 134.e1-4.

Schulz, R., Proudhon, C., Bestor, T.H., Woodfine, K., Lin, C.-S., Lin, S.-P., Prissette, M., Oakey, R.J., and Bourc'his, D. (2010). The parental non-equivalence of imprinting control regions during mammalian development and evolution. *PLoS Genet.* 6, e1001214.

Schuster, A., Skinner, M.K., and Yan, W. (2016). Ancestral vinclozolin exposure alters the epigenetic transgenerational inheritance of sperm small noncoding RNAs. *Environ. Epigenetics* 2.

Seisenberger, S., Andrews, S., Krueger, F., Arand, J., Walter, J., Santos, F., Popp, C., Thienpont, B., Dean, W., and Reik, W. (2012). The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol. Cell* 48, 849–862.

Serrano, T., Chevrier, C., Multigner, L., Cordier, S., and Jégou, B. (2013). International geographic correlation study of the prevalence of disorders of male reproductive health. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 28, 1974–1986.

Sharif, J., Muto, M., Takebayashi, S., Suetake, I., Iwamatsu, A., Endo, T.A., Shinga, J., Mizutani-Koseki, Y., Toyoda, T., Okamura, K., et al. (2007). The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 450, 908–912.

Sharma, A. (2015). Transgenerational epigenetic inheritance requires a much deeper analysis. *Trends Mol. Med.* 21, 269–270.

Sharma, A. (2016). Transcriptomic data reanalysis allows for a contribution of embryonic transcriptional change-induced gene expression reprogramming in transgenerational epigenetic inheritance. *Environ. Epigenetics* 2, dvw009.

Sharpe, R.M., Rivas, A., Walker, M., McKinnell, C., and Fisher, J.S. (2003). Effect of neonatal treatment of rats with potent or weak (environmental) oestrogens, or with a GnRH antagonist, on Leydig cell development and function through puberty into adulthood. *Int. J. Androl.* 26, 26–36.

Shea, J.M., Serra, R.W., Carone, B.R., Shulha, H.P., Kucukural, A., Ziller, M.J., Vallaster, M.P., Gu, H., Tapper, A.R., Gardner, P.D., et al. (2015). Genetic and Epigenetic Variation, but Not Diet, Shape the Sperm Methylome. *Dev. Cell* 35, 750–758.

Shen, L., Inoue, A., He, J., Liu, Y., Lu, F., and Zhang, Y. (2014). Tet3 and DNA replication mediate demethylation of both the maternal and paternal genomes in mouse zygotes. *Cell Stem Cell* 15, 459–471.

Shirley, C.R., Hayashi, S., Mounsey, S., Yanagimachi, R., and Meistrich, M.L. (2004). Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol. Reprod.* 71, 1220–1229.

Shmela, M.E., and Gicquel, C.F. (2013). Human diseases versus mouse models: insights into the regulation of genomic imprinting at the human 11p15/mouse distal chromosome 7 region. *J. Med. Genet.* 50, 11–20.

Siklenka, K., Erkek, S., Godmann, M., Lambrot, R., McGraw, S., Lafleur, C., Cohen, T., Xia, J., Suderman, M., Hallett, M., et al. (2015). Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. *Science* 350, aab2006.

Sinclair, K.D., Young, L.E., Wilmut, I., and McEvoy, T.G. (2000). In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 15 Suppl 5, 68–86.

Sinclair, K.D., Lea, R.G., Rees, W.D., and Young, L.E. (2007). The developmental origins of health and disease: current theories and epigenetic mechanisms. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 64, 425–443.

Siomi, M.C., Sato, K., Pezic, D., and Aravin, A.A. (2011). PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 246–258.

Skakkebaek, N.E., Berthelsen, J.G., Giwercman, A., and Müller, J. (1987). Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int. J. Androl.* 10, 19–28.

Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., and Main, K.M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 16, 972–978.

Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G.M., Toppari, J., Andersson, A.-M., Eisenberg, M.L., Jensen, T.K., Jørgensen, N., Swan, S.H., Sapra, K.J., et al. (2016). Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol. Rev.* 96, 55–97.

Skinner, M.K., Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., Haque, M., and Nilsson, E.E. (2013). Ancestral dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) exposure promotes epigenetic transgenerational inheritance of obesity. *BMC Med.* 11.

- Skinner, M.K., Guerrero-Bosagna, C., and Haque, M.M. (2015). Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of sperm epimutations promote genetic mutations. *Epigenetics* 10, 762–771.
- Smallwood, S.A., Tomizawa, S.-I., Krueger, F., Ruf, N., Carli, N., Segonds-Pichon, A., Sato, S., Hata, K., Andrews, S.R., and Kelsey, G. (2011). Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat. Genet.* 43, 811–814.
- Smith, Z.D., and Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 14, 204–220.
- Soejima, H., and Higashimoto, K. (2013). Epigenetic and genetic alterations of the imprinting disorder Beckwith–Wiedemann syndrome and related disorders. *J. Hum. Genet.* 58, 402–409.
- Song, R., Hennig, G.W., Wu, Q., Jose, C., Zheng, H., and Yan, W. (2011). Male germ cells express abundant endogenous siRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13159–13164.
- Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M., and Steger, K. (2002). Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* 34, 384–390.
- Sonne, S.B., Almstrup, K., Dalgaard, M., Juncker, A.S., Edsgard, D., Ruban, L., Harrison, N.J., Schwager, C., Abdollahi, A., Huber, P.E., et al. (2009a). Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. *Cancer Res.* 69, 5241–5250.
- Soubry, A. (2018). POHaD: why we should study future fathers. *Environ. Epigenetics* 4, dvy007.
- Soubry, A., Verbeke, G., and Hoyo, C. (2014). Do early paternal exposures to lifestyle factors such as smoking increase the risk of chronic diseases in the offspring? *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 22, 1341–1342.
- Soubry, A., Guo, L., Huang, Z., Hoyo, C., Romanus, S., Price, T., and Murphy, S.K. (2016). Obesity-related DNA methylation at imprinted genes in human sperm: Results from the TIEGER study. *Clin. Epigenetics* 8, 51.
- Soubry, A., Hoyo, C., Butt, C.M., Fieuws, S., Price, T.M., Murphy, S.K., and Stapleton, H.M. (2017). Human exposure to flame-retardants is associated with aberrant DNA methylation at imprinted genes in sperm. *Environ. Epigenetics* 3, dvx003.
- Sperger, J.M., Chen, X., Draper, J.S., Antosiewicz, J.E., Chon, C.H., Jones, S.B., Brooks, J.D., Andrews, P.W., Brown, P.O., and Thomson, J.A. (2003). Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13350–13355.
- Stouder, C., and Paoloni-Giacobino, A. (2011). Specific transgenerational imprinting effects of the endocrine disruptor methoxychlor on male gametes. *Reprod. Camb. Engl.* 141, 207–216.
- Surani, M.A., Barton, S.C., and Norris, M.L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308, 548–550.
- Suter, C.M., Martin, D.I.K., and Ward, R.L. (2004). Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat. Genet.* 36, 497–501.
- Swan, S.H., Elkin, E.P., and Fenster, L. (2000). The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934–1996. *Environ. Health Perspect.* 108, 961–966.
- Swan, S.H., Brazil, C., Drobnis, E.Z., Liu, F., Kruse, R.L., Hatch, M., Redmon, J.B., Wang, C., Overstreet, J.W., and Study For Future Families Research Group (2003). Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ. Health Perspect.* 111, 414–420.
- Sweeney, M.F., Hasan, N., Soto, A.M., and Sonnenschein, C. (2015). Environmental endocrine disruptors: Effects on the human male reproductive system. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 16, 341–357.
- Szabó, P.E. (2016). Response to “Variable directionality of gene expression changes across generations does not constitute negative evidence of epigenetic inheritance” Sharma, A.

Environmental Epigenetics, 2015, 1-5. *Genome Biol.* 17, 105.

Tang, W.W.C., Dietmann, S., Irie, N., Leitch, H.G., Floros, V.I., Bradshaw, C.R., Hackett, J.A., Chinnery, P.F., and Surani, M.A. (2015). A Unique Gene Regulatory Network Resets the Human Germline Epigenome for Development. *Cell* 161, 1453–1467.

Tillo, D., Mukherjee, S., and Vinson, C. (2016). Inheritance of Cytosine Methylation: INHERITANCE OF CYTOSINE METHYLATION. *J. Cell. Physiol.* 231, 2346–2352.

Tobi, E.W., Lumey, L.H., Talens, R.P., Kremer, D., Putter, H., Stein, A.D., Slagboom, P.E., and Heijmans, B.T. (2009). DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4046–4053.

Torregrosa, N., Domínguez-Fandos, D., Camejo, M.I., Shirley, C.R., Meistrich, M.L., Ballescà, J.L., and Oliva, R. (2006). Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 21, 2084–2089.

Tracey, R., Manikkam, M., Guerrero-Bosagna, C., and Skinner, M.K. (2013). Hydrocarbons (jet fuel JP-8) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 36, 104–116.

Trasler, J.M. (2009). Epigenetics in spermatogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 306, 33–36.

Urduingio, R.G., Bayón, G.F., Dmitrijeva, M., Toraño, E.G., Bravo, C., Fraga, M.F., Bassas, L., Larriba, S., and Fernández, A.F. (2015). Aberrant DNA methylation patterns of spermatozoa in men with unexplained infertility. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 30, 1014–1028.

Veenendaal, M.V.E., Painter, R.C., de Rooij, S.R., Bossuyt, P.M.M., van der Post, J. a. M., Gluckman, P.D., Hanson, M.A., and Roseboom, T.J. (2013). Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 120, 548–553.

Verma, M., Rogers, S., Divi, R.L., Schully, S.D., Nelson, S., Joseph Su, L., Ross, S.A., Pilch, S., Winn, D.M., and Khoury, M.J. (2014). Epigenetic research in cancer epidemiology: trends, opportunities, and challenges. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 23, 223–233.

de Waal, E., Yamazaki, Y., Ingale, P., Bartolomei, M., Yanagimachi, R., and McCarrey, J.R. (2012). Primary epimutations introduced during intracytoplasmic sperm injection (ICSI) are corrected by germline-specific epigenetic reprogramming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 4163–4168.

Wan, L.-B., and Bartolomei, M.S. (2008). Regulation of imprinting in clusters: noncoding RNAs versus insulators. *Adv. Genet.* 61, 207–223.

Wang, H., Maurano, M.T., Qu, H., Varley, K.E., Gertz, J., Pauli, F., Lee, K., Canfield, T., Weaver, M., Sandstrom, R., et al. (2012). Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome Res.* 22, 1680–1688.

Ward, W.S. (2010). Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 30–36.

Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., et al. (2008). Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* 453, 539–543.

Waterland, R.A., and Jirtle, R.L. (2003). Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5293–5300.

Wei, Y., Schatten, H., and Sun, Q.-Y. (2015). Environmental epigenetic inheritance through gametes and implications for human reproduction. *Hum. Reprod. Update* 21, 194–208.

Welsh, M., Saunders, P.T.K., Fiskin, M., Scott, H.M., Hutchison, G.R., Smith, L.B., and Sharpe, R.M. (2008). Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J. Clin. Invest.* 118, 1479–1490.

- van de Werken, C., van der Heijden, G.W., Eleveld, C., Teeuwssen, M., Albert, M., Baarends, W.M., Laven, J.S.E., Peters, A.H.F.M., and Baart, E.B. (2014). Paternal heterochromatin formation in human embryos is H3K9/HP1 directed and primed by sperm-derived histone modifications. *Nat. Commun.* 5, 5868.
- Wermann, H., Stoop, H., Gillis, A.J.M., Honecker, F., van Gurp, R.J.H.L.M., Ammerpohl, O., Richter, J., Oosterhuis, J.W., Bokemeyer, C., and Looijenga, L.H.J. (2010). Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance. *J. Pathol.* 221, 433–442.
- Wilkins, J.F., Úbeda, F., and Van Cleve, J. (2016). The evolving landscape of imprinted genes in humans and mice: Conflict among alleles, genes, tissues, and kin. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 38, 482–489.
- Williams, K., McKinnell, C., Saunders, P.T., Walker, M., Fisher, J.S., Turner, K.J., Atanassova, N., and Sharpe, M. (2001). Neonatal exposure to potent and environmental oestrogens and abnormalities of the male reproductive system in the rat: evidence for importance of the androgen-oestrogen balance and assessment of the relevance to man. *Hum. Reprod. Update* 7, 236–247.
- Williamson, S.R., Delahunt, B., Magi-Galluzzi, C., Algaba, F., Egevad, L., Ulbright, T.M., Tickoo, S.K., Srigley, J.R., Epstein, J.I., Berney, D.M., et al. (2017). The World Health Organization 2016 classification of testicular germ cell tumours: a review and update from the International Society of Urological Pathology Testis Consultation Panel. *Histopathology* 70, 335–346.
- Woodcock, C.L. (2006). Chromatin architecture. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 213–220.
- Wu, H., Estill, M.S., Shershebnnev, A., Suvorov, A., Krawetz, S.A., Whitcomb, B.W., Dinnie, H., Rahil, T., Sites, C.K., and Pilsner, J.R. (2017). Preconception urinary phthalate concentrations and sperm DNA methylation profiles among men undergoing IVF treatment: a cross-sectional study. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 32, 2159–2169.
- Wu, L., Lu, Y., Jiao, Y., Liu, B., Li, S., Li, Y., Xing, F., Chen, D., Liu, X., Zhao, J., et al. (2016). Paternal Psychological Stress Reprograms Hepatic Gluconeogenesis in Offspring. *Cell Metab.* 23, 735–743.
- Wu, W., Shen, O., Qin, Y., Niu, X., Lu, C., Xia, Y., Song, L., Wang, S., and Wang, X. (2010). Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant promoter methylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *PLoS One* 5, e13884.
- Yamada, Y., and Yamada, Y. (2018). The causal relationship between epigenetic abnormality and cancer development: in vivo reprogramming and its future application. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 94, 235–247.
- Yamanaka, K.-I., Yamashita, K., Khatun, H., Wada, Y., Tatemoto, H., Sakatani, M., Takenouchi, N., Takahashi, M., and Watanabe, S. (2018). Normal DNA methylation status in sperm from a somatic cell cloned bull and their fertilized embryos. *Anim. Sci. J. Nihon Chikusan Gakkaiho* 89, 1406–1414.
- Yauk, C., Polyzos, A., Rowan-Carroll, A., Somers, C.M., Godschalk, R.W., Van Schooten, F.J., Berndt, M.L., Pogribny, I.P., Koturbash, I., Williams, A., et al. (2008). Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 605–610.
- Yu, Z., Raabe, T., and Hecht, N.B. (2005). MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biol. Reprod.* 73, 427–433.
- Yuan, S., Tang, C., Zhang, Y., Wu, J., Bao, J., Zheng, H., Xu, C., and Yan, W. (2015). mir-34b/c and mir-449a/b/c are required for spermatogenesis, but not for the first cleavage division in mice. *Biol. Open* 4, 212–223.
- Zeilinger, S., Kühnel, B., Klopp, N., Baurecht, H., Kleinschmidt, A., Gieger, C., Weidinger, S., Lattka, E., Adamski, J., Peters, A., et al. (2013). Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. *PLoS One* 8, e63812.

Zhang, L., Liu, Z., Li, X., Zhang, P., Wang, J., Zhu, D., Chen, X., and Ye, L. (2015). Low long non-coding RNA HOTAIR expression is associated with down-regulation of Nrf2 in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia or oligoasthenozoospermia. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 14198–14205.

Zhao, Y., and Garcia, B.A. (2015). Comprehensive Catalog of Currently Documented Histone Modifications. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a025064.

Znaor, A., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., and Bray, F. (2014). International variations and trends in testicular cancer incidence and mortality. *Eur. Urol.* 65, 1095–1106.

ANNEXE

Liste des publications

- **Bruno C**, Blagoskonov O, Barberet J, Guilleman M, Daniel S, Tournier B, Binquet C, Choux C, Fauque P. Sperm imprinting integrity in seminoma patients? Clinical epigenetic 2018 sept; sous presse.
- Blagosklonov O et **Bruno C**. Devenir des embryons congelés en France. La revue du praticien 2018 Sept ;68(7) 713-715.
- C Choux, C Binquet, V Carmignac, **C Bruno**, C Chapusot, J Barberet, M Lamotte, P Sagot, D Bourc'his, P Fauque. The epigenetic control of transposable elements and imprinted genes in newborns is affected by the mode of conception: ART versus spontaneous conception without underlying infertility. Human Reproduction 2018 Feb 1;33(2):331-340.
- Barberet J, Chammas J, **Bruno C**, Fauque P: Randomized controlled trial comparing embryo culture in two incubator systems: G185 K-System vs. Embryoscope. Fertil Steril 2018 Feb;109(2):302-309.
- Choux C, Barberet J, Ginod P, Cottenet J, **Bruno C**, Benzénine E, Sagot S, Fauque P. Severe ovarian hyperstimulation syndrome modifies early maternal serum beta-hCG kinetics but obstetrical and neonatal outcomes are not impacted. Fertil Steril. 2017 ; 108:650-658.
- Desch L, **Bruno C**, Luu M, Barberet J, Choux C, Lamotte M, Schmutz E, Sagot P, Fauque P. Embryo multinucleation at the 2-cell stage is an independent predictor of ICSI outcomes. Fertil Steril. 2017 Jan;107(1):97-103.
- Carmignac V, Dupont J-M, Reyna C, Barberet J, **Bruno C.**, Desch L, Lieury N, Dulioust E, Auger J, Fauque P: Diagnostic genetic screening for ART patients with macrozoospermia. Andrology. 2017 Mar;5(2):370-380.
- **Bruno C**, Dudkiewicz-Sibony C, Berthaut I, Weil E, Brunet L, Fortier C, Pfeffer J, Ravel C, Fauque P, Mathieu E, Antoine JM, Kotti S, Mandelbaum J. Survey of 243 ART patients having made a final disposition decision about their surplus cryopreserved embryos: the crucial role of symbolic embryo representation. Human Reprod, 2016 Jul;31(7):1508-14.
- **Bruno C** et Mandelbaum J. « L'accueil d'embryons en France ». Chapitre 4 de « Procréation Médecine et don » Deuxième édition - éditions Lavoisier 2016.
- Bouillon C, Léandri R, Desch L, Ernst A, **Bruno C**, Cerf C, Chiron A, Souchay C, Burguet A, Jimenez C, Sagot P, Fauque P. Does Embryo Culture Medium Influence the Health and Development of Children Born after In Vitro Fertilization? PLoS One. 2016 Mar 23;11.
- **Bruno C**, Carmignac V, Netchine I, Choux C, Duffourd Y, Faivre L, Thauvin-Robinet C, Le Bouc Y, Sagot P, Bourc'his D, Fauque P. Germline correction of an epimutation related to Silver-Russell syndrome. Hum Mol Genet. 2015 Jun 15;24(12):3314-21.
- Choux C, Carmignac V, **Bruno C**, Sagot P, Vaiman D, Fauque P. The placenta: phenotypic and epigenetic modifications induced by Assisted Reproductive Technologies throughout pregnancy. Clin Epigenetics. 2015 Aug 21;7(1):87
- Desch L, Bruno C, Herbemont C, Michel F, Bechoua S, Girod S, Sagot P, Fauque P. Impact on ICSI outcomes of adding 24 h of in vitro culture before testicular sperm freezing: a retrospective study. Basic Clin Androl. 2015 Jun 9;25:6.
- Reis e Silva AR, **Bruno C**, Fleurot R, Daniel N, Archilla C, Peynot N, Lucci CM, Beaujean N, Duranthon V. Alteration of DNA demethylation dynamics by in vitro culture conditions in rabbit pre-implantation embryos. Epigenetics. 2012 May;7(5):440-6.

Etudes des mécanismes de transmission de dérégulations épigénétiques : Analyse de la transmission spermatique chez l'homme

Résumé

Les notions selon lesquelles l'exposition environnementale peut être mémorisée et puisse dans des conditions défavorables favoriser l'apparition d'épimutations soulèvent la question d'une possible transmission transgénérationnelle chez l'Homme lorsque les gamètes sont atteints.

Afin de répondre à la question du risque de transmission de dérégulation épigénétique (épimutation) chez l'Homme, nous l'avons abordé selon deux axes. Le premier nous a permis d'évaluer le risque de transmission intergénérationnelle chez un patient présentant un syndrome de Silver-Russell (SRS) et nous avons pu démontrer pour la première fois l'efficacité de la reprogrammation épigénétique chez l'Homme pour des régions soumises à empreinte : disparition du défaut de méthylation du locus *H19/IGF2* causal dans les gamètes du patient ainsi qu'une absence de transmission à sa descendance. Le second nous a conduit à dépister la présence d'épimutations spermatiques à partir de deux modèles : 1/ de pères d'enfants atteints de pathologies liées à l'empreinte parentale et 2/ de patients atteints de cancer testiculaire. Dans les 2 cas, l'analyse par pyroséquençage de leurs spermatozoïdes n'a pas mis en évidence de défaut d'empreinte. Néanmoins, nous avons retrouvé une association entre oligozoospermie et défaut d'empreinte spermatique.

Le principal défi des études à venir est d'identifier les mécanismes intervenant dans l'apparition de ces épimutations. Les principales pistes convergent vers les petits ARNs non codants ou certaines régions de l'ADN dont les marques épigénétiques pourraient (au moins partiellement) échapper aux contrôles mis en place lors des phases successives de reprogrammation épigénétique.

Mots clés : Epimutation, Spermatozoïde, Transmission transgénérationnelle, Méthylation de l'ADN, Cancer testiculaire : séminome

Mechanisms involved in the transmission of epigenetic deregulation: Analyses of transmission in human sperm

Abstract

The notion that environmental exposure can be memorized and promote epimutation (defined as defects on DNA methylation) raises the question of possible epigenetic transgenerational transmission in humans. To address whether an epimutation could be transmitted in humans, we pursued two axes. First, the evaluation of intergenerational transmission in the family of a Silver-Russell patient has shown, for the first time, the efficiency of epigenetic reprogramming in humans, specifically on imprinted regions. Indeed, no imprinted defect on causal *H19/IGF2* locus was detected in the patient's spermatozoa or in the DNA of his daughter. The second axis was to assess the presence of sperm epimutations 1/ from fathers of children diagnosed with imprinted syndromes and 2/ from men presenting testicular seminoma. Pyrosequencing analyses on imprinted genes did not reveal any alteration of sperm DNA methylation, though we confirmed an association between oligozoospermia and sperm imprinting defects.

The next step will be to identify the mechanisms involved in the origin of the sperm epimutation. The main hypotheses converge to small non-coding RNAs or certain DNA regions which escape to controls setting up (at least partially) at the time of epigenetic reprogramming.

Keywords: Epimutation, Spermatozoa, epigenetic transgenerational transmission, DNA methylation, testicular cancer, seminoma