



**HAL**  
open science

# Etude de l'épigénétique du spermatozoïde chez les poissons : risques induits par la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN

Marina El Kamouh

► **To cite this version:**

Marina El Kamouh. Etude de l'épigénétique du spermatozoïde chez les poissons : risques induits par la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN. Biologie cellulaire. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENB042 . tel-04419333

**HAL Id: tel-04419333**

**<https://theses.hal.science/tel-04419333>**

Submitted on 26 Jan 2024

**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.

# Thèse de doctorat de

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637

*Sciences de la Vie et de la Santé*

*Spécialité : Biologie cellulaire, Biologie du développement*

Par

**Marina EL KAMOUH**

**Etude de l'épigénétique du spermatozoïde chez les poissons : risques induits par la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN**

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 25/10/2023

Unité de recherche : INRAE UR 1037 Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons

## Rapporteurs avant soutenance :

Hervé ACLOQUE      Chargé de recherche, GABI INRAE  
Samuel BUFF        Professeur, VetAgro Sup

## Composition du Jury :

Président :	Samuel BUFF	Professeur, VetAgro Sup
Examineurs :	Samuel BUFF	Professeur, VetAgro Sup
	Anaïs VITORINO CARVALHO	Chargée de recherche, PRC INRAE
	Bertrand PAIN	Directeur de recherche, SBRI INSERM-INRAE
	Vincent COUSTHAM	Chargé de recherche, NuMeA INRAE
Dir. de thèse :	Catherine LABBE	Directrice de recherche, LPGP INRAE
Co-encad. de thèse :	Audrey LAURENT	Chargée de recherche, LPGP INRAE

## Invités

Antoine ROLLAND      Maître de conférence, Université Rennes I  
Hervé ACLOQUE        Chargé de recherche, GABI INRAE



# Remerciements

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à **Mr Hervé Acloque** et **Mr Samuel Buff** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, **Mme Anaïs Vitorino Carvalho**, **Mr Bertrand Pain** et **Mr Vincent Coustham** d'être examinateurs et **Mr Antoine Rolland** d'être invité. Je vous remercie d'avoir accepté de consacrer votre temps et votre expertise à évaluer mon travail de recherche. Votre présence dans ce jury et votre engagement envers ce processus ont été d'une valeur inestimable pour moi.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse **Mme Catherine Labbé**. Vos conseils avisés, votre disponibilité, vos discussions enrichissantes et vos encouragements constants ont été d'une importance majeure pour ma progression. Merci pour la confiance que vous m'avez témoignée et pour votre rôle déterminant dans la réalisation de ce projet. Je vous remercie également pour les opportunités que vous m'avez données notamment la participation au parcours EIR-A et au congrès. Je vous suis reconnaissante pour votre bienveillance et pour m'avoir permis de grandir académiquement et personnellement.

Je remercie aussi tout spécialement ma co-directrice de thèse **Mme Audrey Laurent**. Vos compétences, votre engagement et votre rigueur ont été des atouts essentiels dans la progression de mes recherches. Vos conseils pertinents et vos remarques constructives ont été d'une grande aide pour améliorer la qualité de ma thèse. Je vous adresse mes sincères remerciements pour votre collaboration précieuse.

Je remercie sincèrement les membres de mon comité de thèse : **Mr Antoine Rolland**, **Mr Vincent Coustham**, **Mr Jean-Jacques Lareyre** et **mes directrices de thèse**. Votre expertise et votre implication ont été essentielles dans l'amélioration de cette thèse. Vos commentaires et vos évaluations rigoureuses ont été une source précieuse pour enrichir ma réflexion et pour approfondir mes analyses. Je vous adresse mes plus sincères remerciements pour votre soutien tout au long de ce parcours académique.

Je remercie également mes collègues des installations expérimentales notamment **Amélie Patinote**, qui est maintenant en reconversion professionnelle, et **Cécile Duret** d'avoir pris soin des truites afin de pouvoir réaliser mon projet. Merci d'avoir aussi été toujours disponible pour préparer les salles d'incubation pour les expérimentations des tests en fécondance.

Je remercie **Aurélien Brionne** de m'avoir formé et énormément aidé dans les analyses bio-informatiques. Je tiens aussi à remercier **Charlène Labesse** pour son immense aide dans les expérimentations durant ma dernière année de thèse et d'avoir passé de bons moments ensemble en tant que collègue de bureau. Je remercie aussi **Anne-Sophie Goupil** de m'avoir aidé dans les expérimentations et d'avoir répondu à mes questions quand j'en avais besoin surtout au début de ma thèse. Je tiens à remercier chaleureusement **Aline Perquis** de m'avoir donné des astuces dans les expérimentations en début de ma thèse, de m'avoir soutenu durant ce parcours et d'avoir passé de bons moments ensemble. Je remercie aussi l'étudiante en master 2 **Maria Mafalda Almeida** de m'avoir aidé dans des expérimentations quand j'en avais besoin.

Merci à mes collègues de l'équipe MaRé, **Nathalie Chenais et Pierre-Yves Le Bail ainsi que les autres membres déjà évoqués**, pour tous les bons moments que nous avons pu passer ensemble en tant qu'équipe et pour toutes les discussions constructives suite à mes présentations en réunion d'équipe.

Je remercie aussi mes collègues des autres équipes avec qui j'ai pu discuter autour d'un café, à midi ou suite à mes présentations orales.

Je souhaite également remercier **Emilie Penvern, Guylène Roudaut, Patricia Dubois et Nathalie Huet** pour l'appui administratif apporté au cours de ma thèse.

I am deeply thankful to **Pr. Oliana Carnevali** for accepting me into their research group during my internship. Their passion for scientific inquiry and their willingness to share knowledge have been fundamental in my growth as a researcher. Additionally, I would like to thank **Dr. Marta Lombo** and **Christian Giommi** for their invaluable tutoring. I am also appreciative of the warm hospitality shown by **Pr Carnevali and the team** during my stay at Univpm which made my research experience even more enriching and memorable.

Je remercie également la « team jeune » du labo, **Constance Merdrignac, Maxime Goguet, Sarah Janati-Idrissi, Sully Mak, Valentine Goffette** ainsi que les autres doctorants qui ont déjà soutenu leur thèse ou les étudiants avec qui j'ai pu aussi partager le bureau, **Océane Amichaud, Manon Lesage, Aude Kleiber, Antoine Clément, Lucas Genève, Emilien Segret**. Merci pour tous les bons moments qu'on a pu partager ensemble à midi, durant les pauses café ou même en dehors du labo (brunch libanais, brésilien, crêpe, etc) !!

Merci à toute personne du laboratoire qui m'a aidée de près ou de loin.

Merci à mes meilleur(e)s ami(e)s et ami(e)s, notamment **Myriam Nader, Marie-Josée Bou Eid, Tonia Dargham, Rima Souki, Violette Sfeir, Rami Daccache, Isaac Kaddouh, Charbel Touma, Joelle Semaan, Marie-Josée Saleh Afif, Nancy Maalouf, Moura Abboud, Tania Al Hajj, et Josephine Faddoul**. Merci pour votre amitié, votre soutien et votre encouragement ! Chacun(e) d'entre vous a contribué d'une façon ou d'une autre à l'accomplissement de cette thèse ! Merci pour tous les bons moments et souvenirs !

Merci à mon copain **Alexandre Zada**. Je tiens à t'adresser un remerciement tout particulier. Ta présence, ton soutien et ton amour inconditionnel ont été des piliers essentiels dans la réalisation de cette thèse !

Pour finir, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers ma famille : **Maman Silva, Papa Antoine, mon frère Bakhos et ma sœur Bernadette**. Merci pour votre soutien, votre amour inconditionnel et votre encouragement constant ! C'est grâce à ces éléments déterminants que j'ai pu réaliser cette thèse. Merci d'avoir été à mes côtés à chaque étape ! Je vous adresse mes plus sincères remerciements pour tout ce que vous avez fait pour moi.

« La persévérance vient à bout de tout »



# Table des matières

Remerciements .....	3
Glossaire .....	9
Partie I : Introduction .....	12
1. Positionnement du sujet .....	13
2. Synthèse bibliographique.....	14
2.1 Méthylation de l'ADN, une marque épigénétique majeure .....	14
2.2 Principes, contraintes et usages de la cryoconservation .....	35
2.3 Spécificités des spermatozoïdes de poissons .....	45
3. Objectifs de la thèse et stratégie expérimentale retenue .....	53
Partie II : Matériel et méthodes .....	55
1. Collecte du sperme et procédure de cryoconservation.....	56
2. Analyse de la qualité cellulaire du sperme décongelé.....	58
2.1 Qualité des membranes.....	58
2.2 Qualité des mitochondries.....	59
2.3 Motilité.....	61
2.4 Capacité de fécondance.....	62
2.5 Analyse statistique des données de qualité du sperme .....	63
3. Analyse de la méthylation de l'ADN.....	64
3.1 Extraction de l'ADN.....	64
3.2 Procédure du RRBS .....	65
3.3 Traitement des données de séquençage .....	68
Partie III : Résultats.....	72
1. Qualité cellulaire du sperme décongelé .....	73
1.1 Qualité membranaire.....	73
1.2 Qualité des mitochondries.....	74
1.3 Motilité.....	87
1.4 Capacité de fécondance du sperme décongelé.....	94
2. Analyse de la méthylation de l'ADN par le RRBS : forces et faiblesses.....	102
3. Méthylation de l'ADN en réponse à la cryoconservation .....	130
3.1 Validation des données de séquençage des échantillons issus de cryoconservation	130
3.2 Analyse de l'effet de la cryoconservation.....	132

3.3 Lien entre la méthylation de l'ADN et la qualité cellulaire du sperme décongelé  
145

Partie IV : Discussion Générale .....	150
Références bibliographiques.....	160
Annexes .....	178
Annexe 1 : Publication N° 2 .....	179
Annexe 2 : Communications orales.....	193
Annexe 3 : Séjour en Italie .....	195
Annexe 4 : Fiche protocole.....	197

# Glossaire

5-caC :5-carboxylcytosine

5-fC : 5-formylcytosine

5-mC : 5-méthylcytosine

5-hmC : 5-hydroxyméthylcytosine

ATAC-seq : assay for transposase-accessible chromatin with sequencing, méthode visant à déterminer l'accessibilité à la chromatine tout au long du génome en séquençant les régions ouvertes de la chromatine.

ART : technique de reproduction assistée

BAM : Binary Alignment/Map : format de fichiers comprenant une version compacte et indexée des données pour représenter les séquences de nucléotides.

BER : base excision-repair

BPA : bisphénol A

CASA : Computer Assisted Sperm Analysis

CCCP : carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, agent découplant de la chaîne de transport des électrons

DMA : diméthyl acétamide

DMC : cytosine différenciellement méthylée

DMF : diméthyl formamide

DMR : région différenciellement méthylée

DMSO : diméthylsulfoxyde

DNMTs : méthyltransférases de l'ADN

DSS : Dispersion shrinkage for sequencing data : package, du logiciel statistique R, permettant d'étudier le différentiel de méthylation de l'ADN

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay, technique de dosage basée sur la reconnaissance des molécules à doser par un anticorps.

HA : acide hyaluronique

HATs : histones acétyl transférases

HDACs : histones déacétylases

HDMs : histones déméthylases

HES : hydroxyéthylamidon

HMTs : histones méthylases

HPLC : High-performance liquid chromatography

JC-1 : 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide, fluorochrome utilisé pour l'analyse du potentiel membranaire mitochondrial.

IP : iodure de propidium

lincRNAs : longs intergéniques ARNs non codants

lncARNs : long ARNs non codants

LUMA : Luminometric assay, technique de dosage global du niveau de méthylation des sites génomiques CCGG.

MBD : methyl binding domain : domaine de liaison à la méthyl-CpG

MBD-Seq : methyl binding domain sequencing, méthode qui consiste à l'identification et la liaison aux sites CpGs méthylés grâce au domaine MBD de la protéine MBP, suivie d'un séquençage

MBP: methyl CpG binding protein

MBT : stade de la transition mid blastula

MeDIP-Seq : methylated DNA immuno precipitation, méthode qui consiste en une immunoprécipitation de régions génomiques contenant la 5-mC par un anticorps anti 5-mC, suivie d'un séquençage

MeHg : méthylmercure

MeOH : méthanol

miARN : microARNs

MSP : methylation specific PCR : PCR méthylation-spécifique

ncARN : ARN non codants

OT : Original Top, brin 5'-3' sens d'une séquence à analyser

OB : Original Bottom, brin 5'-3' antisens d'une séquence à analyser

PG : propylène glycol

piARN : ARN interagissant avec PIWI

PPi : pyrophosphate inorganique

PVP : polyvinylpyrrolidone

qMSP : quantitative methylation specific PCR : PCR méthylation-spécifique quantitative

read : séquence (lecture) obtenue à l'issue du séquençage d'un fragment d'ADN (insert) hybridé et amplifié sur la Flow Cell

raw read : read brut avant les corrections apportées lors des premières étapes de contrôle qualité (élimination des bases de mauvaise qualité, des reads trop courts etc.)

RRBS : reduced representation bisulfite sequencing, technique d'analyse de la méthylation de l'ADN sur une fraction réduite du génome.

RR genome : reduced representation genome, le nombre de bases obtenue suite à la digestion du génome *in silico* par une enzyme de restriction (ici MspI) et sélection des fragments théoriques produits.

SAM : S-adénosyl-L-méthionine

SAH : S-adénosylcystéine

SFMM : Seminal Fluid-like Mineral Medium, milieu utilisé pour la dilution et la conservation à l'état immobile des spermatozoïdes de truite arc-en-ciel et de poisson rouge.

siARN : ARN interférents courts

SNPs : single nucleotide polymorphisms

SNBPs: protéines basiques spécifiques au sperme

TDG : thymine DNA glycosylase

TET : ten-eleven translocation

VAP : average path velocity

WGBS : whole genome bisulfite sequencing, méthode d'analyse de la méthylation de l'ADN du génome en entier

ZGA : activation du génome zygotique

# Partie I : Introduction

# 1. Positionnement du sujet

La cryoconservation du sperme est une biotechnologie très utilisée en pisciculture, car elle contribue à sécuriser les programmes de sélection génétique et elle commence à être utilisée pour optimiser la gestion des mâles. Cependant, il n'existe que très peu d'études qui évaluent son innocuité vis-à-vis de l'intégrité phénotypique de la descendance, ce qui pose la question de la pérennité des collections de sperme actuellement stockées en cryobanque, ou celle des collections de sperme à venir.

Quelques études ont montré que la cryoconservation peut modifier les marques épigénétiques, notamment la méthylation de l'ADN, du sperme de poissons (Depincé et al, 2019 ; Herranz-Jusdado et al, 2019). Or il a été proposé dans le spermatozoïde de poisson zèbre que le profil de méthylation de l'ADN de certaines régions du génome est transmis à l'embryon et qu'il serait important pour orchestrer la séquence d'expression des gènes dans l'embryon précoce (Jiang et al, 2013 ; Potok et al, 2013). Cette importance du profil épigénétique du spermatozoïde pour la descendance prend un sens majeur lorsqu'on utilise une biotechnologie, la cryoconservation, qui peut altérer ce profil. Pour autant, les informations publiées sur les altérations liées à la cryoconservation restent globales et les sites affectés ne sont pas décrits. De plus, aucune donnée n'est à ce jour disponible chez la truite arc-en-ciel, espèce ayant une importante représentation de son sperme congelé dans la cryobanque nationale française.

Ainsi, l'objectif de cette thèse était d'étudier l'impact de la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes chez la truite arc-en-ciel afin de déterminer s'il y a un risque de transmission d'une altération à la descendance.

Afin de comprendre les divers enjeux scientifiques de cette thèse, une synthèse bibliographique abordera, dans un premier chapitre, les bases de la méthylation de l'ADN. Un second chapitre abordera les principes, contraintes et usages de la cryoconservation. Les spécificités des spermatozoïdes de poissons seront présentées dans un troisième chapitre. Suite à cette étude bibliographique, nous nous pencherons sur les questions scientifiques de la thèse et les stratégies expérimentales choisies seront expliquées. Une deuxième partie de la thèse présentera les méthodes employées lors des expérimentations. Elle sera suivie d'une troisième partie contenant les trois chapitres expérimentaux de la thèse. Une discussion générale permettra d'examiner les principales réalisations et de présenter les perspectives.

## 2. Synthèse bibliographique

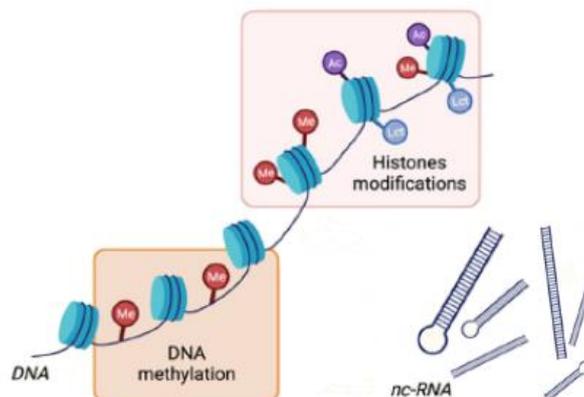
### 2.1 Méthylation de l'ADN, une marque épigénétique majeure

La méthylation de l'ADN est un des principaux acteurs de l'épigénétique. Elle est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques essentielles pour un fonctionnement et développement normal d'un individu. Elle peut être mesurée par différentes méthodes donnant des informations à différentes échelles. C'est une marque épigénétique qui semble être stable mais elle est affectée par les facteurs environnementaux et par les biotechnologies de la reproduction.

#### 2.1.1 Principaux acteurs épigénétiques

L'épigénétique est définie comme étant l'ensemble des facteurs moléculaires et des processus autour de l'ADN qui régulent l'expression des gènes, sans modification de la séquence d'ADN, et qui sont transmis au cours des mitoses, voire des méioses. L'épigénétique contribue et peut déterminer le phénotype d'un individu. L'épigénétique peut également servir de lien entre l'environnement et les organismes. En effet, l'origine de l'utilisation du terme « épigénétique » était par Conard Waddington dans les années 1940s pour faire référence à la façon dont les gènes d'un organisme et son environnement peuvent interagir pour donner lieu à l'hérédité non-Mendélienne des phénotypes (Waddington 1940). L'épigénétique est également un élément majeur d'orchestration des séquences de l'expression des gènes lors du développement et un élément de stabilisation du destin cellulaire.

Les acteurs de l'épigénétique renferment entre autres les modifications post-traductionnelles des histones. Certains ARN non codants (ncARNs) sont également impliqués dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes. Un autre acteur épigénétique principal est la méthylation d'ADN (**Figure 1**).



**Figure 1 : Des acteurs de l'épigénétique (adapté de Vezzani et al. 2022).**

Les modifications post-traductionnelles des histones sont impliquées dans la spermatogenèse et dans le développement embryonnaire indiquant l'intérêt de l'étude de ces marques épigénétiques. Ces marques épigénétiques ont été identifiées dans les années 1990. Il a été également montré qu'elles régulent l'activité des promoteurs et l'expression des gènes (revu par Turner 1998). En plus, les modifications post-traductionnelles des histones peuvent directement altérer la structure de la chromatine sachant qu'elle est formée de complexes nucléoprotéiques où ont lieu tous les processus liés à l'ADN. En effet, la structure de la chromatine régule l'accessibilité de l'information génétique. La chromatine est en effet organisée en 2 structures différentes : euchromatine qui est une structure ouverte, riche en gènes. Il s'agit également du site de la transcription active des gènes. La deuxième structure est l'hétérochromatine qui est beaucoup plus dense, pauvre en gènes et c'est là où se trouve la répression du génome.

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome qui est formé d'un octamère d'histones (2 H2A, 2 H2B, 2 H3 et 2 H4) entouré par 146 pb d'ADN (Luger et al. 1997). Une autre histone, l'histone de liaison H1 agit comme un lien à l'extrémité du nucléosome. Les modifications post-traductionnelles des histones consistent en de nombreuses modifications au niveau des terminaisons N-terminal des histones (que j'appellerai ici queue des histones) telles que l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, la phosphorylation et autres (revu par Rothbart and Strahl 2014). Ces modifications sont connues sous le nom « code des histones » (Strahl and Allis 2000). Les modifications les mieux étudiées sont l'acétylation et la méthylation. Ces modifications changent les interactions entre les histones et l'ADN ainsi que les interactions entre les histones elles-mêmes, et servent de sites d'ancrage pour les effecteurs protéiques, également appelés « readers » (revu par Musselman et al. 2012). Ces marques épigénétiques peuvent ainsi affecter le recrutement d'autres protéines et de complexes protéiques sur la chromatine (revu par Kouzarides 2007). Par conséquent, l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription et du profil de l'expression des gènes peuvent être contrôlés par les modifications post-traductionnelles des histones.

L'acétylation de la queue des histones est réalisée sur les résidus de lysine des histones par des enzymes « writers » qui sont les histones acétyl transférases (HATs) et supprimée par les « erasers » qui sont les histones déacétylases (HDACs). L'acétylation qui neutralise la charge positive de la lysine sur les histones H3 et H4 est principalement associée à un état actif de transcription. La mono-, di- ou triméthylation des queues d'histones sur les résidus de lysine ou d'arginine est principalement observée sur les queues des histones H3 et de H4. Les histones méthylases (HMTs) et déméthylases (HDMs) ont été identifiées comme « writers » et « erasers ». Selon le site, la méthylation des queues d'histone est associée à un état permissif ou répressif de l'expression des gènes. La méthylation des histones a également été identifiée chez les poissons (Lindeman et al. 2011; Andersen et al. 2012).

Outre les modifications post-traductionnelles des histones, un fonctionnement normal de la chromatine repose aussi sur la méthylation de l'ADN vu que cette dernière est impliquée dans la formation des régions hétérochromatiques dans le génome et dans la répression de la transcription des gènes. Cela indique que les modifications post-traductionnelles des histones et la méthylation de l'ADN sont hautement liées. Ceci est important pour la régulation des

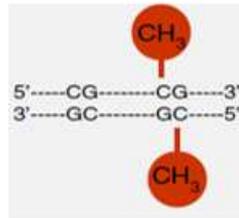
gènes (revu par Rose and Klose 2014). Il est ainsi crucial de prendre en compte que les modifications des histones et de l'ADN peuvent s'influencer réciproquement dans des séquences très complexes qui sont l'objet de plusieurs études. De plus, les interactions entre les « readers », « writers » et « erasers » jouent un rôle primordial. La perturbation de ces interactions entraîne des altérations de la fonction tissulaire et des maladies.

En ce qui concerne les ncARNs, ils sont formés des petits et longs ARNs. Ils peuvent influencer l'expression des gènes et jouent un rôle important dans le développement embryonnaire (revu par Pauli, Rinn, and Schier 2011). Certains de ces ncARN sont identifiés comme acteurs épigénétiques, du fait de certaines fonctions bien spécifiques transmises entre mitoses. D'une façon générale, les petits ncARNs (20-30 nucléotides) incluent certains microARNs, les ARN interférents courts et les ARN interagissant avec PIWI. Les fonctions de ces petits ARNs ont été revues par Kaikkonen et ses collègues (Kaikkonen, Lam, and Glass 2011). Les microARNs (miARN) sont de petites molécules formées d'un seul brin avec une structure caractéristique en « épingle à cheveux ». Les miARNs n'ont pas tous un rôle épigénétique, ce rôle dépend de leur cible. Autour de 45 % des miARNs proviennent des transcrits d'ARNs non codants alors que le reste provient des loci codant des protéines. Quant aux ARN interférents courts (siARN), ils agissent afin de renforcer les marques épigénétiques dans les régions où la structure de chromatine est dense. Ils sont également associés de façon plus générale à la répression transcriptionnelle des gènes. Les fonctions des ARN interagissant avec PIWI (piARN) ont été revues par Costa (Costa 2008). Ces piARNs sont capables de se lier aux protéines PIWI et sont souvent localisés sur des éléments répétés. Leur fonction est liée au contrôle des transposons en orientant les mécanismes de méthylation de l'ADN vers les éléments transposables. En plus des petits ARNs, il est suggéré que les long ARNs non codants (lncARNs), formés de plus de 200 nucléotides, ont la capacité de réguler des processus épigénétiques tels que l'inactivation du chromosome X, l'empreinte génomique, la réponse aux dommages de l'ADN ou la modification de la chromatine, en guidant les mécanismes épigénétiques (revu par Kaikkonen, Lam, and Glass 2011; Conaway 2012). Il existe également des lncARNs habituellement associés à des complexes de modification de la chromatine connus sous le nom de longs intergéniques ARNs non codants (lincRNAs). Les fonctions de ces lincRNAs ont été également revu par Kaikkonen et ses collègues (Kaikkonen, Lam, and Glass 2011). Ces complexes ont la capacité de promouvoir des états épigénétiques spécifiques en ciblant des loci génomiques.

La méthylation de l'ADN est, quant à elle, cruciale pour le développement embryonnaire (E. Li, Bestor, and Jaenisch 1992; Okano et al. 1999). Cette marque épigénétique a été découverte chez les animaux et une plante, mais pas chez les bactéries, par chromatographie des acides nucléiques (Wyatt 1951). La méthylation de l'ADN est non seulement l'un des premiers processus épigénétiques identifiés et étudiés (revu par Riggs 1975) mais il s'agit également de la marque épigénétique la plus étudiée. Il a été ensuite démontré qu'elle se produit depuis les plantes jusqu'aux êtres humains.

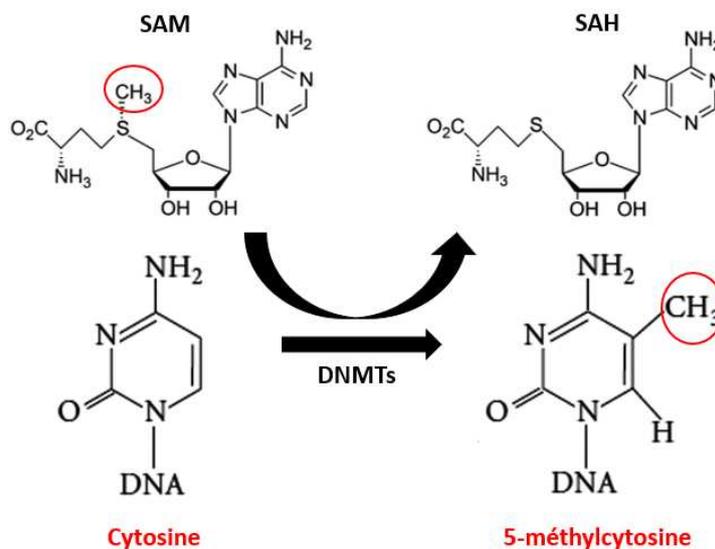
Elle consiste en une liaison covalente d'un groupement méthyl à une base de l'ADN. Chez les vertébrés, il est proposé que la majorité des méthylations a lieu au niveau d'une cytosine suivie presque exclusivement d'une guanine. C'est pourquoi on parle de la méthylation du

dinucléotide CpG (**Figure 2**). Quant au site CpG, il est présent sur les 2 brins. Il est également rapporté que la méthylation est toujours symétrique dans une cellule hors phase S.



**Figure 2 : La méthylation de l'ADN (adapté de Labbé, Robles, and Herraes 2017).** Liaison d'un groupement méthyl sur une cytosine suivi d'une guanine dans le sens 5'-3'.

Le processus de la méthylation de l'ADN implique l'action enzymatique des méthyltransférases de l'ADN (DNMTs). Les DNMTs sont responsables du transfert d'un groupe méthyl du donneur universel de groupe méthyle, S-adénosyl-L-méthionine (SAM) au carbone en position 5 d'une cytosine de l'ADN génomique d'où l'appellation 5-méthylcytosine (5-mC) (**Figure 3**).



**Figure 3 : La méthylation d'une cytosine par DNMT.** ADN méthyltransférase (DNMTs) présente au carbone en position 5 de la cytosine en contexte CpG transfère un groupe méthyle de SAM (S-adénosylméthionine) à SAH (S-adénosylcystéine) formant 5-méthylcytosine.

La méthylation de l'ADN peut aussi avoir lieu dans un contexte non-CpG comme au niveau des sites CHG et CHH (avec H=C, T ou A) surtout chez les plantes (revu par Henderson and Jacobsen 2007) et les cellules souches humaines (Lister et al. 2009) (**Figure 4**).

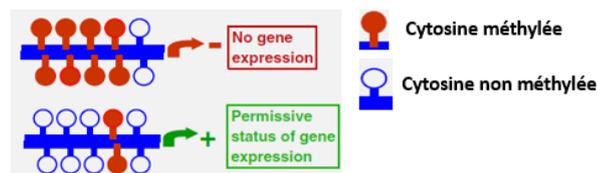


**Figure 4 : La méthylation de l'ADN dans un contexte non CpG (adapté de Grimanelli and Ingouff 2020).** me : groupement méthyl : CH<sub>3</sub>

Outre son rôle dans le développement embryonnaire, la méthylation de l'ADN est cruciale dans de nombreuses fonctions biologiques incluant l'empreinte parentale qui consiste à réprimer un des 2 allèles parentaux pour réguler l'expression génique adéquate (monoallélique) pour un développement normal (revu par Li 2002 et Jaenisch et Bird 2003). La méthylation de l'ADN est également impliquée dans l'inactivation d'un des 2 chromosomes X chez la femelle (revu par Li 2002). Chez les poissons, l'existence de l'empreinte parentale et l'inactivation de l'X n'a pas encore été démontrée (Ma et al. 2011 ; revu par McGowan and Martin 1997 et par Alonso et al. 2023). Il a été aussi prouvé que la méthylation de l'ADN est cruciale pour la différenciation de différents types cellulaires (E. Li, Bestor, and Jaenisch 1992; Okano et al. 1999). Par ailleurs, des altérations du profil de cette marque épigénétique et des mutations des gènes codant des régulateurs ou des enzymes responsables de la méthylation de l'ADN sont associés à des troubles développementaux.

### 2.1.2 Effet de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est essentielle dans la régulation de l'expression des gènes. Il est souvent proposé que de façon globale la méthylation de l'ADN au niveau des sites génomiques spécifiques est associée à une absence d'expression des gènes associés. En effet, l'hyperméthylation au niveau des promoteurs bloque l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN (revu par Jenkins and Carrell 2012). Par contre, l'absence ou même une faible méthylation au niveau des régions promotrices indique un état permissif de la transcription des gènes puisque la polymérase a un meilleur accès à l'ADN (revu par Jenkins and Carrell 2012) (**Figure 5**).

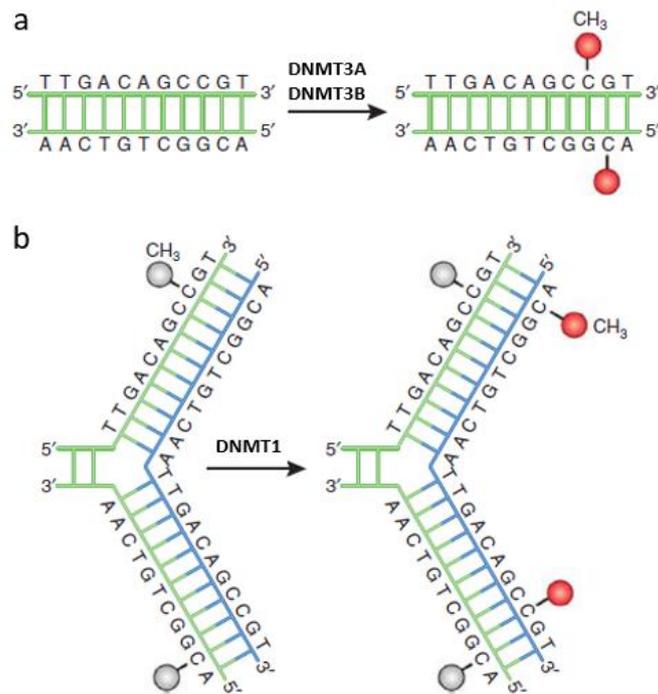


**Figure 5 : Contrôle de l'expression des gènes par la méthylation de l'ADN (adapté de Labbé, Robles, and Herraéz 2017).** Hyperméthylation ou hypométhylation des promoteurs des gènes indique un état répressif ou permissif de la transcription.

### 2.1.3 Processus de méthylation et de déméthylation de l'ADN

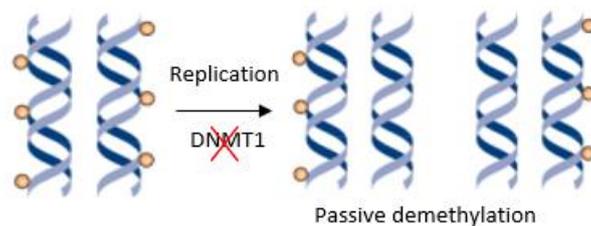
Au cours de l'embryogenèse et de la formation des lignées germinales, l'établissement de la méthylation de l'ADN (méthylation de novo) est important pour un développement embryonnaire normal. Il existe des ADN méthyltransférases (DNMTs) qui sont responsables de la méthylation de novo. Chez les mammifères, ces DNMTs sont DNMT3A et DNMT3B vu qu'elles renferment des domaines catalytiques qui permettent de transférer des groupes méthyles à des cytosines non-méthylées (**Figure 6a**) (revu par Mary Grace Goll and Bestor 2005 et Jenkins and Carrell 2012). DNMT3A est nécessaire pour une différenciation cellulaire normale alors que DNMT3B est nécessaire durant le développement embryonnaire précoce (Okano et al. 1999). Chez le poisson zèbre, ces DNMTs sont codées par 6 gènes orthologues, elles peuvent potentiellement servir de méthyltransférases de novo chez le poisson (revu par Mary G. Goll and Halpern 2011). Cela suggère que ce processus a également lieu chez le poisson zèbre. Parmi les enzymes codées par ces gènes orthologues, *dnmt4* est impliquée dans la différenciation cellulaire hématopoïétique (Takayama et al. 2014) et *dnmt7* participe dans le développement de la queue et de la notochorde (Shimoda et al. 2005).

Comme la méthylation de l'ADN peut être transmise au cours des divisions cellulaires mitotiques et qu'elle est importante pour le développement embryonnaire, il est important que cette marque soit maintenue lors de ces divisions cellulaires. Il existe des DNMTs qui permettent le maintien de la méthylation de l'ADN au cours de la synthèse de l'ADN qui précède les divisions cellulaires durant lesquelles le profil de méthylation est transmis de la cellule mère à la cellule fille (mémoire cellulaire) (revu par Mary Grace Goll and Bestor 2005). Parmi ces ADN méthyltransférases de maintien, DNMT1 est capable de reconnaître spécifiquement l'ADN hémiméthylé et de transférer un groupement méthyl sur le brin non méthylé (**Figure 6b**). Chez le poisson zèbre, l'enzyme d'un gène orthologue de *dnmt1* est présente et exerce la même fonction que celle présente chez les mammifères (revu par Mary G. Goll and Halpern 2011).



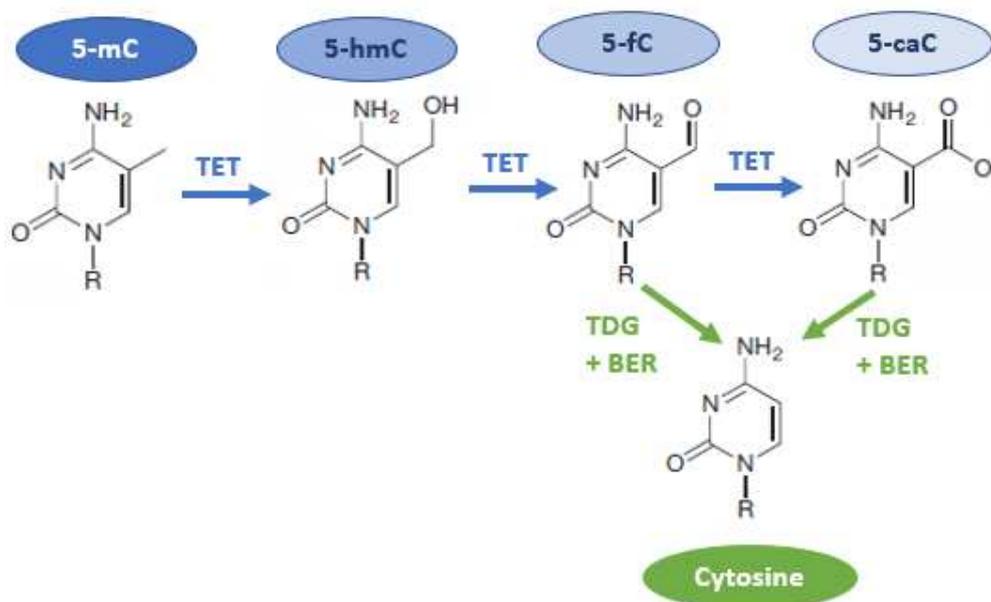
**Figure 6 : Les rôles des ADN méthyltransférases (DNMTs) de maintenance et de novo (adapté de Moore, Le, and Fan 2013).** a. DNMT3A et DNMT3B sont les ADN méthyltransférases de novo et transfèrent des groupes méthyles (en rouge) à l'ADN dépourvu de groupement méthyle. b. DNMT1 maintient la méthylation durant la réplication de l'ADN. DNMT1 s'associe au brin d'ADN nouvellement synthétisé (en bleu) et réplique précisément le motif de méthylation de l'ADN du brin d'origine (en vert) en ajoutant des groupes méthyles (en rouge) sur le brin nouvellement synthétisé (en bleu).

La méthylation de l'ADN peut ne pas être maintenue au cours des divisions cellulaires quand les DNMTs de maintenance ne sont pas actives après la réplication de l'ADN. Ainsi, une déméthylation passive a lieu au cours des divisions cellulaires (**Figure 7**) (revu par J.-K. Zhu 2009). La déméthylation passive de l'ADN est impliquée dans la reprogrammation épigénétique qui est essentielle pour le développement embryonnaire.



**Figure 7 : Mécanisme de la déméthylation passive de l'ADN (adapté de S. C. Wu and Zhang 2010).** Si DNMT1 (ADN méthyltransférase) est inhibée ou absente quand la cellule se divise, le brin nouvellement synthétisé ne va pas être méthylé et des divisions cellulaires successives vont résulter en une déméthylation passive.

La reprogrammation épigénétique peut aussi avoir lieu par une déméthylation active de l'ADN qui est indépendante de la réplication de l'ADN. Afin d'identifier un éventuel mécanisme de la déméthylation active, de nombreuses équipes recherchaient une déméthylase de la 5-mC. Suite à la présence d'homologie entre 2 enzymes dioxygénases ayant une activité hydroxylase envers le groupe méthyl au carbone en position 5 d'une thymine et TET, il a été proposé et ensuite démontré que la famille des enzymes TET est impliquée dans la déméthylation active (Tahiliani et al. 2009). Il est maintenant connu que la déméthylation active consiste en une oxydation itérative de la 5-mC en 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC), 5-formylcytosine (5-fC) et 5-carboxylcytosine (5-caC) par la famille des enzymes dioxygénases « ten-eleven translocation » (TET) (Figure 8) (Tahiliani et al. 2009; Ito et al. 2011; He et al. 2011; Ito et al. 2010). Ces produits oxydés, correspondant à des intermédiaires de la déméthylation de l'ADN, sont présents en une faible abondance par rapport à 5-mC (Ito et al. 2011). Pour compléter la déméthylation active de l'ADN, l'enzyme « thymine DNA glycosylase » (TDG) reconnaît et élimine les 5-fC et 5-caC du génome. Cela va générer des sites abasiques avant que la cytosine non modifiée ne soit rétablie par le système de réparation « base excision-repair » (BER) (He et al. 2011; Maiti and Drohat 2011; Weber et al. 2016). Chez les poissons, le processus de déméthylation active de l'ADN est similaire à celui décrit chez les mammifères (Kamstra et al. 2015; X. Wang and Bhandari 2019).

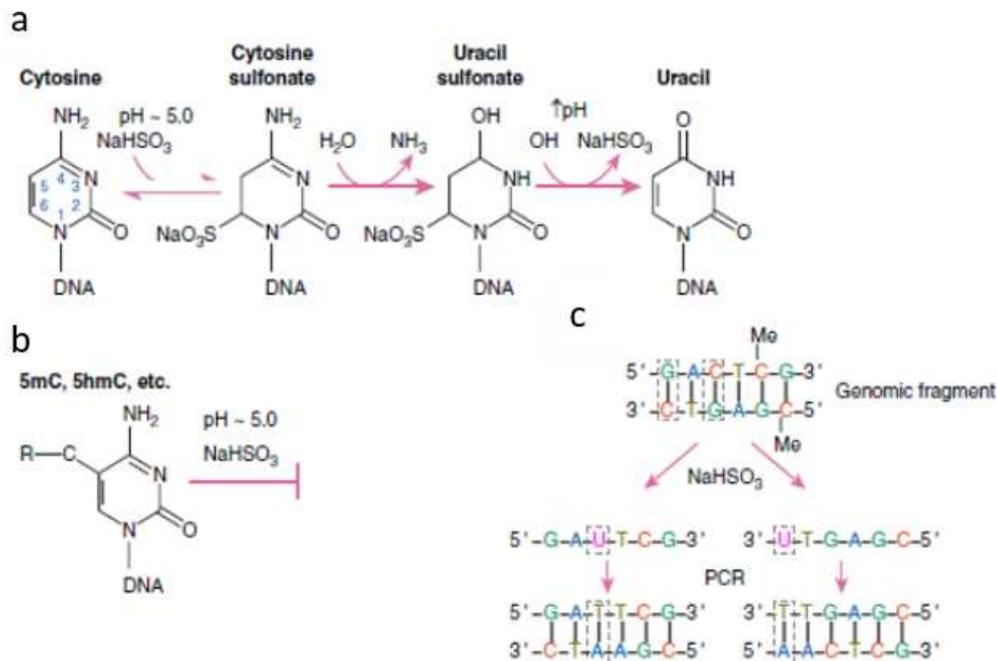


**Figure 8 : Processus de déméthylation active de l'ADN.** 5-mC : 5-méthylcytosine ; 5-hmC : 5-hydroxyméthylcytosine ; 5-fC : 5-formylcytosine ; 5-caC : 5-carboxylcytosine ; TET : ten eleven translocase ; TDG : thymine DNA glycosylase ; BER : base excision repair.

## 2.1.4 Méthodes d'analyse de la méthylation de l'ADN

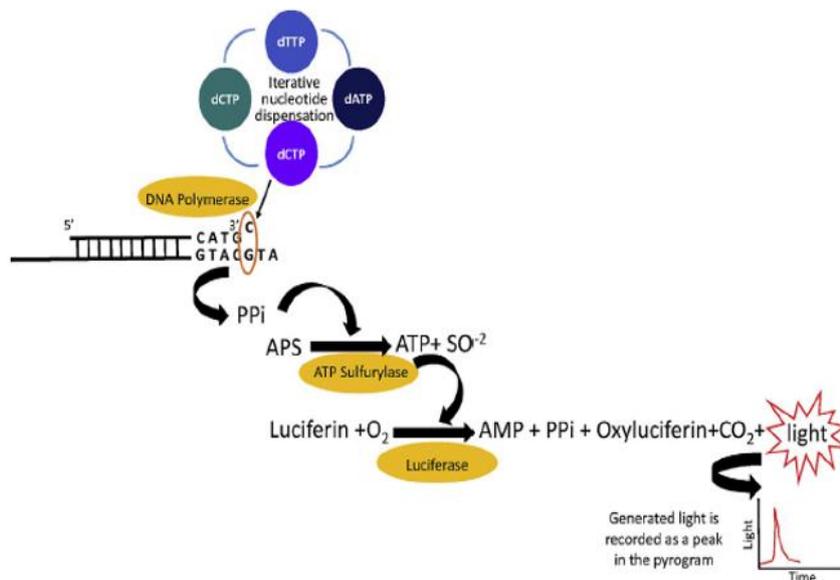
La méthylation de l'ADN peut être déterminée à l'échelle globale par un dosage, mais d'autres méthodes permettent d'étudier la méthylation de l'ADN à l'échelle du nucléotide.

Les méthodes mesurant la méthylation de l'ADN à l'échelle globale incluent entre autres le dosage ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) et l'HPLC (High-performance liquid chromatography). L'ELISA consiste à incuber l'ADN en entier adhérent à une plaque d'ELISA avec un anticorps primaire anti-5mC puis à incuber un anticorps secondaire et la dernière étape consiste en une révélation fluorométrique ou colorimétrique (revu par Kurdyukov et Bullock 2016). Quant à la technique HPLC, elle nécessite au préalable une hydrolyse enzymatique de l'ADN en ses composants désoxyribonucléotidiques suivi de la séparation ultérieure des nucléotides et leur quantification par HPLC (Ramsahoye 2002). D'autres méthodes incluent un traitement chimique préalable de l'ADN au bisulfite de sodium suivi d'un pyroséquençage ou d'une analyse par spectrométrie de masse. Le traitement au bisulfite (ou conversion au bisulfite) convertit la cytosine non méthylée en uracile par déamination (**Figure 9a**) alors que les cytosines méthylées (5-mC et 5-hmC) ne sont pas converties (**Figure 9b**) (Nestor et al. 2010). Suite à une étape d'amplification de l'ADN par PCR, l'uracile sera remplacé par une thymine alors que les cytosines méthylées non converties seront remplacées par des cytosines simples (**Figure 9c**).



**Figure 9 : Principe de la conversion au bisulfite de sodium (Singer 2019).** a. Les réactions chimiques impliqués dans la conversion de la cytosine non méthylée en uracile suite au traitement au bisulfite de sodium. b. Les cytosines méthylées (5-mC et 5-hmC) ne sont pas converties suite au traitement au bisulfite de sodium. c. Schéma illustrant le remplacement de l'uracile en thymine suite aux deux premiers cycles de PCR (la base uracile sera d'abord répliquée en base adénine, qui sera répliquée ensuite en thymine).

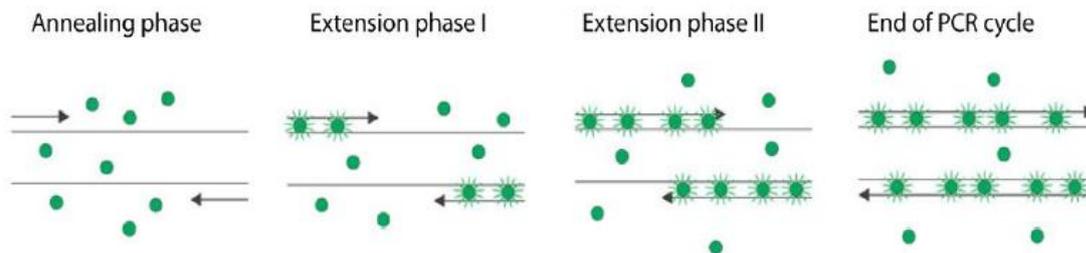
A l'issue de cette séquence de conversion au bisulfite et amplification par PCR, les cytosines initialement méthylées peuvent être différenciées des cytosines non méthylées par pyroséquençage (étude à l'échelle de gènes candidats) ou par séquençage classique du génome (RRBS et WGBS, voir plus bas) suivi d'une comparaison à un génome de référence (étude à l'échelle du génome). Le pyroséquençage (**Figure 10**) est une méthode de séquençage par synthèse qui consiste à incorporer des nucléotides dans un ordre défini à une séquence d'ADN connue (de taille forcément réduite). Durant cette incorporation des nucléotides, des molécules de pyrophosphate inorganique (PPi) sont libérées et converties en signaux bioluminométriques. Ces derniers sont enregistrés sous forme de pics dans un pyrogramme qui est une représentation quantitative de l'incorporation de chaque nucléotide. Là où une base cytosine est attendue, le séquenceur analysera deux signaux, celui de la cytosine (issue d'une cytosine méthylée) et celui de la thymidine (issu d'une cytosine non méthylée). La proportion de ces deux signaux donnera le ratio de méthylation de l'ADN de ce site particulier.



**Figure 10 : Principe du pyroséquençage (adapté de Kumar, Dalan, and Carless 2020).**

Outre le pyroséquençage, deux autres méthodes permettent l'étude de la méthylation de l'ADN des régions candidates suite à une étape de conversion au bisulfite, la PCR méthylation-spécifique (methylation specific PCR -MSP-) et la PCR méthylation-spécifique quantitative (quantitative methylation specific PCR -qMSP-). La MSP (Herman et al. 1996) amplifie soit la version méthylée soit la version non méthylée de la séquence d'intérêt. Cette méthode nécessite 2 jeux d'amorces différents pour chaque locus étudié, un qui se lie spécifiquement à l'ADN méthylé et l'autre qui se lie spécifiquement à l'ADN non méthylé. Les paires d'amorces sont utilisées dans deux réactions d'amplification parallèles. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel et visualisés. Le statut de méthylation du locus d'intérêt est

déterminé en fonction de la présence ou de l'absence de bandes dans les deux réactions. Les bandes peuvent être quantifiées par ImageJ. La méthode qMSP se différencie de la MSP par le fait que la détection des produits de PCR se fait en temps réel. Cette détection peut être basée sur l'utilisation d'un fluorochrome, SYBR Green, au cours de la qPCR. Lors de la liaison à l'ADN double brin, le fluorochrome SYBR augmente largement son émission de fluorescence. Ce signal augmente à chaque tour d'amplification et peut être détecté par l'instrument (**Figure 11**) (van der Velden et al. 2003).



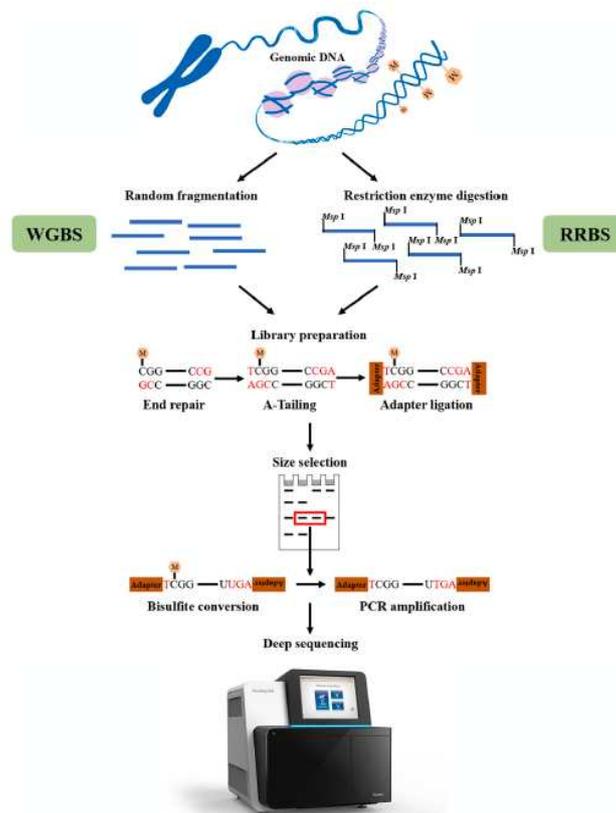
**Figure 11 : Une illustration de l'amplification dans qMSP basée sur le principe du SYBR Green (adapté de van der Velden et al. 2003).** Lignes horizontales : ADN double brin. Points verts : SYBR.

Lors de la liaison à l'ADN double brin, l'émission de fluorescence du fluorochrome SYBR augmente considérablement. Au cours de l'amplification PCR, de plus en plus de SYBR se liera à des quantités accrues de produits PCR, ce qui entraînera une augmentation continue du niveau de signaux fluorescents.

Le deuxième moyen de quantification implique l'utilisation de sondes spécifiques, TaqMan pendant la qPCR. Contrairement au fluorochrome SYBR, les sondes TaqMan sont des sondes à double marquage spécifiques du locus d'intérêt et de sa méthylation (Candiloro, Mikeska, and Dobrovic 2011). Ces sondes, dites d'hydrolyse, contiennent un fluorochrome (reporter) en 5', et habituellement un quencher non fluorescent en 3'. Après la fixation de la sonde et des amorces, l'ADN polymérase incluse dans le mélange de réaction commencera à amplifier l'ADN. Quand le site de fixation de la sonde est atteint, la sonde est clivée et détachée de la matrice. Les sondes intactes n'émettent pas de fluorescence car le quencher non fluorescent supprime l'émission du fluorochrome. Cependant, en raison du clivage de la sonde lors de l'amplification, le quencher et le fluorochrome sont séparés. Le fluorochrome commence à émettre un signal fluorescent capté par un détecteur laser, permettant ainsi de quantifier la quantité de matériel amplifié.

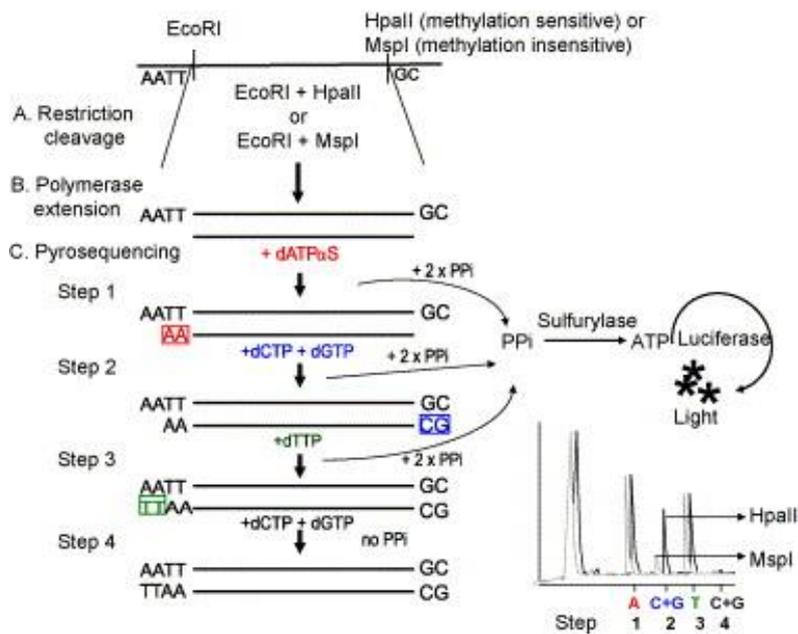
Les 2 méthodes les plus courantes pour analyser les séquences bisulfiteées par séquençage sont le séquençage du génome entier (WGBS : Whole Genome Bisulfite Sequencing) (Frommer et al. 1992b) et le séquençage d'une représentation réduite du génome (RRBS : Reduced Representation Bisulfite Sequencing) (Meissner et al. 2005) (**Figure 12**). Au cours de la préparation des banques d'ADN du WGBS, l'ADN est fractionné par sonication. Par contre, pour le RRBS, une digestion enzymatique avec une enzyme insensible à la méthylation d'ADN

(MspI) reconnaissant les sites CCGG a lieu pour casser l'ADN. Il est attendu de l'utilisation de cette enzyme que les brins coupés soient enrichis en sites CpGs. Ainsi, le RRBS est vanté comme permettant une couverture élevée des sites CpGs génomiques pour une faible couverture du génome, d'où la notion de représentation réduite du génome. Les méthodes basées sur une conversion au bisulfite suivie de séquençages classiques (type Illumina) présentent des avantages par rapport aux autres techniques en raison de leur adaptabilité à plusieurs organismes (revu par Singer 2019).



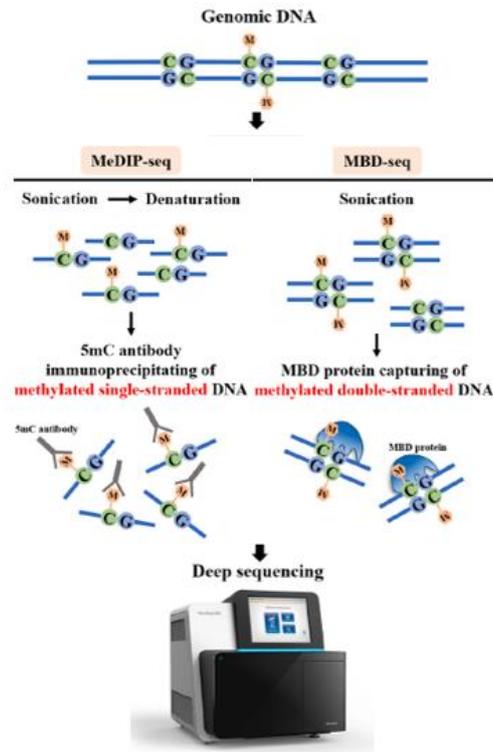
**Figure 12: WGBS et RRBS (S. Li and Tollefsbol 2021)**

Une autre méthode qui s'apparente plus à une analyse globale de la méthylation, bien qu'elle fasse intervenir le pyroséquençage, est le LUMA (luminometric methylation assay) (Karimi et al. 2006). Elle consiste en une digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction suivi d'un dosage par pyroséquençage de la quantité d'extrémités cohésives produites. Deux isoenzymes ayant pour site de restriction CCGG sont utilisées. L'une, HpaII, est sensible à la méthylation de la cytosine du CpG (coupure des sites non méthylés seulement) et l'autre, MspI, est insensible à la méthylation (coupure de tous les sites CCGG). Suite à ces 2 réactions de digestion indépendantes, la quantité d'extrémités cohésives produites dans chaque digestion est analysée lors de l'ajout des nucléotides pendant le pyroséquençage. Finalement, le rapport du signal lumineux mesuré dans les échantillons HpaII et des échantillons MspI est proportionnel à la quantité d'ADN méthylé présent dans l'échantillon (Figure 13).



**Figure 13 : Luminometric assay (LUMA) (Ho and Tang 2007)**

Des méthodes ont été développées afin de mesurer la méthylation de l'ADN à l'échelle de régions génomiques, en utilisant l'enrichissement d'affinité de la méthylation d'ADN incluant le MeDIP-Seq (methylated DNA immuno precipitation) et le MBD-Seq (methyl binding domain) (**Figure 14**). Le MeDIP-Seq consiste en une immunoprécipitation de régions génomiques contenant la 5-mC par un anticorps anti 5-mC, suivie d'un séquençage et d'une comparaison de la fraction immunoprécipitée et de la fraction totale (input) (Taiwo et al. 2012). Le MBD-Seq est une autre méthode qui utilise le domaine de liaison à la méthyl-CpG (MBD) de la protéine MBP (methyl CpG binding protein). Ce domaine identifie et se lie aux sites CpGs méthylés suivi d'un séquençage (Serre, Lee, and Ting 2010).



**Figure 14 : Exemples de méthodes d’analyses de la méthylation de l’ADN basées sur un enrichissement d’affinité de la méthylation de l’ADN (adapté de S. Li and Tollefsbol 2021).**

### 2.1.5 Modifications de méthylation de l’ADN induites par l’environnement

La méthylation de l’ADN dans les spermatozoïdes joue un rôle crucial dans le développement embryonnaire comme déjà évoqué au début de cette synthèse bibliographique. Bien que cette marque épigénétique soit considérée comme stable à l’échelle de cellules ou tissus différenciés, il existe de plus en plus de données montrant que la méthylation de l’ADN est labile en réponse à l’exposition des organismes à des facteurs environnementaux. L’impact de l’environnement est d’une importance particulière pour les poissons en élevage qui subissent des contraintes environnementales variées telles que la domestication, le régime alimentaire artificiel, les changements de température, voire les xénobiotiques dissous.

#### Domestication

La domestication est le processus durant lequel une espèce sauvage est capturée puis soumise à un environnement d’élevage pour la faire croître, mûrir, se reproduire et se développer. Ce processus consiste donc à adapter un sous-groupe de la population d’une espèce aux conditions d’élevage (revu par Teletchea and Fontaine 2014). Il n’est pas encore connu si la

domestication implique une sélection des individus les plus adaptés (la mort des plus fragiles) ou une adaptation des individus, y compris par des médiations épigénétiques, voire une certaine part des deux phénomènes. Comme on souhaite améliorer l'aptitude des poissons à la domestication, la compréhension des mécanismes en jeu est importante pour pouvoir disposer de leviers d'amélioration de l'aptitude d'espèces nouvelles. Étant donné que la domestication est en jeu presque uniquement chez les poissons, l'étude des mécanismes notamment épigénétiques est particulièrement spécifique à leur sujet. Afin d'obtenir des informations sur la programmation épigénétique, éventuellement transmissible, ayant lieu suite aux changements de conditions d'élevage, l'impact de la domestication a été étudié au niveau des spermatozoïdes de poissons. Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), la présence de 108 régions différentiellement méthylées (DMRs) dans les spermatozoïdes d'adultes domestiques par rapport aux sauvages a été rapportée (Gavery et al. 2018). Parmi ces DMRs, plusieurs sont associées à des gènes dont la fonction moléculaire la plus commune est la liaison aux acides nucléiques. Une seconde étude a également montré un grand nombre de DMRs entre des adultes domestiques par rapport aux sauvages chez la même espèce (Nilsson et al. 2021). Ces altérations de la méthylation de l'ADN peuvent avoir des effets majeurs sur l'activité du génome et être potentiellement corrélées avec les altérations phénotypiques chez les poissons (Nilsson et al. 2021). Chez une autre espèce, le saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*), parmi les 183 DMRs repérées entre les adultes domestiques en comparant aux sauvages, 58 ont été superposées avec des transcrits uniques (Leitwein et al. 2021). Parmi ces transcrits, 3 sont associés au développement cérébral, 7 à l'homéostasie cellulaire, 3 à la réponse immunitaire et 8 avec le développement multicellulaire de l'organisme et l'apoptose (Leitwein et al. 2021). De plus, chez le saumon atlantique (*Salmo salar*), des DMRs ont été identifiées entre les adultes domestiques par rapport aux adultes sauvages. Ces DMRs sont associées à des gènes qui codent des protéines régulant l'expression des gènes, la transcription, la structure de la chromatine et des protéines liées à la spermiogenèse et au développement embryonnaire (Rodriguez Barreto et al. 2019). De même, une autre étude a identifié 4 998 cytosines différentiellement méthylées (DMCs) entre les adultes domestiques par rapport aux adultes sauvages chez le saumon atlantique. Ces DMCs ont été groupées en 284 DMRs (Wellband et al. 2021). Ces DMRs sont associées à des gènes significativement enrichis codant pour une variété de fonctions notamment celles impliquées dans les voies de transduction du signal, développement cérébral, différenciation du tissu, développement du muscle et contraction (Wellband et al. 2021).

## Nutrition

Le régime alimentaire peut altérer les grandes fonctions physiologiques de l'animal telles que la fertilité, la spermatogenèse, le métabolisme ainsi que les système nerveux et musculaire, et la médiation de ces modifications par des changements de la méthylation de l'ADN suite à un régime alimentaire particulier commence à être plus explorée chez les poissons (L et al. 2022). Pourtant, d'après nos connaissances, l'effet de la nutrition sur la méthylation de l'ADN n'est pas encore étudié au niveau des spermatozoïdes. Par contre, des études ont été menées

afin d'évaluer l'impact du régime alimentaire sur la croissance musculaire et sur le foie vu l'importance de la qualité du muscle et du métabolisme chez les poissons. Ces études avaient aussi pour but soit de réduire le coût de l'alimentation des poissons soit de se diriger vers des pratiques d'aquaculture durables. Chez des poissons nourris avec un régime riche en glucides, 3 135 régions différentiellement méthylées (DMRs) ont été identifiées dans le muscle de la carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idella*). Parmi ces DMRs, 29,6 % sont localisées dans les promoteurs des gènes. De plus, les promoteurs des gènes qui sont essentiels entre autres pour la différenciation cellulaire et la contraction musculaire sont hypométhylés ou hyperméthylés (Xie et al. 2023).

Une alimentation riche en glucides a également entraîné une hypométhylation globale de l'ADN du foie chez les truites arc-en-ciel (Marandel et al. 2016). En plus d'un régime alimentaire riche en glucides, un régime alimentaire basé sur les plantes peut affecter le méthylome hépatique global selon le fond génétique des lignées de truite (L et al. 2022).

Contrairement aux poissons, il existe des études sur l'effet de la nutrition sur la méthylation de l'ADN du spermatozoïde chez les mammifères, et il est décrit que le régime alimentaire peut affecter la fertilité en affectant l'épigénome du spermatozoïde. Par exemple chez l'humain, une consommation fréquente de frites est liée à une plus grande probabilité que le sperme soit méthylé au niveau d'un des gènes d'empreinte parentale (Soubry et al. 2021). Chez le mouton, une supplémentation en méthionine (connue pour stimuler la méthylation de l'ADN) a induit 166 DMCs dans leurs spermatozoïdes dont certaines sont présentes dans les promoteurs, exons et introns entraînant une altération de l'expression des gènes (Townsend et al. 2023).

## Température

Le changement climatique peut impacter les poissons d'eau douce, et la médiation de cet impact par la méthylation de l'ADN commence à être étudiée dans les spermatozoïdes. Ainsi, une étude récente dans l'équipe a évalué l'impact d'une augmentation de la température de l'eau durant la gamétogénèse sur le méthylome des spermatozoïdes des truites arc-en-ciel (Brionne et al. 2023). En comparant les poissons à 16 °C par rapport à ceux à 12 °C (condition contrôle), la moyenne des taux de méthylation des poissons à 16 °C était similaire à ceux à 12 °C, mais 112 386 DMCs ont été identifiées, dont 92 % appartiennent à des DMRs. Parmi ces DMRs, 10 % concernent les promoteurs de gènes qui sont en lien avec la spermiogénèse et le métabolisme des lipides.

L'effet de la température sur la méthylation de l'ADN a été également étudié au niveau des embryons de poissons. A titre d'exemple, chez la truite arc-en-ciel, une étude a évalué l'effet de la température d'incubation des embryons de truites arc-en-ciel de différentes lignées isogéniques sur la méthylation de l'ADN, avec une température d'incubation test de 16 °C et une température contrôle de 11 °C (Lallias et al. 2021). Au stade œillé (22 jours post fécondation), l'analyse de la méthylation globale de l'ADN n'a pas montré de différence

significative entre embryons à 16 °C et 11 °C. Les auteurs ont cependant observé que d'une lignée à l'autre, la méthylation globale des embryons pouvait être différente des autres lignées, à une température donnée. Parmi les 6 lignées isogéniques, 385 loci différenciellement méthylés ont été identifiés et localisés sur les 29 chromosomes de la truite. Parmi ces 385 loci, 251 loci sont situés dans ou à proximité (1 Kb) d'un ou plusieurs gènes qui sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques comme la transduction du signal, le système endocrinien, le système immunitaire et la communauté cellulaire (Lallias et al. 2021). Cela indique qu'une modification de la température durant le développement embryonnaire altère le pattern de la méthylation de l'ADN selon le fond génétique.

## Xénobiotiques

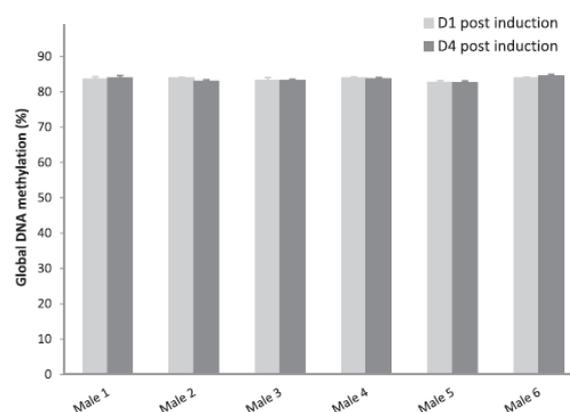
L'exposition à des xénobiotiques induit des altérations morphologiques et moléculaires notamment au niveau de la méthylation de l'ADN des gonades ainsi que des spermatozoïdes des poissons entraînant des altérations de la reproduction chez les poissons. Plusieurs études ont par exemple évalué l'effet du bisphénol A (BPA), un perturbateur endocrinien, sur la méthylation de l'ADN. Chez le poisson zèbre, une exposition à 1 mg/L BPA a entraîné une diminution significative de la méthylation globale de l'ADN dans les gonades mâles (Laing et al. 2016). Les auteurs proposent que ces modifications pourraient entraîner une altération du fonctionnement des testicules qui peut résulter en une démasculinisation. De même, chez le poisson zèbre, une exposition à 2 mg/L BPA a augmenté les taux de 5-mC dans les cellules testiculaires (S. González-Rojo et al. 2019). Par contre, il n'y pas eu de modifications de la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes chez les mâles qui ont été exposés au BPA pendant leur développement embryonnaire ou à l'âge adulte (Lombó, Getino-Álvarez, et al. 2019; Lombó, Fernández-Díez, et al. 2019). Chez le *Gobiocypris rarus*, l'exposition au BPA a augmenté l'expression du gène en lien à la méthylation de l'ADN (*dnmt7*) (L. Zhu et al. 2021). Cela suggère que des variations de la méthylation de l'ADN dans les testicules peuvent principalement être due à une altération des mécanismes du maintien de la méthylation de l'ADN suite à une exposition au BPA (L. Zhu et al. 2021). En plus du BPA, d'autres substances chimiques affectent également le profil de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes. En effet, une exposition des poissons zèbre au cuivre a induit 730 DMRs au niveau des spermatozoïdes (Tai et al. 2022). Il a été aussi montré que les gènes associés à ces DMRs sont exprimés dans le cerveau/système nerveux central, les yeux/rétine et l'intestin/foie (Tai et al. 2022). Outre le cuivre, le méthylmercure altère également la méthylation de l'ADN. En effet, une exposition des poissons zèbre mâles au méthylmercure (MeHg) a aussi entraîné des modifications de la méthylation de l'ADN de leurs spermatozoïdes (Carvan et al. 2017).

## 2.1.6 Modifications de la méthylation de l'ADN induites par les biotechnologies de reproduction

La méthylation de l'ADN des spermatozoïdes de poisson peut ainsi être modifiée par l'environnement, mais l'impact des biotechnologies de la reproduction reste encore peu documenté. Les biotechnologies les plus utilisées chez les poissons sont la réversion du sexe, le contrôle photopériodique de la gamétogenèse, l'induction de l'ovulation et la cryoconservation du sperme. D'après nos connaissances, la cryoconservation est la biotechnologie pour laquelle il existe quelques études d'impact sur la méthylation de l'ADN (de Mello et al. 2017; Herranz-Jusdado et al. 2019; Depincé et al. 2020). En revanche, parmi les autres biotechnologies, nous avons une étude en induction hormonale montrant son impact sur la méthylation de l'ADN (Depincé et al. 2020). Mais aucune information n'est disponible pour les autres biotechnologies. Cela montre que dans la littérature, il existe encore peu de données autour de l'effet des biotechnologies de reproduction sur la méthylation de l'ADN chez les poissons alors qu'elle est plus abondante chez les mammifères.

### Induction hormonale

L'induction hormonale est une biotechnologie nécessaire pour plusieurs espèces de poissons importantes en aquaculture, notamment chez les cyprinidés ainsi que chez plusieurs poissons marins (bar, turbot, anguille), car elle permet de stimuler ou même d'améliorer la production du sperme. L'impact de la stimulation hormonale de la production de sperme sur la méthylation de l'ADN a été évalué uniquement en système modèle, chez le poisson rouge (Depincé et al. 2020). Les auteurs ont montré que suite à une dose d'un analogue de GnRH, les taux de la méthylation globale de l'ADN n'ont pas été modifiés entre les spermatozoïdes produits directement suite au traitement hormonal et ceux qui sont produits d'une façon plus naturelle 4 jours après le traitement (**Figure 15**).



**Figure 15 : Comparaison des taux de la méthylation globale de l'ADN entre les spermatozoïdes collectés 1 et 4 jours après une stimulation hormonale de la production de sperme (Depincé et al. 2020).** Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type à la moyenne (n=8 échantillons par mâle collecté chaque semaine pendant 8 semaines). Aucune différence significative

n'a été détectée entre 16h (D1 post induction) et 4 jours (post induction) après traitement hormonal ( $p > 0.05$ ).

Chez les mammifères, contrairement aux poissons, les données disponibles concernent la voie femelle avec l'effet de la superovulation. Cette biotechnologie est une étape importante de la technique de reproduction assistée (ART) puisqu'elle permet la maturation folliculaire et la croissance d'un grand nombre d'ovocytes à la fois. Chez les souris, la superovulation a entraîné des altérations de la méthylation au niveau de sites spécifiques des ovules produits (Huo et al. 2020). Des DMRs ont été identifiées et certains des gènes, associés à certaines de ces DMRs, sont impliqués dans le métabolisme du glucose, le développement du système nerveux et le cycle cellulaire (Huo et al. 2020). Chez la vache, les taux de méthylation globale de l'ADN sont similaires entre les ovocytes d'individus stimulés et les contrôles (Lopes et al. 2022). Par contre, ces auteurs ont observé des différences significatives des taux de méthylation de l'ADN dans des gènes soumis à empreinte parentale tels que *apeg3*, *meg3*, *meg9* et *tssc4*.

## Cryoconservation

Chez les poissons, quelques études ont évalué de façon préliminaire l'impact de la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN, en utilisant le LUMA. Cette technique fournit des données sur le niveau global de méthylation de l'ADN sans donner d'information sur l'identité des sites altérés (Herranz-Jusdado et al. 2019 ; Depincé et al. 2020). Ces études ont montré des effets complexes liés à des combinaisons entre espèces et cryoprotecteurs (**Table 1**). Par exemple, la cryoconservation du sperme en présence du méthanol (MeOH) comme cryoprotecteur n'a pas altéré la méthylation de l'ADN chez l'anguille et le poisson rouge mais a induit une légère hyperméthylation chez le poisson zèbre. Le sperme de poisson rouge n'a pas été complètement insensible à la cryoconservation puisque le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le 1,2-propanediol ont induit une hypométhylation de l'ADN dans ces espèces (Depincé et al. 2020). La cryoconservation a également induit une hypométhylation globale des spermatozoïdes du tambaqui (*Colossoma macropomum*) quel que soit le cryoprotecteur testé, incluant MeOH, DMSO et glycérol (de Mello et al. 2017).

Espèces	DMSO	MeOH	Pdiol	Gly	Références
Anguille	HYPO	Pas d'effet*	NA	NA	Herranz-Jusdado et al. 2019
Poisson rouge	HYPO	Pas d'effet *	HYPO	NA	Depincé et al. 2020
Poisson zèbre	NA	HYPER *	NA	NA	Depincé et al. 2020
Tambaqui	HYPO	HYPO*	NA	HYPO	de Mello et al. 2017

**Table 1 : Effet de la cryoconservation du sperme selon différents cryoprotecteurs sur la méthylation de l'ADN de différentes espèces de poissons. \* : cryoprotecteur le mieux adapté**

pour préserver la capacité de fécondation de cette espèce. NA: information non disponible ; HYPO : hypométhylation ; HYPER : hyperméthylation ; Pdiol : 1,2-propanediol ; Gly : glycérol.

Comme chez les poissons, il existe peu d'études qui évaluent l'effet de la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN chez les mammifères. Chez l'humain, l'étude de la méthylation de l'ADN suite à la cryoconservation du sperme a été évaluée dans des régions ou gènes cibles avec différentes techniques telles que le pyroséquençage, la PCR méthylation-spécifique (methylation specific PCR -MSP-) et la PCR méthylation-spécifique quantitative (quantitative methylation specific PCR -qMSP-). Une absence d'effet de la cryoconservation sur la méthylation de l'ADN a été observée après pyroséquençage de 3 gènes à empreinte maternelle (*lit1*, *snrpn*, *mest*), 2 gènes à empreinte paternelle (*meg3*, *h19*), 2 éléments répétés (*alu*, *line1*), un gène spécifique de la spermatogenèse (*vasa*) et un gène associé à l'infertilité masculine (*mthfr*) (Kläver et al. 2012). Une autre étude toujours chez l'homme a évalué la méthylation de l'ADN dans les promoteurs de *ube3a* (gène à empreinte paternelle) et *snurf-snrpn* (SNURF- petite ribonucléoprotéine nucléaire polypeptide ; gène à empreinte maternelle) ainsi que *pws-icr* et *as-icr* dans le chromosome 15 q11 q13 en utilisant la méthode de PCR méthylation-spécifique quantitative (Khosravizadeh et al. 2020). Cette étude a également révélé l'absence d'altération de la méthylation de l'ADN. Par contre, une étude récente utilisant la PCR méthylation-spécifique a démontré une augmentation des taux de méthylation dans les promoteurs des gènes *pax8*, *peg3* et *rtl1* qui sont des gènes à empreinte paternelle jouant un rôle dans la fertilité des mâles (Khosronezhad et al. 2023). Au niveau de la méthylation globale de l'ADN (par la méthode ELISA), une étude chez le bélier a montré une augmentation de la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes suite à la cryoconservation (Güngör et al. 2021). La technique d'ELISA a été également utilisée pour évaluer la méthylation globale de l'ADN après la cryoconservation du sperme chez le cheval (Aurich et al. 2016), où une augmentation des taux de méthylation de l'ADN a également été observée. Il a été suggéré que ces modifications de la méthylation de l'ADN peuvent expliquer en partie la faible fertilité du sperme, sans que des éléments probants aient été montrés. Outre les mammifères, une étude a été menée chez le coq en utilisant la méthode d'immunofluorescence ciblant la 5-mC, puis en mesurant par cytométrie en flux l'intensité de marquage des spermatozoïdes (Salehi et al. 2020). Ces auteurs ont montré que la cryoconservation du sperme a induit une réduction significative de la méthylation globale de l'ADN, et proposent que cela pourrait avoir un impact sur le développement embryonnaire.

Ainsi, comme résumé **Table 2**, l'effet de la cryoconservation sur la méthylation de l'ADN est étudié de façon peu comparable selon les espèces, et même lorsque les comparaisons sont possibles, les effets sont extrêmement variés.

Espèces	Méthodes	Cibles	Effet	Références
Humain	Pyroséquençage	Gènes candidats	Pas d'effet	Kläver et al. 2012
	qMSP	Régions candidates	Pas d'effet	Khosravizadeh et al. 2020
	MSP	Promoteurs des gènes à empreinte paternelle	HYPER	Khosronezhad et al. 2023
Bélier	ELISA	Méthylation globale	HYPER	Güngör et al. 2021
Cheval	ELISA	Méthylation globale	HYPER	Aurich et al. 2016
Coq	Immunofluorescence ciblant la 5-mC puis mesure par cytométrie en flux de l'intensité de marquage des spermatozoïdes	Méthylation globale	HYPO	Salehi et al. 2020
Anguille	LUMA	Méthylation globale	HYPO et HYPER selon le cryoprotecteur	Herranz-Jusdado et al. 2019
Poisson rouge	LUMA	Méthylation globale	HYPO et HYPER selon le cryoprotecteur	Depincé et al. 2020
Poisson zèbre	LUMA	Méthylation globale	HYPER	Depincé et al. 2020
Tambaqui	LUMA	Méthylation globale	HYPO	de Mello et al. 2017

**Table 2 : Résumé des données disponibles concernant l'effet de la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN.** qMSP :PCR méthylation-spécifique quantitative ; MSP :PCR méthylation-spécifique ; ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay ; LUMA : Luminometric assay ; HYPO : hypométhylation ; HYPER : hyperméthylation.

## 2.2 Principes, contraintes et usages de la cryoconservation

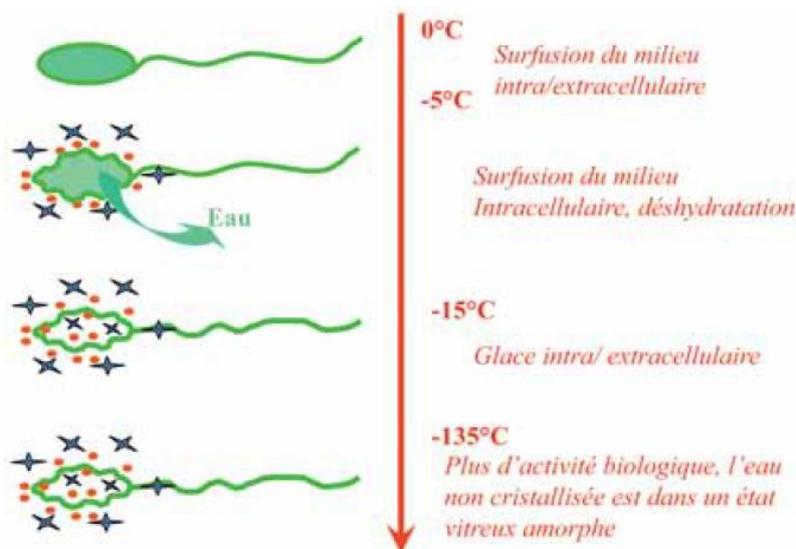
La cryoconservation est une biotechnologie qui permet de conserver des échantillons biologiques à des températures auxquelles plus aucune activité biologique n'est plus possible. Il s'agit d'un arrêt du métabolisme cellulaire de manière réversible. Cette inhibition de l'agitation moléculaire a lieu autour de  $-135\text{ °C}$ . C'est à cette température que toute l'eau a atteint un état soit cristallin (glace) soit vitreux (Mazur 1984). Comme l'azote a une température d'ébullition de  $-196\text{ °C}$ , c'est le milieu le plus utilisé à l'état liquide pour la cryoconservation à long terme d'échantillons biologiques.

La cryoconservation consiste en une étape de refroidissement, de stockage à  $-196\text{°C}$ , puis d'une étape de réchauffement ou décongélation qui a lieu pour utiliser l'échantillon cryoconservé. Les deux étapes de congélation et de décongélation sont responsables des dommages cellulaires et moléculaires induits par la cryoconservation. Pour minimiser ces dommages, des cryoprotecteurs sont utilisés. La cryoconservation du sperme est de plus en plus utilisée en aquaculture, comme indiqué au tout début de ce manuscrit, ses performances dépendent de l'aptitude des spermatozoïdes à la cryoconservation et de la maîtrise des différentes étapes de la méthode de congélation.

### 2.2.1 Principe de la cryoconservation

Il est primordial d'appréhender le principe de la cryoconservation pour être au courant des dommages éventuels qui peuvent se produire, ainsi que des mesures à prendre afin d'éviter ou de minimiser ces altérations et par conséquent favoriser la survie cellulaire. Cette biotechnologie nécessite la maîtrise de deux étapes primordiales : la phase de refroidissement et la phase de réchauffement ou décongélation. Durant la phase de refroidissement, la cristallisation et la nucléation ont lieu (revu par Karlsson and Toner 1996; Meryman 2007). A partir de  $-0,6\text{ °C}$ , l'eau à l'état liquide devient instable. Cela correspond à l'état de surfusion. Cette instabilité est favorable à la formation d'un état cristallin, où l'eau passe à l'état solide en formant des cristaux de glace. A ces températures élevées, l'eau ne se solidifie pas spontanément. La formation des cristaux nécessite la présence de foyers de nucléation qui ont pour rôle d'initier l'organisation de l'eau en glace. Ces foyers de nucléation peuvent être une poussière, des débris cellulaires ou une bactérie. Ils induisent ce qu'on appelle une nucléation hétérogène de la glace. C'est le type de nucléation qui est en jeu lors de la cryoconservation des cellules ou tissus. Par contre, si ces foyers de nucléation sont absents (à très haute altitude dans l'atmosphère par exemple), l'état de surfusion peut perdurer jusqu'à atteindre la température de nucléation homogène du milieu (à partir de  $-45\text{ °C}$  pour l'eau pure). Dans ce cas, la présence d'un noyau de la taille d'un nanomètre, correspondant à une molécule d'eau, peut induire une cristallisation spontanée. Lors de la nucléation hétérogène en condition de cryoconservation, la cristallisation de l'échantillon commence à l'extérieur de la cellule, là où les foyers de nucléations sont présents et où les volumes d'eau libre sont les

plus importants (**Figure 16**). Par conséquent, le milieu intracellulaire de la cellule restera plus longtemps en état de surfusion. Lors de la formation des cristaux dans le milieu extracellulaire, les solutés sont exclus de la glace nouvellement formée et se concentrent dans de très faibles volumes d'eau toujours à état liquide. Ceci entraîne une augmentation considérable de la pression osmotique du milieu extracellulaire. Un gradient osmotique se crée alors entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire, ce qui induit une déshydratation des cellules. Éventuellement, à une température suffisamment basse et sous effet nucléant des cristaux extracellulaires, le milieu intracellulaire peut finir par cristalliser lui aussi. Lorsque les plus basses températures sont atteintes, une faible fraction de l'eau demeure dans un état vitreux avec une viscosité très importante, tandis que toute l'eau restante est cristallisée.



**Figure 16 : Cristallisation extracellulaire puis intracellulaire lors de la phase de refroidissement (Labbe 2013b).** Points rouges : fortes concentrations en ions. Les croix sombres représentent les cristaux de glace.

La croissance des cristaux est influencée par plusieurs facteurs, notamment la température environnante conditionnant l'état de surfusion, la vitesse de refroidissement et la viscosité de la solution (revu par Karlsson and Toner 1996 et Meryman 2007). Plus la viscosité de la solution est élevée, moins la croissance des cristaux est importante. De plus, la viscosité de la solution augmente quand la température diminue. Ainsi, les cristaux formés à basse température, suite à un refroidissement rapide, sont nombreux et petits, alors que des cristaux de plus grande taille et moins nombreux se forment à plus haute température, lors d'un refroidissement lent (revu par Meryman 2007).

Durant la décongélation ou la phase de réchauffement, les échanges thermiques entre l'échantillon congelé et le milieu extérieur sont lents. Cela a pour conséquence que les petits cristaux se retrouvent à nouveau dans un environnement thermiquement favorable à leur

croissance, voire même à leur fusion (fonte des cristaux) alors que la température de l'échantillon est toujours thermodynamiquement favorable à la formation de gros cristaux de glace. Suite à la fusion des petits cristaux, l'eau libérée recristallisera en cristaux volumineux.

## 2.2.2 Dommages induits par la cryoconservation

Durant le processus de congélation, les cellules subissent différents dommages suite à leur exposition à de nombreux stress. Parmi ces dommages, nous distinguons les dommages osmotiques et les dommages mécaniques. Ces dommages entraînent des altérations de la structure et de l'intégrité des cellules, ce qui a pour conséquence que les fonctions de la cellule sont perturbées. Les dommages osmotiques sont liés à l'exposition des cellules à de très fortes concentrations en ions (dont l'origine est décrite ci-dessus) induisant des dénaturations des protéines et des changements de phase des lipides membranaires. Les dommages mécaniques incluent des variations de volume de la cellule notamment un rétrécissement de la cellule quand elle se déshydrate (Karlsson and Toner 1996; Labbe 2013). Ils concernent aussi des déchirures de la membrane plasmique et des structures intracellulaires dont on suppose de façon théorique qu'elles sont dues au caractère tranchant des cristaux de glace. Il faut noter que la cristallisation intracellulaire n'a pas pu être démontrée chez les spermatozoïdes (revu par John Morris et al. 2012), ce qui est cohérent au vu de leur faible contenu en eau. Pour autant, un risque de recristallisation ne peut être exclu, qui pourrait expliquer les lésions des membranes par des cristaux (revu par John Morris et al. 2012).

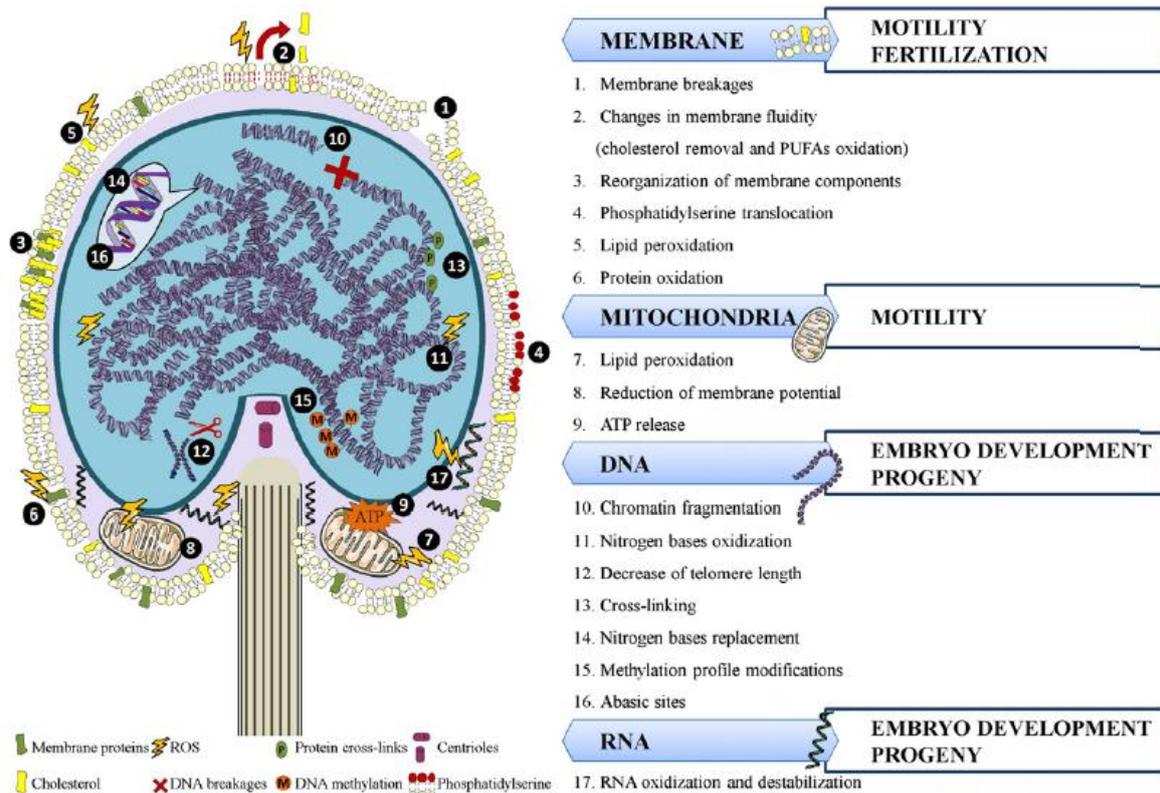
Un autre dommage mécanique est attribué au phénomène de choc froid, mis en évidence par la sensibilité des spermatozoïdes à une température inférieure à leur température physiologique (Wales and White 1959). Cette sensibilité est attribuée à un phénomène biophysique qui est la transition de phase des lipides mentionnée plus haut, ayant lieu quand la température diminue. A température physiologique, les différents lipides formant les membranes cellulaires sont dans un état organisé mais fluide appelé l'état cristal liquide. Lorsque la température diminue, certains lipides ont tendance à se rigidifier afin d'atteindre un état de gel alors que d'autres lipides ayant une autre composition moléculaire plus favorable au désordre (insaturation des acides gras) sont toujours dans un état liquide (Drobnis et al. 1993). Le processus inverse a lieu au moment du réchauffement de l'échantillon. C'est la coexistence de ces deux états (cristal liquide/gel) qui induit des changements de l'environnement des protéines membranaires. Cela entraînerait des dénaturations de ces protéines ou des réarrangements spatiaux (Ilieva et al. 1992) ainsi que des défauts de compaction de la membrane qui conduisent à des fuites de matériel intracellulaire. La sensibilité des membranes cellulaires au choc froid dépend des espèces. La plupart des espèces aquatiques sont très peu sensibles au choc froid au moins aux températures supérieures à 0 °C (Labbe et al., 1997). Il est suggéré que cette sensibilité peut être liée à la nature des lipides formant la membrane. Or les espèces aquatiques possèdent des membranes riches en phospholipides insaturés entraînant une plus grande fluidité

membranaire à basse température (C. Labbe et al. 1995). Les cellules sont donc moins sensibles vis-à-vis du choc froid.

Ces différents types de dommages affectent la structure et par conséquent la fonction des spermatozoïdes (**Figure 17**). Comme déjà évoqué, la membrane plasmique peut être altérée suite à des cassures de la membrane ou à des pertes de régionalisation entraînant une perte de fonctionnalité des domaines membranaires. La perméabilité de la membrane plasmique peut également être modifiée. Outre la membrane, les mitochondries peuvent également être affectées du fait de leur abondance en membrane. Cela peut entraîner une perte du potentiel énergétique et un relargage d'agents oxydants (radicaux libres). La structure de la chromatine est également une cible de dommages, avec un phénomène de décondensation et de fragmentation de l'ADN (Labbe et al. 2001 ; Zilli et al. 2003). Enfin, comme développé plus haut, l'épigénome du spermatozoïde de poisson, en particulier son niveau de méthylation de l'ADN, peut également être altéré chez certaines espèces (Herranz-Jusdado et al. 2019; Depincé et al. 2020).

Ces altérations structurelles entraînent logiquement des altérations de la fonctionnalité des spermatozoïdes. Une de ces fonctions altérées est la motilité. Ceci peut s'expliquer par l'altération de la membrane incluant une altération ou perte des canaux ioniques sensibles à la composition ionique du milieu extérieur et responsables de l'activation de la motilité. En plus de la motilité, la capacité de fécondation est aussi affectée. Ceci peut être dû aux altérations de la membrane.

Les dommages causés à la descendance obtenue à partir de spermatozoïdes cryoconservés ont été abordés dans peu d'études. Une augmentation des taux de malformations embryonnaires ou une diminution de la survie des embryons a été observée chez certaines espèces comme chez le poisson-chat africain (*Clarias gariepinus*) ou la loche d'étang (*Misgurnus fossilis*) après fécondation avec du sperme cryoconservé (Horváth and Urbányi 2000; Kopeika et al. 2003). En revanche, chez la truite arc-en-ciel, une étude a montré que les survies embryonnaires et les taux de malformés n'étaient pas affectés après fécondation avec du sperme cryoconservé (Martoriati et al. 1999). Par contre, à des stades plus tardifs, il a été montré que des truites juvéniles issues d'une fécondation avec du sperme cryoconservé présentaient une augmentation significative du taux de cortisol moyen (Hayes et al. 2005). Cela indique que la cryoconservation du sperme a induit des modifications de la résistance au stress des descendants. Il a été également montré chez la truite arc-en-ciel que la fécondation avec du sperme cryoconservé entraînait une altération de l'expression de certains gènes dans les embryons et les larves produits (Pérez-Cerezales et al. 2011). Une autre étude menée chez la truite fario *Salmo trutta* a montré que la cryoconservation du sperme induisait une diminution significative de la croissance des larves après l'éclosion (Nusbaumer, Marques da Cunha, and Wedekind 2019). Ces études nous incitent à essayer de comprendre l'origine des dommages observés : génétiques ou épigénétiques.



**Figure 17: Illustration d'une partie d'un spermatozoïde de poissons montrant les principaux types de dommages ayant lieu au niveau de la membrane plasmique, des mitochondries, de l'ADN et de l'ARN pouvant être utilisés comme marqueurs de la qualité du sperme (Cabrita et al. 2014).** Ces marqueurs peuvent identifier les changements dans la motilité, la capacité de fécondation, le développement embryonnaire et la qualité de la descendance.

### 2.2.3 Cryoprotecteurs : perméants et imperméants

Pour protéger les échantillons biologiques des dommages induits par la congélation, des molécules sont ajoutées au milieu et ont un rôle protecteur d'où leur nom de cryoprotecteur. Ces cryoprotecteurs sont divisés en 2 catégories : perméants et imperméants. Les cryoprotecteurs perméants traversent la membrane plasmique tandis que les cryoprotecteurs imperméants ne peuvent pas pénétrer à l'intérieur de la cellule.

#### Cryoprotecteurs perméants

Les cryoprotecteurs perméants sont des molécules ayant un caractère amphiphile. Ainsi, elles sont solubles en milieu aqueux mais elles sont capables de traverser la bicouche lipidique de la membrane plasmique des cellules. Ces molécules ont généralement un faible poids moléculaire, inférieur à 400 Da (revu par Bakhach 2009).

Ces cryoprotecteurs comprennent entre autres le glycérol, premier cryoprotecteur utilisé pour le sperme chez les mammifères, le diméthylsulfoxyde (DMSO) très utilisé pour le sperme de poisson, le méthanol (MeOH), 1,2-propanediol (ou propylène glycol (PG)), diméthyl formamide (DMF) ou le diméthyl acétamide (DMA).

Certains cryoprotecteurs perméants ont un pouvoir osmotique élevé (De Baulny et al. 1997) qui induit une déshydratation de la cellule lors de leur mise en présence. Après équilibration du cryoprotecteur entre les deux compartiments, la cellule retrouve son volume initial du fait de l'équilibre osmotique atteint après la réentrée d'eau. Cette propriété de réduction du volume cellulaire suivie d'un retour à l'équilibre est beaucoup utilisée pour mesurer la perméabilité membranaire des cellules aux différents cryoprotecteurs. Quelques cryoprotecteurs augmentent la perméabilité de la membrane à l'eau, permettant une fuite plus rapide de l'eau intracellulaire lors de la cristallisation, contribuant aussi à l'inhibition de la croissance des cristaux intracellulaires (Akhoondi et al. 2012). Les cryoprotecteurs perméants diminuent par ailleurs la température de cristallisation du milieu extra- et intracellulaire, en réduisant la capacité d'organisation de l'eau en cristaux. Certains cryoprotecteurs augmentent en outre ailleurs la viscosité du milieu, ce qui est favorable à une croissance moindre des cristaux. Ces propriétés ont pour conséquence que les cristaux extracellulaires se forment à plus basse température, ils sont donc de plus petite taille et croissent moins vite du fait de la viscosité élevée atteinte. Il est aussi proposé que les cryoprotecteurs perméants réduisent l'effet osmotique lié aux ions lors de la cristallisation, car ils permettent le maintien d'une plus grande quantité de liquide à l'état vitreux. Ainsi, la nucléation et la croissance des cristaux sont limitées suite à l'augmentation de la viscosité intra- et extracellulaire en présence de cryoprotecteurs, entraînant une dilution des solutés. Pour toutes ces raisons, les cryoprotecteurs limitent aussi la recristallisation durant la décongélation (Chaytor et al. 2012).

Ces molécules présentent en revanche une toxicité importante, en raison de leur nature amphiphile, cette toxicité étant exacerbée à forte concentration en cryoprotecteur ou à haute température (physiologique). L'expression de cette toxicité dépend de plusieurs facteurs dont le cryoprotecteur, le type cellulaire, l'espèce étudiée, la température et le temps de contact (revu par Fuller 2004). Cela indique qu'en modifiant ces facteurs par réduction de la concentration du cryoprotecteur, du temps d'exposition, de la température de contact, la toxicité peut être réduite. Il est donc important de trouver un compromis entre la protection et la toxicité de ces cryoprotecteurs pour chaque type cellulaire.

### Cryoprotecteurs imperméants

Les cryoprotecteurs imperméants sont des molécules solubles dans l'eau qui ne peuvent pas traverser la membrane plasmique. Parmi les cryoprotecteurs imperméants, les plus utilisés sont des sucres mono et disaccharidiques (glucose, fructose, saccharose, lactose, tréhalose), des protéines ou des acides aminés (protéines du lait, albumine, protéines antigél, proline) ou

des lipides (liposomes, jaune d'œuf). Ces cryoprotecteurs peuvent aussi être des macromolécules telles que le polyvinylpyrrolidone (PVP), l'hydroxyéthylamidon (HES) ou l'acide hyaluronique (HA).

Les cryoprotecteurs imperméants agissent seulement sur le milieu extracellulaire et ont un effet osmotique plus restreint que la plupart des cryoprotecteurs perméants (revu par Meryman 2007). Les cryoprotecteurs imperméants agissent néanmoins en augmentant l'osmolarité de l'environnement extracellulaire. Cela contribue à la déshydratation des cellules, avant même que la température d'induction de la nucléation extracellulaire ne soit atteinte, et donc à une plus faible probabilité de cristallisation intracellulaire (revu par Lemma 2011). Les cryoprotecteurs imperméants protègent aussi les cellules de l'éclatement lors de la décongélation, car ils évitent l'entrée massive d'eau dans la cellule en agissant en tant que tampon osmotique lors des étapes d'enlèvement progressif des cryoprotecteurs perméants. Malgré leurs fonctions cryoprotectrices démontrées expérimentalement, il est très compliqué de mettre en évidence la nature des interactions entre ces molécules et les cellules. Ainsi, il est proposé que ces molécules interfèreraient avec la membrane plasmique des cellules et seraient capables de restreindre les dénaturations protéiques induites durant le processus de congélation (Anchordoguy et al. 1987). En effet, il a été démontré que lors de la lyophilisation (conservation par la déshydratation complète des échantillons) les molécules d'eau ont été remplacées par les sucres, ces derniers assurant le maintien des liaisons hydrogènes qui sont indispensables au maintien de la qualité des membranes et des protéines (revu par Crowe et al. 1988). Malgré l'impossibilité d'extrapoler la lyophilisation à la congélation, sachant qu'en congélation, de l'eau résiduelle demeure toujours en état vitreux au niveau des structures cellulaires, des molécules efficaces en lyophilisation ont été testées en congélation aboutissant à un succès. Quant aux protéines antigel, glycosylées ou pas, leur mode d'action est mieux connu vu qu'elles se lient aux cristaux en croissance et modifient leur forme ou limitent leur progression (revu par Feeney, Burcham, and Yeh 1986). Les polymères quant à eux agissent par augmentation de la viscosité du milieu.

## 2.2.4 Cryoconservation du sperme

### Aptitude à la cryoconservation du sperme

L'aptitude du sperme de poisson à la cryoconservation est variable (Labbe 2013). Le sperme frais collecté sur les poissons doit être de très bonne qualité au niveau morphologique et fonctionnel, ce qui exclut les collectes en début ou en fin de saison de reproduction. La collecte d'un sperme de bonne qualité peut aussi poser problème chez certaines espèces modèle dont, paradoxalement, on ne maîtrise pas forcément parfaitement la reproduction artificielle. Cependant, l'aptitude à la cryoconservation du sperme est plus variable que ne l'est la qualité initiale du sperme, au moins telle qu'on peut la juger. En effet, les contraintes induites par la cryoconservation révèlent des fragilités qui ne s'expriment jamais en conditions

physiologiques normales. Il a en outre été montré une forte variabilité de l'aptitude à la cryoconservation entre les espèces. Par exemples, les motilités du sperme sont inférieures à 10-20 % à la décongélation chez les salmonidés (Dziewulska et al. 2011) et les cyprinidés (Morris, Hagen, and Kaken 2008), alors qu'elles sont supérieures à 70 % chez les poissons marins (Fauvel and Suquet 2008; Suquet, Cherehuini, and Fauvel 2008). La fécondation externe chez les espèces à faible potentiel de cryoconservation permet, en augmentant le rapport sperme/œuf, de compenser la faible viabilité du sperme. Ainsi, les taux de fécondation du sperme décongelé de poisson sont peu fréquemment en dessous de 40 % et des taux de 100 % sont couramment obtenus, chez les poissons marins particulièrement. Chez la truite, les taux de fécondation peuvent atteindre 80 % malgré les dommages de la majorité des spermatozoïdes décongelés (De Baulny et al. 1997; C. Labbe et al. 2001).

## Principales méthodes de la cryoconservation du sperme chez les poissons

Les méthodes de cryoconservation du sperme reposent sur les mêmes principes généraux pour toutes les espèces, même en comparant aux oiseaux et aux mammifères (à l'exclusion de la protection contre le choc froid). Par contre, ce qui diffère entre les espèces de poissons est essentiellement le choix du cryoprotecteur, la nature des additifs et la vitesse de congélation (revu par Cabrita et al. 2010). De plus, même au sein d'une espèce, il existe de nombreux protocoles de cryoconservation différents selon les auteurs. Cela indique un manque de standardisation des pratiques à l'échelle internationale.

Chez les poissons, la collecte de sperme se fait sur des mâles matures soit par pression abdominale des animaux anesthésiés, soit par collecte et dilacération des testicules des animaux euthanasiés. Les quantités de sperme obtenues sont très variables selon l'espèce, pouvant aller de 500  $\mu\text{L}$  avec différentes concentrations de sperme (0.2 à  $12 \times 10^9$  spz/mL) chez le turbot, le bar ou le poisson rouge à plus de 30 mL chez la truite avec un sperme concentré (10 à  $50 \times 10^9$  spz/mL). La collecte du plus faible volume de sperme est chez le poisson zèbre (1-3  $\mu\text{L}$ ) alors que le plus grand volume peut être récupéré chez la plupart des espèces d'esturgeons (100 mL).

Après la collecte, le sperme peut être directement mis dans la glace (0-4°C) vu que les spermatozoïdes des espèces aquacoles ne sont pas sensibles au choc froid. Chez les salmonidés, dont la truite, le sperme peut aussi être conservé à ces températures pendant plusieurs jours. Afin d'améliorer la cryoconservation du sperme en limitant l'asphyxie des cellules et les proliférations bactériennes tout en maintenant l'immobilité des cellules, des solutions salines sont habituellement utilisées pour diluer le sperme. Ces solutions salines sont communément élaborées à partir de la composition du fluide séminal. Pour autant, une même solution saline telle que le Storfish® (IMV Technologies, L'Aigle, France) peut être utilisée pour conserver le sperme de plusieurs espèces incluant la truite, la daurade, le turbot, la carpe etc. (revu par Labbe 2013). Cette solution peut également favoriser la maturation du sperme testiculaire. En France, ce temps de conservation est important pour pouvoir envoyer le

sperme à CryoAqua qui est le site centralisé de congélation et de stockage pour les espèces aquacoles (revu par Labbe 2013).

La cryoconservation du sperme nécessite l'utilisation d'un dilueur de congélation qui contribue au maintien de la viabilité des cellules durant la cryoconservation, fournit les ressources énergétiques aux spermatozoïdes, protège les cellules de la température et maintient un environnement adéquat pour les spermatozoïdes afin de survivre pendant la cryoconservation. Le dilueur de congélation a habituellement la même base saline que la solution de conservation. Le dilueur de congélation renferme aussi des additifs imperméants lipidiques et protéiques. Ces additifs renferment entre autres de l'albumine sérique bovine, jaune d'œuf, liposomes et lait écrémé. Cependant, ces additifs peuvent avoir des interactions délétères avec certains cryoprotecteurs perméants (Labbe, Crowe, and Crowe 1997). C'est pour cette raison que les groupes qui utilisent certains additifs ne choisissent pas les mêmes cryoprotecteurs perméants que ceux qui utilisent d'autres additifs.

De plus, l'ajout de sucres est indiqué dans la plupart des protocoles. Parmi ces sucres, le plus fréquemment utilisé est le saccharose. Mais le glucose ou le tréhalose sont également mentionnés. Cependant, très peu de spermatozoïdes de poisson sont capables de métaboliser ces sucres à partir du milieu extracellulaire. Ces sucres exercent donc un rôle cryoprotecteur, comme évoqué précédemment, et ne soutiennent pas le métabolisme cellulaire. La nature du sucre ne semble de plus pas cruciale, puisque le même niveau de cryoprotection a été obtenu chez la truite arc-en-ciel avec une grande variété de sucre différents (Maisse 1994).

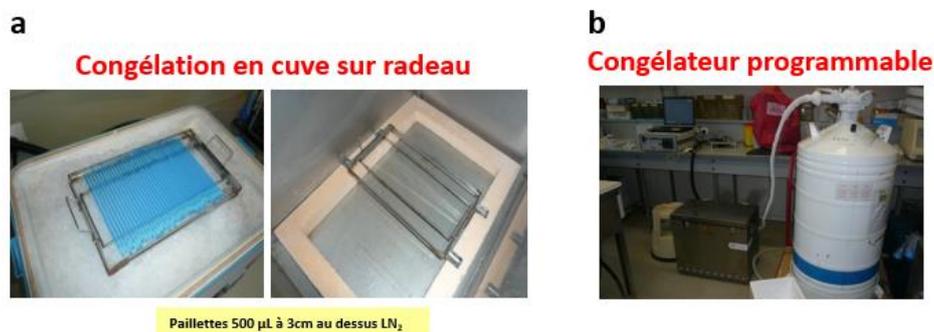
Concernant les cryoprotecteurs perméants, une concentration adéquate est requise pour le développement d'un protocole de cryoconservation, pour éviter le caractère toxique des cryoprotecteurs. Les cryoprotecteurs sont habituellement utilisés à des concentrations finales de 5 à 10 % (en volume). Par contre, les cryoprotecteurs les plus communément utilisés pour la cryoconservation du sperme chez les poissons sont le DMSO, le MeOH et le PG. Le DMSO est le cryoprotecteur le plus utilisé chez les poissons marins et les salmonidés. C'est un des meilleurs cryoprotecteurs rapporté pour la truite arc-en-ciel, et c'est celui qui est proposé dans les kits commerciaux (IMV Technologies). Le méthanol (MeOH) est un autre cryoprotecteur également utilisé chez les salmonidés. Ce cryoprotecteur apporte une protection plus aléatoire selon les mâles et les auteurs chez la truite arc-en-ciel (Ciereszko et al. 2014; Horváth et al. 2015). Il est le meilleur pour la cryoconservation du sperme des cyprinidés (Harvey, Kelley, and Ashwood-Smith 1982), esturgeons (Judycka et al. 2015) et tilapia (Rana and McAndrew 1989). Le propylène glycol est un cryoprotecteur efficace pour la cryoconservation du sperme de *Pleuronectes ferrugineus* (Richardson et al. 1999). Quant au glycérol, c'est une molécule qui apporte une protection structurelle aux spermatozoïdes de truite arc-en-ciel (De Baulny et al. 1997), mais qui ne permet pas de protection fonctionnelle (Ogier de Baulny 1997).

Un même dilueur de congélation peut être utilisé pour plusieurs espèces, sur une base saline commune disponible commercialement (Freezefish<sup>®</sup>, IMV Technologies, L'Aigle, France), le

cryoprotecteur perméant ajouté étant celui le plus adapté à l'espèce. La dilution du sperme dans le dilueur de congélation est très différente selon les auteurs, pouvant aller de 1/1 à 1/9 et est indépendante des espèces.

De plus, le sperme est la plupart du temps conditionné dans des paillettes bovines de 500  $\mu\text{L}$  (IMV Technologies, L'Aigle France). Quant au remplissage des paillettes, il est fait communément grâce à des machines automatiques (MRS1 ou PACE, IMV/CBS, L'Aigle, France).

La congélation s'effectue communément sur un radeau flottant au-dessus de l'azote liquide (**Figure 18a**). La vitesse générale de congélation est conditionnée par la hauteur du cadre de flottaison sur lequel sont déposées les paillettes (3 à 10 cm au-dessus de l'azote liquide). Il s'agit d'une méthode très robuste. Mais la surface de la cuve et la hauteur d'air entre les paillettes et le couvercle supérieur de la cuve conditionnent la vitesse de congélation. Cela entraîne une variabilité entre les groupes appliquant cette méthode. Une autre méthode consiste à utiliser les congélateurs programmables (**Figure 18b**), largement répandus pour les mammifères. Ces derniers permettent de contrôler précisément la courbe de descente en température. Leur usage est moins fréquent, sauf pour le poisson zèbre où il est indispensable, mais est en expansion. Par exemple, l'emploi de ces appareils programmables est envisagé à CryoAqua dans un cadre de standardisation et d'augmentation des débits de congélation pour les espèces aquacoles. Malgré l'application des mêmes principes, le protocole de cryoconservation du sperme doit être optimisé pour chaque espèce.



**Figure 18: Appareils de congélation**

## 2.3 Spécificités des spermatozoïdes de poissons

### 2.3.1 Morphologie et biologie cellulaire du spermatozoïde

Chez la plupart des espèces d'intérêt pour l'aquaculture, la fécondation se fait dans le milieu externe suite à la libération des gamètes matures. Ainsi, des caractéristiques morphologiques spécifiques se présentent suite aux adaptations évolutives qui ont eu lieu afin de permettre la fécondation externe dans des milieux diversifiés. Ces caractéristiques sont donc différentes de celles des mammifères.

Contrairement aux spermatozoïdes des mammifères, les spermatozoïdes de poisson sont immobiles dans le tractus génital. C'est leur libération dans l'eau qui induit leur activation. Chez les espèces d'eau douce, la quasi-absence d'ions dans l'eau (hypo osmolarité) sert de signal aux spermatozoïdes afin d'activer leur motilité (revu par Labbe 2013). Par contre, chez les espèces marines, c'est la concentration élevée en ions dans le milieu (hyper osmolarité) qui induit la motilité (revu par Labbe 2013). D'autres mécanismes ont été développés par d'autres espèces pour activer la motilité des spermatozoïdes. Ces mécanismes incluent la dilution d'un ion spécifique du fluide séminal comme le potassium chez les salmonidés. Ils impliquent aussi des variations dans le pH ou de pression partielle en oxygène (Chauvaud et al. 1995). Ces spécificités sont utilisées par les biologistes pour assurer le stockage des spermatozoïdes par la formulation de dilueurs permettant de conserver les spermatozoïdes dans leur état immobile.

La durée de la motilité est également très variable selon les espèces. Elle dure moins d'une minute pour les salmonidés comme la truite (Perchec, Cosson, and Billard 2007) et les cyprinidés comme la carpe (Perchec, Cosson, and Billard 2007) et le bar (Dreanno et al. 1999) alors qu'elle peut durer plusieurs minutes chez l'esturgeon (Cheer and Clark 1985), le turbot (Dreanno et al. 2000) ou le hareng (Geffen 1999). Il est souvent avancé que cette variabilité de la durée de motilité dépend de la variabilité de la capacité énergétique des gamètes. Ainsi, la composition des dilueurs de conservation prend en compte ces spécificités en ajoutant ou pas des molécules favorables à la production de l'énergie des spermatozoïdes.

Techniquement, la motilité du sperme peut être déterminée au microscope optique en estimant le pourcentage de spermatozoïdes mobiles par champ après dilution du sperme dans un milieu d'activation adapté. Mais cette méthode présente des limites notamment l'absence de l'information sur la durée de la motilité ou sur les autres paramètres cinétiques. Une méthode plus intégrative permet d'enregistrer les trajectoires ainsi que tous les paramètres cinétiques des spermatozoïdes mobiles. Cette technique est un système automatisé d'analyse d'image connu sous le nom de CASA. (Computer Assisted Sperm Analysis).

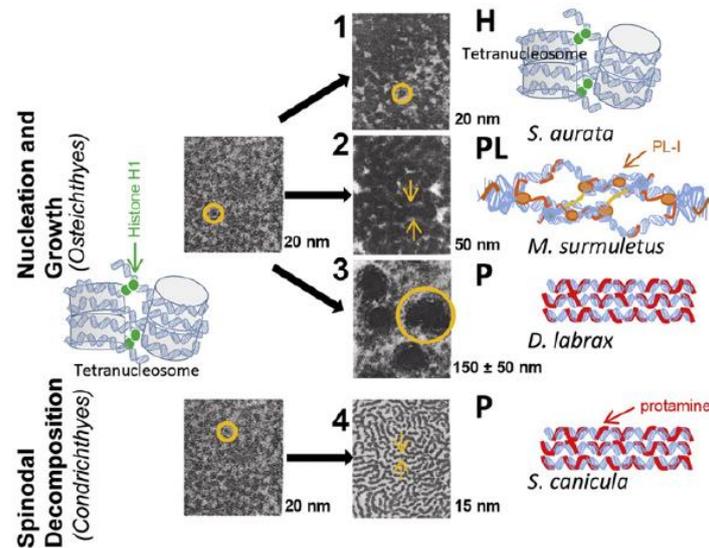
La morphologie des spermatozoïdes est très diversifiée entre les espèces de poissons, en plus d'être très différente entre les poissons et les mammifères. Les principaux composants des spermatozoïdes de poisson sont la tête, la pièce intermédiaire et le flagelle. La structure de ces différents composants a été revue par Cosson et Prokopchuk (Prokopchuk et al. 2017; Cosson 2019).

Chez la plupart des espèces de poissons, la tête a une forme plutôt sphérique avec un diamètre de 2  $\mu\text{m}$  (chez la truite arc-en-ciel) alors qu'elle est allongée (jusqu'à 9  $\mu\text{m}$  en longueur et 2  $\mu\text{m}$  en largeur) chez certaines espèces comme chez l'esturgeon et l'anguille. La tête est occupée par le noyau renfermant l'ADN paternel. Ce noyau est souvent sphérique et la chromatine est homogène et hautement condensée.

Quant aux protéines assurant la compaction de l'ADN, des différences sont observées entre les différentes espèces de poissons, et avec les mammifères. La différence générale entre les cellules somatiques et les spermatozoïdes est le remplacement, durant la spermiogenèse (phase post méiotique de la spermatogenèse), des histones somatiques par des protéines basiques spécifiques au sperme connues (SNBPS). Chez les poissons, les SNBPs sont très diversifiées. Les SNBPs des poissons peuvent être classées en 3 groupes : histones (H), protamines (P) et protamine-like (PL). Quelques espèces comme la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Silvia González-Rojo et al. 2014), le saumon Kéta (*Oncorhynchus keta*) (revu par Frehlick et al. 2006), le bar (*Dicentrarchus labrax*) et la petite roussette (*Scyliorhinus canicula*) ont totalement remplacé les histones par des protamines. Par contre, d'autres espèces, comme le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Ausió, González-Romero, and Woodcock 2014), la daurade royale (*Sparus aurata*), le poisson rouge (*Carassius auratus*) (Muñoz-Guerra et al. 1982) maintiennent des protéines similaires aux histones somatiques (somatic like histones) avec une absence de protamines. De plus, certaines espèces comme chez le rouget barbet (*Mullus surmuletus*) présentent des SNBPs avec des caractéristiques intermédiaires entre protamines et histones appelées protéines similaires aux protamines (protamine-like) (Núria Saperas et al. 2006).

Selon le type de SNBP, 4 types de compaction de la chromatine peuvent être distingués. Le premier type est la structure fibro-granulaire. Cette structure est présente chez les espèces ayant des histones en tant que SNBP comme la daurade (Kurtz et al. 2009) (**Figure 19**). Un autre type de structure présent chez les espèces ayant des protamine-like comme le rouget barbet est la formation des complexes nucléoprotéiques très entrelacés (Núria Saperas et al. 2006). Chez les espèces où les histones sont remplacées par des protamines riches en arginines comme chez le bar, des complexes nucléoprotamines fortement condensés sont présents (N. Saperas et al. 1993). Par contre, chez les espèces ayant des protamines contenant, en plus de l'arginine, des cystéines comme chez la petite roussette (*Scyliorhinus canicula*), les complexes nucléoprotamines deviennent des structures lamellaires de 15 nm environ d'épaisseur. Chez les espèces avec des histones spermatiques comme le poisson zèbre, le degré de compaction est atteint grâce à une expression plus élevée des histones de liaison H1 (S.-F. Wu, Zhang, and Cairns 2011a). Ces différences de compaction de la

chromatine suggèrent que dans le cadre de l'analyse de l'effet d'une biotechnologie sur la chromatine, différentes altérations de la chromatine peuvent être possibles.

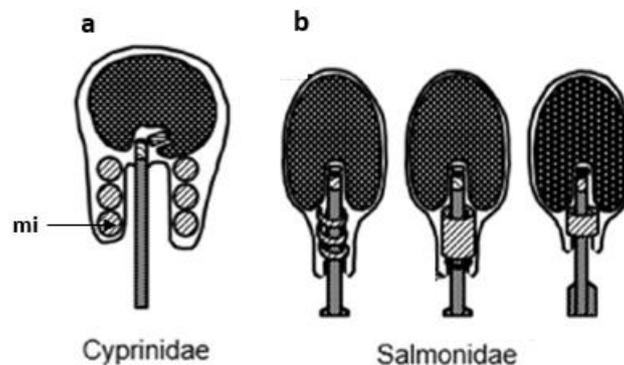


**Figure 19 : Les différents types de compaction de chromatine résultant de 3 types majeurs de SNBP (H, PL et P) (Herráz et al. 2017).** H : histones ; PL : protamine-like et P : protamine. Les petits cercles représentent les tétra-nucléosomes, les grands cercles indiquent les structures  $150 \pm 50$  nm. L'ADN est en bleu, histone H1 (en vert), PL : en orange, protamine : en rouge et le cœur d'histone du nucléosome est représenté par des cylindres gris.

Quant à l'acrosome, il est absent chez les poissons téléostéens, poisson osseux à squelette ossifié de la classe des actinoptérygiens alors qu'il est présent chez l'esturgeon (classe des chondrostéens). Ainsi, chez les poissons téléostéens qui constituent la majorité des espèces aquacoles, la fécondation a lieu à travers un petit orifice appelé micropyle qui traverse les membranes protectrices de l'ovocyte. Cette absence d'acrosome destiné à digérer les membranes de l'ovule fait que les spermatozoïdes n'ont pas toute la machinerie enzymatique associée à la fécondation spécifiquement celle induisant la production de radicaux libres. Cette caractéristique rend le sperme moins sensible aux phénomènes de peroxydation que chez les mammifères.

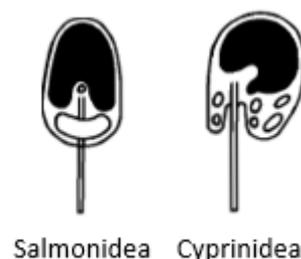
La pièce intermédiaire est formée de mitochondries et de centrioles. Concernant les mitochondries, le manchon mitochondrial présent chez les mammifères est absent chez les poissons téléostéens. Cependant, selon les espèces, 1 mitochondrie circulaire (truite arc-en-ciel) ou 6-7 mitochondries peuvent être trouvées, issues de la fusion des mitochondries goniales lors de la spermiogénèse. Ce faible nombre de mitochondrie diminue considérablement la source de radicaux libres qui sont produits lors de la respiration, par comparaison aux mammifères. Cela peut cependant entraîner une plus faible capacité de production énergétique dans les cellules. De plus, les mitochondries des poissons peuvent être cylindriques ou sphériques (**Figure 20**). Par contre, les spermatozoïdes humains et ceux des autres mammifères ont des mitochondries ovales. Les mitochondries produisent également

de l'énergie pour la motilité. Cette énergie produite sous forme d'ATP est stockée tout le long du flagelle sous forme d'ATP, de créatine phosphate, et d'AMPc notamment.



**Figure 20 : Morphologie des mitochondries de spermatozoïdes de poissons (adapté de Ulloa-Rodríguez et al. 2017).** mi : mitochondrie. Représentation schématique de l'ultrastructure des spermatozoïdes de quelques poissons téléostéens montrant la forme des mitochondries. Ces schémas sont basés sur ceux de Lahnsteiner and Patzner 2008. a. Gardon de la mer Noire ; b. Ombre commun ; Corégone ; Truite arc-en-ciel (de gauche à droite).

Le complexe centriolaire de la pièce intermédiaire est constitué des centrioles proximaux et distaux formant le corps basal du flagelle. Ce dernier est utilisé pour que le flagelle se fixe à la tête du spermatozoïde. En effet, l'insertion du flagelle dans la tête du spermatozoïde est un élément morphologique important (**Figure 21**). Cette insertion va conditionner la solidité du lien tête-flagelle. Chez les salmonidés, le flagelle est inséré dans une invagination du noyau environ au tiers de la hauteur du noyau, tandis que chez les cyprinidés, cette insertion a lieu à la base du noyau.



**Figure 21 : Insertion du flagelle dans la tête des spermatozoïdes des salmonidés et cyprinidés (adapté de Mattei 1991).**

Quant au flagelle, il s'agit d'un organe hautement conservé durant l'évolution. Il est également quasi identique entre les flagelles des protozoaires allant jusqu'à ceux de l'humain. La taille du flagelle du spermatozoïde varie entre 20 à 100  $\mu\text{m}$  selon les espèces de poissons. Le mouvement du flagelle peut avoir lieu grâce à son système cylindrique de microtubules

hautement organisé appelé axonème. L'axonème est formé de 9 paires de doublets de microtubules et une paire centrale de microtubules en singlet d'où l'organisation en « 9 + 2 ». Par contre, chez les Anguilliformes, le flagelle des spermatozoïdes présente un pattern « 9 + 0 » avec une absence des microtubules centraux (Gibbons, Baccetti, and Gibbons 1985). Contrairement aux spermatozoïdes de poissons qui ne possèdent pas de tubes fibreux, ces derniers sont présents chez les mammifères où ils entourent l'axonème de leurs spermatozoïdes. Le flagelle du spermatozoïde des truites arc-en-ciel possède aussi deux extensions cytoplasmiques symétriques opposées (Billard 1983) (**Figure 22**).



**Figure 22 : Extensions cytoplasmiques symétriques opposées du flagelle du spermatozoïde de la truite arc-en-ciel (adapté de Billard 1983).**

### 2.3.2 Épigénome du spermatozoïde

L'épigénome du spermatozoïde joue un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le développement embryonnaire.

La méthylation de l'ADN a lieu majoritairement dans un contexte CpG chez les poissons, et elle atteint des valeurs très élevées dans le sperme, notamment chez la truite arc-en-ciel (en moyenne 87 % des CpGs) (Brionne et al. 2023) et le poisson zèbre (en moyenne 91-95% des CpGs) (L. Jiang et al. 2013; Potok et al. 2013). Il a été montré chez la truite arc-en-ciel que les méthylations dans un contexte CHG et CHH (H représentant A, T ou C) sont détectées à des taux inférieurs à 1 % au niveau des spermatozoïdes (Brionne et al. 2023). Chez le poisson zèbre, la méthylation dans un contexte non CpG est de 1,39 % (Potok et al. 2013).

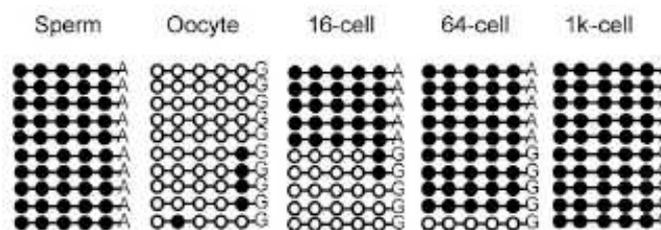
La méthylation des CpGs n'est pas distribuée d'une façon aléatoire tout au long du génome. Certaines régions du génome renferment une plus grande densité de CpGs méthylés. Ainsi, la distribution des taux de méthylation de l'ADN n'est pas identique entre les différentes régions fonctionnelles du génome. En effet, chez la truite arc-en-ciel, il a été démontré que les corps des gènes ainsi que les éléments répétés présentent des taux de méthylation particulièrement élevés (Brionne et al. 2023). Cependant, les promoteurs proximaux (1 kb en amont du TSS (transcription start site)) présentent une baisse importante de la méthylation des CpGs (Brionne et al. 2023). Ainsi, chez la truite arc-en-ciel comme chez la plupart des vertébrés, les corps des gènes et les éléments répétés sont hautement méthylés alors que les promoteurs

présentant des taux de méthylation plus hétérogènes semblent être dépourvus de méthylation (Brionne et al. 2023). La présence d'une hypométhylation a été également observée chez le poisson zèbre au niveau des promoteurs des gènes liés à la régulation du développement, des facteurs de transcription et du métabolisme et de la biosynthèse (Potok et al. 2013; L. Jiang et al. 2013). Comme chez le poisson zèbre, les promoteurs des gènes du développement du spermatozoïde sont également hypométhylés chez l'humain (Hammoud et al. 2009). L'hypométhylation de ces promoteurs chez les poissons et l'humain indique un état permissif de l'expression de ces gènes qui est essentiel pour que le développement embryonnaire ait lieu.

La méthylation de l'ADN du spermatozoïde n'est pas la seule marque épigénétique fonctionnelle dans cette cellule. Une méthylation donnée peut être additionnellement régulée par des marques histones spécifiques. Il a été montré que quelques loci importants pour le développement embryonnaire sont riches en marques d'histones répressives transitoires même s'ils sont hypométhylés (S.-F. Wu, Zhang, and Cairns 2011). Il a été également démontré que des gènes hypométhylés dominés par des facteurs de transcription embryonnaires ne sont pas nécessairement enrichis par des marques d'histones actives (S.-F. Wu, Zhang, and Cairns 2011). Par contre, les enrichissements en marques d'histones actives (H3K4me3, H3K4me2 et H3K14ac) les plus importants sont localisés au niveau des gènes liés à la méiose et à la spermatogenèse (S.-F. Wu, Zhang, and Cairns 2011). Pourtant, plus globalement, les marques d'histones dans les spermatozoïdes semblent être corrélées avec l'expression des gènes dans l'embryon : les gènes exprimés avant ou au début de la transition à mi-blastula (MBT, quand le génome embryonnaire est massivement actif) sont enrichis par des marques d'histones actives alors que ceux qui sont exprimés plus tard durant le développement présentent un pattern de chromatine multivalent renfermant H3K4me3, H3K27me3 et une hypométhylation de l'ADN (S.-F. Wu, Zhang, and Cairns 2011).

### 2.3.3 Transmission possible de l'épigénome à la descendance par le spermatozoïde

Le rôle du spermatozoïde de poisson dans la transmission d'informations épigénétiques à la descendance a été démontré au niveau du méthylome chez le poisson zèbre (Potok et al. 2013; L. Jiang et al. 2013). Ces auteurs ont montré que le profil de méthylation établi dans certaines régions génomiques du spermatozoïde servait de guide à la mise en place d'un profil de méthylation similaire dans l'embryon avant même l'activation du génome embryonnaire (**Figure 23**). De façon plus expérimentale, il a été démontré par ailleurs chez le xénope qu'un méthylome non conforme de la chromatine paternelle (spermatide injectée par ICSI) entraînait, entre autres, une altération du méthylome de l'embryon, induisant des défauts de développement précoce (Teperek et al. 2016).



**Figure 23 : Programmation du méthylome embryonnaire sur la base du profil de méthylation paternel (L. Jiang et al. 2013).** Les modifications de la méthylation de l'ADN pour un locus représentatif dans le chr 6 : 27,393,375-27,393,560 suivies avec des SNPs (single nucleotide polymorphisms) a permis de distinguer l'ADN maternel de l'ADN paternel. Les données ont été obtenues par la méthode de MethylC-seq. 10 reads ont été sélectionnés aléatoirement pour le sperme et l'ovocyte. 5 reads des données paternelles et 5 reads des données maternelles sont sélectionnés aléatoirement dans les stades 16 cellules, 64 cellules et 1 000 cellules de l'embryon de poisson zèbre (ce dernier stade étant celui de l'activation du génome embryonnaire).

La question du mécanisme de cette transmission du profil de méthylation du spermatozoïde vers l'embryon a été explorée chez le poisson zèbre. Murphy et al, 2018 ont décrit la présence de nucléosomes particuliers, les placeholder nucleosomes, qui contiennent un variant de l'histone H2A (H2AFV) et la marque H3K4me1 (Murphy et al. 2018). Ces nucléosomes particuliers occupent toutes les régions promotrices hypométhylées de l'ADN du spermatozoïde. Après fécondation, ils sont maintenus par la machinerie de l'embryon précoce. Lors de l'activation du génome zygotique, les gènes dont les régions promotrices portent ces placeholder nucléosomes deviennent soit actifs par gain de H3K4me3 (modification permissive), soit réprimés de façon transitoire par gain de H3K4me3 et H3K27me3 (modification à effet répressif transitoire). Par ailleurs, Liu et al. 2018 ont montré que les régions promotrices de gènes les plus hypométhylées dans le spermatozoïde se retrouvaient associées à une plus grande quantité de chromatine ouverte (pics d'ATAC seq) dans l'embryon après l'activation de son génome, ce qui corrobore la transmission d'une information de nature permissive du spermatozoïde vers l'embryon par le biais du profil de méthylation du spermatozoïde.

Ces éléments de transmission du spermatozoïde à l'embryon donnent un poids considérable à tout phénomène environnemental qui induirait une modification du profil de méthylation des spermatozoïdes. Nous avons vu précédemment (partie 2.1 de cette synthèse bibliographique) que les facteurs environnementaux et certaines biotechnologies telles que la cryoconservation sont capables d'entraîner des modifications de la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes des géniteurs exposés. Pour autant, la question de la transmission de telles modifications est rarement traitée. Chez des saumons atlantiques domestiqués, dont la méthylation des spermatozoïdes a été modifiée, il a été montré que les F1 ont des modifications de la méthylation de leur ADN hépatique, et certains de leurs paramètres

morphologiques sont par ailleurs modifiés (Wellband et al. 2021). Chez le médaka, les spermatozoïdes de mâles F2 issus de grands-parents soumis à un stress hypoxique (dont la méthylation du sperme est modifiée) présentent une hyperméthylation globale de leurs spermatozoïdes par rapport au contrôle de la même génération (S. Y. Wang et al. 2016).

En ce qui concerne l'effet de la cryoconservation du sperme sur la descendance, bien que des modifications phénotypiques aient été rapportées (partie 2.2 de cette synthèse bibliographique), nous n'avons trouvé aucune étude qui ait étudié les modifications épigénétiques éventuelles de ces descendants.

### 3. Objectifs de la thèse et stratégie expérimentale retenue

Nous avons vu dans cette synthèse bibliographique que la cryoconservation du sperme induisait des contraintes physico-chimiques majeures pour les spermatozoïdes, et que dans certains cas, l'utilisation de sperme cryoconservé induisait des modifications phénotypiques de la descendance. Nous avons aussi vu que le profil de méthylation de l'ADN du spermatozoïde de poissons jouait un rôle important dans la mise en place des marques épigénétiques dans l'embryon, et qu'un profil altéré dans les spermatozoïdes était susceptible d'altérer la qualité de la progéniture. Nous nous posons donc la question du risque de transmission d'altérations à la descendance en cas d'altération de la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes. Or l'étude de l'impact de l'environnement ou des biotechnologies de reproduction, notamment la cryoconservation, est compliquée à réaliser chez les embryons étant donné les différents facteurs qui entrent en jeu : intervention de la chromatine maternelle, impact de l'environnement propre à l'embryon, mise en place des différents tissus ayant leur signature épigénétique propre, stade de la vie de l'animal auquel peut s'exprimer l'altération. Nous pensons donc que l'étude de ce risque doit être réalisée en amont, au niveau des spermatozoïdes.

La question scientifique abordée dans cette thèse est donc de comprendre si la cryoconservation du sperme peut modifier le profil de méthylation de l'ADN du spermatozoïde chez les poissons. Nous voulons également explorer si la nature des altérations de la qualité cellulaire du sperme décongelé peut influencer le niveau d'altération de la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes. Un autre questionnement de ce projet est de comprendre si la nature chimique des cryoprotecteurs utilisés joue un rôle dans les altérations possibles de la méthylation de l'ADN.

Le modèle choisi dans cette étude est la truite arc-en-ciel. Il s'agit d'un poisson téléostéen appartenant à la famille des salmonidés, comme le saumon atlantique. Nous avons choisi ce modèle animal car il a un fort intérêt économique en France, et une importante représentation de son sperme congelé dans la cryobanque nationale française. De plus, son génome est séquencé. Cela permet la réalisation des analyses bio-informatiques incluant l'alignement au génome. Outre ces avantages, le mâle produit une quantité de sperme très importante à sa période de maturation, ce qui permet d'avoir assez de sperme pour toutes les conditions, le sperme frais contrôle d'une part et le sperme cryoconservé d'autre part.

Pour induire des situations contrastées présentant des cryoprotecteurs cellulaires variables, ainsi que pour traiter de l'impact des différentes molécules cryoprotectrices sur la méthylation de l'ADN, le sperme mature émis par des truites arc-en-ciel mâles a été cryoconservé dans 3 cryoprotecteurs différents : le DMSO, le MeOH et le glycérol. Le DMSO est un des meilleurs cryoprotecteurs rapporté pour la truite arc-en-ciel. Pour autant, c'est une molécule extrêmement réactive chimiquement car elle renferme un groupement sulfoxyde et 2 groupements méthyl. La réactivité du DMSO a été démontrée in vitro par une étude qui a démontré que le DMSO peut produire des groupements méthyls réactifs en présence des

espèces réactives à l'oxygène (ROS) entraînant la méthylation des cytosines de l'ADN purifié (Kawai et al. 2010). Le méthanol (MeOH) est un autre cryoprotecteur également utilisé chez les salmonidés. Nous avons vu que ce cryoprotecteur apporte une protection plus aléatoire selon les mâles et les auteurs chez la truite arc-en-ciel. En comparant au DMSO, c'est une molécule beaucoup moins réactive chimiquement vu qu'elle renferme un groupement OH. Nous avons choisi ces 2 cryoprotecteurs afin d'étudier l'effet de 2 cryoprotecteurs perméants méthylés dont l'un, renfermant un groupement sulfoxyde, est plus réactif que l'autre. Quant au glycérol, nous avons vu dans la synthèse bibliographique que c'est une molécule connue pour apporter une protection structurelle aux spermatozoïdes de truite arc-en-ciel, mais qui ne permet pas de protection fonctionnelle. Cette troisième condition avait pour objectif de tester si des altérations de la fonctionnalité des spermatozoïdes avait des répercussions sur l'intégrité du profil de méthylation de l'ADN.

Le premier travail de la thèse a été d'analyser l'effet de la cryoconservation du sperme sur la qualité cellulaire des spermatozoïdes en fonction du cryoprotecteur utilisé. Les critères que nous avons sélectionnés pour évaluer la qualité cellulaire du sperme décongelé sont la qualité membranaire, la qualité des mitochondries, la motilité et la capacité de fécondance. La qualité membranaire est étudiée par la mesure de son intégrité physique, notamment son imperméabilité à une petite molécule hydrosoluble, l'iodure de propidium. Pour l'étude de la qualité des mitochondries, nous avons utilisé un marqueur de l'activité mitochondriale, le JC-1. La motilité a été déterminée avec un système automatisé d'analyse d'image (CASA - Computer Assisted Sperm Analysis) qui permet d'enregistrer la trajectoire des spermatozoïdes ainsi que plusieurs paramètres cinématiques. Quant à la capacité de fécondation des spermatozoïdes, elle rend compte de l'intégralité de la fonctionnalité des spermatozoïdes. Elle a été déterminée par des tests de fécondance.

La seconde tâche de la thèse a été l'analyse de la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes. La méthode que nous avons choisie pour analyser la méthylation de l'ADN en contexte CpG est le RRBS. Comme évoqué dans la synthèse bibliographique, le RRBS, repose sur une digestion de l'ADN génomique par une enzyme de restriction spécifique suivie d'une conversion au bisulfite de l'ADN. Cette méthode permettant de représenter le génome d'une façon réduite, la quantité réduite de données de séquençage produites nous a permis d'analyser plusieurs réplicats biologiques et d'étudier quatre conditions expérimentales (sperme frais, et cryoconservé avec 3 cryoprotecteurs différents). L'analyse des données issues du RRBS a été réalisée en deux étapes. Nous avons d'abord étudié dans quelle mesure les données réduites obtenues étaient bien représentatives du génome entier de la truite. Nous avons réalisé cette étude sur le jeu de données des spermes frais, qui a donné lieu à l'écriture d'une publication (soumise à *Fish Physiology and Biochemistry*). Dans une seconde étape, nous avons exploré dans quelle mesure les caractéristiques de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes cryoconservés dans les trois cryoprotecteurs divergeaient de celles des échantillons frais, et nous avons recherché le lien possible avec les données sur les dommages cellulaires. Cette seconde étape a fait l'objet de l'écriture d'une seconde publication (en révision à *Scientific Reports*).

# Partie II : Matériel et méthodes

# 1. Collecte du sperme et procédure de cryoconservation

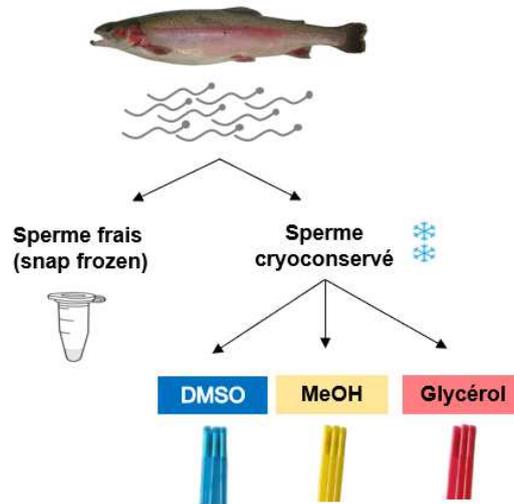
Des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) mâles matures, âgées de deux ans et ayant un poids moyen de 1,2 kg, de la souche SYNTHETIQUE provenant de la pisciculture expérimentale d'INRAE (UE PEIMA) ont été transférées dans les circuits recirculés des infrastructures d'élevage de l'unité (ISC-LPGP). Les mâles ont été stabulés à 12°C sous photopériode naturelle. La collecte du sperme des 6 premiers mâles a eu lieu 13 jours après le transfert des poissons et 22 jours après leur transfert pour les 6 autres mâles. La manipulation des poissons a été effectuée dans le strict respect des principes de la réglementation française sur les animaux de laboratoires, des réglementations française et européenne sur le bien-être des animaux (Autorisation N° 005239 niveau 1 ; C. Labbé).

Avant la collecte du sperme, les mâles ont été anesthésiés dans un bain de Tricaine/biocarbonate de soude (80 mg/L et 500 mg/L d'eau du circuit d'élevage respectivement). Chaque mâle a été pêché et manipulé avec des gants lisses et des serpillières humides pour empêcher la perte du mucus protecteur. L'urine a été éliminée par pression sur la vessie afin d'éviter la contamination du sperme. La collecte du sperme a eu lieu par la méthode dite du stripping. Cette méthode consiste en une pression abdominale antéro-postérieure manuelle qui permet la libération du sperme. Ce dernier a été directement conservé à 4°C. La concentration du sperme frais a été mesurée par cytométrie en flux et ajustée à  $6 \times 10^9$  spz/mL dans du SFMM (seminal fluid-like mineral medium) (composition **Table 3**), pour s'affranchir de la variabilité de la concentration inter-mâles. Le SFMM est un milieu utilisé pour la dilution des spermatozoïdes de truite arc-en-ciel et de poisson rouge. Il permet de contrôler le pH et de conserver le sperme pendant au moins 24h.

Produits	PM (en g/mol)	Molarité (en mM)	Quantité (g) dans 1L (H <sub>2</sub> O)
NaCl	58,44	110	6,4 g
KCl	74,55	28,3	2,1 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	246,47	1,1	0,3 g
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	147,02	1,8	0,26 g
Bicine	163,2	10	1,63 g
Hépès de sodium	260,3	10	2,6 g

**Table 3 : Composition du milieu SFMM.** pH 8. Osmolarité 290 mOsm/L . PM : poids molaire. SFMM : seminal fluid-like mineral medium

Le sperme de chaque mâle a été immédiatement divisé en 4 fractions : 1 fraction qui a subi une congélation ultrarapide dans l'azote liquide (snap freezing) et 3 autres fractions qui ont été cryoconservées avec respectivement du DMSO, du MeOH, et du glycérol (**Figure 24**).



**Figure 24: Design expérimental**

Concernant le snap freezing, une fraction contenant  $25 \times 10^6$  spermatozoïdes placée dans un tube eppendorf (volume  $\leq 10 \mu\text{L}$ ) a été plongée directement dans l'azote liquide. Ce sperme a été ensuite stocké à  $-80^\circ\text{C}$ . Cette fraction de sperme figée par la congélation ultra-rapide correspond à notre contrôle frais. Cette fraction n'a pas été soumise à l'ensemble du processus de cryoconservation, c'est-à-dire qu'elle n'a pas été exposée au cryoprotecteur, ni aux processus de congélation et décongélation lentes. Par conséquent, elle n'a pas subi les dommages associés à ces processus. Ainsi, le snap freezing fige tout le matériel cellulaire sans aucun risque d'interactions cellulaires ou biochimiques.

Pour la cryoconservation du sperme, un volume de sperme frais à  $6 \times 10^9$  spz/ml a été ajouté à un volume de kit FreezeFish (IMV Technologies ref 026913) renfermant du Freezesol (solution saline + saccharose), du cryoprotecteur (DMSO ou MeOH ou glycérol) à 15 % du volume total et du Freezlip (suspension de liposomes) à 2,5 % du volume total. La concentration finale en cryoprotecteur et en liposomes est de 7,5 % et 1,25 % respectivement (en volume). Le mélange du sperme et de la solution de cryoconservation a été introduit dans des paillettes bovines de  $500 \mu\text{L}$  (36 à 48 paillettes par mâle et 144 à 192 paillettes par condition). Ces paillettes ont été ensuite alignées sur des racks inox qui ont été déposés dans la cuve du congélateur programmable Micro DigitCool (IMV Technologies). La cryoconservation de ces paillettes a été réalisée avec le programme IMV Technologies validé dans le projet Biogerm (courbe bovine rapide). Après la congélation, les paillettes sont plongées dans l'azote liquide et transférées dans des bonbonnes d'azote liquide jusqu'à leur utilisation.

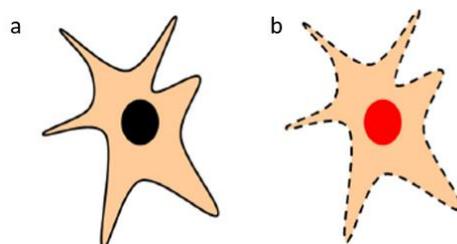
La décongélation du sperme a été réalisée par immersion des paillettes pendant 10 s dans un bain marie à 37°C. Le sperme décongelé est ensuite lavé du cryoprotecteur en le diluant dans du SFMM (1 vol + 20 vol) suivi d'une centrifugation à 200 g pendant 10 min à 4 °C. Le culot est repris à  $100 \times 10^6$  cellules/mL dans du SFMM. Il est maintenu à 4 °C quelques minutes maximum avant utilisation.

## 2. Analyse de la qualité cellulaire du sperme décongelé

L'analyse de la qualité des spermatozoïdes n'a été réalisée que sur les échantillons décongelés, puisque l'objectif de cette étape était d'objectiver la variabilité de la qualité cellulaire du fait de la cryoconservation. De plus, la qualité du sperme frais chez la truite arc-en-ciel est toujours très élevée et très homogène lorsque les mâles sont collectés au cœur de leur saison de reproduction, ce qui a été le cas dans nos expérimentations. Comme indiqué plus loin, un contrôle de motilité a permis de vérifier que tous les spermatozoïdes frais collectés étaient de la plus haute qualité, et qu'aucun accident de manipulation ne les avait dégradés.

### 2.1 Qualité des membranes

La qualité des membranes a été évaluée après marquage des cellules à l'iodure de propidium (IP). L'iodure de propidium est une molécule fluorescente rouge (Exc. 535 nm ; Émi. 617 nm si liaison à l'ADN), hydrophile, ayant une capacité pratiquement nulle à traverser les membranes intactes des cellules viables. Lorsque la membrane plasmique d'une cellule est endommagée, ce fluorochrome pénètre dans la cellule et s'intercale entre les bases de l'ADN du noyau (**Figure 25**). Ses propriétés physico-chimiques font que sa liaison à l'ADN décuple l'intensité du signal fluorescent émis (x 30), ce qui évite le recours au lavage des cellules pour éliminer le fluorochrome libre.



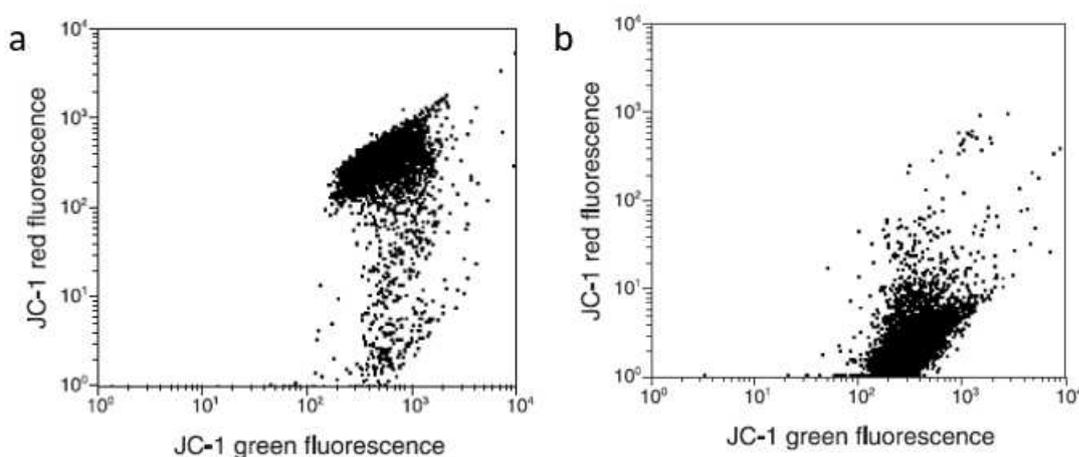
**Figure 25: Représentation schématique des noyaux marqués ou pas par l'iodure de propidium (Gutiérrez et al. 2017).** a. Cellule ayant une membrane intacte et un noyau non marqué à l'IP. b. Cellule ayant une membrane altérée et un noyau marqué à l'IP.

Les échantillons du sperme frais et décongelé dilués à  $1 \times 10^6$  cellules/mL dans du SFMM ont été incubés avec l'iodure de propidium à une concentration finale 24 nM pendant 2 min à 4°C. Le pourcentage de cellules non marquées (cellules avec des membranes plasmiques intactes) a été évalué par la cytométrie en flux (Ref 130-096-343, MACSQuant Analyzer 10). Dans nos conditions d'analyse, l'IP a été excité à 488 nm (laser bleu) et la fluorescence émise a été mesurée sur un filtre de bande passante 655-730 nm (filtre rouge). Des duplicats techniques de chaque échantillon ont été mesurés (2 marquages suivis de 2 mesures de la même suspension cellulaire) et une valeur moyenne par échantillon a été calculée.

## 2.2 Qualité des mitochondries

La qualité des mitochondries a été évaluée par le marquage JC-1 en utilisant le kit MitoProbe™ JC-1 Assay Kit for Flow Cytometry (M34152, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Le JC-1 est un fluorochrome cationique ayant un pic d'excitation à 514 nm. Il marque toutes les mitochondries indépendamment de leur activité, sous forme de monomères de JC-1 ayant une fluorescence qui émet dans le vert (529 nm). En théorie, quand le potentiel membranaire mitochondrial est élevé (mitochondrie fonctionnelle), le JC-1 se concentre avec les protons dans l'espace intermembranaire mitochondrial et forme des agrégats dont la fluorescence émet alors dans le rouge (590 nm).

Ainsi, d'après le principe théorique proposé par le fournisseur, il semble qu'il faille rechercher des valeurs stables du vert (présence des monomères en quantité constante dans les membranes, représentative de la quantité de membrane), et que les variations du rouge rendent compte des variations de la fonctionnalité des mitochondries (**Figure 26**).



**Figure 26 : Profils de cytométrie en flux des cellules Jurkat marquées au JC-1 (Notice du JC-1, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific).** a. Cellules cultivées non traitées, marquées au JC-1. Les cellules ont incorporé le marqueur (green fluorescence en X) et la présence d'un marquage rouge (red fluorescence en Y) signe l'accumulation du JC-1 du fait de l'activité mitochondriale des cellules analysées. B. Cellules cultivées, traitées avec l'agent découplant de la chaîne de transport des électrons

CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone), et marquées au JC-1. L'accumulation de rouge liée à l'activité mitochondriale des cellules a diminué considérablement.

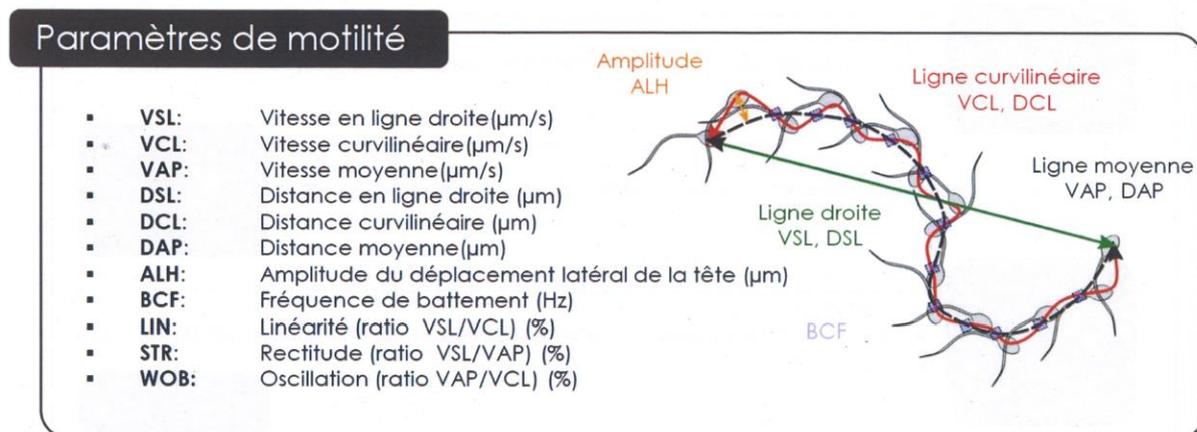
Ainsi, le ratio d'intensité de fluorescence rouge/vert diminue en cas de dépolarisation des mitochondries de la cellule analysée. L'intérêt de ce ratio est qu'il dépend uniquement du potentiel membranaire mitochondrial et non pas d'autres facteurs tels que la taille des mitochondries, leur forme et leur densité, paramètres qui pourraient influencer l'intensité de fluorescence dans le cas de molécules à un seul signal.

Pour évaluer la qualité des mitochondries de nos échantillons, le sperme décongelé dilué à  $1 \times 10^6$  cellules/mL dans du SFMM a été incubé avec du JC-1 à une concentration finale de 0,5  $\mu\text{M}$  pendant 15 min à 20 °C. Le JC-1 a été préparé à partir d'une solution mère à 50  $\mu\text{M}$  dans du DMSO pur, et une prise d'essai de 5  $\mu\text{L}$  de cette solution mère a été ajoutée à 495  $\mu\text{L}$  de la suspension de spermatozoïdes. Un contrôle de la même suspension cellulaire mais sans JC-1 (5  $\mu\text{L}$  de DMSO seul) a été réalisé afin de vérifier comment le DMSO affectait le profil cellulaire (taille/structure) et de valider la concentration de la suspension cellulaire dans la fenêtre d'analyse du cytomètre. Les échantillons ont été ensuite mesurés par cytométrie en flux à une excitation de 488 nm (laser bleu) et avec une analyse simultanée des intensités d'émission dans le vert (filtre 500-550 nm) et dans le rouge (filtre 565-605 nm). Chaque échantillon a été mesuré en triplicats (3 marquages suivis de 3 analyses de la même suspension de spermatozoïdes). En effet, au cours de nos mises au point, nous avons déterminé que des réplicats techniques constituaient une bonne sécurité d'analyse. Cette analyse a été réalisée à temps fixe post-décongélation (56 min 37 s  $\pm$  18 s)

## 2.3 Motilité

La motilité du sperme frais a été mesurée au microscope optique en estimant le pourcentage de spermatozoïdes mobiles par champ. Du fait de la très bonne motilité du sperme frais, cette mesure était juste destinée à s'assurer que tous les spermatozoïdes retenus dans l'expérience étaient de très bonne qualité (> 99 %). Nous avons ensuite estimé une moyenne de spermatozoïdes mobiles sur un ensemble de champs. A cet effet, sur une lame de microscopie, 2  $\mu\text{L}$  de sperme frais ( $60 \times 10^6$  spermatozoïdes/mL) ont été activés avec 20  $\mu\text{L}$  d'Actifish (REF. 018274, IMV Technologies) avec de la BSA à 5 mg/mL. La mesure a été faite au microscope sur fond noir (LEITZ DMRB, Leica) à un grossissement x 400 immédiatement après l'activation.

La motilité du sperme décongelé a été mesurée de façon plus poussée avec un système automatisé d'analyse d'image (CASA : Computer Assisted Sperm Analysis) IVOSII (Hamilton Thorne) en utilisant le programme "HTCasall" (IMV Technologies). Les spermatozoïdes retenus comme mobiles ont été sélectionnés sur la base d'une VAP (average path velocity) > 30  $\mu\text{m/s}$ , et les spermatozoïdes retenus comme progressifs ont une VAP  $\geq 65 \mu\text{m/s}$ . La VAP (**Figure 27**) est une mesure de vitesse qui correspond au ratio de la distance moyenne de la trajectoire parcourue par la tête du spermatozoïde divisée par la durée pour parcourir cette trajectoire (Rurangwa et al. 2001).



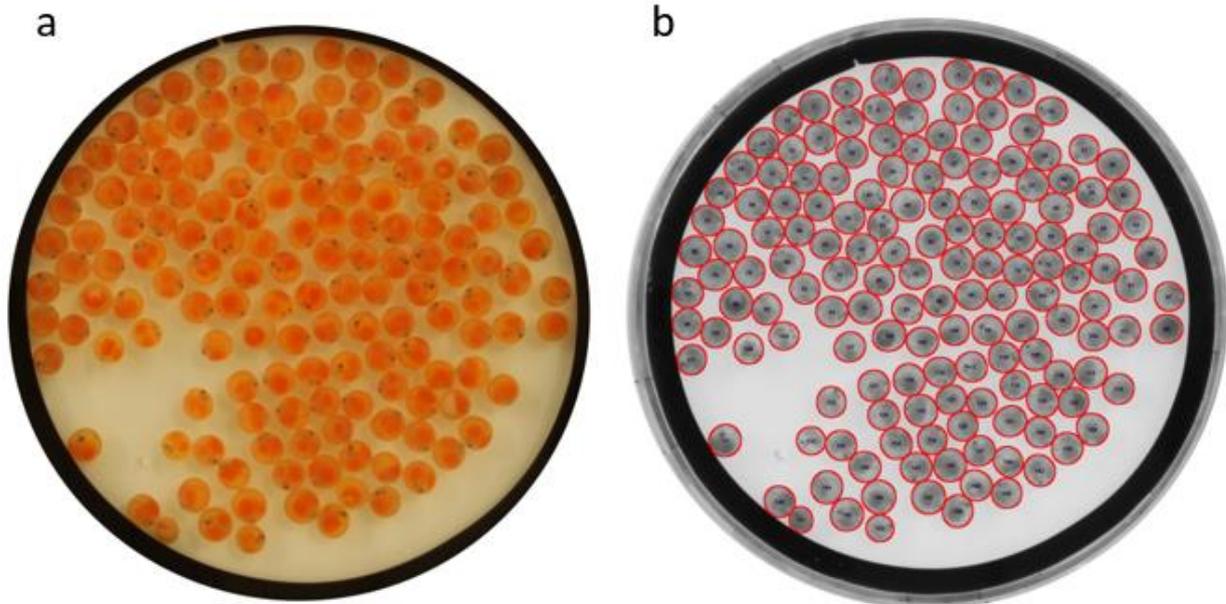
**Figure 27: Les différents paramètres de motilité : manuel de l'IVOS II (IMV technologies)**

Chaque valeur de motilité pour un échantillon donné correspond à la moyenne des mesures de 3 réplicats techniques (3 prises d'essai et mesures du même échantillon). Les mesures ont été réalisées dans les 3 min post décongélation. Pour chaque réplicat, 10  $\mu\text{L}$  du sperme décongelé ( $2,4 \times 10^9$  spz/mL) ont été activés avec 600  $\mu\text{L}$  d'Actifish (REF. 018274, IMV technologies) et une fraction (2,8  $\mu\text{L}$ ) a été chargée dans une chambre d'une lame Leja (Leja®, REF. 025107-025108). La motilité totale (%) du sperme décongelé a été mesurée pour chaque réplicat entre 10 s et 15 s après activation (8 films de 30 images, à une vitesse de 60 images/s).p\*

## 2.4 Capacité de fécondance

Deux tests de fécondance indépendants ont été réalisés avec les mêmes échantillons, avec des paillettes différentes et des ovules issus de femelles différentes. La veille de chacun de ces tests, sur le site de l'UE PEIMA d'INRAE, les ovules de 30 femelles âgées de 2 ans issues de la souche printanière et de 22 femelles âgées de 3 ans issues de la souche SYNTHETIQUE ont été collectés par stripping après anesthésie. Les pontes avec l'aspect le plus intègre (homogénéité des lipides à la surface des ovules) ont été égouttées (élimination du liquide cœlomique) et enfermées par lot de 2 000 dans des sacs à congélation gonflés sous oxygène. L'ensemble des ovules a été stocké sur glace et envoyé sur le site LPGP par transporteur. Ils ont été utilisés le lendemain, 24 h après collecte, après mélange des ovules de tous les sacs. Des témoins de fécondance frais (voir plus bas) ont permis d'évaluer la qualité des ovules au moment de leur utilisation.

Dans la première expérimentation, le test de fécondance de chaque échantillon cryoconservé (12 mâles x 3 conditions de cryoconservation) a été réalisé immédiatement après décongélation, en utilisant deux rapports spermatozoïdes/ovule. Ainsi, 100 µL de sperme décongelé non lavé et 10 mL d'Actifish (IMV Technologies) ont été ajoutés à environ 150 ovules (ratio de  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes/ovule), et 25 µL du même sperme décongelé et 10 mL d'Actifish (IMV Technologies) ont été ajoutés à un autre lot de 150 ovules (ratio de 500 000 spermatozoïdes/ovule). Pour réaliser le contrôle de la qualité des ovules, 25 µL de sperme frais (issu d'un mâle de truite arc-en-ciel de la souche printanière prélevé la veille dans la pisciculture expérimentale UE PEIMA d'INRAE) et 10 mL d'Actifish (IMV Technologies) ont été ajoutés à environ 150 ovules tous les 8 tests de fécondance. Après la fécondation et l'agitation douce, les œufs ont été incubés en absence de lumière à 10°C dans l'eau recirculée des installations expérimentales de l'ISC LPGP d'INRAE. Les pourcentages de fécondation ont ensuite été déterminés à partir des pourcentages de développement au stade œillé (environ 20 jours post fécondation). Pour ce faire, chaque test de fécondance a été transféré dans une boîte de pétri et une photo a été prise. Le nombre total d'œufs a été compté automatiquement avec la macro « VisEgg » (Cardona et al. 2021) avec le logiciel Fiji-ImageJ (**Figure 28**). Ensuite, le nombre d'œufs fécondés (embryons développés au stade œillé) a été compté par clic manuel sur chaque photo, avec le compteur Fiji-ImageJ. Le pourcentage de fécondation a été calculé selon l'équation suivante :  $\text{nombre d'œufs fécondés} / \text{nombre total d'œufs} \times 100$ . Tous les résultats avec le sperme décongelé ont ensuite été exprimés en pourcentage du pourcentage de fécondation du sperme frais (= valeurs normalisées).



**Figure 28: Exemple de photos utilisées pour le comptage des œufs fécondés (embryons au stade œillé) avec la macro VisEgg.** a. Photo des embryons au stade œillé (œuf avec 2 points noirs correspondant aux yeux pigmentés) et ovules non fécondés (absence de points noirs). b. Image de a, après traitement avec la macro VisEgg. Les lignes rouges qui entourent les embryons et les ovules non fécondés indiquent ceux qui ont été reconnus par la macro (vérification de la qualité du comptage automatique).

Pour la seconde expérimentation, le test de fécondance s'est déroulé de la même façon, mais les ovules provenaient d'une souche de femelles SYNTHETIQUE à reproduction hivernale. Dans cette série, les tests avec les échantillons de sperme cryoconservé avec du glycérol n'ont pas été réalisés, puisque nous avons déjà confirmé, suite à la première expérimentation, que les pourcentages de fécondation étaient tous à 0 % avec ce cryoprotecteur.

## 2.5 Analyse statistique des données de qualité du sperme

Pour toutes les analyses, nous avons utilisé des tests non-paramétriques sur  $k$  échantillons indépendants. Le test de Kruskal-Wallis suivi d'une correction de Dunn pour faire une comparaison multiple, ou le test de Mann-Whitney pour des comparaisons deux à deux, ont été utilisés à l'aide du logiciel graphpad prism. Pour mieux visualiser la variabilité des données, les données ont été représentées sous forme de boîte à moustache. La boîte à moustache choisie dans ce travail nous donne la valeur de la médiane (valeur centrale), la symétrie de distribution (quartiles, bords hauts et bas de la boîte), et la position des valeurs extrêmes (longueur des moustaches hautes et basses).

## 3. Analyse de la méthylation de l'ADN

### 3.1 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a impliqué une digestion préalable du sperme frais ( $25 \times 10^6$  spermatozoïdes figés par congélation ultra rapide, voir en 1 de cette partie) et du sperme décongelé ( $4 \times 10^6$  spermatozoïdes) dans 800  $\mu\text{L}$  du mix de tampon TNES (**Table 4**) et de protéinase K (concentration finale  $75 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (P6556 ; Sigma-Aldrich) à  $42^\circ\text{C}$  pendant la nuit.

Produits	PM (g/mol)	Molarité (mM)	Quantité (g) dans 250 ml (H <sub>2</sub> O)
NaCl	58,44	125	1,83
EDTA	372,2	10	0,93
SDS	288,4	17	1,25
Urée	60,06	4 000	60,06
Tris-HCl	157,6	10	0,40

**Table 4 : Composition du milieu TNES. (Ajusté à pH 8) PM : poids molaire.**

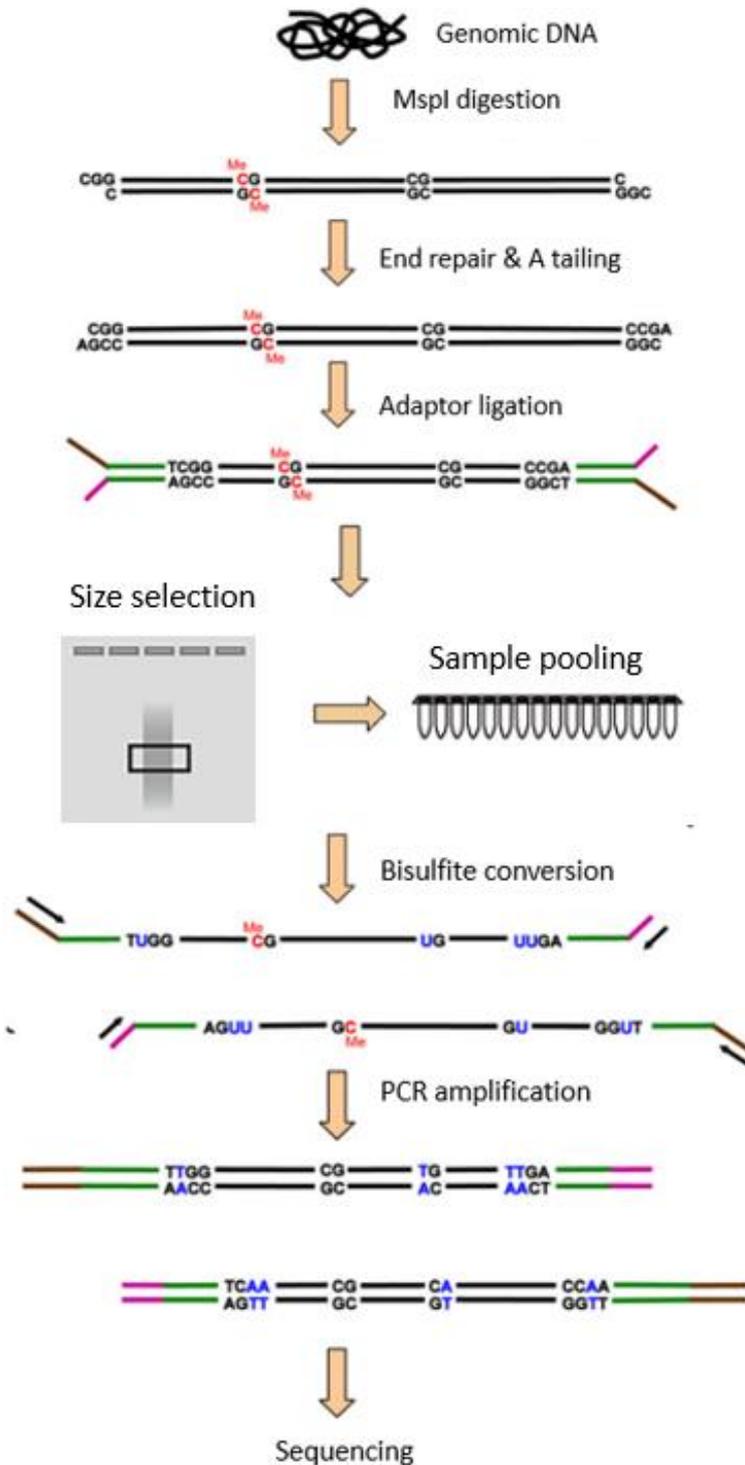
L'urée dénature les protéines, le SDS solubilise les membranes et inhibe toute activité RNasique et DNasique, et l'EDTA inhibe l'activité des nucléases en chélatant les ions divalents nécessaires à ces enzymes. La digestion des spermatozoïdes avec ce mix permet de digérer les cellules et de libérer l'ADN de ses protéines nucléaires. Pour séparer l'ADN des lipides et des protéines dénaturées, 800  $\mu\text{L}$  de phénol-chloroforme-isoamyl (25 :24 :1) ont été ajoutés aux 800  $\mu\text{L}$  de l'échantillon digéré. L'ensemble a été doucement agité et maintenu pendant 15 min à température ambiante avant d'être centrifugé (8 000 g,  $4^\circ\text{C}$ , 15 min). L'ajout de ce mélange permet une extraction en système biphasique (aqueux/organique). L'ADN se localise dans la phase aqueuse, les lipides sont dans la phase organique (phénol chloroforme) et les protéines insolubles sont dénaturées et s'agrègent à l'interface. L'ADN de la phase aqueuse (400  $\mu\text{L}$ ) a été transféré dans de nouveaux tubes Eppendorf et a été précipité avec 100  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M (0,25 vol pour 1 vol de phase aqueuse) et 1 mL d'éthanol absolu (2,5 vol pour 1 vol de phase aqueuse) pendant 15 min à température ambiante, puis centrifugé (12 000 g,  $4^\circ\text{C}$ , 15 min). La précipitation de l'ADN est due au fait que les ions  $\text{Na}^+$  du sel neutralisent les charges négatives des phosphates de l'ADN et réduisent sa solubilité dans l'eau. L'éthanol favorise l'interaction  $\text{Na}^+/\text{PO}_3^-$  (car sa constante diélectrique est plus basse que celle de l'eau) et renforce l'insolubilité de l'ADN. L'ADN est ensuite lavé avec 100  $\mu\text{L}$  d'éthanol 75 % puis recentrifugé. Le

surnageant est éliminé et le culot est mis à sécher à l'air libre à température ambiante. Une fois que le culot d'ADN est sec, il est re-suspendu avec de l'eau nucléase free et de la RNase (100 µg/mL) pour dégrader l'ARN. Afin d'activer l'activité RNAsique, l'échantillon est incubé à 37 °C pendant 1 h. L'ADN extrait est légèrement contaminé par la RNase (contamination protéique) et par les nucléotides libres issus de la digestion de l'ARN. Nous avons donc purifié l'ADN en le re-précipitant avec 100 µL NaCl 5M et 1 mL d'éthanol absolu froid. Après 4 h environ, une centrifugation a eu lieu suivi d'un lavage avec 100 µL d'éthanol 75 %. Suite à une nouvelle centrifugation et au séchage du culot, l'ADN a été re-suspendu dans 20 µL d'eau nucléase free. L'ADN a été stocké à -20 °C pour limiter toute prolifération bactérienne et activité nucléasique résiduelle. La concentration d'ADN obtenue a été mesurée au Qubit™dsDNA BR Assay kit (REF Q32853, invitrogen by Thermo Fisher Scientific) par la mesure de fluorescence d'un fluorochrome à forte affinité pour l'ADN. La qualité de l'ADN extrait a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose (absence d'échelle de dégradation). En moyenne, 500 ng d'ADN ont été envoyés à la compagnie Integragen pour réaliser le RRBS.

## 3.2 Procédure du RRBS

La préparation de la banque d'ADN et le séquençage ont été réalisés par la compagnie de séquençage « Integragen ». La préparation de la banque a été effectuée avec le kit « Diagenode Premium RRBS kit ». La procédure consiste en une digestion enzymatique de l'ADN avec l'enzyme MspI qui coupe au niveau du site CCGG après la 1<sup>e</sup> cytosine dans le sens 5'-3' (**Figure 29**). Cette étape est suivie de l'ajout des nucléotides adéquats (cytosine et guanine) pour réparer les extrémités des fragments après la coupure. En plus de ces nucléotides, une adénine est ajoutée afin de permettre la ligation des adaptateurs qui a lieu à l'étape suivante. Le traitement individuel des échantillons à cette étape permet que l'identifiant (index) contenu dans les adaptateurs soit différent entre chaque échantillon (que ce soient les réplicats biologiques et ou les traitements de congélation). Durant l'étape de réparation des extrémités des fragments, une séquence contrôle (spike-in) est ajoutée à chacun des échantillons. Le spike-in est une séquence d'ADN contrôle dont toutes les cytosines sont non méthylées (spike-in contrôle non méthylé). Cette séquence permettra par la suite d'analyser la qualité de la conversion au bisulfite. Les fragments sont ensuite sélectionnés selon leur taille. Pour notre étude, la majorité des fragments sélectionnés pour le premier séquençage avaient une taille observée sur les puces comprise entre 150 et 1000 pb, alors que pour le second séquençage (reséquençage), la majorité des fragments sélectionnés avaient une taille comprise entre 300 et 2000 pb. Ce second séquençage nous a semblé nécessaire car suite au premier séquençage, la profondeur de séquençage des cytosines n'était pas suffisante, du fait d'un nombre trop important de petits fragments et de leur élimination technique. Suite à la sélection de la taille des fragments, les échantillons sont ensuite mélangés par lots aléatoires puis traités au bisulfite de sodium pour conversion (voir plus loin).

Chaque fragment contient donc l'ADN d'intérêt (insert) issu du brin + ou du brin – de l'ADN de l'échantillon, et les adaptateurs. Pour différencier ces deux brins qui ne seront plus appariés après conversion bisulfite (**Figure 29**), on parle de brin du dessus (original top -OT-) et du dessous (original bottom -OB-). Les échantillons sont ensuite amplifiés par PCR. Les banques étant orientées (amélioration méthodologique récente), seuls les brins correspondant à l'OT et l'OB ont été séquencés (et non plus tous les brins issus de la PCR, incluant les brins complémentaires des OT et OB). Le séquençage a été réalisé par synthèse sur un Illumina NovaSeq™ 6000 en mode extrémités pairées (paired-end) (2 x 100 b), sur une Flow Cell à motifs (patterned). Chaque séquence de 100 b générée sera mentionnée avec l'anglicisme read (lecture) dans la suite du document. Le read 1 fait référence au séquençage de la première extrémité de l'insert, le read 2 fait référence au séquençage de la seconde extrémité après inversion du site d'attachement du fragment d'ADN sur la Flow Cell (voir <https://www.youtube.com/watch?v=womKfikWlxM> pour la description du principe). Les tailles des reads seront mentionnées en bases (b) et non pas en paires de base (pb) car l'identité de chacun des brins (OT et OB) est différente après conversion au bisulfite (**Figure 29**).



**Figure 29: Les différentes étapes du RRBS (adapté de <https://www.ngbdx.com/rpbs.php>).**

Pour le séquençage, le nombre de reads commandé à Integragen a été calculé de la façon suivante : la taille du génome de la truite arc-en-ciel est de 2,18 Gb et la représentation génomique minimale que nous avons recherchions par la technique du RRBS était de 5 % du génome. Cela donne donc 0,109 Gb à séquencer. Or d’après une étude réalisée par notre équipe (Brionne et al. 2023), nous avons savions que l’efficacité de l’alignement des reads au

génomique de référence de la truite arc-en-ciel était d'environ 50 %. Ainsi, nous avons dû doubler le nombre de bases à séquencer (= 0,218 Gb). Comme nous avons choisi une profondeur de séquençage de 20-25X, nous avons calculé que nous devrions séquencer 5 Gb par échantillon. Or les reads demandés ayant une taille de 100 b, les 5 Gb correspondent à  $50 \times 10^6$  reads. Cela nous a amenés à commander  $25 \times 10^6$  paired-end reads. En raison de certaines difficultés avec le premier séquençage comme évoqué plus haut, certains échantillons ont été re-séquencés. Cela a donné une moyenne de 68,5 millions de paired end reads, autrement dit 137 millions de reads bruts totaux.

### 3.3 Traitement des données de séquençage

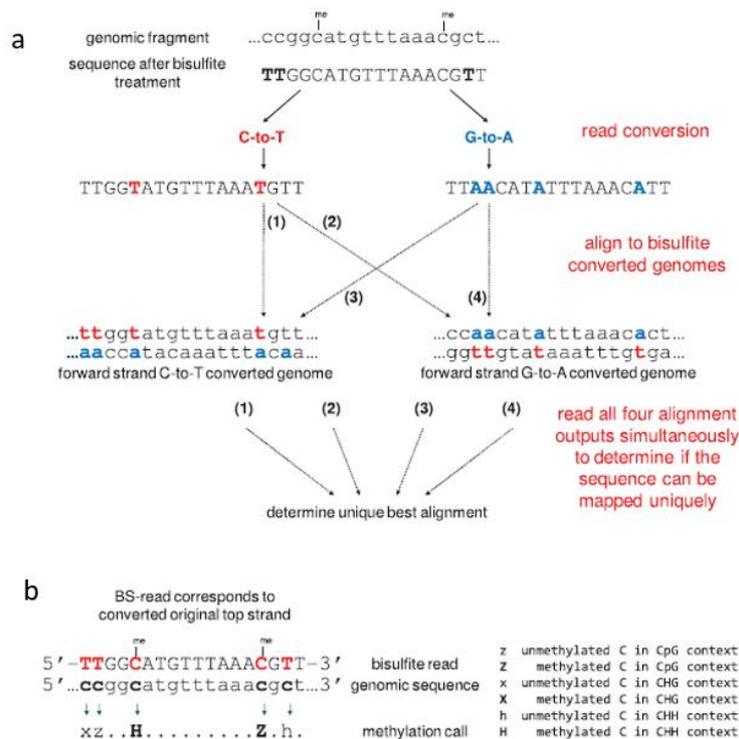
Les données de séquençage ont été d'abord soumises à un contrôle qualité par le programme FastQC (FastQC\_v0.11.7) (Andrews, n.d.) afin de vérifier qu'il n'y a pas eu d'erreur lors du déroulement du séquençage et afin de vérifier si les données de séquençage reçues sont de bonne qualité.

Nous avons ensuite traité les données de séquençage avec le programme Trim Galore (version : TrimGalore-0.6.5) (Krueger, n.d.). Ce programme supprime les séquences des adaptateurs et les bases ajoutées ainsi que les bases d'intérêt (contenues dans les inserts) mais de faible qualité, c'est-à-dire qui ont un phred score  $< 30$ , et enfin les reads qui ont une taille inférieure à 20 b. La suppression des reads de moins de 20 b permet de réduire la taille des fichiers résultant de cette étape, et évite qu'il y ait des problèmes au niveau des programmes d'alignement au génome nécessitant des séquences avec une taille minimale. Trim Galore fournit des fichiers avec les séquences trimmées des reads 1 et reads 2 mais aussi un rapport de qualité indiquant le nombre de séquences analysées qui correspond au nombre de séquences avant le trimming, le % des séquences ayant eu des adaptateurs (donc dont les inserts font moins de 100 b) et le % des paires de séquences dont l'un des 2 reads est inférieur à 20 b. L'option « fastqc » a été précisée dans le programme TrimGalore.

Afin de calculer le taux de conversion au bisulfite des échantillons, nous avons traité la séquence du « spike in » non méthylé au bisulfite in silico grâce à Bismark (Bismark-0.22.3) avec l'option « bismark\_genome\_preparation ». Ensuite, les séquences trimmées (reads 1 et 2) de chacun de nos échantillons contenant par ailleurs la séquence contrôle (spike-in) ont été alignées à la séquence du spike in non méthylé converti, suivi d'une extraction de toutes les cytosines dans tous les contextes (en ignorant les 2 premières bases et les 2 dernières bases des reads 1 et reads 2 car il existe un biais au niveau de ces bases en 5' et 3'). Nous avons ensuite modifié le fichier de façon à avoir des colonnes indiquant le numéro du chromosome (chr), le numéro de la position (pos), le nombre de cytosines totales (N) et le nombre de cytosines méthylées (X) par position chromosomique, sachant que dans ce cas-là le chromosome ce n'est que la séquence du spike in. Nous avons calculé le ratio de méthylation en divisant le nombre de cytosines méthylées (X) par le nombre total de cytosines (N) pour chaque position chromosomique, puis calculé la moyenne du ratio méthylation de toutes les

positions chromosomiques pour chaque échantillon. Le taux de conversion au bisulfite (%) = 100 - taux moyen de méthylation.

Pour l'alignement au génome de référence des échantillons séquencés, les séquences trimmées des reads 1 et 2 de chacun des échantillons sont alignées au génome de référence « Omyk\_1.0 » (version du génome) avec le programme bio-informatique Bismark (Krueger and Andrews 2011). Pour réaliser cet alignement, le génome de référence « Omyk\_1.0 » a été converti au bisulfite in silico grâce à l'option « bismark\_genome\_preparation ». Les séquences trimmées ont été également converties avant leur alignement. A cet effet, les cytosines ont été transformées en thymine et les guanine en adénine (ce qui est équivalent à une conversion de C en T sur le brin « reverse ») (Krueger and Andrews 2011) (**Figure 30a**). Bismark, en utilisant bowtie2, a ensuite passé en revue les différentes possibilités d'alignement de séquence (chaque read 1 avec son read 2) au génome avant de choisir le meilleur et unique alignement (**Figure 30a**). En parallèle de l'alignement, Bismark a déterminé l'état de méthylation de chaque cytosine dans chaque read (Krueger and Andrews 2011). L'étape d'inventaire des méthylations, ou methylation call, consiste en pratique à attribuer un point pour toute base qui n'est pas une cytosine, et des lettres aux cytosines (Majuscule= cytosine méthylée et minuscule= cytosine non méthylée) la nature de la lettre indiquant la nature du contexte de la cytosine (**Figure 30b**). Cela permettra par la suite de n'extraire que les données qui correspondent aux cytosines en contexte CpG.



**Figure 30 : L'approche de Bismark pour l'alignement et le « methylation call » (Krueger and Andrews 2011).**a. Une conversion des C en T est effectuée sur les séquences des reads. Ces séquences converties sont ensuite alignées au génome de référence préalablement converti. Un meilleur et unique alignement est déterminé à partir des 4 processus d'alignement ayant lieu en parallèle. b. L'état de méthylation des cytosines est déterminé en comparant les séquences des reads par rapport aux séquences du génome de référence.

A la fin de l'étape de l'alignement et du « methylation call », Bismark nous a fourni des fichiers BAM (Binary Alignment/Map). Ce format de fichiers est une version compacte et indexée pour représenter les séquences de nucléotides alignés issues du methylation call. Un rapport du mapping est également généré pour chaque échantillon. Ce rapport indique le nombre de paires de séquences alignées une fois au génome, le nombre de paires de séquences qui ont été alignées plusieurs fois au génome et le nombre de paires de séquences non alignées. Nous avons ensuite utilisé les fichiers BAM pour extraire les données sur les cytosines en contexte CpG, toujours à l'aide de Bismark en utilisant l'option « bismark\_methylation\_extractor ». A cette étape, nous avons ignoré les 2 premières bases et les 2 dernières bases des reads 1 et 2, car comme déjà évoqué, il existe un biais de séquençage au niveau de ces bases. Cette étape nous a permis de produire des fichiers « extracted\_cytosines » renfermant les positions chromosomiques des cytosines en contexte CpG ainsi que le brin d'ADN concerné ( + ou – selon qu'il est dans le même sens ou dans le sens inverse du génomes de référence), le nombre de cytosines méthylées, et le nombre de cytosines non méthylées, par position chromosomique.

Afin de pouvoir étudier le différentiel de méthylation entre traitements, nous avons modifié les fichiers « extracted\_cytosines ». Ces nouveaux fichiers, toujours propres à chaque échantillon, et appelés ici fichiers « count », sont constitués d'une première colonne qui contient toutes les positions chromosomiques contenant une cytosine en contexte CpG. Les colonnes suivantes contiennent successivement le sens du brin, le nombre de cytosines totales et enfin le nombre de cytosines méthylées pour chaque position chromosomique. (Figure 31).

chr	pos	strand	N	X
1	215	-	35	35
1	494	-	73	73
1	543	-	73	37
1	676	-	14	14
1	680	-	14	14

**Figure 31: Exemple d'une partie du fichier « count ».** Cette partie est issu du fichier « count » du sperme du mâle 1 cryoconservé avec du DMSO. Chr : numéro du chromosome, pos : numéro de la position sur le chromosome ; strand : sens du brin ; N : nombre total de cytosines ; X : nombre de cytosines méthylées.

Cette modification de fichiers en ce nouveau format est essentielle pour leur traitement ultérieur par DSS (Dispersion shrinkage for sequencing data), package du logiciel statistique R. Mais ces fichiers modifiés ont aussi été utilisés pour déterminer plusieurs paramètres d'intérêt dont la profondeur de séquençage des cytosines, et le ratio de méthylation global de chaque échantillon. La profondeur de séquençage a été déterminée en appliquant la fonction « summary » de R sur le nombre total de cytosines (N) par position chromosomique, afin d'obtenir la médiane et la moyenne du nombre de cytosines séquencées par échantillon. Pour calculer la méthylation globale de l'ADN l'échantillon, le nombre de cytosines méthylées

(X) a été divisé par le nombre total de cytosines (N) pour chaque position chromosomique, suivi de l'application de la fonction « summary » pour obtenir le ratio de méthylation moyen (moyenne des valeurs de toutes les positions) par échantillon. Pour visualiser les taux de méthylation des cytosines en contexte CpG, nous avons converti les fichiers BedGraph en fichiers BigWig avec l'outil bedGraphToBigWig (Kent et al. 2010). Les fichiers en format BedGraph sont des fichiers utilisés pour représenter des données quantitatives le long d'un génome ou d'une séquence génomique. Quant au fichier BigWig, il s'agit d'un format de fichier binaire utilisé pour l'affichage de données denses et continues sous forme de graphique. Nous avons ensuite affiché ces fichiers avec le logiciel Integrative Genome Viewer (Robinson et al. 2011). L'intégralité de ces outils est en libre accès en ligne.

Pour déterminer s'il existe des DMCs entre les échantillons issus de sperme cryoconservé, par comparaison aux frais, le package DSS de R (Feng, Conneely, and Wu 2014; H. Wu et al. 2015) a été utilisé. Nous avons comparé l'état de méthylation de toutes les cytosines en contexte CpG de tous les échantillons de chacun des spermatozoaires cryoconservés avec du DMSO ou MeOH ou glycérol par rapport à ceux du sperme frais. Pour comparer l'état de méthylation des mêmes cytosines d'un même mâle en condition de cryoconservation par rapport au frais, une analyse en mode pairée du modèle généralisé de DSS a été effectuée. Enfin, nous avons fait le choix de ne pas lisser nos données. On a donc précisé l'option « smoothing= FALSE », afin de désactiver le mécanisme glissant d'attribution d'un niveau de méthylation mesuré sur une cytosine aux cytosines voisines. En effet, le lissage est adapté aux modifications de méthylation de nature physiologique qui affectent souvent de la même façon des cytosines contiguës. Dans le cas de l'étude de la cryoconservation, nous voulions pouvoir visualiser un éventuel effet ponctuel, autrement dit sur une cytosine donnée indépendamment de ses voisines.

A l'issue de ces étapes de recherche des DMCs, DSS a ensuite été utilisé afin de déterminer s'il existe des DMRs. Pour identifier les DMRs, nous avons utilisé la fonction « callDMR » en précisant une taille minimale de fenêtre glissante de 50 b (minlen = 50) contenant au moins 5 CpGs (minCG = 5), avec au moins 75 % de ces CpGs identifiées comme des DMCs (pct.sig = 0.75) et avec une p-value < 0.001 (p.threshold = 0.001).

Pour réaliser une digestion in silico du génome de référence « Omyk\_1.0 » avec MspI (qui donnera un RR génome, ou reduced representation génome), nous avons utilisé la fonction « DigestDNA » disponible dans le package de R « DECIPHER v2.0 » (Wright 2023). Cela nous a permis de couper l'ADN du génome de référence (brin +) au niveau de ses sites CCGG. Nous avons également précisé que la coupure avait lieu après la première cytosine de ce site (site de restriction de MspI). « DigestDNA » montre aussi les positions des fragments. Le package de R « Biostrings: Efficient manipulation of biological strings » (Pagès et al. 2023) a ensuite été utilisé pour identifier la taille des fragments et le nombre de CpG, ce qui nous a permis de réaliser les seuils de taille voulus et de récupérer l'information sur le nombre de CpG théoriques attendus.

# Partie III : Résultats

# 1. Qualité cellulaire du sperme décongelé

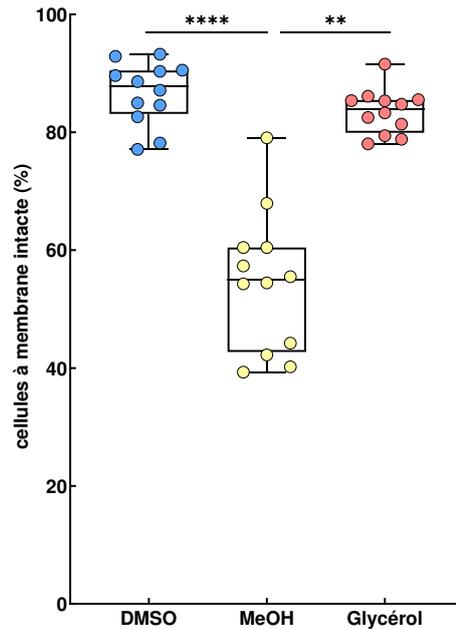
Notre projet de recherche avait pour objectif d'étudier la méthylation de l'ADN dans des situations contrastées de sperme décongelé, grâce à l'utilisation de différents cryoprotecteurs. Pour qualifier ces situations, nous avons évalué certains critères cellulaires et fonctionnels qui sont affectés par la cryoconservation et qui renseignent sur la qualité cellulaire du sperme décongelé. Une partie des données présentées dans cette section a alimenté l'article « Cryopreservation effect on DNA methylation profile in rainbow trout spermatozoa » (doi : [10.1038/s41598-023-44803-2](https://doi.org/10.1038/s41598-023-44803-2)) publié dans Scientific reports et ajouté en annexe.

## 1.1 Qualité membranaire

Le processus de congélation induit des stress osmotique et mécanique entraînant respectivement une dénaturation des protéines et des cassures de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Ainsi, nous nous sommes intéressés à étudier la qualité membranaire des spermatozoïdes décongelés pour voir l'état d'altération de la membrane.

Nous avons observé que les meilleurs pourcentages de cellules à membrane plasmique intacte sont obtenus avec le DMSO et le glycérol (**Figure 32**). Ces résultats valident ce qui est déjà connu d'après la littérature quant au fait que le DMSO est le meilleur cryoprotecteur pour le sperme de salmonidés. Ils montrent également que le glycérol assure bien une protection structurelle des spermatozoïdes. Par contre, avec le MeOH, le pourcentage de cellules à membrane plasmique intacte est significativement plus faible que celui du DMSO et du glycérol. Cette faible protection de l'intégrité membranaire avec le MeOH peut être expliquée soit par la présence de lésions dans les membranes (trous), soit par le fait que le MeOH aurait induit des modifications des propriétés de la membrane en la rendant plus perméable à l'iodure de propidium.

De plus, avec le DMSO et le glycérol, les pourcentages des cellules à membrane intacte des différents mâles sont homogènes entre eux. Cela indique que les spermatozoïdes décongelés issus de différents mâles auraient la même réponse envers le DMSO et le glycérol. Par contre, avec le MeOH, nous avons observé une grande variabilité entre les mâles, ce qui suggère que les spermatozoïdes décongelés issus des différents mâles se comportent différemment avec le MeOH.



**Figure 32: Qualité membranaire du sperme décongelé en fonction du cryoprotecteur utilisé.**

Chaque point représente la valeur individuelle du sperme d'un mâle donné (n=12 réplicats biologiques dans chaque condition). Les valeurs individuelles sont issues de la moyenne de deux réplicats techniques. Les boîtes à moustaches présentent (du bas vers le haut) : minimum, 1e quartile, médiane, 3e quartile, maximum. Les différences significatives entre cryoprotecteurs sont indiquées par \*\* : p value < 0,01 et \*\*\*\* : p value < 0,0001 (Test Kruskal-Wallis).

**En résumé, le DMSO préserve particulièrement bien la qualité membranaire. Le glycérol a pu également protéger la qualité membranaire avec une efficacité similaire au DMSO. En revanche, le MeOH n'est pas aussi bon à la protection des membranes. Un effet cryoprotecteur marquant est déjà visible au niveau de la qualité membranaire.**

## 1.2 Qualité des mitochondries

Au cours du processus de congélation, la partie intracellulaire des spermatozoïdes est susceptible d'être altérée, notamment les mitochondries. L'altération des mitochondries a pour risque d'entraîner une perte du potentiel énergétique et un relargage d'agents oxydants qui peuvent induire des altérations des spermatozoïdes se trouvant à côté de ceux ayant les mitochondries altérées. Nous avons évalué la qualité des mitochondries du sperme décongelé en fonction du cryoprotecteur.

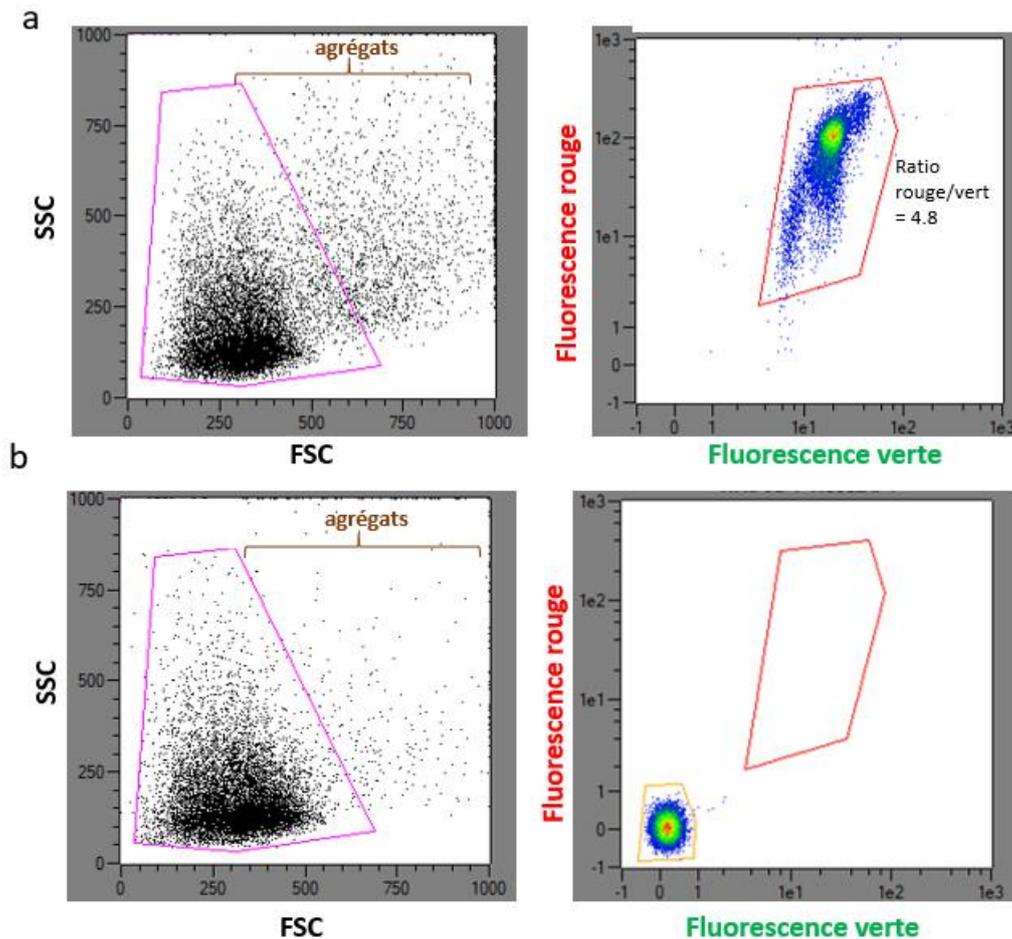
## 1.2.1 Mise au point du marquage JC-1 avec du sperme décongelé

Le JC-1 est un marqueur qui a été initialement développé pour l'étude de cellules mammaliennes en culture. Les conditions d'incubation préconisées sont donc adaptées à ces modèles cellulaires (concentration de marqueur, température et durée de marquage). Il était donc important de tester ces différents paramètres sur notre modèle cellulaire, afin de nous assurer de la validité des résultats donnés par le test.

Deux paramètres d'analyse ont été fixés à priori pour nos tests, la concentration en cellules, et la température d'incubation. La notice recommandait d'incuber les cellules à une concentration de  $1 \times 10^6$  de cellules/mL dans le JC-1, ce qui est également la concentration optimale d'analyse des spermatozoïdes dans notre cytomètre. Nous avons donc choisi d'utiliser cette concentration. De plus, nous avons décidé d'incuber le JC-1 à 20 °C, car c'est la température maximale que peuvent supporter les truites arc-en-ciel, et par extension leurs spermatozoïdes. Cette température est beaucoup plus basse que les 37 °C recommandés par le fabricant, et cette différence s'ajoute au fait que la mitochondrie unique des spermatozoïdes de truite arc-en-ciel est lovée dans les replis membranaires au niveau de l'insertion du flagelle (voir en 2.3.1 de notre synthèse bibliographique), ce qui est susceptible de la rendre moins accessible. Ces éléments spécifiques nous ont donc conduits à tester les concentrations de JC-1 et les durées d'incubation. L'ensemble des tests a été réalisé sur spermatozoïdes décongelés, pour des raisons de disponibilité en matériel biologique, mais les résultats ont ensuite été validés sur du sperme frais (non montré dans ce manuscrit).

### 1.2.1.1 Critère de mesure du signal du JC-1

Comme indiqué en méthodes dans la section 2.2, les cellules à mitochondries fonctionnelles sont caractérisées par une intensité de fluorescence verte du JC-1 qui rend compte du nombre et taille des mitochondries de la cellule, et par une intensité de fluorescence rouge du JC-1 rendant compte de la fonctionnalité des mitochondries. Le rapport des intensités rouge/vert est donc le critère de résultat proposé par le fabricant. Un exemple du profil que nous avons obtenu avec les spermatozoïdes décongelés de truite arc-en-ciel est présenté **Figure 33a**. Ce profil apparaît peu différent, en première analyse, de l'exemple donné par le fabricant (**Figure 26a**), et un ratio des intensités rouge/vert a pu être défini. Le contrôle DMSO (**Figure 33b**) indique la position des cellules en absence de marquage, et valide l'absence d'auto fluorescence de nos cellules.



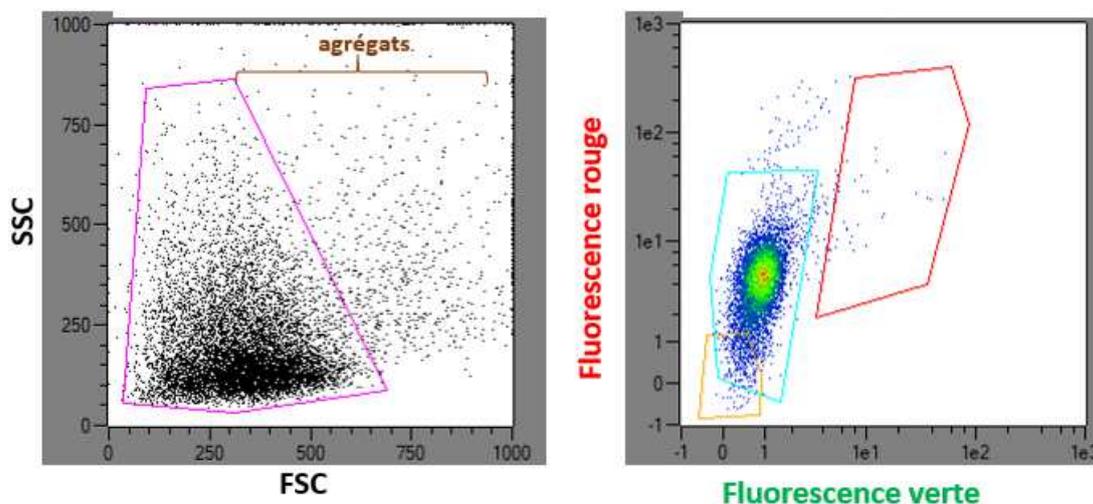
**Figure 33: Exemple de profils obtenus suite au marquage du sperme décongelé en présence et absence de JC-1.**

**a:** Profils obtenus suite à l'incubation du sperme (décongelé lavé) avec du JC-1 0.5  $\mu\text{M}$  (concentration finale) pendant 15 min à 20 °C. L'excitation du JC-1 s'est faite à 488 nm (laser bleu) et la fluorescence émise a été recueillie dans le vert (filtre 500-550 nm) et une dans le rouge (filtre 565-605 nm). **b:** Profils obtenus suite à l'incubation du sperme décongelé lavé avec du DMSO (vecteur du JC-1) pendant 15 min à 20 °C.

Les profils de gauche montrent la distribution des cellules selon leur taille (FSC) et leur structure (ou brillance, SSC). La population de cellules de taille et structure homogènes (cadre rose) a été utilisée pour l'analyse JC-1. Les cellules dispersées, de taille et structure plus élevées, considérées comme des agrégats, n'ont pas été intégrées dans l'analyse. Les profils de droite sont des profils de fluorescence en format density plot (les zones les plus denses en cellules ont les couleurs les plus chaudes, échelle arbitraire). Le sperme décongelé utilisé a été cryoconservé au préalable avec du DMSO.

Afin de valider l'évolution du rapport d'intensité rouge/vert dans le cas de mitochondries défectueuses, nous avons réalisé le contrôle classique d'exposition des spermatozoïdes à l'agent découplant CCCP, qui neutralise toute activité mitochondriale. Comme évoqué en méthode (section 2.2), cet agent induit, sur les cellules Jurkat, une disparition du signal rouge tout en maintenant le signal vert (**Figure 26b**). Mais dans notre étude sur les spermatozoïdes de truite, nous avons constaté qu'en présence de CCCP, l'intensité de la fluorescence verte a

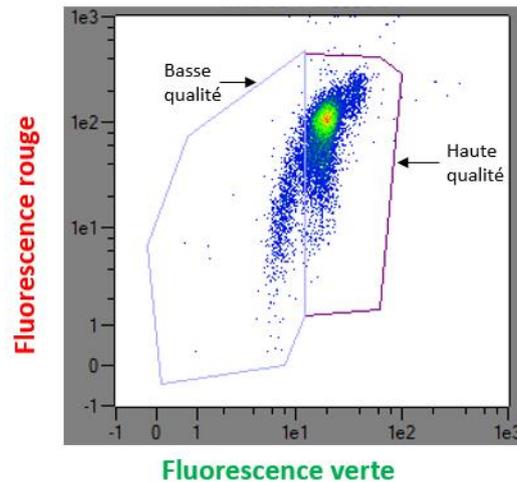
considérablement diminué et devient presque nulle par rapport à celle observée sur les cellules non traitées au CCCP (**Figure 34**). La fluorescence rouge a également considérablement diminué. Ainsi, ces cellules dont les mitochondries ont été rendues non-fonctionnelles par le CCCP adoptent un profil différent de celui attendu en cellules mammaliennes (**Figure 26b, notice du fabricant**). Or nos cellules restent intègres en taille et structure (**Figure 34**). Nous faisons l'hypothèse que le JC-1 ne s'intègre pas de façon pérenne dans les mitochondries des spermatozoïdes de truite. Ainsi, les mitochondries fonctionnelles intégreraient le JC-1 (fluorescence verte) tout en l'accumulant (fluorescence rouge), tandis que les mitochondries non fonctionnelles perdraient cette aptitude à intégrer le marqueur et à l'accumuler (diminution puis perte des deux fluorescences).



**Figure 34 : Exemple de profils obtenus suite au traitement du sperme à l'agent découplant CCCP.** a: Profils obtenus suite à l'incubation du sperme (décongelé lavé) avec du JC-1 0.5  $\mu\text{M}$  (concentration finale) et du CCCP 50  $\mu\text{M}$  (concentration finale) pendant 15 min à 20 °C. L'excitation du JC-1 s'est faite à 488 nm (laser bleu) et la fluorescence émise a été recueillie dans le vert (filtre 500-550 nm) et dans le rouge (filtre 565-605 nm). Le sperme décongelé lavé incubé avec du JC-1 et du CCCP a été cryoconservé au préalable avec du DMSO. SSC : taille. FSC : structure.

Ce résultat surprenant nous a conduits à reconsidérer le critère d'analyse de la fonctionnalité des mitochondries. En effet, si les cellules à mitochondries non fonctionnelles perdent les deux fluorescences, l'utilisation du ratio d'intensités rouge/vert n'a pas de sens dans notre système. Après de nombreuses et exigeantes analyses dont certaines sont présentées à la suite de ce chapitre, nous avons retenu un critère discriminant fiable. Il est basé sur la mesure de la capacité d'intégration du JC-1 par les spermatozoïdes dont les mitochondries sont les plus fonctionnelles. Ainsi, en se basant sur les intensités de fluorescence des spermatozoïdes du cytogramme, nous avons sélectionné la sous population ayant les plus fortes intensités de fluorescence verte comme étant les spermatozoïdes dont des mitochondries sont les plus fonctionnelles (cette sous-population fixe mieux le JC-1). Cette population a été qualifiée de haute qualité (**Figure 35**) en référence à la qualité de leurs mitochondries. Par contre, les intensités vertes plus faibles des spermatozoïdes hors de cette sous-population indiquent

qu'ils fixent mal le JC-1. Ils seraient donc de moindre qualité, d'où leur qualification de basse qualité (**Figure 35**).

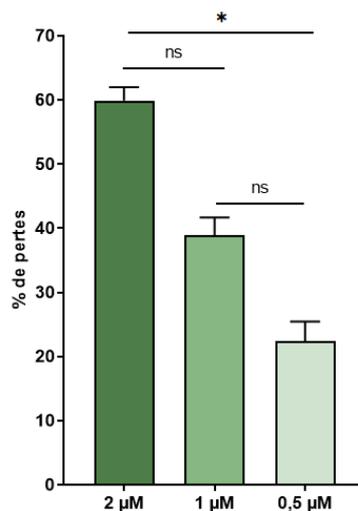


**Figure 35 : Un exemple de profil de fluorescence obtenu suite au marquage du sperme décongelé.**

Ainsi, pour rendre compte du critère de fonctionnalité des mitochondries des spermatozoïdes, nous avons choisi d'utiliser le pourcentage de cellules dans la population qualifiée de haute qualité. Cependant, pour la suite des mises au point et des analyses de ce chapitre, nous avons continué à présenter ce rapport d'intensité rouge/vert, afin d'en montrer les limites et les arguments qui nous ont fait faire un autre choix de critère. De plus, en vue de la valorisation de ce travail, il était nécessaire de pouvoir comparer nos résultats au critère proposé en cellules somatiques mammaliennes.

#### 1.2.1.2 Choix de la concentration finale du JC-1

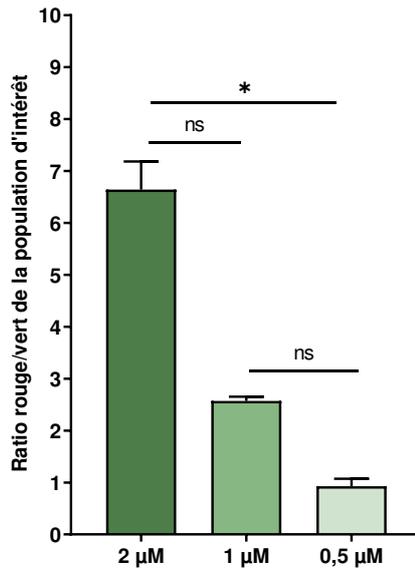
Pour déterminer la concentration optimale de JC-1 à utiliser dans notre étude, nous avons décidé de tester plusieurs concentrations (2  $\mu\text{M}$  ; 1  $\mu\text{M}$  et 0,5  $\mu\text{M}$ ), sachant que d'après la notice du JC-1, il est recommandé d'incuber les cellules à une concentration finale de 2  $\mu\text{M}$ . Suite au marquage JC-1 à ces différentes concentrations (en gardant un volume de vecteur, le DMSO, constant), nous avons observé que la densité des cellules dans la région des agglutinées diminuait avec la baisse des concentrations de JC-1 (**Figure 36**). Nous avons observé qu'à la concentration de 2  $\mu\text{M}$  de JC-1, ces pertes pouvaient atteindre 60 % de la population des cellules marquées, et qu'elles sont les plus faibles à la concentration de 0,5  $\mu\text{M}$  de JC-1.



**Figure 36 : Pertes de spermatozoïdes en fonction de la concentration finale du JC-1.** Pour une même suspension cellulaire, nous avons mesuré la concentration de la population principale (cadran SSC/FSC Figure 33) dans le contrôle DMSO, et la concentration de la même population après marquage aux 3 concentrations de JC-1 (20 °C, 15 min). Les pourcentages de pertes sont calculés selon :  $100 - (\% \text{ de récupération des spermatozoïdes})$ , sachant que le % de récupération de spermatozoïdes correspond à  $(\text{concentration des cellules du test JC-1} / \text{concentration du contrôle DMSO}) * 100$ . Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ET de  $n = 3$  réplicats biologiques indépendants. Les différences significatives (test de Kruskal-Wallis) sont indiquées par : \* :  $p$ -value < 0,05. ET : écart-type.

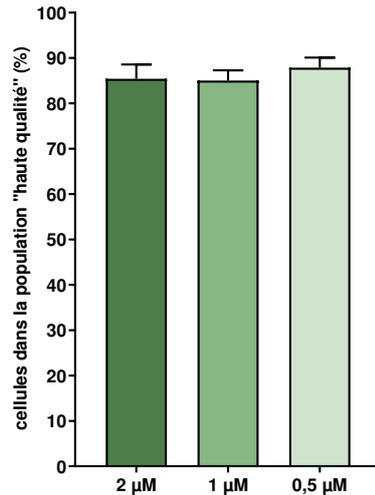
Comme nous avons choisi d'exclure des analyses la région des cellules agglutinées, les agglutinations entraînent une perte des cellules analysées dans la population d'intérêt, et donc un risque de perte d'information. Nous avons donc choisi d'incuber les spermatozoïdes avec une concentration finale de JC-1 de 0,5 µM, car c'est la concentration pour laquelle il existe le moins de pertes de cellules.

Lors de ces mises au point sur la concentration de JC-1, nous avons observé que le ratio des intensités de fluorescence rouge/vert de la population d'intérêt diminue avec la concentration de JC-1 (**Figure 37**). Cette diminution est significative entre 2 et 0,5 µM. Cela indique que le ratio des intensités de fluorescence rouge/vert est sensible à la concentration finale du JC-1, ce qui est un argument supplémentaire pour réfuter ce critère d'analyse. Pour autant, cette observation (instabilité d'un critère) pose la question de la stabilité du propre critère que nous avons retenu (taille des populations de haute et basse qualité).



**Figure 37 : : Ratio des intensités de fluorescence rouge/vert des spermatozoïdes en fonction de la concentration finale de JC-1.** Le JC-1 est incubé pendant 15 min à 20 °C. Les résultats sont exprimés en moyenne ± ET. ET: écart-type. Les différences significatives (test de Kruskal-Wallis) sont indiquées par : \* : p-value < 0,05. n=3 réplicats biologiques.

Pour analyser ce risque de biais, nous avons comparé le pourcentage de spermatozoïdes dans la population de haute qualité selon les différentes concentrations de JC-1. Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes concentrations (**Figure 38**). Cela indique que ce critère de mesure n'est pas biaisé par la concentration en JC-1 utilisée, puisque quelle que soit la concentration finale du JC-1, la proportion de spermatozoïdes appartenant à la population de haute qualité est constante. Cela indique également que même si le ratio des intensités de fluorescence rouge/vert est le plus faible à 0,5 µM, ceci n'affecte pas l'analyse de la qualité des mitochondries des spermatozoïdes selon notre critère. En effet, cela signifie que les spermatozoïdes ont suffisamment de JC-1 pour pouvoir évaluer la qualité de leur mitochondrie.

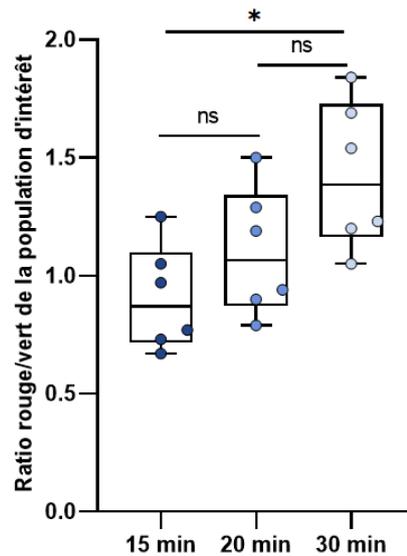


**Figure 38 : : Comparaison des pourcentages de spermatozoïdes dans la population de haute qualité en fonction de la concentration finale du JC-1.** Le JC-1 est incubé pendant 15 min à 20 °C. Les résultats sont exprimés en moyenne ± ET. ET : écart-type. n=3 réplicats biologiques par concentration. Test Kruskal-Wallis : pas de différence significative.

### 1.2.1.3 Choix de la durée d'incubation du JC-1

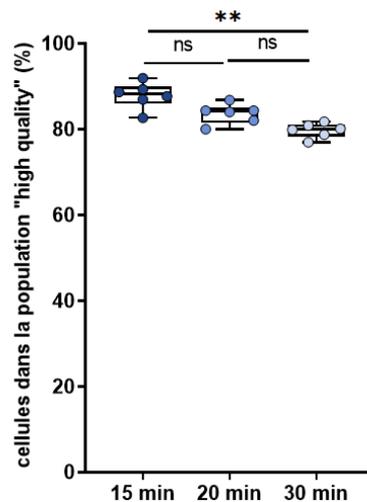
Afin de déterminer la durée d'incubation optimale des spermatozoïdes dans le JC-1, nous avons testé plusieurs durées d'incubation (15 min, 20 min et 30 min) à 20 °C sachant que la notice recommande une incubation pendant 15 à 30 min à 37°C.

A nouveau, le ratio des intensités de fluorescence rouge/vert s'est avéré très sensible vis à vis des conditions expérimentales, notamment quant aux différentes durées d'incubation testées ici (**Figure 39**). En effet, ce ratio augmente avec la durée d'incubation, le ratio le plus élevé étant obtenu à 30 min.



**Figure 39: Ratio des intensités de fluorescence rouge/vert en fonction de la durée d'incubation des spermatozoïdes dans le JC-1.** Le JC-1 est incubé à une concentration finale de 0,5  $\mu$ M à 20 °C. Chaque point représente la moyenne d'un triplicat technique d'un mâle donné. n=6 réplicats biologiques. Les différences significatives (test de Kruskal-Wallis) sont indiquées par : \* : p-value < 0,05.

En ce qui concerne le critère du pourcentage de spermatozoïdes dans la population de haute qualité à ces différentes durées d'incubation (**Figure 40**), nous avons observé que le pourcentage le plus élevé était obtenu à 15 min. A 20 min, ce pourcentage était légèrement plus faible mais aucune différence significative n'a été observée par rapport à 15 min. Par contre, nous avons observé une diminution significative de ce pourcentage à 30 min par rapport à 15 min. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'au cours du temps d'incubation à 20 °C, les spermatozoïdes de bonne qualité se dégradent et disparaissent de la population de haute qualité. Ces résultats montrent qu'afin d'éviter tout biais d'altération des spermatozoïdes au cours de l'incubation, la meilleure durée d'incubation est 15 min. Une durée d'incubation de 20 min est une autre alternative si jamais certains soucis ont eu lieu en cours d'expérimentation et ont empêché une mesure à 15 min.



**Figure 40: Quantité de cellules dans la population de haute qualité en fonction de la durée d'incubation des spermatozoïdes dans le JC-1.** Le JC-1 est incubé à une concentration finale de 0,5  $\mu\text{M}$  à 20 °C. Chaque point représente la moyenne d'un triplicat technique d'un mâle donné. n=6 réplicats biologiques. Les différences significatives (test de Kruskal-Wallis) sont indiquées par : \*\* : p-value < 0,01.

Suite à ces résultats, nous avons décidé d'incuber les spermatozoïdes dans le JC-1 pendant 15 min. Nous recommandons en outre d'être rigoureux dans cette durée d'incubation, puisque l'augmentation de la durée induit un risque de baisse de la population de haute qualité, et peut rendre inopérante la comparaison de différents échantillons.

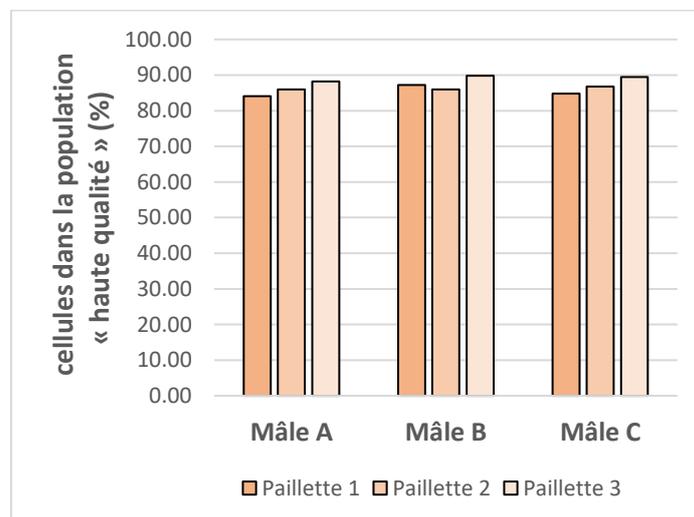
**Au final, ces expérimentations ont permis de disposer d'une procédure fiable d'évaluation de la qualité des spermatozoïdes en fonction de leur qualité mitochondriale. La méthode retenue, présentée en méthodes (section 2.2), implique une incubation de  $1 \times 10^6$  spermatozoïdes en présence de 0,5  $\mu\text{M}$  de JC-1 pendant 15 min à 20 °C. Le critère de qualité retenu est le pourcentage de spermatozoïdes dans la population de haute qualité du cytogramme de fluorescence rouge et verte.**

### 1.2.2 Étude de la variabilité inter-palettes

Il est souvent avancé que la température de cristallisation lors de la congélation pouvait varier d'une paillette à l'autre, avec le risque d'induire une certaine variabilité de la qualité des spermatozoïdes entre paillettes. Pour déterminer l'étendue de la variabilité de la qualité des mitochondries présente entre les paillettes de sperme cryoconservé d'un même mâle, afin de pouvoir ensuite différencier la variabilité observée entre les paillettes de celle due à l'effet d'une biotechnologie ou d'un traitement, nous avons étudié la variabilité de la qualité des

mitochondries entre les paillettes du même mâle. La variabilité a été objectivée en s'appuyant sur le coefficient de variation (écart-type/moyenne \*100).

Comme illustré par la **Figure 41**, nous avons observé une très faible variabilité du pourcentage de spermatozoïdes dans la population de haute qualité entre paillettes d'un même mâle. La variabilité moyenne (coefficient de variation) est respectivement de 2,4 %, 2,2 % et 2,7 % entre les paillettes des mâles A, B et C. La répétabilité des mesures nous permet de considérer que des moyennes d'échantillons qui s'écarteront de plus de 3 % les unes des autres signifieront vraisemblablement des différences notables de qualité des mitochondries liées à un traitement. Nous avons également calculé le coefficient de variation entre les ratios de fluorescence rouge/vert de la population d'intérêt des différentes paillettes d'un même mâle. Nous avons observé que le coefficient de variation est respectivement de 10,4 %, 15,5 % et 12 % en moyenne entre les paillettes du mâle A, B et C. Cela montre la variabilité du ratio de fluorescence rouge/vert.

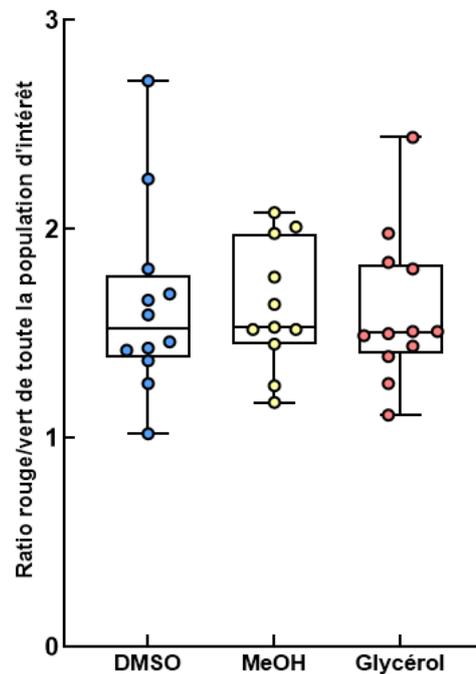


**Figure 41: Variabilité de la réponse au test JC-1 entre les paillettes d'un même mâle.** Le JC-1 est incubé à une concentration finale de 0,5  $\mu$ M pendant 15 min à 20 °C. Chaque valeur de pourcentage de cellules dans la population de haute qualité représente la moyenne d'un triplicat technique d'un mâle donné.

### 1.2.3 Comparaison de la qualité des mitochondries selon le cryoprotecteur

Notre objectif était d'étudier l'effet du cryoprotecteur couplé au processus de congélation-décongélation sur la qualité de la mitochondrie des spermatozoïdes. Dans cette partie, nous avons choisi de maintenir la présentation des résultats du ratio rouge/vert, car ils contribuent une nouvelle fois à illustrer les faiblesses de ce critère et les raisons du choix du critère obtenu. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les ratios des intensités de fluorescence rouge/vert des spermatozoïdes entre les différents cryoprotecteurs (**Figure 42**).

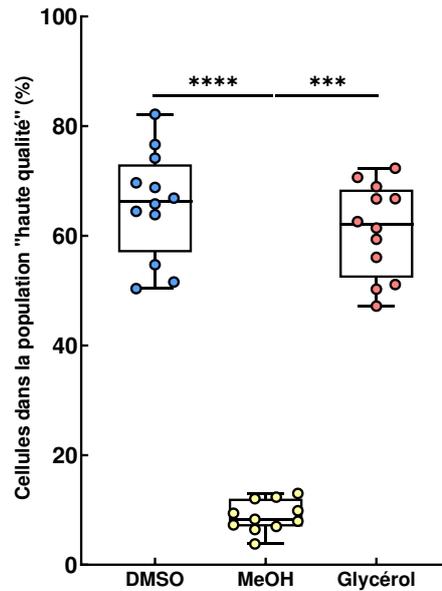
Les ratios sont en effet très proches les uns des autres. En revanche, la variabilité entre les mâles au sein du même cryoprotecteur est assez élevée.



**Figure 42 : Ratio des intensités de fluorescence rouge/vert en fonction du cryoprotecteur.**

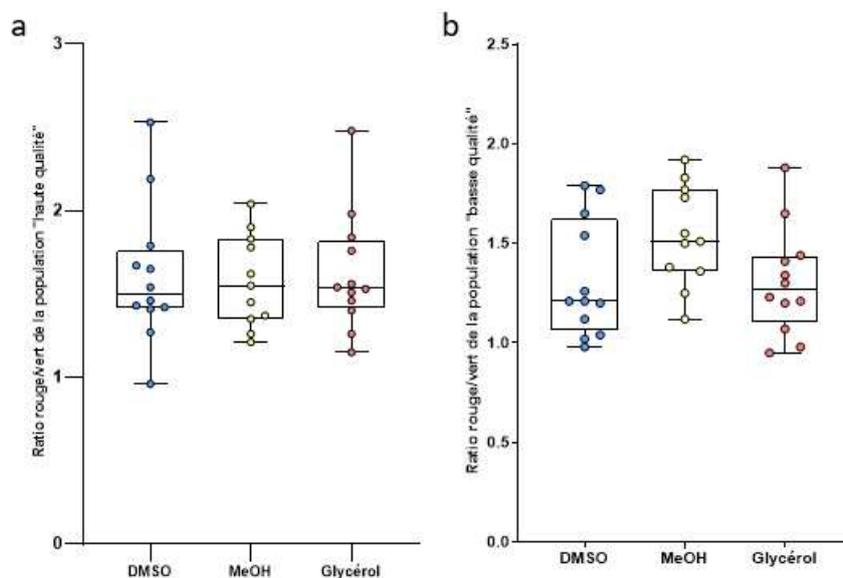
Chaque point représente la moyenne du ratio des intensités de fluorescence rouge/vert d'un triplicat technique d'un mâle donné. n=12 répliquats biologiques par condition. Test de Kruskal-Wallis : pas de différence significative.

En revanche, lorsque nous avons comparé le pourcentage de spermatozoïdes dans la population de haute qualité entre les différents cryoprotecteurs, nous avons observé un net effet du cryoprotecteur (**Figure 43**). Les pourcentages les plus élevés ont été obtenus avec le DMSO. Cela est cohérent avec le fait que le DMSO soit connu pour apporter la meilleure cryoprotection aux spermatozoïdes de truite. Ces pourcentages sont également élevés avec le glycérol, bien que légèrement plus faible (non significatif) que ceux obtenus en DMSO. Cela indique que le glycérol a protégé la qualité des mitochondries aussi bien que le DMSO. En revanche, le pourcentage de spermatozoïdes dans la population de haute qualité s'est effondré après cryoconservation avec le MeOH, ce qui indique une moindre protection de la fonctionnalité des mitochondries par le MeOH. En outre, la variabilité entre les mâles est plus importante en MeOH (coefficient de variation : 32 %) qu'avec les deux autres cryoprotecteurs (coefficient de variation : 14-15 %, proche du coefficient de variation interpaille voir ci-dessus). Cela révèle que la cryoprotection apportée par le MeOH sur les mitochondries des spermatozoïdes est plus variable que celle du DMSO ou du glycérol.



**Figure 43 : Qualité des mitochondries selon le cryoprotecteur.** Chaque point représente la moyenne du nombre de spermatozoïdes dans la population « haute qualité » d'un triplicat technique d'un mâle donné. n=12 réplicats biologiques par condition. Test Kruskal-Wallis. Les différences significatives sont indiquées : \*\*\* : p-value < 0,001 ; \*\*\*\* : p-value < 0,0001.

La réponse cellulaire vis-à-vis des cryoprotecteurs, que nous avons pu visualiser grâce au critère de la population de haute qualité, nous a conduits à chercher à mieux caractériser les sous populations (haute qualité et basse qualité). Nous avons alors analysé le ratio des intensités de fluorescence rouge/vert de ces deux populations selon les cryoprotecteurs. Comme le montre la **Figure 44a**, il n'y a pas de différence significative entre les ratios des intensités de fluorescence rouge/vert obtenus dans les différents cryoprotecteurs. Par contre, les valeurs individuelles sont toujours très variables, sans que nous ayons pu faire de corrélation entre ces valeurs et tout autre critère de qualité. Cela suggère que le ratio des intensités de fluorescence rouge/vert de la population de haute qualité n'est pas informatif. Le même manque de caractère informatif du ratio rouge/vert a été constaté pour la population de basse qualité (**Figure 44b**). De plus, les ratios des intensités de fluorescence rouge/vert des deux populations (haute qualité et basse qualité) sont similaires. Cela confirme que le ratio des intensités de fluorescence rouge/vert n'est pas informatif et pas pertinent pour notre modèle cellulaire.



**Figure 44 : Ratio rouge/vert des sous-populations « haute qualité » et « basse qualité » selon les cryoprotecteurs.** Chaque point représente la moyenne du ratio des intensités de fluorescence rouge/vert d'un triplicat technique d'un mâle donné. n=12 réplicats biologiques par condition. Test d'ANOVA : pas de différence significative.

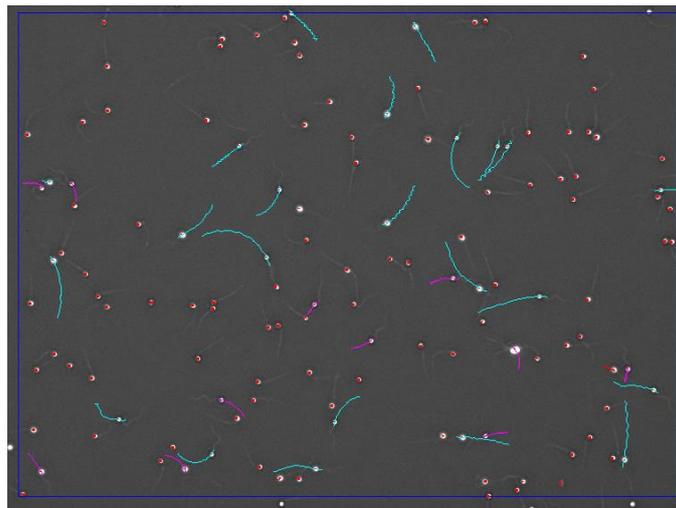
Nos résultats nous permettent de conclure que le DMSO et le glycérol ont montré la meilleure capacité à préserver la qualité des mitochondries des spermatozoïdes cryoconservés, alors qu'avec le MeOH la qualité des mitochondries est très faible. Nous avons aussi pu valider un critère fiable, répétable et discriminant de caractérisation de la fonctionnalité des mitochondries des spermatozoïdes de truite, basé sur la capacité à incorporer le JC-1 des spermatozoïdes les plus fonctionnels, indépendamment du ratio rouge/vert.

## 1.3 Motilité

La motilité des spermatozoïdes de poissons dépend des canaux ioniques présents dans la membrane plasmique et sensibles aux ions présents dans le milieu extra-cellulaire. La détection d'une variation des ions dans le milieu extra-cellulaire par ces canaux entraîne une activation de la motilité du spermatozoïde. La motilité peut aussi dépendre de l'énergie produite par la mitochondrie et stockée dans le spermatozoïde. Par conséquent, suite à la congélation, toute altération structurelle, même transitoire, de la membrane plasmique est susceptible d'entraîner une perte de motilité de certains spermatozoïdes, conduisant à une altération du pourcentage de motilité globale d'un ensemble de spermatozoïdes. Nous avons étudié la motilité du sperme décongelé en fonction des cryoprotecteurs afin de comparer l'impact du cryoprotecteur couplé au processus de congélation-décongélation sur la motilité.

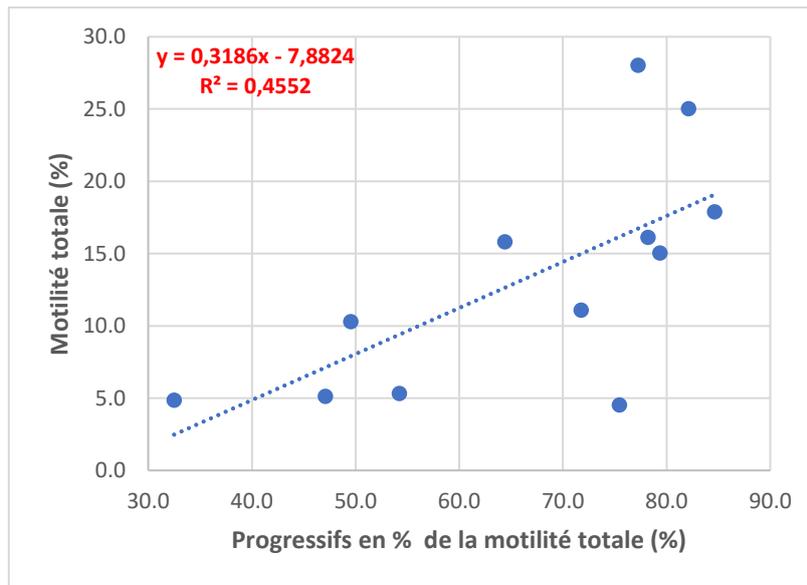
### 1.3.1 Adaptation des conditions de mesure de la motilité du sperme décongelé

Pour l'analyse des spermatozoïdes décongelés, nous avons fixé un seuil de VAP (average path velocity) de façon à ce que les spermatozoïdes lents soient ceux ayant ( $30 \mu\text{m/s} < \text{VAP} < 65 \mu\text{m/s}$ ) et que les progressifs soient les spermatozoïdes ayant une  $\text{VAP} \geq 65 \mu\text{m/s}$  (**Figure 45**). Ainsi, les spermatozoïdes dits mobiles renferment à la fois les spermatozoïdes lents et progressifs.



**Figure 45: Exemple de mesure de motilité du sperme décongelé, illustrant les différentes catégories de spermatozoïdes selon leur VAP.** La trace des trajectoires des spermatozoïdes individuels lors de la prise du film est indiquée par différentes couleurs. En bleu : spermatozoïde progressif ; en violet : spermatozoïde lent ; en rouge : spermatozoïde non mobile. Mesure réalisée avec l'IVOS II avec une vitesse de la caméra de 60 images /seconde et un enregistrement d'un film de 30 images.

Nous avons alors analysé si le pourcentage de spermatozoïdes progressifs pouvait apporter une information supplémentaire par rapport à l'analyse de la motilité totale. Nous avons détecté une corrélation significative entre les pourcentages de motilité totale et ceux des spermatozoïdes progressifs (**Figure 46**). Une telle corrélation fait un peu perdre de son intérêt au paramètre du pourcentage de spermatozoïdes progressifs, puisque, à l'exception de quelques mâles qui s'écartent de la droite de corrélation, une information similaire est donnée par les deux paramètres.



**Figure 46: Etude de la corrélation entre la motilité totale et les spermatozoïdes progressifs.**

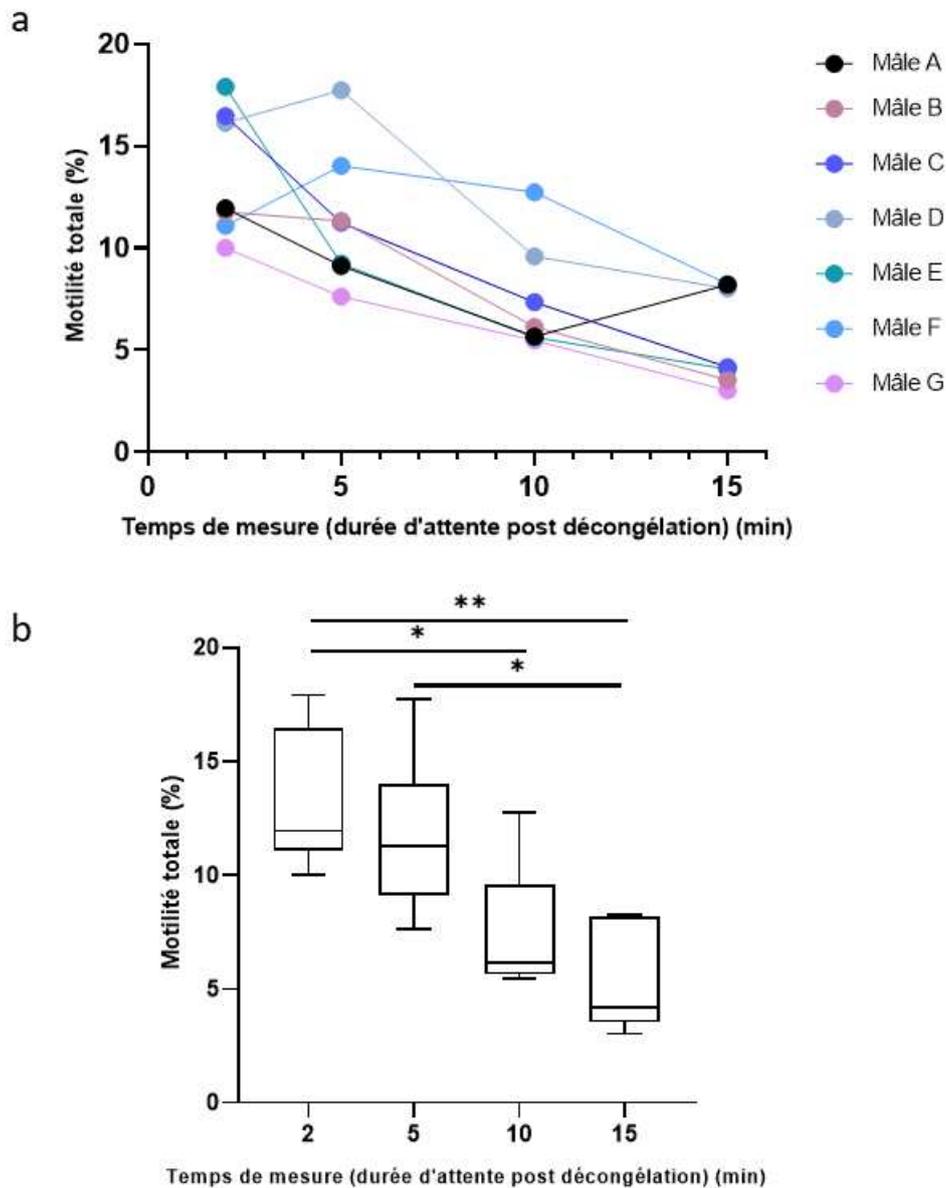
La motilité des spermatozoïdes étudiés est celle de ceux ayant subi congélation classique en DMSO. Progressifs en % de la motilité totale : pourcentage de spermatozoïdes ayant une motilité dans la catégorie des progressifs a été normalisé par rapport au pourcentage de spermatozoïdes motiles, afin de ne pas induire de biais de corrélation (l'IVOS II exprime ces valeurs en % de la population totale de spermatozoïdes). Corrélation de Spearman (p-valeur : 0,0106) : corrélation significative. n= 12 réplicats biologiques.

Au final, malgré cette exploration des paramètres de motilité dans la présente mise au point, nous les avons donc peu utilisés ensuite dans l'analyse de l'effet des cryoprotecteurs, car ils ne nous apportaient pas, en pratique, d'information supplémentaire majeure. Cela n'exclut pas leur utilisation dans l'équipe pour d'autres questions scientifiques, mais dans ce présent travail, nous avons exprimé les résultats de mobilité de nos expériences en pourcentages de motilité totale (nombre de spermatozoïdes mobiles (VAP > 30  $\mu\text{m/s}$ ) /nombre total de spermatozoïdes (mobiles et non mobiles) x 100).

Le second point d'attention avant de réaliser nos analyses de motilité concernait la question de la stabilité des motilités au cours du temps après la décongélation. Nous avons donc voulu déterminer la durée d'attente que peut supporter le sperme après la décongélation, sans perte de ses performances de motilité totale.

Comme illustré par la **Figure 47a**, la meilleure motilité totale du sperme a été obtenue à 2 min post décongélation sauf pour les mâles D et F, alors qu'elle a diminué progressivement au cours du temps pour la plupart des mâles. Nous avons également observé une grande variabilité entre les mâles à 2 et 5 min. Cela pourrait expliquer l'absence d'une différence significative entre ces deux temps de mesure (**Figure 47b**) alors que la motilité totale diminue significativement au cours du temps en comparant les autres temps de mesure à celui de 2 min. Quant à 5 min, nous avons déjà une baisse avec 5 mâles sur 7. Ainsi, suite à ces analyses

toutes les mesures ultérieures de la motilité totale ont été faites à 2 min. De plus, pour avoir la meilleure motilité, il est recommandé de mesurer à 2 min post décongélation.

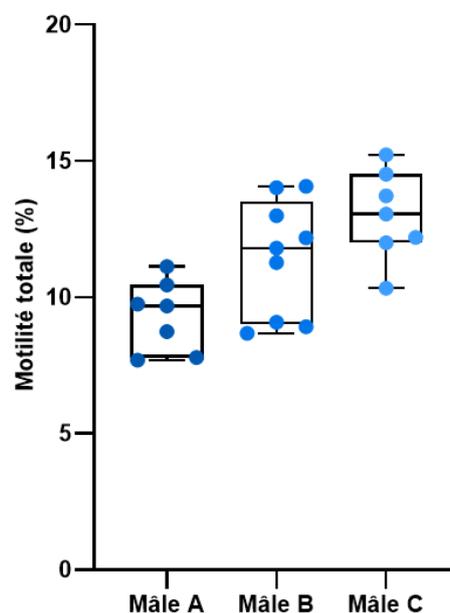


**Figure 47: Motilité totale du sperme décongelé selon le temps d'attente post décongélation.**

a. Motilité totale de chaque mâle en fonction du temps de mesure. Chaque point représente la moyenne de la motilité totale d'un triplicat technique d'un mâle donné. n= 7 réplicats biologiques. b. Les boîtes à moustaches présentent (du bas vers le haut) : minimum, 1<sup>e</sup> quartile, médiane, 3<sup>e</sup> quartile, maximum. Ces valeurs sont celles de n= 7 réplicats biologiques analysés en triplicats à chaque temps de mesure. Test de Kruskal-Wallis. Les différences significatives sont indiquées : \* : p-value < 0,05 ; \*\* : p-value < 0,01.

### 1.3.2 Étude de la variabilité de la motilité entre les paillettes du même mâle

Pour les mêmes raisons que décrit précédemment en 1.2., nous avons voulu déterminer la variabilité de la motilité du sperme décongelé entre les différentes paillettes du même mâle. Nous avons mesuré la motilité du sperme décongelé de 7 à 8 paillettes du même lot de paillettes pour chaque mâle (**Figure 48**). Les motilités totales du sperme décongelé sont en moyenne  $9,3 \pm 1,3$  % pour le mâle A,  $11,25 \pm 2,05$  % pour le mâle B et  $13,01 \pm 1,66$  % pour le mâle C. Cette analyse montre une certaine variabilité de la motilité totale entre les paillettes de chacun de ces mâles. Cette variabilité (coefficient de variation) est de 13,9 % pour le mâle A, 18,2 % pour le mâle B et 12,8 % pour le mâle C (**Figure 48**).



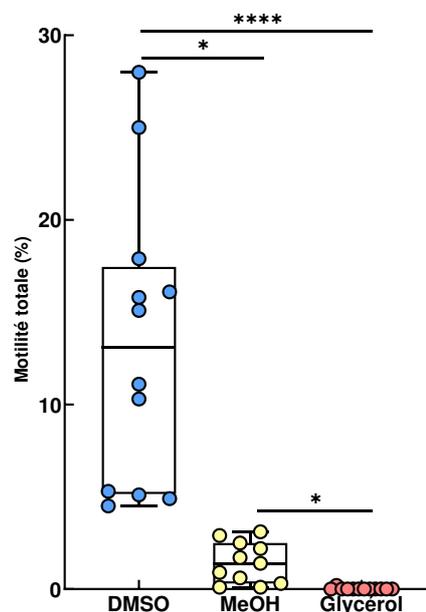
**Figure 48 : Etude de la variabilité de la motilité totale entre les paillettes d'un même mâle.**

Chaque point représente la moyenne de la motilité totale d'un triplicat technique pour une paillette d'un mâle donné.  $n= 7-9$  paillettes différentes par mâle.

Cette variabilité entre les paillettes illustre le fait que, contrairement au paramètre de qualité des mitochondries, la motilité n'est pas un paramètre stable entre les paillettes. Dans la mesure où nous avons parfaitement rationalisé les conditions de mesure de ce paramètre, nous faisons l'hypothèse que nous sommes bien en face de la variabilité du comportement des paillettes lors de la congélation-décongélation, et que la motilité des spermatozoïdes est une fonction qui y est très sensible. On ne peut exclure par ailleurs une hypothèse plus mathématique. En effet, les faibles valeurs de motilité du sperme décongelé donnent beaucoup de poids à des variations de quelques % (une variation de 5 à 10 % semble plus importante qu'une variation de 65 à 70 % comme ce que nous avons en sperme frais). Au final, une telle variabilité rend le test de motilité peu sensible et donc peu discriminant pour comparer différents échantillons, et elle nous a imposé le recours à de nombreux réplicats (pools de paillettes à la décongélation, multiplication des réplicats biologiques).

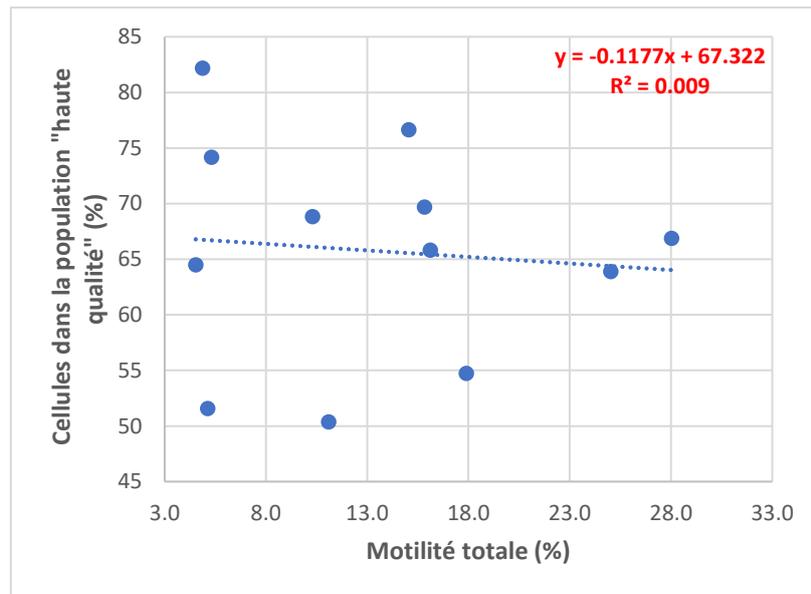
### 1.3.3 Comparaison de la motilité du sperme décongelé selon les cryoprotecteurs

Nous avons mesuré la motilité totale du sperme décongelé selon le cryoprotecteur (**Figure 49**). Les meilleures motilités ont été obtenues avec le DMSO. Cela est cohérent avec le fait que le DMSO est le meilleur cryoprotecteur en assurant une meilleure protection aux spermatozoïdes chez la truite arc-en-ciel (voir notre synthèse bibliographique). Ces résultats sont également cohérents avec ceux que nous avons obtenus sur la qualité membranaire et la qualité des mitochondries. Avec le MeOH, la motilité a significativement diminué. Ces résultats sont également cohérents avec la qualité membranaire qui a subi une protection insuffisante avec le MeOH, et la qualité des mitochondries montrant un très faible pourcentage de spermatozoïdes appartenant à la population de haute qualité. Cela indique que le MeOH a apporté une certaine protection aux spermatozoïdes de truite arc-en-ciel, mais pas aussi bonne que celle apportée par le DMSO. De plus, nous avons observé que les motilités sont très variables entre les mâles, que ce soit au sein du DMSO ou du MeOH (**Figure 49**). Ceci s'explique par la variabilité biologique entre les mâles. Enfin, la motilité est nulle avec le glycérol alors qu'il protégeait la membrane et la qualité des mitochondries d'une façon similaire au DMSO. Cette absence de motilité avec le glycérol peut s'expliquer par le fait que, soit le glycérol affecte directement les spermatozoïdes en inhibant leur motilité, selon un mécanisme à élucider, soit le processus de congélation-décongélation avec le glycérol entraîne cette perte de motilité.



**Figure 49 : Motilité totale du sperme décongelé selon le cryoprotecteur.** Chaque point représente la moyenne de la motilité totale de 3-4 réplicats techniques de chaque mâle. n=12 réplicats biologiques par condition. Test de Kruskal-Wallis. Les différences significatives sont indiquées : \* : p-value < 0,05 ; \*\*\*\* : p-value < 0,0001.

Comme les meilleures motilités ainsi que la meilleure qualité des mitochondries sont obtenues avec le DMSO, nous avons recherché si ces 2 critères sont liés. En étudiant la corrélation entre la qualité des mitochondries et la motilité totale obtenue avec le DMSO, nous n'avons pas observé une corrélation significative (**Figure 50**). Cela indique qu'une population de spermatozoïdes capable de bien fixer le JC-1, ayant ainsi une activité mitochondriale élevée, n'entraîne pas forcément une motilité élevée. Ainsi, la qualité des mitochondries n'expliquerait pas la motilité à la décongélation.



**Figure 50 : Etude de la corrélation entre la qualité des mitochondries et la motilité totale du sperme décongelé en DMSO.** Corrélation de Spearman (p-value = 0,5881) : pas de corrélation. n= 12 répliquats biologiques. L'analyse a été effectuée sur les échantillons cryoconservés avec le DMSO.

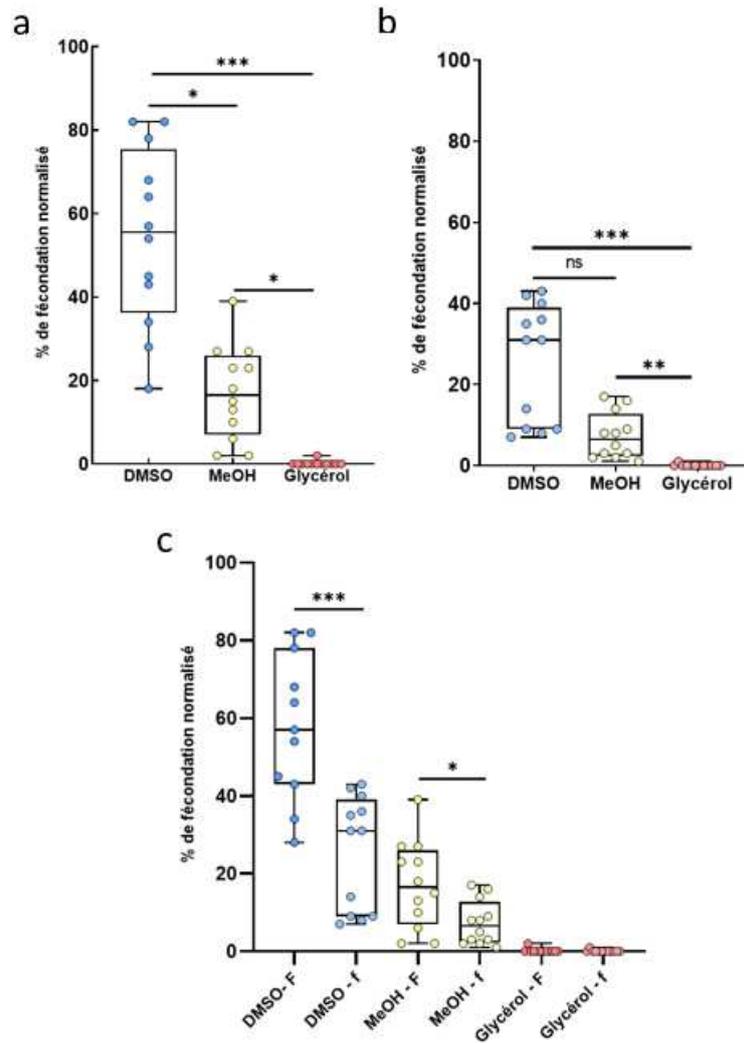
Pour conclure, nos analyses sur la motilité du sperme décongelé indiquent que les mesures doivent être réalisées au plus tard à 2 min post décongélation, pour avoir la meilleure motilité totale. Nous avons aussi vu que la variabilité de la motilité d'une paillette à l'autre est élevée, ce qui rend l'analyse de la motilité peu sensible pour détecter de faibles variations de qualité sur ce critère. Pour autant, nous avons pu montrer que les meilleures motilités totales du sperme décongelé sont obtenues avec du DMSO alors qu'elles sont extrêmement faibles avec le MeOH et nulles avec le glycérol.

## 1.4 Capacité de fécondance du sperme décongelé

Pour évaluer l'intégralité de la fonctionnalité du sperme décongelé, nous avons évalué leur capacité de fécondance. Il s'agit d'un critère très important car la finalité du sperme décongelé est de pouvoir féconder l'ovocyte. Pour étudier la capacité de fécondance maximale ainsi que la capacité limite de chaque sperme décongelé selon le cryoprotecteur, nous avons réalisé des tests de fécondance avec des concentrations de sperme en excès et en quantité limite, en appliquant respectivement 2 ratios spermatozoïdes/ovule différents :  $2 \times 10^6$  et 500 000 spermatozoïdes/ovule. Nous faisons en effet l'hypothèse que si le nombre de spermatozoïdes par ovule est en trop grand excès, cela peut conduire à masquer des différences ténues de capacité de fécondance, et faire perdre de sa sensibilité au test.

Avec le ratio  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes/ovule, nous avons observé que les pourcentages de fécondation les plus élevés sont obtenus en DMSO (en moyenne :  $54 \pm 21$  %) (**Figure 51a**). Cela est cohérent avec les meilleures motilités obtenues avec le DMSO, ainsi que la bonne protection de la qualité membranaire et de la qualité des mitochondries. Les pourcentages de fécondation obtenus avec le MeOH sont significativement plus faibles (en moyenne :  $17 \pm 11$  %) que ceux du DMSO. Ces résultats sont également cohérents avec la plus faible protection procurée par le MeOH à la membrane, aux mitochondries et à la motilité. Nous avons également noté que malgré des pourcentages de motilité très bas avec les échantillons MeOH, les pourcentages de fécondation sont un peu plus élevés. Cela indique qu'un excès de spermatozoïdes au moment de la fécondation a permis d'augmenter la performance de fécondance de ces échantillons. Avec le glycérol, les pourcentages de fécondation observés sont nuls. Cela est cohérent avec l'absence de motilité des spermatozoïdes, et ce malgré la préservation de la membrane et de la qualité des mitochondries. De plus, nous avons observé une grande variabilité des pourcentages de fécondation avec le DMSO et le MeOH entre mâles.

Avec le ratio 500 000 spermatozoïdes/ovule, bien que les pourcentages de fécondation soient globalement plus faibles, la même hiérarchie de l'impact du cryoprotecteur sur les pourcentages de fécondation a été observée (**Figure 51b**). En effet, les pourcentages de fécondation sont en moyenne  $25 \pm 15$  % avec le DMSO,  $7 \pm 6$  % avec le MeOH et nuls avec le glycérol. En revanche, aucune différence significative n'a été détectée entre le DMSO et le MeOH. Ceci peut s'expliquer par la grande variabilité des pourcentages de fécondation entre les différents mâles que ce soit avec le DMSO ou avec le MeOH à ce ratio de fécondation.

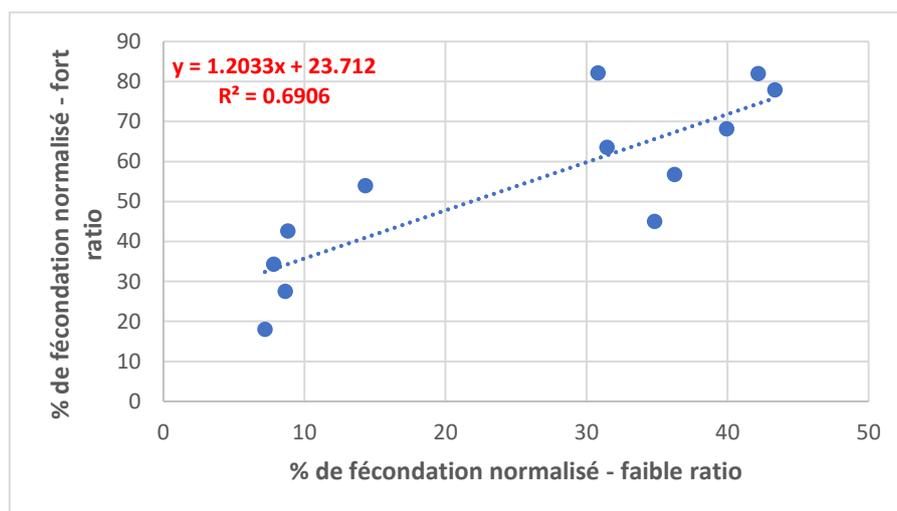


**Figure 51 : Capacité de fécondance du sperme décongelé selon le cryoprotecteur.** a. Pourcentages de fécondation normalisés obtenus avec un ratio de  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes/ovule. Test de Kruskal-Wallis : \* : p-value < 0,05 ; \*\*\* : p-value < 0,001. b. Pourcentages de fécondation normalisés obtenus avec un ratio de 500 000 spermatozoïdes/ovule. Test de Kruskal-Wallis : \*\* : p-value < 0,01 ; \*\*\* : p-value < 0,001. c. Représentation fusionnée des pourcentages de fécondation deux premiers graphes (ratios  $2 \times 10^6$  et 500 000 spermatozoïdes/ovule) pour comparer les ratios spermatozoïdes/ovule. F : forte concentration :  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes/ovule ; f : faible concentration : 500 000 spermatozoïdes/ovule. Test de Mann Whitney entre forte et faible concentration de chaque cryoprotecteur : \* : p-value < 0,05 ; \*\*\* : p-value < 0,001.

La baisse significative des pourcentages de fécondation obtenus avec 500 000 spermatozoïdes/ovule (**Figure 51c**) pouvait être attendue, mais elle pose la question de la linéarité de ce pourcentage par rapport aux spermatozoïdes disponibles. En effet, entre les 2 ratios 500 000 et  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes/ovule, il existe un facteur 4 x de quantité de spermatozoïdes. Nous pouvions donc nous attendre à ce qu'à  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes/ovule, les pourcentages de fécondation soient 4 x plus élevés que ceux à 500 000

spermatozoïdes/ovule. Or nos résultats contredisent cette hypothèse. De même, nous avons montré que les pourcentages de fécondation ne sont pas à 100 % avec un ratio de  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes/ovule, alors que ce ratio donnait un très fort excès de spermatozoïdes par ovule. Nous n'avons donc pas atteint une saturation de la fécondation des ovules. Cette observation nous conduit à proposer que les spermatozoïdes endommagés ou même morts bloqueraient l'accès aux ovules par les autres spermatozoïdes, en raison de leur nombre important.

Un dernier élément d'analyse de ces données concerne le maintien, ou pas, de la hiérarchie entre mâles quel que soit le ratio de fécondation. Bien que la hiérarchie mâle à mâle n'ait pas été parfaitement conservée, nous avons cependant observé une corrélation très significative entre les deux pourcentages de fécondation, que ce soit en DMSO ou en MeOH (**Figure 52**). Ainsi, les meilleurs spermatozoïdes donneront les meilleurs pourcentages, quel que soit le ratio de fécondation utilisé. Cette observation, ajoutée aux résultats décrits ci-dessus, font donc un peu perdre de son intérêt au bas ratio spermatozoïdes/ovule qui n'apporte en fait pas d'information supplémentaire.



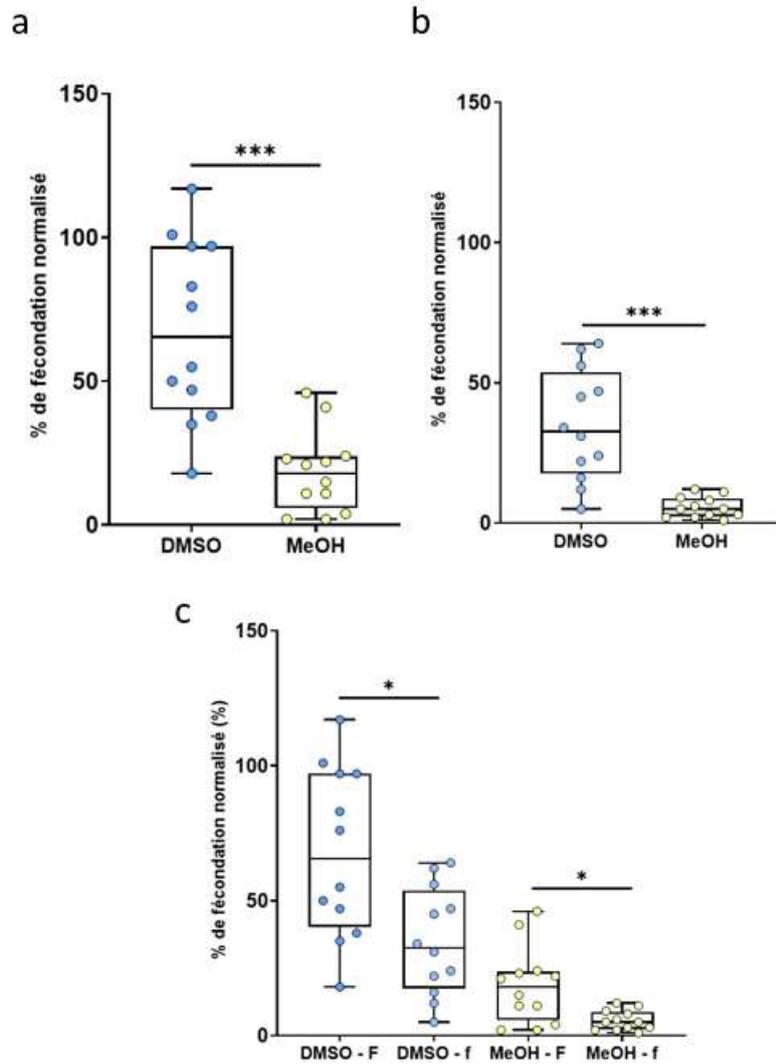
**Figure 52 : Etude de la corrélation entre les pourcentages de fécondation obtenus à un fort et à un faible ratio de spermatozoïdes/ovule.** Quel que soit le ratio de spermatozoïdes/ovule, les pourcentages de fécondation normalisés ont été obtenus avec du sperme décongelé lavé issu d'une cryoconservation avec du DMSO. Test de Spearman : corrélation significative : p value : 0,0073.

En raison de la grande variabilité des pourcentages de fécondation que nous avons obtenue au sein d'un même cryoprotecteur entre les différents mâles, sachant que chaque test de fécondance a été fait en un seul réplicat pour chaque mâle, nous avons décidé de valider les résultats de cette première expérimentation en réalisant une deuxième expérimentation avec des duplicats de chaque test de fécondance de chaque mâle selon le cryoprotecteur. Étant donné que les pourcentages de fécondation avec le glycérol sont nuls, nous avons uniquement

réalisé la deuxième expérimentation avec du sperme cryoconservé avec du DMSO ou MeOH uniquement.

Comme le montrent les **Figure 53a** et **Figure 53b**, cette deuxième expérience a permis de confirmer que les meilleurs pourcentages de fécondation sont obtenus avec du DMSO alors que ceux obtenus avec du MeOH sont significativement plus faibles. Les pourcentages de fécondation avec  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes/ovule étaient de  $68 \pm 31$  % en DMSO et  $19 \pm 14$  % en MeOH, et les pourcentages de fécondation avec 500 000 spermatozoïdes/ovule étaient en moyenne  $35 \pm 20$  % en DMSO et  $6 \pm 4$  % en MeOH. Bien que dans cette seconde expérience de fécondation, les pourcentages aient été un peu meilleurs pour les deux cryoprotecteurs, ces résultats valident les résultats de la première expérimentation en démontrant la même hiérarchie des pourcentages de fécondation selon le cryoprotecteur.

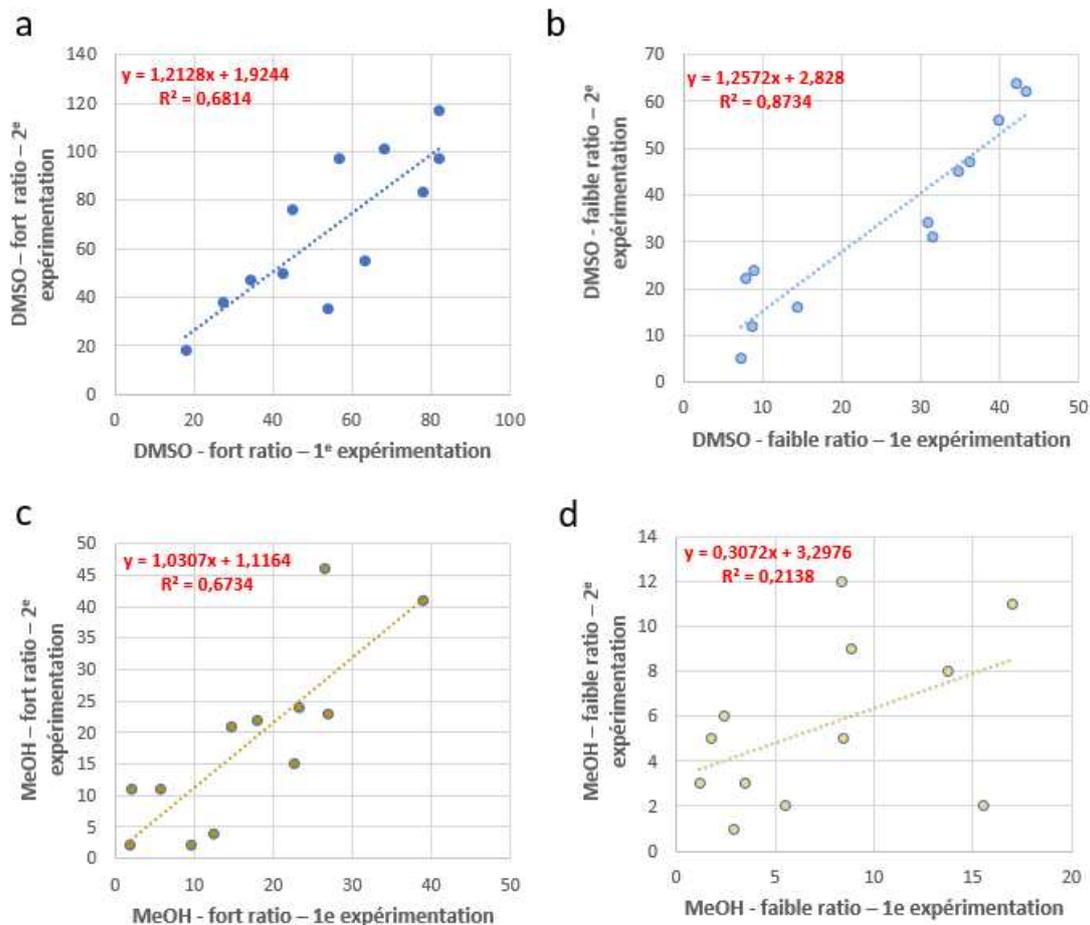
Comme pour la première expérimentation, nous avons constaté une variabilité importante des pourcentages de fécondation entre les différents mâles en DMSO et en MeOH. L'homogénéité des duplicats pour chaque test de fécondance indique que la variabilité observée est liée à la variabilité biologique entre mâles (à laquelle s'ajoute la variabilité entre paillettes) comme suggéré suite aux résultats de la première expérimentation. En outre, les pourcentages de fécondation avec un ratio 500 000 spermatozoïdes/ovule ont également été significativement plus faibles que ceux avec  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes/ovule pour un même cryoprotecteur (**Figure 53c**). Ainsi, ces résultats valident nos observations de la première expérimentation.



**Figure 53: Validation des pourcentages de fécondation du sperme décongelé selon le cryoprotecteur.** a. Pourcentages de fécondation normalisés obtenus avec un ratio de  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes/ovule. Test de Mann Whitney : \*: p-value < 0,001. b. Pourcentages de fécondation normalisés obtenus avec un ratio de 500 000 spermatozoïdes/ovule. Test de Mann Whitney : \*: p-value < 0,001. c. Pourcentages de fécondation normalisés obtenus avec les ratios  $2 \times 10^6$  et 500 000 spermatozoïdes/ovule. F : forte concentration :  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes/ovule. f : faible concentration : 500 000 spermatozoïdes/ovule. Test de Mann Whitney entre fort et faible ratio de chaque cryoprotecteur : \*: p-value < 0,05

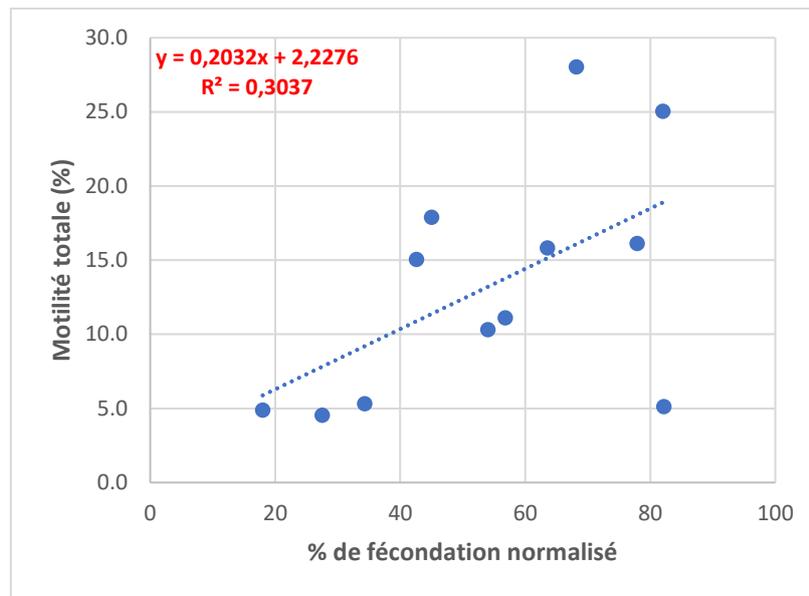
Par ailleurs, nous avons voulu tirer profit de ces deux expériences de fécondation indépendantes pour évaluer si nous obtenions la même hiérarchie entre mâles, et étudier si les résultats de la 1<sup>e</sup> expérimentation étaient suffisants malgré la mesure d'un seul réplicat pour chaque test de fécondance et l'obtention de pourcentages de fécondations un peu plus faibles. Nous avons étudié la corrélation entre ces deux expérimentations, et avons observé que les pourcentages de fécondation en DMSO étaient corrélés, et ce quel que soit le ratio de spermatozoïdes/ovule (**Figure 54**). Cette corrélation a également été observée en MeOH, mais uniquement au fort ratio spermatozoïdes/ovule. Nous pensons que l'absence de corrélation

au faible ratio est techniquement due aux faibles variations des pourcentages de fécondation entre mâles dans les 2 expérimentations, entraînant un poids important à des petites différences pas nécessairement significatives biologiquement. Ces corrélations indiquent que les résultats obtenus avec la première expérimentation sont valides et fiables. Cela suggère également qu'une expérimentation unique et en simplicité de tests en fécondance est suffisante pour avoir des résultats fiables, notamment grâce au nombre élevé de réplicats biologiques.



**Figure 54: Etude de la corrélation des pourcentages de fécondation entre les 2 expérimentations.** a. Corrélation entre les pourcentages de fécondation normalisés obtenus en DMSO avec un ratio  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes/ovule entre la 1<sup>e</sup> et la 2<sup>e</sup> expérimentation. Test de Spearman : p value : 0,001. b. Corrélation entre les pourcentages de fécondation normalisés obtenus en DMSO avec un ratio de 500 000 spermatozoïdes/ovule entre la 1<sup>e</sup> et la 2<sup>e</sup> expérimentation. Test de Spearman : p value < 0,0001. c. Corrélation entre les pourcentages de fécondation normalisés obtenus en MeOH avec un ratio  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes/ovule entre la 1<sup>e</sup> et la 2<sup>e</sup> expérimentation. Test de Spearman : p value : 0,0005. d. Corrélation entre les pourcentages de fécondation normalisés obtenus en MeOH avec un ratio de 500 000 spermatozoïdes/ovule entre la 1<sup>e</sup> et la 2<sup>e</sup> expérimentation. Test de Spearman : p value : 0,23.

Les meilleurs pourcentages de fécondation obtenus avec le DMSO, associés aux meilleures motilités que nous avons observées avec ce cryoprotecteur, nous ont conduits à vouloir tester si la capacité de fécondance d'un mâle pouvait être prédite par sa motilité. Nous avons observé une absence de corrélation entre ces deux paramètres (**Figure 55**), malgré une tendance globale montrant que quand la motilité totale augmente, la capacité de fécondance augmente.



**Figure 55 : Etude de la corrélation entre la motilité totale et la capacité de fécondance en DMSO.** Corrélation de Spearman : p value : 0,0541. Absence de corrélation significative. Les pourcentages de fécondation normalisés sont ceux obtenus avec du DMSO à un ratio  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes/ovule.

Nos résultats montrent que la meilleure capacité de fécondance est obtenue avec le DMSO puis avec le MeOH, et que le glycérol ne maintient aucune capacité de fécondation dans le spermatozoïde. Nos données montrent également une absence de saturation des taux de fécondation avec une concentration de spermatozoïdes en excès.

## Conclusion générale concernant l'analyse de la qualité cellulaire du sperme décongelé

L'analyse de la qualité cellulaire du sperme décongelé a révélé la présence d'un panel d'altérations différentes des spermatozoïdes selon le cryoprotecteur. Le DMSO est bien le cryoprotecteur le plus performant dans nos conditions, qui préserve le mieux toutes les fonctions cellulaires du spermatozoïde. Le MeOH est moins efficace dans la protection de la qualité cellulaire quel que soit le paramètre cellulaire. De manière intéressante, le glycérol a été capable de préserver particulièrement bien la qualité membranaire et la qualité des mitochondries, alors qu'il s'est avéré complètement inefficace dans la protection de la motilité et capacité de fécondance. Outre la variabilité constatée entre les cryoprotecteurs, nous avons également observé une certaine variabilité entre les mâles pour certains paramètres. Par conséquent, ce panel d'altérations montre que nous avons pu induire des situations contrastées suite à la cryoconservation du sperme avec différents cryoprotecteurs. Notre objectif consiste ensuite à étudier l'impact de la cryoconservation sur la méthylation de l'ADN dans des situations d'altérations cellulaires très variables, à la fois liées aux molécules cryoprotectrices en présence et aux réponses individuelles des mâles.

## 2. Analyse de la méthylation de l'ADN par le RRBS : forces et faiblesses

Pour étudier la méthylation de l'ADN, nous avons utilisé la technique du RRBS. Comme évoqué auparavant dans ce manuscrit (section 2.4 de la synthèse bibliographique), nous avons choisi cette méthode de représentation réduite du génome afin de limiter la quantité de données produites, et donc d'étudier plusieurs réplicats biologiques et plusieurs conditions expérimentales. En préalable à cette étude, nous proposons ici de déterminer la qualité de représentations des informations fournies par le RRBS. Nous avons ainsi réalisé une analyse critique des données de séquençage obtenues avec le RRBS et des traitements bio-informatiques retenus.

Cette analyse, réalisée sur le jeu de données issues des 12 spermatozoïdes frais, a consisté tout d'abord à effectuer les contrôles classiques de qualité des données de séquençage à leur réception, à déterminer la quantité des données disponibles suite au nettoyage des données brutes, et enfin à déterminer l'ampleur des informations disponibles par rapport aux CpGs du génome de référence, notamment en évaluant la qualité de l'alignement de nos séquences à ce génome (pourcentage d'alignement). De plus, dans la mesure où les informations sur la méthylation des cytosines dans les sites CpGs de chacun des 2 brins de l'ADN nous intéressent, car nous ignorons leur degré d'indépendance lors de dommages liés à la cryoconservation, nous avons recherché à quel pourcentage de représentation du génome les cytosines séquencées correspondent, en incluant tous les sites des brins + et - du génome de références.

Comme indiqué auparavant, le RRBS s'appuie sur un séquençage réduit du génome. Le choix de l'enzyme de restriction MspI pour la digestion de l'ADN a en outre permis que chez les souris et les humains, les régions séquencées soient enrichies en sites CpG, notamment les îlots CpGs et les régions promotrices (Smith et al. 2009 ; Gu et al. 2010). Ainsi, le RRBS génère, chez les mammifères, une couverture en sites CpGs supérieure à la couverture de la fraction séquencée du génome. Suite à une coupure *in silico* du génome, digestion identique à celle réalisée par MspI, le RRBS induit en effet un enrichissement en sites CpGs qui est de x 5,9 (par rapport à la couverture du génome) chez l'humain. Cet enrichissement, calculé à partir des données de Smith et al. 2009 est de x 5,0 chez la souris. Par contre, chez le poisson zèbre, cet enrichissement ne serait que de x 2,4, d'après un calcul théorique suite à une coupure *in silico* du génome, digestion identique à celle réalisée par MspI (Chatterjee et al. 2013). Cette observation soulève la question de l'aptitude du RRBS à représenter suffisamment de sites CpGs chez d'autres espèces de poissons. Ainsi, nous avons cherché à déterminer quel enrichissement en sites CpGs du génome nous obtenions chez la truite, par rapport à la couverture du génome (déterminée par le pourcentage d'alignement de nos séquences au génome de référence). Notre objectif était au final de déterminer si des fragments d'ADN enrichis en sites CpG ont été capturés par le RRBS dans nos échantillons (ADN de spermatozoïdes de truite arc-en-ciel).

En raison de la digestion de l'ADN par l'enzyme MspI, les fragments qui seront sélectionnés et séquencés sont plus susceptibles de représenter les mêmes régions génomiques entre les réplicats biologiques que ne le ferait une fragmentation aléatoire (par sonication par exemple). C'est en tout cas ce qui a été précédemment proposé par Meissner et ses collègues ( Meissner et al. 2008) pour les génomes de mammifères. Cela devrait donner des sites CpGs qui seront plus similaires entre les réplicats biologiques en comparant à ceux obtenus à la suite d'une fragmentation aléatoire. Pour évaluer cela, nous avons exploré dans notre étude si les sites CpG génomiques représentés étaient reproductibles entre les réplicats biologiques. Nous avons apporté une attention particulière à la représentation des CpGs dans les réplicats biologiques, puisque notre objectif initial était d'intégrer cette notion de variabilité biologique.

Nous avons en outre analysé la distribution des données tout au long du génome pour pouvoir identifier à quel point les données représentent le génome d'une façon réduite mais homogène. Afin d'étudier d'une manière plus approfondie la représentation du génome avec nos données de RRBS, nous avons évalué dans quelle mesure les sites CpGs génomiques appartenaient aux différentes régions génomiques annotées qui sont les régions promotrices, les régions 5' et 3'UTR, les introns et les exons et les régions intergénomiques.

Pour mettre en avant l'importance d'adapter l'analyse bioinformatique aux données obtenues avec le RRBS, et à ne pas se lancer aveuglément dans l'interprétation des données en se basant sur les DMCs qui peuvent ne pas avoir de signification biologique, nous avons mené une analyse factice, en comparant la méthylation de l'ADN du sperme frais entre 2 groupes de mâles créés de façon totalement aléatoire (tirage au sort). Dans la mesure où ces deux groupes ont les mêmes caractéristiques, aucune différence statistique ne doit sortir d'une telle analyse.

La réalisation de cette analyse critique des données fournies par le RRBS m'a permis de découvrir, et donc de mettre en avant, des points d'attention lorsqu'on a affaire à un jeu de données de RRBS.

Ce travail a été soumis le 20/06/2023 dans la revue Fish Physiology and Biochemistry et sur le site BioRxiv sous le DOI : 10.1101/2023.06.20.545730. Il est en cours de révision dans la revue Fish Physiology and Biochemistry.

## Publication N° 1 : Strengths and limitations of reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) for DNA methylation analysis in fish: a case-study with rainbow trout spermatozoa

Marina El Kamouh<sup>1\*</sup>, Aurélien Brionne<sup>1</sup>, Amin Sayyari<sup>2</sup>, Delphine Lallias<sup>3</sup>, Catherine Labbé<sup>1\*</sup>, Audrey Laurent<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRAE, Fish Physiology and Genomics, UR 1037, Rennes, France

<sup>2</sup>Department of Production Animal Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway

<sup>3</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, Jouy-en-Josas, France

[marina.el-kamouh@inrae.fr](mailto:marina.el-kamouh@inrae.fr) ; [aurelien.brionne@inrae.fr](mailto:aurelien.brionne@inrae.fr) ; [amin.sayyari@nmbu.no](mailto:amin.sayyari@nmbu.no) ; [delphine.lallias@inrae.fr](mailto:delphine.lallias@inrae.fr) ; [catherine.labbe@inrae.fr](mailto:catherine.labbe@inrae.fr) ; [audrey.laurent@inrae.fr](mailto:audrey.laurent@inrae.fr)

\* Corresponding authors

Email address of corresponding authors: [marina.el-kamouh@inrae.fr](mailto:marina.el-kamouh@inrae.fr) ; [catherine.labbe@inrae.fr](mailto:catherine.labbe@inrae.fr)

Marina El Kamouh: <https://orcid.org/0009-0008-9656-3348>

Delphine Lallias: <https://orcid.org/0000-0002-1609-0827>

Catherine Labbé: <https://orcid.org/0000-0002-6058-9684>

Audrey Laurent: <https://orcid.org/0000-0002-7643-6017>

### Abstract

DNA methylation in CpG dinucleotides is an important epigenetic mark in fish spermatozoa since it has been shown that some sperm methylome features are transmitted to the offspring. RRBS (reduced representation bisulfite sequencing) is one of the genome-scale methods developed to assess DNA methylation. It allows the sequencing of a reduced fraction of the genome expected to be enriched in CpGs. We aim to characterize the features of the CpGs provided by RRBS in rainbow trout spermatozoa, in order to evaluate the potential of this approach for sperm biotechnologies studies. We observed that RRBS did provide a reduced amount of genomic data, the sum of the CpGs analyzed on 12 males spanning 9 % of the total genomic CpGs. CpGs were only slightly enriched in the RRBS data (x 1.7 when referring to all the sequenced nucleotides), likely because of the trout genome structure and the sequenced fragments size. All genomic functional features were represented in our CpG dataset, with a noticeable enrichment in exons but not in promoters. We also showed that the sharing of common CpGs between biological replicates was reduced (< 10 % of the analyzed CpGs), although this proportion was maintained from 3 to 9 biological replicates. RRBS is therefore a relevant method to scan the CpG DNA methylation status of spermatozoa along rainbow trout genome, although in a very reduced pattern. The choices that are to be made regarding fragment size selection and regarding the options during bioinformatic data

104

PARTIE III : RESULTATS

2. Analyse de la méthylation de l'ADN par le RRBS : forces et faiblesses

processing are discussed.

**Keywords:** epigenetics, gamete, fish, bisulfite sequencing

## **Acknowledgment**

The authors acknowledge the skillful involvement of the staff from the ISC LPGP (Infrastructure Scientifique Collective du Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons) and UE INRAE PEIMA for animal rearing and care. The authors wish to warmly thank Vincent Coustham for his valuable comments on the interpretation of our RRBS data which triggered the motivation to write this paper.

## **Introduction**

Epigenetic actors include the well described histone tails modifications and DNA methylation (Labbé et al., 2017; Cavalli and Heard, 2019). DNA methylation, one of the most extensively studied epigenetic mark, involves the covalent binding of a methyl group on a cytosine, followed almost exclusively in vertebrates by a guanine. Hence, DNA methylation can be referred to as the methylation of CpG dinucleotides. This epigenetic mark has significant importance in the control of gene expression, X chromosome inactivation and monoallelic gene expression in mammals (Bird, 2002). Furthermore, DNA methylation is particularly important in fish spermatozoa. Indeed, it has been demonstrated in zebrafish that some sperm methylome features are transmitted to the offspring and maintained during early embryogenesis (Jiang et al., 2013; Murphy et al., 2018; Potok et al., 2013). These features are involved in the control of embryo development. Hence, we surmise that alterations of the DNA methylation in spermatozoa might induce the risk of altering the offspring's development.

To assess DNA methylation at the whole genome level, bulk assay of the cytosines bearing methyl groups include the LUMA (Luminometric Methylation Assay) (Karimi et al., 2006), LC-MS/MS or HPLC (Kurdyukov and Bullock, 2016), but these provide a mean methylation level for the whole sample rather than the methylation status of a given cytosine in the genome. Characterization of methylated sites at identified positions in the genome relies, among others (Agius et al., 2023), on methods involving DNA bisulfite conversion and sequencing (BS-Seq). During bisulfite treatment of the purified and fragmented DNA, unmethylated cytosines are deaminated into uracils, the latter being converted into thymines after PCR amplification of the DNA fragments. Since methylated cytosines (both 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine) will not be deaminated, they can be *a posteriori* differentiated from the unmethylated cytosines that will have been thymine-converted. This differentiation is carried out after DNA fragments sequencing, and mapping of the sequences to a reference genome (both in its *in silico* bisulfite-converted and non-converted versions). Whole-genome bisulfite sequencing (WGBS) (Frommer et al., 1992), and reduced representation bisulfite

sequencing (RRBS) (Meissner et al., 2005, 2008; Smith et al., 2009) are the two genome-wide bisulfite-based methods. The RRBS method for DNA methylation study differs from WGBS in that it involves endonuclease fractionation of the DNA instead of a random one, and that the number of fragments submitted to sequencing is reduced. RRBS was developed for mice genome in order to assess the methylation status of a reduced CpG fraction deemed to be representative of the whole genome (Meissner, 2005). This technique was then considered as cheaper than would be the sequencing of the whole genome, while still providing a reliable amount of information on DNA methylation. The choice of the MspI endonuclease for DNA fractionation further allowed that in mice and humans, the sequenced regions are enriched in CpG-sites, namely CpG islands and promoter regions, while CpG poor regions are underrepresented (Smith et al., 2009; Gu et al., 2010). Hence, RRBS generates, in mammals, a CpG coverage that is higher than the coverage of the sequenced genome fraction. Another advantage of RRBS is that it cuts the genomic DNA at specific restriction sites, and the subset of the fragments resulting from this cut was proposed to be reproducible among the biological replicates (Meissner, 2005). Last, because RRBS does not involve the sequencing of the whole genome, the amount of produced data is reduced. As a consequence, less storage availability and less calculation power for analyses will be needed. This allows the analysis of many biological replicates at a lower cost, which is very useful when the assessment of sample variability is at stake.

The question of using RRBS for fish genome studies was first settled in zebrafish (Chatterjee et al., 2013) and applied to the brain methylome. Despite zebrafish genome being smaller than in humans and mice, the *in silico* testing of RRBS showed that, for the same amount of sequenced genome (about 2.2 % of the whole genome), a lower amount of CpG-sites would be recovered in zebrafish compared to humans and mice. This meant that a reduced sequenced fraction would yield a lower fraction of informative CpGs than in humans or mice. This observation raises the question of the suitability of RRBS to really represent enough CpG-sites in other fish species.

Rainbow trout is a farmed species with high economic importance for which the transmission of environmental clues to the progeny via DNA methylation in the spermatozoa is an important question (Brionne et al., 2023). To date, however, only one study assessed sperm DNA methylation with RRBS in this species (Gavery et al., 2018). They evaluated the genetic and epigenetic variations of sperm from hatchery and natural origin males. While this study provided valuable insights into environmentally-driven genetic and epigenetic modifications in rainbow trout, the efficiency of the RRBS in representing the genomic CpGs sites from a reduced genome fraction was not explored. In the present study, our aim is to characterize the data yielded by RRBS in rainbow trout spermatozoa, in order to evaluate the suitability of this approach on a reduced sequenced fraction of the genome, when the incorporation of many biological replicates (n=12) is at stake.

## Results and Discussion

### Sequencing strategy and yield

As shown in Table 1, our RRBS sequencing provided 79 to 182 million raw reads depending on the sperm DNA sample: some males had a much lower number of reads (males 1, 3, 6) than the average while others were over-represented in the sequencing data (males 4 and 8). This variability is due to the difficulty of obtaining a homogeneous representation of the different samples during the sequencing step, after libraries preparation and sample multiplexing. The males with the lowest read numbers have been resequenced to increase their representation to at least  $80 \times 10^6$  reads. We can only surmise that the over representation of some males is due to the hybridization which was randomly more favorable to these samples on the flow cell. Another feature of our data is that among the total raw reads, an average of 53 % had adapters (Table 1). Because our sequencing conditions were set on 100 bases per read, such detection of adapters in more than half the reads means that the smallest DNA fragments (inserts < 100 bp) were abundant in our libraries. The size selection step of the library preparation did not remove enough of the smallest fragments, but it cannot be excluded either that the small fragments attached more easily to the flow cell than did the bigger ones, so that they became more represented during the sequencing. Since these inserts are < 100 bp and that we carried out a paired-end sequencing, this induced sequencing redundancy between read 1 and read 2 of the same fragments. Additionally, the lack of distance between read 1 and read 2 from these too short inserts reduced the chances of the reads to be uniquely mapped to the genome by the Bismark bio-informatic software (Krueger and Andrews, 2011). indeed, we found that an average of 21 % of the trimmed reads were mapped at more than one position, and these were discarded from the analysis.

Male s	Total raw reads	Reads with adapter (%)	Trimmed reads	Mapping efficiency %	Number of covered bases (genome coverage %)	Median sequencing depth of cytosines
1	95 635 102	58 573 187 (61)	95 136 704	51	51 798 719 (2,4)	33
2	151 647 136	83 438 479 (55)	149 738 098	51	87 865 444 (4,0)	27
3	81 595 606	45 338 627 (56)	80 699 518	50	23 734 101 (1,1)	83
4	175 309 432	94 762 242 (54)	173 321 634	50	42 512 540 (2,0)	84
5	147 597 234	79 667 018 (54)	145 989 720	50	45 848 983 (2,1)	66
6	79 520 772	43 445 356 (55)	78 680 558	51	73 916 787 (3,4)	20
7	133 254 172	68 731 323 (52)	132 030 612	52	85 418 648 (3,9)	24
8	182 194 376	92 514 127 (51)	180 072 804	53	88 834 477 (4,1)	31
9	151 669 218	75 371 224 (50)	149 887 092	52	88 480 070 (4,1)	26
10	149 048 894	75 358 506 (51)	147 508 530	52	81 820 981 (3,8)	29
11	163 589 650	81 571 487 (50)	161 959 698	52	86 250 076 (4,0)	30
12	132 473 316	64 790 692 (49)	131 026 414	52	84 231 207 (3,9)	25
<b>Mean</b>	136 961 242	71 963 522 (53)	135 504 282	51	70 059 336 (3,2)	40
<b>SD</b>	34 408 539	16 547 308 (3)	33 943 890	1	22 734 512 (1,0)	23

**Table 1 Summary of the RRBS sequencing data.** *Total raw reads* number includes the reads 1 and the reads 2 of each sample (paired end sequencing). *Reads with adapter* is the number of reads that were shorter than 100 nt. As a consequence, their adapters were sequenced as a part of the read, until the 100 nt length of sequencing was reached. *Trimmed reads* refer to the total number of reads after those shorter than 20 nt were removed (see method section). *Mapping efficiency* = (number of reads that mapped at only one position on the trout genome/trimmed reads number) x 100. *Number of covered bases*= number of bases that were sequenced and mapped at least once to the reference genome. *Genome coverage %* = (number of sequenced bases that matched only once with reference genome bases/ trout genome size (2 178 982 971 nt)) x 100. *Sequencing depth* is the number of times a cytosine has been sequenced, mapped to the reference genome and extracted as a cytosine in a CpG context.

The mapping efficiency of the reads to the reference genome is another important information when processing RRBS data. Indeed, this parameter reflects the amount of data that will be further analyzed for methylation call (the step when the methylation status of the

cytosines is searched) and methylation extraction (when the average methylation value of a given cytosine is calculated). In all, we observed that only 51 % of the trimmed reads could be confidently and uniquely aligned to the trout reference genome (Table 1). A part of the losses is due to the above-mentioned removal of redundantly mapped reads (21 %). Besides, the presence of repetitive sequences in the trout genome is known to account for 57.1 % of the whole genome (Pearse et al., 2019). This added up to alignment redundancies during mapping. Last, the bisulfite conversion of the genome changed almost all cytosines into thymine bases, thus reducing genome sequence diversity. This difficulty was further enhanced by the fact that the salmonid genome underwent two additional rounds of whole genome duplication (Berthelot et al., 2014). As a consequence, duplicated regions that did not diverge enough during evolution were likely to be observed as multi-mapped reads on the bisulfite-converted genome. Our data also revealed that an average of 28 % of reads could not be mapped at all to the reference genome. It must be pointed out that the rainbow trout that was used to create the reference genome (Isolate Swanson of an American strain) is genetically very different from the rainbow trout French line used in our experiment. This may have induced several alignment mismatches that are only due to genetic drift between the two genomes. However, because of bisulfite conversion of the DNA, but we had to use high stringency in our alignment process, and therefore we did not authorize any mismatch at all during the alignment search. This refusal of any mismatch may have induced the above-mentioned mapping failures. In all, our 49 % reads losses during the mapping step consist in reads mapped at more than one position, and reads that were not mapped at all. This seemingly low mapping efficiency was also seen in the study that assessed sperm DNA methylation with RRBS in rainbow trout (Gavery et al., 2018), as we calculated that the average mapping efficiency in this work was about 33 % of the total reads. RRBS data are not the only sequencing data with this level of mapping efficiency. A recent study using whole genome bisulfite sequencing (Brionne et al., 2023) showed that the mapping efficiency with this trout genome was approximately 60 % of the reads. A wide range of mapping efficiency was observed in mammals after RRBS study in spermatozoa depending on the species, with an average mapping efficiency of only 19 % in cattle (Jiang et al., 2018), 55 % in human (Ingerslev et al., 2018), whereas it was up to 70 % in rats (Suvorov et al., 2018).

The last parameter describing the sequencing yield with RRBS is the number of bases from the reference genome that were sequenced in our experiment. When considering all the reads that were mapped at only one position to the reference genome, a mean genome coverage of 3.2 % was obtained (Table 1), but this coverage was highly variable among the males. It is noteworthy that the males who had the lowest raw reads are not necessarily the ones with the lowest genome coverage (see male 6). With our set of data, male 3 represented only 1.1 % of the reference genome. We infer that for this specific sample, many reads represented the same genomic regions, and this is further emphasized by the high CpGs sequencing depth (times the same CpG-site is sequenced) for this sample (n=83) despite its low read number. This may be explained by the fact that RRBS analyses command that the PCR duplicates are

not removed during the alignment check, and this specific sample might have been more prone to PCR duplicates over-representation. Such low genome coverage in one sample may become a problem when comparisons with the other males are at stake, and this male may have to be discarded from further analysis.

#### Analysis of CpG-sites *versus* Individual cytosines (in CpG context)

Among the 2 178 982 971 bases of the rainbow trout reference genome, there is a total of 35 336 285 CpG dinucleotides (Omyk\_1.0 genome version). At the molecular level, this CpG number is the same on the forward and reverse strand. Therefore, a so called CpG-site includes the cytosine (in CpG context) on the forward strand, and its corresponding one on the reverse strand. After both DNA strands are separated, during bisulfite conversion, they no longer match each other and they are treated as separate entities during the sequencing phase. The random selection of the strands during sequencing can result in the fact that the same CpG-site is sequenced twice: once on the cytosine of the former forward strand, once on the cytosine of the former reverse one. Thus, the processing of the data can be carried out in two ways. First, we can consider that the methylation status of the cytosines at a given CpG-site is the same on both strands. This is the case in most situations where a biological process is studied, since DNA methylation occurs symmetrically and it can be repaired by DNA methyltransferase in the case of hemi methylated DNA. In this case, the redundancy between the two strands must be removed during the data treatment, and the resulting unique information is one out of the 35 336 285 CpG-sites. Second, we can be interested in the methylation status of the cytosines on each strand of a given CpG-site. This is the case for example when some biotechnologies are applied to the spermatozoa. If no repair mechanism has been operating, a CpG-site can then be altered on the forward strand but not on the reverse one. Therefore, each CpG-site is characterized by the methylation status of its two cytosines: the one from the forward and the one from the reverse strand. As a consequence, the information that is expected is one out of 70 672 570 cytosines (twice the number of genomic CpG-sites). This seemingly fastidious choice is important in the case of RRBS whose sequencing yield is much lower than by WGBS. In our set of data, we calculated that an average of 28 % of the analyzed cytosines belonged to the reverse strand of a forward cytosine. This can lead to either 28 % redundancy that is to be removed from the data (first choice) or 28 % of sites for which a possible hemimethylation can be explored (second choice).

#### The question of enrichment in CpG-sites after RRBS

Because RRBS reduces the sequencing extent, as confirmed above, we analyzed which proportion of the CpG-sites of the trout genome was present in our data. Our purpose was also to investigate whether RRBS in rainbow trout spermatozoa would capture DNA fragments enriched in CpG-sites, as reported with mammalian DNA. As shown in Table 2, from 2 to 6.9

% of the trout genomic CpG-sites were represented depending on the male. As this value is meant per CpG-site here, the cytosines found on both the forward and reverse strand have been calculated as one single information. However, when we performed the same calculation over the 2 cytosines from each CpG-site of the genome, we obtained a lower representation (from 1.2 to 5.2 % depending on the males, Table 2). This is due to the fact that, as mentioned above, only 28 % of the sequenced cytosines belonged to both DNA strands for a given CpG-site.

In order to assess the enrichment in CpG-sites among the sequenced fraction, the percentage of genomic CpG-sites covered in our analysis (Table 2) was compared to the percentage of genome coverage (Table 1). We observed a very homogeneous enrichment of 1.7 to 1.8 X in CpG-sites in all males. The enrichment fold was only 1.2 X when counting the 2 cytosines from each CpG-site. Hence, in the later situation, RRBS does not provide any substantial enrichment in analyzed cytosines, but it is still providing some information on a small fraction of the genomic CpGs.

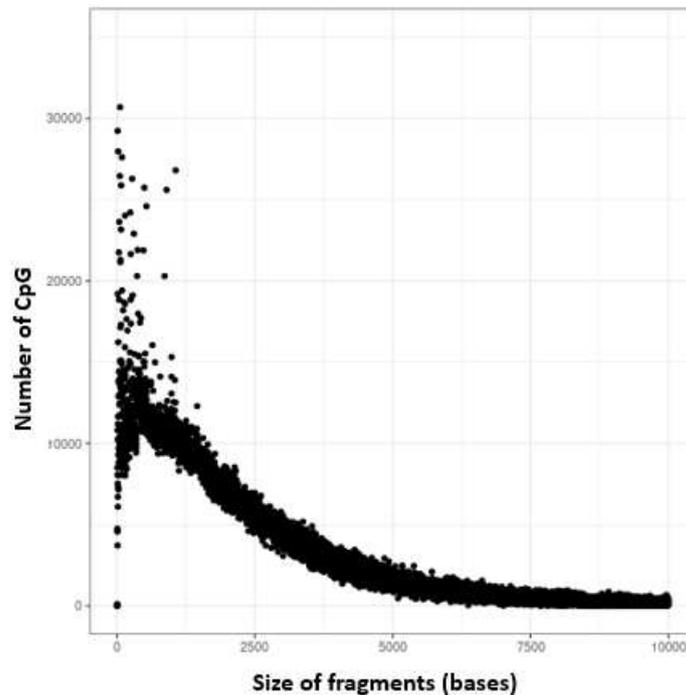
Males	Number of identified CpG-sites (A)	% of total genomic CpG-sites (B)	Enrichment in CpG-sites /genome (C)	Number of identified cytosines (D)	% of total genomic cytosines in a CpG context (E)
1	1 532 633	4,3	1,8	2 031 111	2,9
2	2 406 116	6,8	1,7	3 667 465	5,2
3	710 888	2,0	1,8	813 505	1,2
4	1 244 325	3,5	1,8	1 514 634	2,1
5	1 323 326	3,7	1,8	1 611 036	2,3
6	2 044 500	5,8	1,7	2 898 053	4,1
7	2 369 361	6,7	1,7	3 559 536	5,0
8	2 444 130	6,9	1,7	3 679 864	5,2
9	2 422 373	6,9	1,7	3 665 894	5,2
10	2 263 435	6,4	1,7	3 292 897	4,7
11	2 364 475	6,7	1,7	3 536 955	5,0
12	2 300 074	6,5	1,7	3 405 609	4,8
<b>Mean</b>	1 952 136	5,5	1,7	2 806 380	4,0
<b>SD</b>	591 835	1,7	0,1	1 027 725	1,4

**Table 2** Number of CpG-sites and cytosines in CpG context sequenced by RRBS, compared to the total numbers in the rainbow trout genome.  $B = (A / 35\,336\,285) \times 100$ , with 35 336 285 referring to the number of CpG-sites in the reference genome.  $C = B / F$ , with F referring to the % genome coverage values for each sample shown Table 1. D: includes all the cytosines in CpG-sites whatever their sequencing depth.  $E = (A / 70\,672\,570) \times 100$ , with 70 672 570 referring to the number of cytosines in a CpG context in the reference genome.

These enrichment values are the result of a sequencing experiment on biological samples, where the exact size of the sequenced DNA fragments (inserts) cannot be precisely controlled. The fragment size issue could be important, because MspI digestion of mammalian DNA was proposed to yield lower CpG density in the longest fragments (Smith et al., 2009). Thus, we compared our sequencing data to a theoretical *in silico* digestion at MspI sites (CCGG) that we performed on rainbow trout genome (Table 3). Our objective was to explore whether inserts size would theoretically affect the enrichment ratio in rainbow trout genome. We observed that theoretical fragments of increasing size (40-220 nt to 150-1400 nt) led to decreasing theoretical enrichment ratios (Table 3), from 2.5 X with the smallest fragments to 1.3 X with the biggest ones. This means that when selecting bigger fragments for sequencing, to mitigate the low mapping success of the smallest fragments, the enrichment ratio is at risk to be reduced. This would also indicate that most CpGs are in the smallest fragments fraction of the rainbow trout genome. This is further confirmed by the *in silico* distribution of the CpGs according to the size of the fragments (Fig.1), where we found that the majority of the CpGs were in the small fragments fractions. It is nevertheless difficult to compare such predicted *in silico* enrichment values to the 1.7 X enrichment ratio that we obtained with our sequenced data. Indeed, although the sequencing company proposed a fragment size selection of 150-1400 b, which should have yielded an enrichment of 1.3 X, we know that much smaller fragments were sequenced (< 100 nt, see the discussion above). This illustrates the gap between the theoretical fragments size eventually proposed by the sequencing company and the size of the fragments which were really sequenced. This also means that when ordering the sequencing service, the trade-off in size fragments that is to be made in order to obtain as many CpGs as possible together with fragments long enough to allow a good mapping efficiency does not always yield the expected results.

Species	Rainbow trout			Zebrafish (1)	Mouse (2)
	40 - 220	40 - 400	150 -1 400	40 - 220	40 - 220
<b>Selected fragments size (nt)</b>					
<b>Genome size (Gb) (A)</b>	2.18	2.18	2.18	1.41	2.8
<b>RR genome size (Mb) (B)</b>	56	142	676	31	38
<b>% genome coverage (C)</b>	2.6	6.5	31.1	2.2	1.4
<b>Number of CpG-sites (D)</b>	2 241 808	4 436 904	13 820 867	1 430 390	1 506 712
<b>% CpG (E)</b>	6.3	12.6	39.11	5.3	7.0
<b>CpG-sites enrichment ratio (F)</b>	2.5	1.9	1.3	2.4	5.0

**Table 3 *In silico* analysis of the rainbow trout genome upon *in silico* RRBS treatment.** A Msp1 digestion of the reference genome of rainbow trout was performed *in silico*, and the fragments were *in silico* selected according to different size ranges (Selected fragments size, in nucleotides, nt). (1) comparison with the zebrafish *in silico* analysis (Chatterjee et al., 2013) and (2) the mouse one (calculated from (Smith et al., 2009). RR genome size (in Mb) is the number of bases obtained *in silico* when selecting a given fragments size range.  $C = (B / A) \times 100$ .  $E = (D / 35\,336\,285) \times 100$ , with 35 336 285 referring to the number of CpG-sites in the reference genome.  $F = E / C$



**Fig.1 Distribution of the *in silico* CpG-sites number according to the DNA fragment size.** Each dot represents the total number of CpG-sites in all the fragments of a given size. For the sake of representation, 3 dots corresponding to 3 extreme CpG number values have been hidden: 27 nt fragments contain 52 133 CpGs, 42 nt fragments contain 41 640 CpGs and 52 nt fragments contain 37 587 CpGs. The number of CpGs and the size of the fragments were obtained from our *in silico* digestion of the rainbow trout reference genome (Omyk\_1.0 genome version)

In zebrafish, it has been shown *in silico* that RRBS induced a CpG-sites enrichment of 2.4 X when the selected fragments were between 40-220 bp (Chatterjee et al., 2013), a value that is very similar to the one that we obtained *in silico* with the rainbow trout genome (Table 3). These two calculations show that RRBS did not provide the same enrichment in two fish genomes as it did for mammals. Indeed, with the same selection of size fragments, the enrichment was 5 X in mice (Smith et al., 2009) and 5.9 X in human (Chatterjee et al., 2013). Such low CpGs enrichment in fish can be explained by the fact that fish genomes are less heterogeneous regarding CpG density than in mammals (Cai et al. 2021). This reduces the chance of obtaining CpG dense regions in the fish genome fragments, leading to a reduced genomic CpG representation in the fragments compared to mammalian genomes.

In all, our thorough analysis of CpG enrichment after RRBS in rainbow trout genome, both experimentally and *in silico*, emphasizes the compromise that is to be made when using this method. The sequencing of the smallest fragments should theoretically enrich to some extent the fractions with CpG-sites, but these small fragments will poorly map to the reference

genome, and will be sequenced twice (read 1 and read 2) but to no avail because they produce redundant information. Bigger fragments will better map to the reference genome, their read 1 and read 2 will not overlap, but their CpG density will be lower. This compromise is important to clarify before carrying on the step of libraries preparation and fragment size selection.

#### Representation of RRBS CpGs between biological replicates

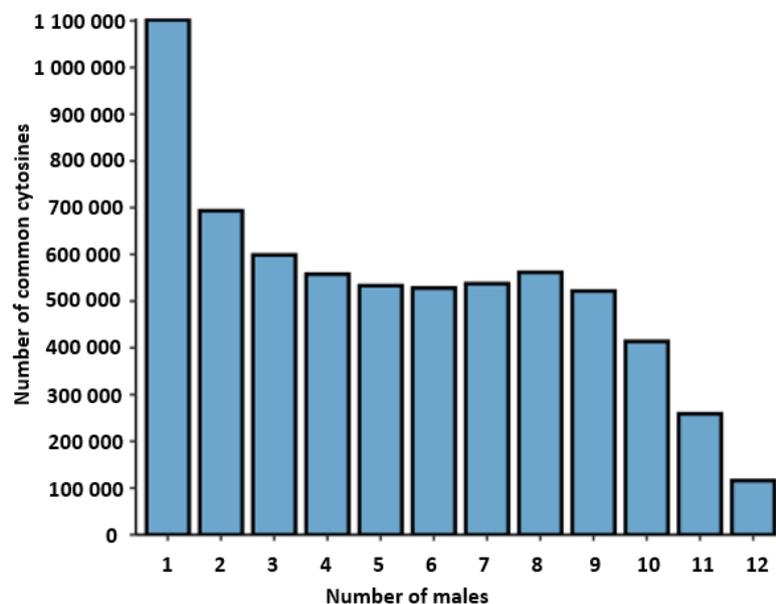
Since RRBS consists in DNA digestion with a restriction enzyme, the fragments that will be selected and sequenced are more likely supposed to represent the same genomic regions among biological replicates, as previously discussed by (Meissner et al., 2008) for mammalian genomes. This should yield CpG-sites that will be more similar among biological replicates than would random fragmentation, such as the one obtained after sonication for example. Hence, we explored in our study whether the represented genomic CpG-sites were repeatable among the biological replicates. Since this issue is important when assessing the impact of reproductive biotechnologies on CpG methylation in fish, we determined the genomic CpG-sites representation at the cytosine level (the forward and reverse ones in a CpG-site), thereby using all 70 672 570 cytosines of the CpG-sites of the reference genome (plus and minus strands).

First, we found that when all the cytosines were combined irrespective of the male origin of the data, an overall 9.1 % of the cytosines in genomic CpG-sites were represented (6 422 403 cytosines at CpG-sites). But when this calculation was made on each individual male as presented before (Table 2), this value dropped to 4 % only (on average). This gives a first hint that, contrarily to the expectations in other species or studies (Meissner et al., 2008), a high number of fragments sequenced in some samples were not sequenced in the others.

We then investigated deeper to which extent the same cytosines were repeatably observed or not between biological replicates, in relation to the number of these replicates. As shown in Fig.2, the highest proportion of cytosines among the 6 422 403 analyzed ones was present in one male only. Interestingly, the numbers of common cytosines were within the same range from low (n=3) to high (n=9) biological replicate numbers (8.1 to 9.3 % of the 6 422 403 analyzed cytosines). This means that increasing the replicates numbers did not lessen the chances to get cytosines that are common between the males. The numbers dropped when selecting 10 to 12 males, the lowest common cytosine number obtained for 12 males being due to the low cytosine yield in male 3 (Table 2). Nevertheless, the low proportion of common cytosines between males (< 10 % of the analyzed ones) indicates that the fragments that were sequenced were very different between males, despite the supposedly non-random fractionation of the genome using *MspI* restriction enzyme.

A small part of this lack of common cytosines between males could be due to the genetic polymorphisms at CpG-sites among these biological replicates, resulting in less sites that

would be common between males. However, this polymorphism cannot account for the whole extend of the divergent cytosines between biological replicates. It was previously reported that rainbow trout and zebrafish genomes have more CpG dense sites than in mammals (Cai et al., 2021; Beck et al., 2022), likely because CpG-sites erosion was lower in fish (Chatterjee et al., 2013; Cai et al., 2021). We believe that this feature induced an almost unbiased fragment selection despite MspI digestion, and contrarily to what could have been expected from RRBS results with mammalian genome. As a consequence, the reduced number of reads that is associated with RRBS did not provide enough coverage because of the diversity of the resulting sequenced regions. In other terms, the too many fragments that were retained because of this unbiased selection induced a high variability in the represented sequences. This effect is amplified by the small size of the sequenced fragments in our study. We could hypothesize that a size selection of bigger fragments may improve the overlapping of these fragments between males upon sequencing. It must be kept in mind however that increasing the fragment size will reduce the number of sequenced CpGs (as discussed above), unless a more important sequencing effort is made (i.e. an increase in the number of ordered raw reads). To some extent, such a compromise could be made, in order to avoid the WGBS option and its huge set of produced data, difficult to handle when many biological replicates are needed.

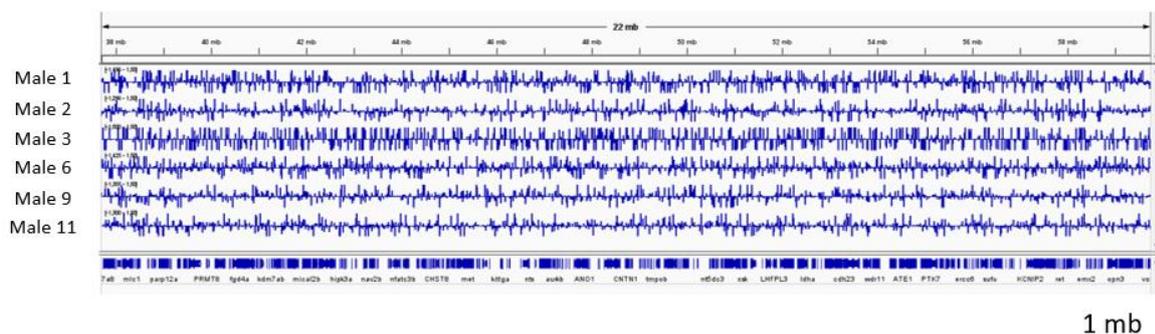


**Fig.2 Distribution of the number of cytosines in a CpG context that are common between males in a given number of biological replicates.** All sequenced cytosine (in CpG context) were checked for the number of male samples where they were found (from 1 to 12), and the number of common cytosines for each given number of biological replicates (males) was calculated (blue bars). The results are thus not shown as cumulative numbers, but as total cytosines shared among the males for each given replicate number. Number of cytosines in 1 male refers to the cytosines that were found only once (not common).

In all, these results showed that increasing the number of replicates in RRBS analysis still ensured an acceptable representation of the genomic cytosines in CpG-sites. However, it also showed that if the purpose of a given study is to assess the variability between biological replicates, such study will have to rely on a very reduced number of cytosines that are common between males (520 000 to 600 000 cytosines), at least in our conditions. This also stresses once more the possible importance of the fragment size selection strategy, and the difficulty encountered with the rainbow trout genome because of its higher density in CpG sites, thus its lower fraction of CpG-deserts.

### Distribution of the data over the reference genome

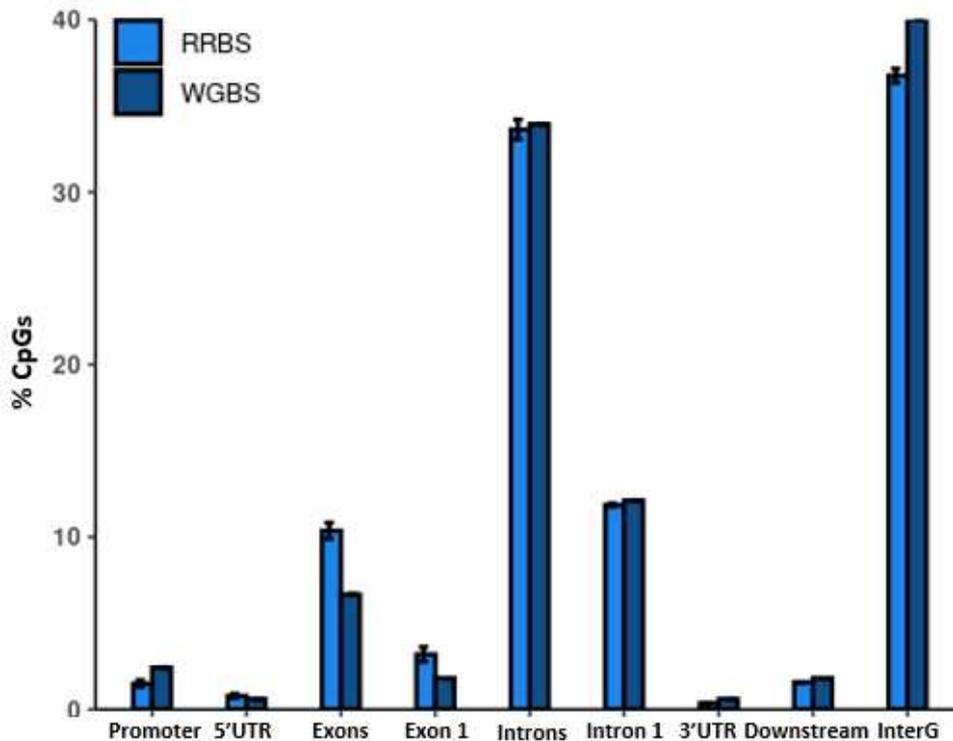
All our analyses concurred to show that RRBS provides a reduced representation of the genome with only a moderate enrichment in CpG-sites. Hence, we wanted to determine the distribution pattern of the sequenced CpG-sites over the whole genome, in order to ensure that the genome is homogeneously represented with our data. It is particularly important when assessing the effect of biotechnologies, because all regions possibly affected, including the random ones in non-functional genome regions, are of interest. As shown in the example Fig.3, our sequenced cytosines (in CpG-sites) were homogeneously distributed all over the genomes. In addition, we did not identify any genomic regions bigger than  $2.9 \times 10^6$  bases that were devoid of these sequenced cytosines. Our results also demonstrated that the represented genomic CpGs per sample were distributed homogeneously across all the chromosomes of the genome. This means that despite the restricted number of CpGs in the RRBS data set, they give some information from all over the genome.



**Fig.3 Distribution of the sequenced cytosines in CpG sites over the reference genome.** The six males represented here have been randomly chosen. The displayed region is representative of the pattern observed over the whole genome. The chart was obtained with IGV\_2.8.13 and shows the distribution on the chromosome 1 from the position 37 682 451 to 59 737 137 ( $22.10^6$  b) of the rainbow trout reference genome “Omyk\_1.0 genome version”. Each line corresponds to a different male, where each sequenced cytosine in a CpG site is represented by a blue bar. The bars position above and below the horizontal line represent cytosines on the plus and minus strands respectively. The bottom line represents the genes associated to this genomic fraction. Scale bar:  $10^6$  bases (1 mb).

To investigate further the genome representation of our RRBS data, we assessed to what extent the sequenced genomic CpG-sites belonged to the different genomic features that are promoter and downstream regions, 5' and 3'UTR regions, introns and exons or intergenic regions (Fig.4). We observed that the CpG genomic sites obtained in our RRBS data were found in all genomic features, most of them being found in gene introns and intergenic regions. Besides, this distribution was repeatable between males, as observed from the low variability of the data. When we compared this distribution with data obtained by WGBS (Brionne et al., 2023), we found that both methods results in a similar distribution of the CpGs (Fig.4). This similarity is striking when considering that WGBS data are representing up to 92 % of the reference genome CpGs, while RRBS data yield only 4 % of those (Table 2). Some slight differences were observed however, as CpG distribution in exons (including exon 1) tended to be higher in our RRBS data than in WGBS ones. On the contrary, the CpGs distribution in promoter was lower in RRBS than in WGBS. Although no statistics can be drawn from this comparison, this would mean that RRBS did induce some enrichment in some genomic regions (the exonic ones), although not in the often-cited promoter region. This is at odds with the *in silico* RRBS analysis of (Meissner et al., 2008) which showed that in mice and in human genome, CpG-islands (contained in promoter regions) are much more enriched (x 10 to 60) than exonic and intronic regions (x 1.3 to 1.5). This may deserve further *in silico* study on CpG density in rainbow trout genome according to the functional genomic region, that is beyond the scope of the present work.

In all, based on the homogeneous distribution of CpGs along the genome and on the representation of all the different genomic features by these CpGs, RRBS represented the whole rainbow trout genome in a reduced but representative pattern.



**Fig.4 Distribution of the CpG sites obtained by RRBS according to their genomic features, and comparison with WGBS published data.** For RRBS, bars represent the mean value of the 12 biological replicates. The values are calculated as a percentage of all the cytosines present in at least one of the chosen genomic features. Error bars: standard deviation. For WGBS, data were calculated from (Brionne et al., 2023). The selected genomic features included the following: Promoter: -1kb up to the transcription starting site (TSS); 5'UTR: untranslated region upstream of the first translated codon; Exons: all exons; Exon 1: first exon of all genes; introns: all introns; 3'UTR: untranslated region downstream of the STOP codon; Downstream: transcription end site (TES) +1kb; InterG: intergenic regions

The risk of poor statistical relevance: case study from a random comparison of males

In the present work, all males belonged to the same line and they were all reared in the same conditions from fertilization to spermiation. Additionally, all sperm samples were processed similarly after collection. As a consequence, all sperm samples should bear the same general DNA methylation profile, although some individual variability would still be present (due to genetic polymorphism and individual physiology). We took the set of data from these biological replicates to build two sham groups of 6 fish, each fish having been randomly allotted to a given group. Each group thus contained individual samples with slightly variable information, but such variability should be reduced during averaging when the data are processed as a group. Therefore, no difference between groups should arise from group comparison. However, when we used DSS for the 2 groups comparison, we obtained, with this

method, as many as 1 593 differentially methylated cytosines (DMCs). This striking observation is underlying a major risk of false interpretation of the results. Indeed, if these two sets of males had belonged to two groups that we would have liked to compare (after biological treatment for example) a background of about 1600 DMCs with no ground for biological significance would have been detected whatever the effect of the treatment. This illustrates the risk of overestimating the number of DMCs when comparing treatment to control conditions.

A deeper analysis of the significant DMCs additionally showed that these were detected from heterogeneous replicate numbers between groups, the outermost values being as little as one male in each group, or one male in one group and 6 males in the other group. This means that for a given cytosine position, some DMCs were identified as significant when only one male in one group differed from 1 to 6 males in the other group (likely because of inference of missing data within groups). We were able to make this striking observation because the RRBS data were small enough to be hand-made and controlled with regards to the number of males involved in each significant DMC. When we applied a threshold so that each DMC should be found in at least 5 males in each group, the number of these spurious DMCs dropped to 22, a more acceptable (because negligible) value. This illustrates why it is to be recommended that the number of biological replicates at each CpG position should be carefully set before the statistical analysis. This seemingly obvious statement becomes more complicated when one is dealing with the selection of bioinformatic options within specific algorithms.

This sham analysis emphasizes the need to carefully adapt the bioinformatic parameters to the dataset and to the experimental purpose, and that one should not go blindly into data interpretation on the basis of DMCs (leading to DMRs) that may not bear any biological significance. One great advantage of studying the effect of biotechnologies on sperm is that in most cases, the same sperm sample can be split between control and treatment conditions. This allows the use of the paired comparison option in DSS (El Kamouh et al., 2023), thus strengthening the biological significance of the identified DMCs and preventing the bias identified in the present study.

## **Conclusion**

Our study showed that the cytosines in CpG context obtained after RRBS on rainbow trout spermatozoa could yield some information on the methylation status of about 10 % of the genomic CpG-sites, provided that enough biological replicates were analyzed (n=12 in our case). These cytosines were evenly distributed all over the genome, and they were present in all genomic features. It can thus be considered that the reduced representation provided a widespread, although restricted, picture of genomic CpGs in rainbow trout. We also showed that this reduced representation provided a reduced but workable number of cytosines that

are shared between biological replicates (< 10 % of the analyzed sites), and that this number was stable when the replicate number increased. This is important for further studies dealing with treatment comparisons. We emphasized that the method provided only a limited enrichment in CpG-sites compared to the genome coverage, as already shown in zebrafish, and contrarily to human and mice. This emphasizes in another fish species the greater homogeneity in CpG distribution along the genome in these vertebrates, as already demonstrated (Cai et al., 2021). Our data also showed the difficult compromise that is to be made between the sequencing of small fragments enriched in CpGs but difficult to map, and the sequencing of bigger fragments with less CpGs but easier to analyze. Last, the choice of the parameters set for data analysis should also be carefully made to avoid any bias in data interpretation. Although in some cases, it may be more relevant to reduce the number of experimental condition and replicate numbers in order to allow the use of WGBS, we propose from the present work that RRBS in rainbow trout is still a relevant first-step approach, as it allows the scanning of a wide range of conditions on many replicates while allowing to treat only a reduced representation of the genomic CpGs.

## **Materials and methods**

### **Sperm collection and DNA extraction**

Two years old mature males from the SYNTHETIC INRAE strain (average weight 1.2 kg) reared at the experimental fish farm of INRAE-PEIMA were transferred to INRAE-ISC LPGP fish facility. After 2 weeks in recirculated water tanks (12 °C, winter photoperiod), the sperm from 12 males was collected by gentle striping and stored individually on ice for up to 30 min. Motility of all sperm samples was above 90 %. After sperm concentration determination by flow cytometry,  $4 \times 10^6$  spermatozoa per sample were snap frozen and stored at - 80 °C until use. Thawed spermatozoa were digested overnight at 42°C in 800 µL TNES buffer (10mM Tris-HCl, 125mM NaCl, 10mM ethylene diamine tetra-acetic acid -EDTA-, 17 mM sodium dodecyl sulfate, 4M urea, pH 8) and 75 µg/mL proteinase k (P6556 ; Sigma-Aldrich), prior to DNA extraction according to (Depince et al., 2019). DNA quality was checked on agarose gel 0.8 % (no degradation smears). DNA concentration was determined by the Qubit™dsDNA BR Assay kit (REF Q32853, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) and 500 ng was sent for RRBS library preparation and sequencing to the Integragen company (Evry, France).

### **RRBS library preparation, sequencing and data processing**

DNA digestion with MspI, library preparation and bisulfite conversion using Diagenode Premium RRBS kit were performed in July 2021 by the Integragen company, and the samples were sequenced on Illumina NovaSeq™ 6000, with S2 patterned flow cells. The number of sequenced clusters that we ordered to the company was calculated from the following: the

size of the rainbow trout genome is 2.18 Gb (x 2 because of plus and minus strands) and the genomic representation that we wanted by RRBS was 5 % of the genome, yielding 0.218 Gb to be sequenced. We knew from Brionne et al (2023) that the mapping efficiency would be about 50 % with the trout genome. As a consequence, we had to double the number of bases to be sequenced (0.436 Gb). Because we chose a 10-15X sequencing depth, we calculated that we should sequence 5 Gb per sample. Since the sequenced reads are 100 nt long, the 5 Gb corresponds to  $50 \times 10^6$  raw reads. This led us to order  $25 \times 10^6$  paired-end raw reads. Because of some difficulties with the first sequencing round (too many reads with adapters), some samples have been resequenced after some trials by Integragen to increase fragment size selection (Supplementary figure S1). This resequencing of the same libraries did not improve the number of reads without adapters, but it increased the number of raw reads in our final dataset. After merging of the two datasets, we obtained an average of 68.5 million paired end raw reads, 137 million total raw reads (Table1). The sequencing quality of the raw data was checked with FastQC program (version: FastQC\_v0.11.7) (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Raw reads were trimmed using Trim Galore to remove adaptors sequences, the bases added in the process of RRBS library preparation, and the bases with a phred score < 30 (Q30) (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore> version: TrimGalore-0.6.5). We observed that only 12 to 16 % of the reads were truncated after removal of these bases showing a low phred score. Last, the trimming step removed all sequences shorter than 20 nt. These sequences cannot map to the bisulfite-converted genome, and they saturate the mapping algorithm with untreatable data.

In order to determine if there is a risk of overestimation of DNA methylation due to a low bisulfite conversion (< 98 %), we calculated the bisulfite conversion rate and found a mean value of 99.5 %. Using bowtie2 aligner (version: bowtie2-2.3.5.1) available in Bismark bio-informatic software (Krueger and Andrews, 2011), trimmed reads were aligned to the reference genome (Omyk\_1.0 genome version). Methylation status of every cytosine in a CpG context was extracted using "bismark\_methylation\_extractor". It must be understood that RRBS increases the chances to digest DNA fragments that are similar within the same sample, because of the non-random MspI digestion step. Because we did not want to lose the information provided by this type of duplicates, we took care to disable the function which searches and removes the PCR duplicates. These steps are available in the workflow which agrees to FAIR principles and is accessible online (<https://forgemia.inra.fr/lpgp/methylome>). BigWig files were obtained with bedGraphToBigWig (Kent et al., 2010) and methylation values were visualized with Integrative Genome Viewer (Robinson et al., 2011).

For the identification of differentially methylated cytosines (DMCs), the "2 group comparison" analysis from DSS R package (Feng et al., 2014; Wu et al., 2015) was used. Each group had 6 males chosen randomly and all the cytosines in CpG context of each sample were used (regardless of their sequencing depth). In addition, we used the option "smoothing=FALSE"

for the *dmlTest* function performed by DSS, leading to the absence of any smoothing of DNA methylation status between adjacent CpGs. This allows that, in a context of studying technological impact, any sporadic alteration remains visible.

For the *in silico* analysis of RR genome, we performed an *in silico* digestion with *MspI* on the *Omyk\_1.0* genome version using DECIPHER v2.0 R package (Wright, 2023). We used “DigestDNA” available in DECIPHER v.2.0 package in order to cut the DNA on the forward strand at the CCGG sites. We also specified that the cut takes place after the first cytosine of this site. These options were applied to mimic the digestion performed with *MspI* enzyme. “DigestDNA” also showed the fragments positions. “Biostrings: Efficient manipulation of biological strings” R package (Pagès et al., 2023) was used to identify the fragments size and CpG content.

### **Ethical approval**

Rainbow trout males were kept in the experimental fish facilities ISC LPGP of INRAE (Agreement number D-35-238-6) with full approval for experimental fish rearing in strict accordance with French and European Union Directive 2010/63/EU for animal experimentation. The Institutional Animal Care and Use Ethical Committee in Rennes LPGP (Fish Physiology and Genomics Department) specifically approved this study (n° T-2020-37-CL). All fish were handled for gamete collection in strict accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Ethical Committee in Rennes LPGP (Fish Physiology and Genomics Department). Catherine Labbé is accredited by the French Veterinary Authority for fish experimentation (n° 005239). The animal study is reported in accordance with ARRIVE guidelines (<https://arriveguidelines.org>) for animal research.

## References

- Agius, D.R., Kapazoglou, A., Avramidou, E., Baranek, M., Carneros, E., Caro, E., Castiglione, S., Cicatelli, A., Radanovic, A., Ebejer, J.-P., Gackowski, D., Guarino, F., Gulyás, A., Hidvégi, N., Hoenicka, H., Inácio, V., Johannes, F., Karalija, E., Lieberman-Lazarovich, M., Martinelli, F., Maury, S., Mladenov, V., Morais-Cecílio, L., Pecinka, A., Tani, E., Testillano, P.S., Todorov, D., Valledor, L., Vassileva, V., 2023. Exploring the crop epigenome: a comparison of DNA methylation profiling techniques. *Front. Plant Sci.* 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1181039>
- Beck, D., Ben Maamar, M., Skinner, M.K., 2022. Genome-wide CpG density and DNA methylation analysis method (MeDIP, RRBS, and WGBS) comparisons. *Epigenetics* 17, 518–530. <https://doi.org/10.1080/15592294.2021.1924970>
- Berthelot, C., Brunet, F., Chalopin, D., Juanchich, A., Bernard, M., Noël, B., Bento, P., Da Silva, C., Labadie, K., Alberti, A., Aury, J.-M., Louis, A., Dehais, P., Bardou, P., Montfort, J., Klopp, C., Cabau, C., Gaspin, C., Thorgaard, G.H., Boussaha, M., Quillet, E., Guyomard, R., Galiana, D., Bobe, J., Volff, J.-N., Genêt, C., Wincker, P., Jaillon, O., Crollius, H.R., Guiguen, Y., 2014. The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nat Commun* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4657>
- Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>
- Brionne, A., Goupil, A.-S., Kica, S., Lareyre, J.-J., Labbé, C., Laurent, A., 2023. Spermatozoa methylome and its sensitivity to water temperature in a teleost fish. *Sci. Total Environ.* 164077. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164077>
- Cai, Z., He, Y., Liu, S., Xue, Y., Quan, H., Zhang, L., Gao, Y.Q., 2021. Hierarchical dinucleotide distribution in genome along evolution and its effect on chromatin packing. *Life Sci. Alliance* 4. <https://doi.org/10.26508/lsa.202101028>
- Cavalli, G., Heard, E., 2019. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature* 571, 489–499. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1411-0>
- Chatterjee, A., Ozaki, Y., Stockwell, P.A., Horsfield, J.A., Morison, I.M., Nakagawa, S., 2013. Mapping the zebrafish brain methylome using reduced representation bisulfite sequencing. *Epigenetics* 8, 979–989. <https://doi.org/10.4161/epi.25797>
- Depince, A., Gabory, A., Dziewulska, K., Le Bail, P.Y., Jammes, H., Labbe, C., 2019. DNA methylation stability in fish spermatozoa upon external constraint: Impact of fish hormonal stimulation and sperm cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* 87, 124–134. <https://doi.org/10.1002/mrd.23297>
- El Kamouh, M., Brionne, A., Sayyari, A., Laurent, A., Labbé, C., 2023. Cryopreservation effect on DNA methylation profile in rainbow trout spermatozoa. *Sci. Rep.* 13, 19029. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44803-2>

- Feng, H., Conneely, K.N., Wu, H., 2014. A Bayesian hierarchical model to detect differentially methylated loci from single nucleotide resolution sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 42, e69. <https://doi.org/10.1093/nar/gku154>
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., Paul, C.L., 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 1827–1831. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1827>
- Gavery, M.R., Nichols, K.M., Goetz, G.W., Middleton, M.A., Swanson, P., 2018. Characterization of Genetic and Epigenetic Variation in Sperm and Red Blood Cells from Adult Hatchery and Natural-Origin Steelhead, *Oncorhynchus mykiss*. *G3 GenesGenomesGenetics* 8, 3723–3736. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200458>
- Gu, H., Bock, C., Mikkelsen, T.S., Jäger, N., Smith, Z.D., Tomazou, E., Gnirke, A., Lander, E.S., Meissner, A., 2010. Genome-scale DNA methylation mapping of clinical samples at single-nucleotide resolution. *Nat. Methods* 7, 133–136. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1414>
- Ingerslev, L.R., Donkin, I., Fabre, O., Versteyhe, S., Mechta, M., Pattamaprapanont, P., Mortensen, B., Krarup, N.T., Barrès, R., 2018. Endurance training remodels sperm-borne small RNA expression and methylation at neurological gene hotspots. *Clin. Epigenetics* 10, 12. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0446-7>
- Jiang, L., Zhang, Jing, Wang, J.-J., Wang, L., Zhang, L., Li, G., Yang, X., Ma, X., Sun, X., Cai, J., Zhang, Jun, Huang, X., Yu, M., Wang, X., Liu, F., Wu, C.-I., He, C., Zhang, B., Ci, W., Liu, J., 2013. Sperm, but Not Oocyte, DNA Methylome Is Inherited by Zebrafish Early Embryos. *Cell* 153, 773–784. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.041>
- Jiang, Z., Lin, J., Dong, H., Zheng, X., Marjani, S.L., Duan, J., Ouyang, Z., Chen, J., Tian, X. (Cindy), 2018. DNA methylomes of bovine gametes and in vivo produced preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* 99, 949–959. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y138>
- Karimi, M., Johansson, S., Stach, D., Corcoran, M., Grandér, D., Schalling, M., Bakalkin, G., Lyko, F., Larsson, C., Ekström, T.J., 2006. LUMA (LUminometric Methylation Assay)--a high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Exp. Cell Res.* 312, 1989–1995. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.03.006>
- Kent, W.J., Zweig, A.S., Barber, G., Hinrichs, A.S., Karolchik, D., 2010. BigWig and BigBed: enabling browsing of large distributed datasets. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 2204–2207. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq351>
- Krueger, F., Andrews, S.R., 2011. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* 27, 1571–1572. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr167>
- Kurdyukov, S., Bullock, M., 2016. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology* 5, 3. <https://doi.org/10.3390/biology5010003>

- Labbé, C., Robles, V., Herraéz, M.P., 2017. Epigenetics in fish gametes and early embryo. *Aquaculture, Recent advances in fish gametes and embryo research* 472, 93–106. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.026>
- Meissner, A., 2005. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 33, 5868–5877. <https://doi.org/10.1093/nar/gki901>
- Meissner, A., Gnirke, A., Bell, G.W., Ramsahoye, B., Lander, E.S., Jaenisch, R., 2005. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 33, 5868–5877. <https://doi.org/10.1093/nar/gki901>
- Meissner, A., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Jaffe, D.B., Gnirke, A., Jaenisch, R., Lander, E.S., 2008. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 454, 766–770. <https://doi.org/10.1038/nature07107>
- Murphy, P.J., Wu, S.F., James, C.R., Wike, C.L., Cairns, B.R., 2018. Placeholder Nucleosomes Underlie Germline-to-Embryo DNA Methylation Reprogramming. *Cell* 172, 993–1006.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.022>
- Nestor, C., Ruzov, A., Meehan, R.R., Dunican, D.S., 2010. Enzymatic approaches and bisulfite sequencing cannot distinguish between 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in DNA. *BioTechniques* 48, 317–319. <https://doi.org/10.2144/000113403>
- Pagès, H., Aboyoun, P., Gentleman, R., DebRoy, S., Carey, V., Delhomme, N., Ernst, F., Lakshman, A., O'Neill, K., Obenchain, V., Ramos, M., Vill, A., Wright, E., 2023. Biostrings: Efficient manipulation of biological strings. <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.Biostrings>
- Pearse, D.E., Barson, N.J., Nome, T., Gao, G., Campbell, M.A., Abadía-Cardoso, A., Anderson, E.C., Rundio, D.E., Williams, T.H., Naish, K.A., Moen, T., Liu, S., Kent, M., Moser, M., Minkley, D.R., Rondeau, E.B., Briec, M.S.O., Sandve, S.R., Miller, M.R., Cedillo, L., Baruch, K., Hernandez, A.G., Ben-Zvi, G., Shem-Tov, D., Barad, O., Kuzishchin, K., Garza, J.C., Lindley, S.T., Koop, B.F., Thorgaard, G.H., Palti, Y., Lien, S., 2019. Sex-dependent dominance maintains migration supergene in rainbow trout. *Nat. Ecol. Evol.* 3, 1731–1742. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1044-6>
- Potok, M.E., Nix, D.A., Parnell, T.J., Cairns, B.R., 2013. Reprogramming the Maternal Zebrafish Genome after Fertilization to Match the Paternal Methylation Pattern. *Cell* 153, 759–772. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.030>
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., Mesirov, J.P., 2011. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 29, 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
- Smith, Z.D., Gu, H., Bock, C., Gnirke, A., Meissner, A., 2009. High-throughput bisulfite sequencing in mammalian genomes. *Methods, Global approaches to study gene regulation* 48, 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.05.003>

Suvorov, A., Shershebnov, A., Wu, H., Medvedeva, Y., Sergeyev, O., Pilsner, J.R., 2018. Perinatal exposure to low dose 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) alters sperm DNA methylation in adult rats. *Reprod. Toxicol.* Elmsford N 75, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.10.009>

Wright, E., 2023. DECIPHER: Tools for curating, analyzing, and manipulating biological sequences. <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.DECIPHER>

Wu, H., Xu, T., Feng, H., Chen, L., Li, B., Yao, B., Qin, Z., Jin, P., Conneely, K.N., 2015. Detection of differentially methylated regions from whole-genome bisulfite sequencing data without replicates. *Nucleic Acids Res.* 43, e141. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv715>

## **Statements and Declarations**

### **Funding**

MEK is recipient of a PhD fellowship ARED from region Bretagne and INRAE PHASE (2020-2023). AS obtained the financial support from the internal funding scheme at the Norwegian University of Life Sciences (project number 1211130114), which financed AS international stay at INRAE, Fish Physiology and Genomics, UR 1037, Rennes, France. This work was funded by the French CRB Anim project ANR-11-INBS-0003 and the European FEAMP BIOGERM measure 47 (Innovation Aquaculture).

### **Competing Interests**

The authors declare no competing interests.

### **Author contribution**

MEK organized and carried out the study, analyzed and interpreted the data, and drafted the manuscript. AB taught and supervised the bioinformatic work of MEK, and contributed to most bio-informatic analyses. AS contributed to the wet lab work. DL contributed to the conception of the project and provided her knowledge of the trout genome for data interpretation. AL and CL conceived, designed and supervised the study. CL supervised the writing of the manuscript and AL provided her knowledge on genomic DNA methylation in trout. All authors approved the final version of the manuscript.

### **Data availability**

The data for this study has been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI under accession number PRJEB60579 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB60579>).

## Conclusion sur les informations fournies par le RRBS chez les spermatozoïdes de truite arc-en-ciel

Notre analyse des données de séquençage obtenues avec le RRBS et des traitements bio-informatiques retenus a confirmé que nous pouvions inclure nos 12 réplicats biologiques sans atteindre de limite de capacité de traitement de nos données. Nous avons aussi observé que le RRBS a fourni des informations sur l'état de méthylation d'environ 9 % des cytosines du génome en contexte CpG, si l'on additionne les données des 12 mâles. En revanche, à l'échelle individuelle, nos données ne représentent plus que 4 % (en moyenne) de toutes les cytosines en contexte CpG du génome. Nous avons aussi montré que, contrairement aux mammifères, l'enrichissement en sites CpGs est limité si l'on ramène le pourcentage de représentation de nos CpG au pourcentage de couverture du génome de nos données séquencées. Dans notre étude *in silico*, nous avons attiré l'attention sur le fait que l'enrichissement dépend aussi de la taille des fragments sélectionnés, sachant que les fragments les plus gros seront mieux alignés au génome de référence mais leur densité en sites CpGs sera plus faible, d'où l'importance de trouver un compromis entre ces deux critères.

Par ailleurs, nous avons pu démontrer que les sites CpGs génomiques représentés par nos échantillons sont distribués tout au long du génome et sont présents dans toutes les régions génomiques. Le RRBS a donc fourni une représentation réduite mais homogène des sites CpGs génomiques chez la truite arc-en-ciel. Quant au nombre de cytosines communes en contexte CpG entre les mâles, nous nous attendions à en obtenir un nombre important. Or nous avons observé un nombre limité de cytosines communes en contexte CpG entre les différents mâles dans notre étude et dans nos conditions d'analyse. Cela reflète l'importance d'avoir plusieurs réplicats biologiques afin d'assurer une représentation acceptable des cytosines génomiques en contexte CpG. Mais l'accessibilité à la variabilité inter-individuelle est restreinte.

Notre travail a aussi permis de mettre en évidence l'importance du choix des paramètres lors de la recherche de DMCs, avec l'importance d'imposer un effectif minimum de réplicats biologiques dans la comparaison entre lots expérimentaux. Nous en avons déduit qu'il est également important, quand c'est possible, de recourir à une analyse pairée des données pour des études d'effet de traitements, afin d'imposer que l'analyse d'une cytosine entre l'échantillon contrôle et traité (sperme frais et cryoconservé dans notre cas) ait lieu sur un même mâle, afin de ne pas biaiser l'analyse de la méthylation de l'ADN.

Ce travail approfondi de la façon dont les scripts bioinformatiques ont traité nos données nous a permis d'être plus critiques et plus vigilants dans le choix des multiples options mise à notre disposition par la communauté des biostatisticiens. Cela nous a permis de faire un choix éclairé pour la suite de ce travail.

## 3. Méthylation de l'ADN en réponse à la cryoconservation

Ce dernier chapitre de la thèse capitalise sur tous les résultats précédents pour explorer de façon fiable l'impact de la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN, et déterminer si cet impact varie selon le cryoprotecteur. La majorité des données évoquées dans cette section a alimenté l'article « Cryopreservation effect on DNA methylation profile in rainbow trout spermatozoa » (doi : [10.1038/s41598-023-44803-2](https://doi.org/10.1038/s41598-023-44803-2)) publié dans Scientific reports et ajouté en annexe.

### 3.1 Validation des données de séquençage des échantillons issus de cryoconservation

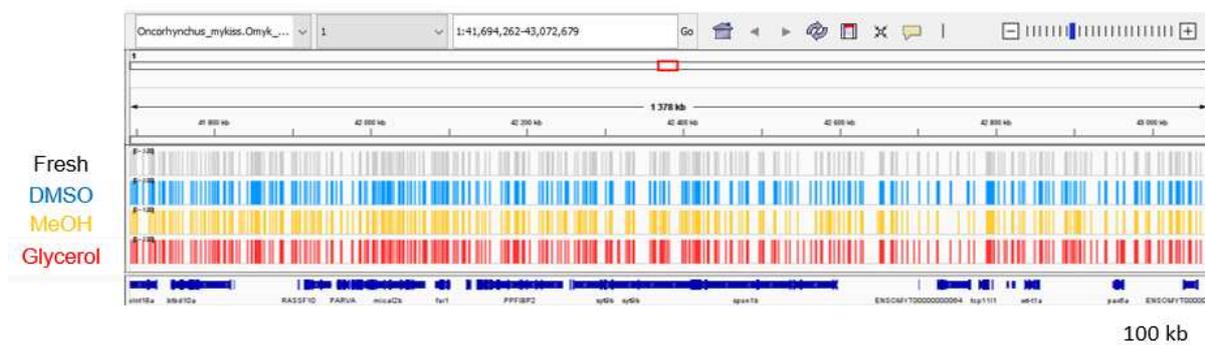
Nous avons développé dans le chapitre précédent l'étendue des informations données par nos séquençages RRBS par rapport au génome de référence, sur le jeu de données des spermatozoaires frais. Dans la présente analyse, nous avons intégré les données du séquençage des trois conditions de cryoconservation (**Table 5**). Nous avons observé que, comme pour le sperme frais, le RRBS a fourni une représentation réduite des  $70,6 \times 10^6$  cytosines en contexte CpG du génome de truite arc-en-ciel dans les trois autres jeux de données. Une moyenne d'environ 4 % des cytosines génomiques en contexte CpG a été analysée par échantillon dans le sperme cryoconservé, avec également une variabilité importante entre mâles. La représentation légèrement plus élevée des échantillons cryoconservés avec du MeOH peut s'expliquer par le fait que ces échantillons ont eu plus de séquences (reads) que les autres conditions (nombre de reads significativement plus élevé en MeOH comparé à DMSO et glycérol). Par conséquent, quand ces séquences en plus grand nombre ont été alignées au génome et que les cytosines en contexte CpG ont été extraites, un plus grand nombre de cytosines en contexte CpG a été obtenu.

Condition	Nombre total de raw reads x 10 <sup>6</sup>	Reads avec adaptateur x 10 <sup>6</sup> (% du total)	% mapping efficiency	Médiane de la profondeur de séquençage des cytosines	Nombre des cytosines identifiés x 10 <sup>6</sup>	% cytosines génomiques en contexte CpG
Frais	137.0 ± 34.4	72.0 (53.0) ± 16.5 (±3.5)	51.3 ± 1.1	39.8	2.8 ± 1.0	4.0 ± 1.5
DMSO	109.9 ± 15.4	57.4 (52.4) ± 7.2 (±2.3)	50.6 ± 0.5	29.1	2.9 ± 0.8	4.0 ± 1.1
MeOH	151.4 ± 45.6	77.9 (51.9) ± 21.2 (±2.2)	50.8 ± 0.6	26.7	3.6 ± 0.2	5.1 ± 0.3
Gly	134.1 ± 49.0	71.0 (53.1) ± 25.8 (±3.3)	50.7 ± 0.9	36.1	2.7 ± 1.0	3.8 ± 1.4

**Table 5 : Résumé des données de séquençage obtenues avec le RRBS.** Le nombre total de raw reads inclut les reads 1 et les reads 2 du paired end sequencing. Les reads avec adaptateur correspond au nombre de reads ayant des inserts inférieurs à 100 bp. Mapping efficiency = (nombre des reads alignés uniquement une fois sur le génome de la truite arc-en-ciel/ nombre de reads trimmés) x 100. La profondeur de séquençage est le nombre de fois qu'une cytosine a été séquencée, alignée au génome de référence et extraite en tant que cytosine en contexte CpG. Le % des cytosines génomiques totales en contexte CpG correspond au (nombre des cytosines identifiées en contexte CpG/ nombre des cytosines en contexte CpG dans le génome de référence -70 672 570-) x 100. Les valeurs sont exprimées en tant que moyenne ± ET des 12 mâles dans chaque condition (Frais, cryoconservé avec du DMSO, MeOH ou glycérol). Gly : glycérol. Test Krukal-Wallis : pas de différence significative pour ces % de cytosines génomiques en contexte CpG entre spermes frais et spermes cryoconservés quel que soit le cryoprotecteur : p-value > 0.05. n= 12 échantillons par condition.

Comme pour le sperme frais, quand tous les échantillons de la même condition ont été combinés, la représentation des cytosines génomiques en contexte CpG a doublé (frais : 9.1 %, DMSO : 9.0 % ; MeOH : 9.1 % ; glycérol : 9.1 %). Ainsi, nous confirmons sur 4 jeux de données différents que la faible représentation des cytosines génomiques en contexte CpG par nos données à l'échelle de l'échantillon a été compensée par le grand nombre de réplicats biologiques dans cette étude.

Nous avons vérifié si ces 9 % de cytosines génomiques en contexte CpG sont distribuées de façon homogène pour toutes les conditions, comme réalisé précédemment avec le sperme frais. Comme le montre la **Figure 56**, ces 9 % des cytosines génomiques en contexte CpG ont été distribuées d'une façon homogène tout au long des chromosomes du génome de truite arc-en-ciel quel que soit le jeu de données, et comme pour le sperme frais, nous n'avons pas observé de régions de plus que 150 kb entre 2 cytosines consécutives. Nous avons également constaté que parmi les régions vides, c'est-à-dire dénuées de cytosines, certaines sont vides à la fois dans le sperme frais et cryoconservé. Cela suggère que ces régions sont non accessibles ou mal annotées.

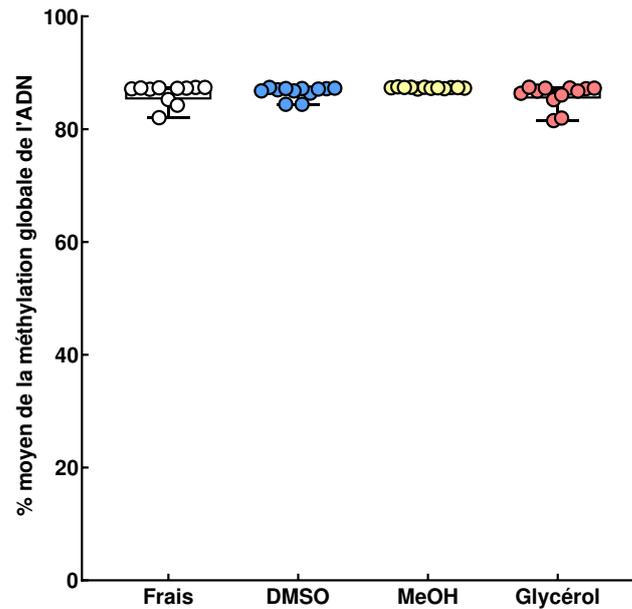


**Figure 56: Exemple de la distribution des cytosines séquencées en contexte CpG tout au long du génome de référence.** Cette région illustrée est représentative du profil observé tout au long du génome. Cette représentation a été obtenue avec IGV\_2.8.13 et montre la distribution sur le chromosome 1 de la position 58 234 274 à la 59 476 270 ( $1.2 \times 10^6$ ) du génome de référence de truite arc-en-ciel “Omyk\_1.0 genome version”. Chaque ligne correspond à une condition différente dans laquelle sont représentées toutes les cytosines séquencées (en contexte CpG) des 12 mâles. Chaque cytosine en contexte CpG séquencée et alignée est représentée par une barre. La ligne du bas représente les gènes (bleu foncé)

## 3.2 Analyse de l’effet de la cryoconservation

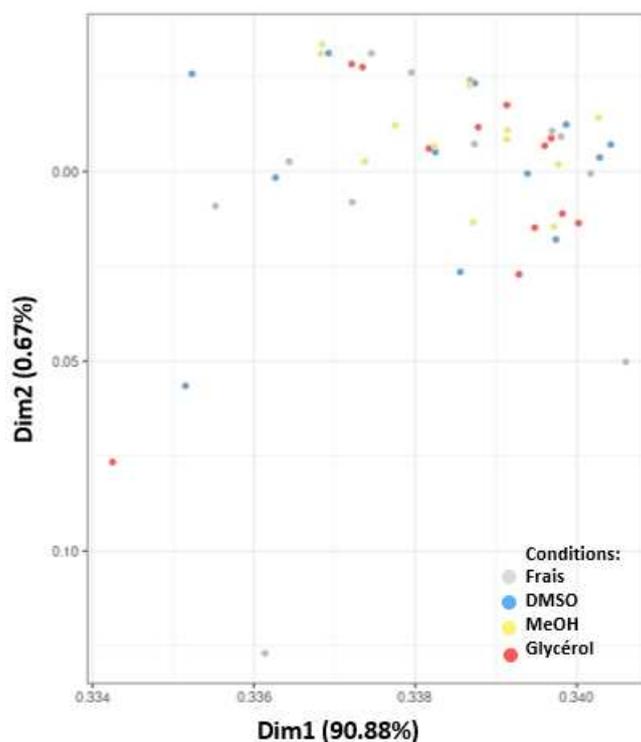
### 3.2.1 Méthylation globale de l’ADN après cryoconservation

La première étape de notre analyse a consisté à évaluer si la cryoconservation du sperme affectait la méthylation de l’ADN à une échelle globale. Comme indiqué **Figure 57**, le pourcentage de méthylation globale de l’ADN est similaire, quel que soit le cryoprotecteur, à celui obtenu avec le sperme frais. Ces résultats démontrent que la cryoconservation du sperme n’affecte pas la méthylation globale de l’ADN.



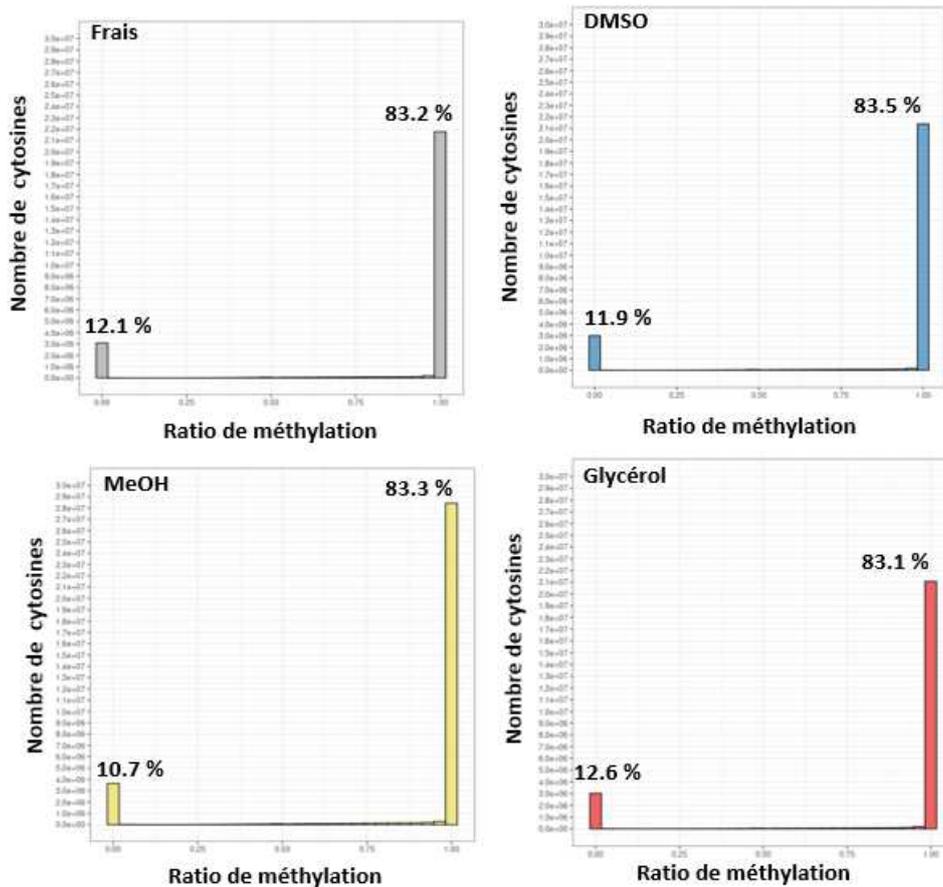
**Figure 57 : Pourcentages moyens de la méthylation globale de l'ADN du sperme frais et cryoconservé.** Chaque point représente la valeur individuelle de chaque sperme d'un mâle donné (n=12 réplicats biologiques dans chaque condition). Chaque valeur individuelle correspond à la moyenne du pourcentage de méthylation de toutes les cytosines dans chaque échantillon. Les boîtes à moustaches présentent (du bas vers le haut) : minimum, 1e quartile, médiane et 3e quartile. Test Kruskal-Wallis : pas de différence significative : p-value > 0.05.

Dans une analyse globale plus poussée que celle basée seulement sur le pourcentage moyen de la méthylation par échantillon, nous avons comparé tous les échantillons les uns aux autres en se basant sur le ratio de méthylation de chacune de leurs cytosines séquencées (entre 2,1 et 3,5 x 10<sup>6</sup> cytosines par échantillon selon les mâles et les traitements, **Table 5**). Comme le montre l'ACP résultant de cette analyse (**Figure 58**), nous n'avons pas observé de ségrégation entre les traitements, sperme frais ou cryoconservé avec un des trois cryoprotecteurs. Quatre échantillons sont relativement séparés des autres (sur l'axe 1), mais ces échantillons ne proviennent pas du même traitement (2 échantillons de sperme frais, 1 cryoconservé avec du DMSO et 1 avec du glycérol). Leur séparation des autres échantillons peut être expliquée par le fait que ces quatre échantillons s'avèrent avoir un nombre de cytosines en contexte CpG plus faible. L'absence de ségrégation des traitements sur les axes de l'ACP renforce le fait que la cryoconservation n'affecte pas la méthylation de l'ADN de façon majeure. Cela signifie que si un effet de la cryoconservation existe, il doit être recherché à un niveau plus fin.



**Figure 58: Distribution des échantillons du sperme frais et cryoconservé.** Analyse en Composantes Principales montrant la distribution des échantillons du sperme frais et cryoconservé selon le ratio de méthylation de l'ADN de chaque cytosine au sein de chaque échantillon (n=12 échantillons de sperme par condition).

Dans une dernière analyse globale, nous avons étudié le ratio de méthylation individuel de toutes les cytosines ayant une profondeur de séquençage  $N \geq 10$  de tous les échantillons dans chaque condition. Nous avons observé que, quelles que soient les conditions expérimentales, plus que 80 % des cytosines analysées en contexte CpG ont un ratio de méthylation de 1 (**Figure 59**). Cela confirme l'état hautement méthylé des cytosines dans tous les échantillons, et le haut pourcentage de méthylation de l'ADN du spermatozoïde de truite. La seconde catégorie la plus représentée englobe les cytosines non méthylées (**Figure 59**). Seule une faible proportion de cytosines a des valeurs intermédiaires de méthylation. Cela signifie que l'état de méthylation des cytosines entre les spermatozoïdes d'un échantillon est très peu variable (la plupart des cytosines sont soit méthylées soit déméthylées). Quand nous avons comparé les échantillons du sperme frais par rapport aux cryoconservés, nous n'avons observé aucune modification significative des valeurs entre les 3 catégories (**Figure 59**). Une augmentation des cytosines à niveau de méthylation variable aurait pu indiquer que certaines cytosines auraient acquis un état de méthylation différent de 0 ou 1 parmi les spermatozoïdes, mais ce n'est pas le cas. Ainsi, si la cryoconservation des spermatozoïdes a induit des altérations subtiles du ratio de méthylation de la cytosine, elle n'a pas été détectée à partir de cette représentation.



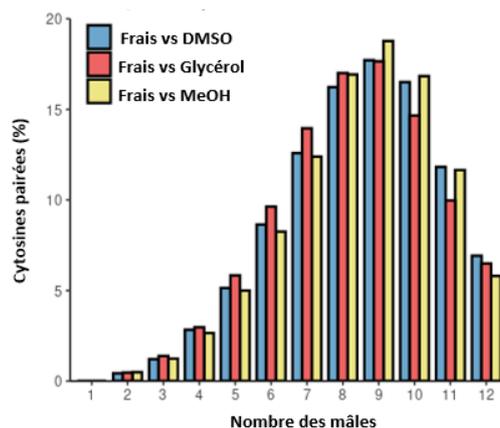
**Figure 59 : Histogramme de fréquence montrant le nombre de cytosines en contexte CpG selon leur ratio de méthylation (0 à 1) pour chaque condition (frais et cryoconservé avec DMSO, MeOH et glycérol).** L'axe des x montre 20 classes avec des intervalles de 0.05 (ratios de méthylation de 0-0.05 à 0.95-1). Les pourcentages indiqués au-dessus des classes de 0-0.05 et 0.95-1.0 indiquent le pourcentage moyen des cytosines totales en contexte CpG dans ces 2 classes (moyenne des 12 échantillons dans chaque traitement). Test Kruskal-Wallis : pas de différence significative pour ces pourcentages entre spermatozoïdes frais et spermatozoïdes cryoconservés quel que soit le cryoprotecteur : p-value > 0.05. n = 12 échantillons par condition.

### 3.2.2 Caractérisation des cytosines différenciellement méthylées (DMCs) après la cryoconservation du sperme.

Le second niveau d'analyse de l'effet de la cryoconservation sur la méthylation de l'ADN a été effectué à l'échelle de la cytosine individuelle, identifiée par ses coordonnées génomiques. Un différentiel de méthylation des cytosines en contexte CpG entre les différentes conditions de cryoconservation a ainsi été recherché. Comme analysé dans le chapitre précédent, nous avons effectué une analyse appariée afin d'étudier une cytosine donnée dans un mâle donné, la cytosine devant être présente à la fois dans la condition frais et dans une des conditions de cryoconservation. Cela empêche tout biais statistique où les cytosines d'autres mâles sont utilisées pour compenser le manque d'information à un site donné. Ainsi, pour chaque mâle,

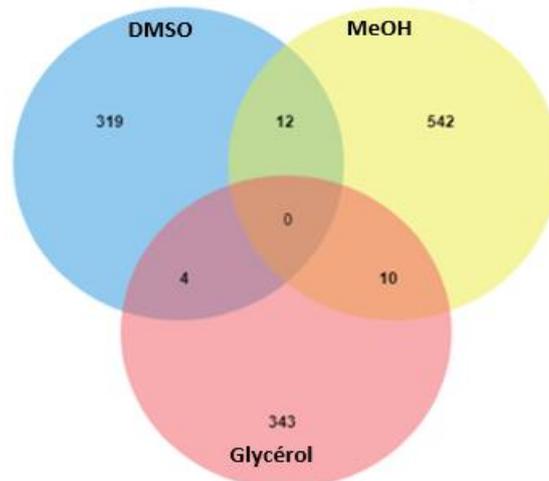
ce sont uniquement les cytosines qui sont présentes à la fois dans le sperme frais et cryoconservé avec le DMSO ou MeOH ou glycérol qui sont prises en considération. Nous les appellerons des cytosines pairées. Dans cette analyse, toutes les cytosines avec une profondeur de séquençage  $N \geq 1$  sont incluses. En effet, comme indiqué plus haut, les cytosines sont en grande majorité soit complètement méthylées, soit complètement déméthylées. Cela nous permet ainsi d'analyser toutes les cytosines sans devoir sélectionner les cytosines en seillant à une certaine profondeur de séquençage.

En première exploration, nous avons recherché combien de cytosines pairées (indépendamment de la nature de la paire -frais/DMSO, frais/MeOH, frais/glycérol-) sont représentées chez les différents mâles. D'une façon surprenante, la plus grande proportion de cytosines pairées ( $> 15\%$  du nombre total de paires de cytosines) sont présents dans 8 à 10 mâles (**Figure 60**) alors qu'une proportion plus faible de cytosines ( $< 6\%$ ) est présente dans uniquement 1 à 5 mâles. La présence d'une portion plus importante de cytosines pairées dans plus de mâles peut indiquer que ce sont les mêmes fragments qui sont séquencés plus que les autres dans la majorité des mâles. Cela peut résulter d'un biais de séquençage dont l'origine est difficile à expliquer. Nous avons également observé que le nombre de cytosines pairées entre les échantillons frais et MeOH était plus important que celui dans les autres comparaisons. Comme évoqué plus tôt, les échantillons MeOH ont plus de cytosines en contexte CpG. Ainsi, en comparant frais vs MeOH, la probabilité d'obtenir des cytosines pairées est plus grande. Enfin, nous avons observé que le nombre de cytosines pairées de 6 à 12 mâles représente 90 % du nombre total de cytosines pairées. Ainsi, comme nous voulons sélectionner la plus grande proportion de cytosines pairées, nous avons décidé de sélectionner les cytosines pairées présentes dans au moins 6 mâles ( $n \geq 6$ ). Ce seuil nous a permis de renforcer le sens biologique des DMCs que nous pourrions obtenir.



**Figure 60 : Distribution du nombre de cytosines pairées selon le nombre de mâles ayant ces cytosines dans chaque comparaison entre le sperme frais et un cryoprotecteur.** Les résultats sont exprimés en pourcentages du nombre total de cytosines pairées (frais vs DMSO : 748 770, frais vs MeOH : 1 645 797 et frais vs glycérol : 714 554).  $n=12$  mâles dans chaque comparaison.

Sur cette base de comparaison des cytosines pairées présentes dans au moins 6 mâles, nous avons observé que 335, 564 et 357 cytosines étaient différentiellement méthylées (DMCs) entre la condition frais et les conditions DMSO, MeOH et glycérol respectivement (**Figure 61**). Aucune DMC n'est commune aux 3 cryoprotecteurs, et seulement quelques DMCs sont communes entre 2 cryoprotecteurs.



**Figure 61 : Diagramme de Venn des cytosines différentiellement méthylées (DMCs) obtenues dans chaque comparaison entre sperme frais et cryoconservé selon le cryoprotecteur.** Les nombres indiquent le nombre de DMCs dans chaque groupe.

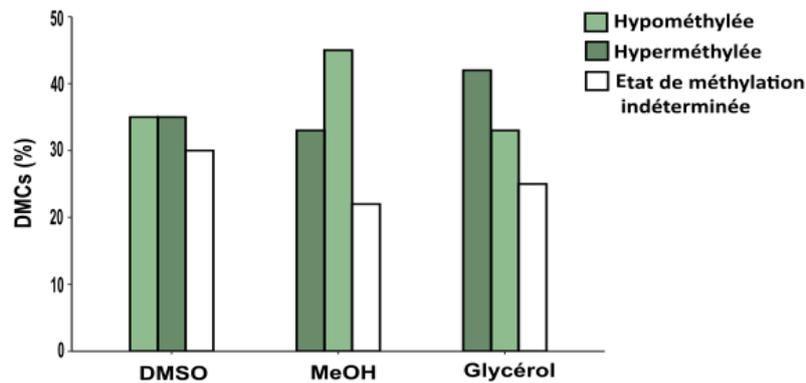
L'analyse individuelle de ces DMCs nous a permis d'observer que les DMCs n'ont pas toutes le même sens de variation chez tous les mâles (**Exemple Figure 62**). Ainsi, dans certains mâles, une DMC donnée aura sa méthylation augmentée par la cryoconservation (nous l'appellerons alors DMC hyperméthylée), alors que chez d'autres mâles, la même DMC aura sa méthylation diminuée par la cryoconservation (nous l'appellerons alors DMC hypométhylée). Une autre observation est qu'au sein d'un même mâle, les différentes DMCs auront également des sens de variation différents. Ainsi, les effets ténus de la cryoconservation que nous observons sont extrêmement variables d'un site à l'autre chez un même mâle et entre mâles.

Mâles	DMCs					
	1-17389978	1-26792038	2-6203380	3-44458615	5-62243754	8-62178762
1		pas de différentiel de méthylation		pas de différentiel de méthylation		
2						
3	NA	NA	NA	NA		NA
4			NA			
5				NA	NA	NA
6						
7					pas de différentiel de méthylation	
8					pas de différentiel de méthylation	
9						
10					pas de différentiel de méthylation	
11						pas de différentiel de méthylation
12						
Statut final de méthylation						

Hypométhylée
  Hyperméthylée

**Figure 62: Exemple de la répartition des différentes classes de DMCs obtenues en frais vs DMSO dans différents mâles.** Ligne du dessus : coordonnées génomiques des DMCs : chromosome-position. Hypométhylée : DMC ayant sa méthylation diminuée par la cryoconservation. Hyperméthylée : DMC ayant sa méthylation augmentée par la cryoconservation. NA : position non séquencée chez un mâle donné. Statut final de méthylation : même tendance de modification de la méthylation (hypo ou hyperméthylation) dans > 50 % des mâles

Afin de déterminer des tendances dans le sens de modification de la méthylation, les DMCs ont été classées en hypométhylée ou hyperméthylée quand elles ont eu la même tendance de modification de la méthylation dans plus de la moitié (> 50 %) des mâles (voir exemple de tendances **Figure 62**). La **Figure 63** montre que la cryoconservation avec le DMSO a entraîné des DMCs hypométhylées et hyperméthylées en proportions identiques (35 %). Par contre, en MeOH, nous avons observé plus de DMCs hypométhylées (45 %) que hyperméthylées (33 %). Une tendance inverse a été observée après la cryoconservation avec du glycérol, avec plus de DMCs hyperméthylées (42 %) que hypométhylées (32 %). En plus des DMCs hypo et hyperméthylées, certaines DMCs n'ont pas pu être classées car elles ne présentaient pas une tendance claire de modification de la méthylation entre les mâles. Cela illustre le fait que la cryoconservation n'a pas entraîné un effet homogène sur tous les mâles. En outre, nos résultats révèlent que l'impact de la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN est cryoprotecteur dépendant.



**Figure 63 : Distribution des différentes classes de DMCs au sein de chaque comparaison entre frais et chaque cryoprotecteur.** Hypométhylée : DMC ayant une tendance vers une hypométhylation dans > 50 % des mâles. Hyperméthylée : DMC ayant une tendance vers une hyperméthylation dans > 50 % des mâles. Etat de méthylation indéterminé inclut les DMCs qui n'ont pas pu être classifiées car elles ne présentaient pas une tendance claire de modification de la méthylation entre les mâles. Les valeurs sont exprimées en tant que pourcentages des DMCs totales. Nombre de DMC totales : DMSO : 335, MeOH : 564 et glycérol : 357.

### 3.2.3 Caractérisation des régions potentiellement sensibles à la cryoconservation

Malgré le faible nombre de DMCs obtenues dans nos conditions de cryoconservation, nous avons exploré s'il existe des DMRs entre le sperme frais et cryoconservé. Aucune DMR n'a été statistiquement détectée entre échantillons frais et cryoconservés avec le DMSO ou le MeOH. En revanche, 2 DMRs ont été observées dans la comparaison frais-cryoconservation avec le glycérol.

Nous avons cherché à affiner cette analyse. En effet, nous ne pouvions exclure que certaines régions potentiellement sensibles avaient peut-être échappé à la détection par DSS en raison des critères stricts sélectionnés dans notre étude, où une recherche DMR exige qu'au moins cinq CpGs consécutifs soient présents dans une fenêtre de 50 bases. A ce seuil s'ajoutait la contrainte supplémentaire que nous nous étions fixés : une DMC doit être présente dans au moins 6 mâles pour être validée, et nous travaillions en cytosines pairées. Par une approche site à site manuelle, focalisée sur les DMCs que nous avons identifiées, nous avons cherché des régions présentant au moins 2 DMCs consécutives séparées par moins de 100 pb. Nous avons donné à ces régions le nom de régions potentiellement sensibles à la cryoconservation. Par cette approche, nous avons observé 62 régions potentiellement sensibles à la cryoconservation dans toutes les comparaisons du sperme cryoconservé au sperme frais (**Table 6**). Parmi ces régions potentiellement sensibles, 17 sont sensibles au DMSO, 33 sont sensibles au MeOH et 16 sont sensibles au glycérol (**Table 6**). Les deux uniques DMRs identifiées précédemment dans la comparaison frais-glycérol figurent par ailleurs dans ces 16

régions potentiellement sensibles au glycérol. Une région est affectée par les 3 cryoprotecteurs (8 : 79 446 507 - 8 : 79 446 591, Table 5) et 3 régions sont sensibles au DMSO et au MeOH mais pas au glycérol.

Les régions qui sont potentiellement sensibles aux cryoprotecteurs sont distribuées dans toutes les régions génomiques incluant les introns, intron1, exons, promoteur 5 kb et les régions intergéniques (**Table 6**). Nous avons pu identifier quelques gènes dans ces régions sensibles, mais la région commune aux 3 cryoprotecteurs appartient à une région intergénique. Parmi les régions sensibles liées à des gènes annotés (promoteurs, introns et exons), seulement 4 sont affectées par DMSO alors que 12 sont affectées par le MeOH et 12 par le glycérol. Ces différences sont intéressantes en regard du meilleur potentiel cryoprotecteur du DMSO, même s'il est difficile de conclure sur de si faibles effets. En se focalisant sur les régions impliquées dans la régulation des gènes (régions promotrices et intron 1), nous avons observé que les promoteurs distaux de *ebf2* et *p4ha1a* sont dans une région sensible à la cryoconservation avec le DMSO. Parmi les promoteurs affectés par le MeOH, l'un d'eux régule le gène *u2*. Les autres promoteurs distaux affectés sont localisés dans le chromosome mitochondrial. Ces promoteurs sont liés aux gènes *cox2*, *cox3*, *nd3*, *nd4*, *nd4l*, *atp6* et *atp8*. Les gènes *pcdhb* et *slc26a2* ont également leur 1<sup>e</sup> intron appartenant à une des régions potentiellement sensibles. Nous avons également observé que parmi les promoteurs distaux affectés par le glycérol, un est associé au gène *znf385d* et un autre est associé au gène *osbpl10*. D'autres gènes comme *ptprub* et *ndufs8a* sont également affectés au niveau de leurs introns par le glycérol.

Régions	Nbre de DMCs DMSO	Nbre de DMCs MeOH	Nbre de DMCs Gly	Région génomique	Gène	Gène ID
1 : 77 284 194 - 1 : 77 284 341	NA	0	7	Other	NA	NA
2 : 51 809 891 - 2 : 51 809 918	0	2	0	Other	NA	NA
2 : 55 059 488 - 2 : 55 059 512	NA	2	NA	Other	NA	NA
2 : 84 969 754 - 2 : 84 969 757	2	0	NA	Introns	NA	ENSOMYG0000003 3911
3 : 18 143 279 - 3 : 18 143 295	0	2	0	Other	NA	NA
3 : 28 999 827 - 3 : 28 999 911	0	0	4	Promoter_5 kb	znf385d	ENSOMYG0000000 7065
3 : 38 641 242 - 3 : 38 641 260	0	0	2	Introns; intron1	Ptprub	ENSOMYG0000000 0944
5 : 87 773 628 - 5 : 87 773 708	0	0	6	Other	NA	NA
6 : 27 006 900 - 6 : 27 006 938	3	0	NA	Promoter 5kb	ebf2	ENSOMYG0000000 7222
6 : 63 230 513 - 6 : 63 230 563	0	3	0	Introns	adam10a	ENSOMYG0000001 0593
7 : 66 339 321 - 7 : 66 339 343	NA	2	NA	Other	NA	NA
8 : 49 417 188 - 8 : 49 417 201	NA	0	2	Other	NA	NA
8 : 62 178 762 - 8 : 62 178 843	6	0	NA	Other	NA	NA
8 : 79 446 507 - 8 : 79 446 591	2	2	4	Other	NA	NA
8 : 79 446 729 - 8 : 79 446 753	2	1	0	Other	NA	NA
8 : 79 446 753 - 8 : 79 446 760	1	2	0	Other	NA	NA
9 : 13 905 316 - 9 : 13 905 359	0	0	2	Exons	NA	ENSOMYG0000001 2701
9 : 23 506 605 - 9 : 23 506 613	NA	2	0	Other	NA	NA
9 : 40 751 199 - 9 : 40 751 319	0	3	0	Promoter_5 kb	NA	ENSOMYG0000000 7596
9 : 65 922 544 - 9 : 65 922 597	0	3	0	Other	NA	NA
10 : 58 822 172 - 10 : 58 822 181	2	NA	NA	Introns; intron 1	NA	ENSOMYG0000002 6688; ENSOMYG0000002 6627; ENSOMYG0000002 6688; ENSOMYG0000002 6627

11 : 41 239 948 - 11 : 41 239 982	NA	0	2	Other	NA	NA
11 : 75 710 382 - 11 : 75 710 453	NA	3	0	Other	NA	NA
12 : 87 125 997 - 12 : 87 126 003	2	NA	NA	Other	NA	NA
14 : 50 325 080 - 14 : 50 325 136	0	2	0	Introns; intron1	Pcdhb	ENSOMYG0000001 4270
16 : 13 278 338 - 16 : 13 278 342	NA	2	NA	Introns	SLC39A1 1	ENSOMYG0000003 3173
17 : 57 694 790 - 17 : 57 694 858	0	2	0	Introns	cdh4	ENSOMYG0000004 4618
18 : 26 437 868 - 18 : 26 437 930**	NA	NA	7	Promoter_5 kb	OSBPL10	ENSOMYG0000002 5071
18 : 28 780 753 - 18 : 28 780 850	5	0	0	Other	NA	NA
18 : 53 775 926 - 18 : 53 775 987	0	2	NA	Other	NA	NA
19 : 14 572 357 - 19 : 14 572 390	0	0	2	Exons; introns; intron1	ndufs8a	ENSOMYG0000000 5413
19 : 43 252 495 - 19 : 43 252 511	0	0	2	Promoter_5 kb	lck	ENSOMYG0000003 2229
19 : 45 634 077 - 19 : 45 634 080	NA	2	NA	Introns	col12a1a	ENSOMYG0000000 6853
20 : 20 273 - 20 : 20 301	0	3	1	Downstream	5_8S_rR NA	ENSOMYG0000000 8170
20 : 3 482 719 - 20 : 3 482 759	3	NA	0	Introns	cdhr1	ENSOMYG0000000 9577
20 : 4 582 942 - 20 : 4 582 970	0	1	2	Other	NA	NA
20 : 13 286 267 - 20 : 13 286 314	2	0	1	Promoter 5kb	p4ha1a	ENSOMYG0000004 3711
20 : 24 528 122 - 20 : 24 528 126	0	2	0	Other	NA	NA
20 : 30 738 907 - 20 : 738 987	0	0	3	Introns	khdrbs2	ENSOMYG0000004 3413
21 : 51 651 818 - 21 : 51 651 870	2	0	1	Other	NA	NA
23: 47 115 194 - 23: 47 115 229	2	0	0	Other	NA	NA

25 : 19 063 744 - 25 : 19 063 823	0	4	NA	Introns; intron1	slc26a2	ENSOMYG0000001 7229
25 : 82 566 468 - 25 : 82 566 493	NA	1	2	Introns	smoc1	ENSOMYG0000003 7447
27 : 391 849 - 27 : 391 854	2	NA	NA	Other	NA	NA
29 : 15 383 450 - 29 : 15 383 576	NA	11	0	Exons; exon1	NA	ENSOMYG0000004 2159
MSJN01 009 823.1 : 484 - MSJN01009823. 1 : 569	3	2	0	Other	NA	NA
MSJN01 009 823.1 : 538 - MSJN01009823. 1 : 569	2	6	0	Other	NA	NA
MSJN01 011 709.1 : 7 185 - MSJN01011709. 1 : 7 215	0	2	0	Other	NA	NA
MSJN01 019 798.1 : 257 543 - MSJN01019798. 1 : 257 574	NA	0	2	Introns; Introns1	NA	ENSOMYG0000004 0507
MSJN01 041 575.1 : 20 760 - MSJN01041575. 1 : 20 774	0	2	NA	Other	NA	NA
MSJN01 051 995.1 : 1 354 - MSJN01051995. 1 : 1404	0	3	0	Other	NA	NA
MSJN01 053 504.1 : 13 293 - MSJN01053504. 1 : 13 312	1	2	NA	Other	NA	NA
MSJN01 053 808.1 : 39 504 - MSJN01053808. 1 : 39 747 **	0	0	8	Introns	NA	ENSOMYG0000003 0867
MSJN01 064 445.1 : 1089 - MSJN01064445. 1 : 1113	0	3	0	Other	NA	NA
MSJN01 064 445.1 : 1 194 - MSJN01064445. 1 : 1261	2	10	0	Other	NA	NA
MSJN01 064 445.1 : 1 227 - MSJN01064445. 1 : 1 247	3	2	0	Other	NA	NA

MSJN01 067 055.1 : 47 598 - MSJN01067055. 1 : 47624	NA	5	0	Other	NA	NA
MSJN01 068 470.1 : 831- MSJN01068470. 1 : 873	0	2	0	Exons; exon1; promoter_5 kb	U2 for promote r_5kb	ENSOMYG0000004 1560; ENSOMYG0000004 1563 for promoter_5kb
MSJN01 119 667.1 : 20 426 - MSJN01119667. 1 : 20 474	0	2	0	Other	NA	NA
MT : 6 657 - MT : 6754	0	2	0	* : voir légende		

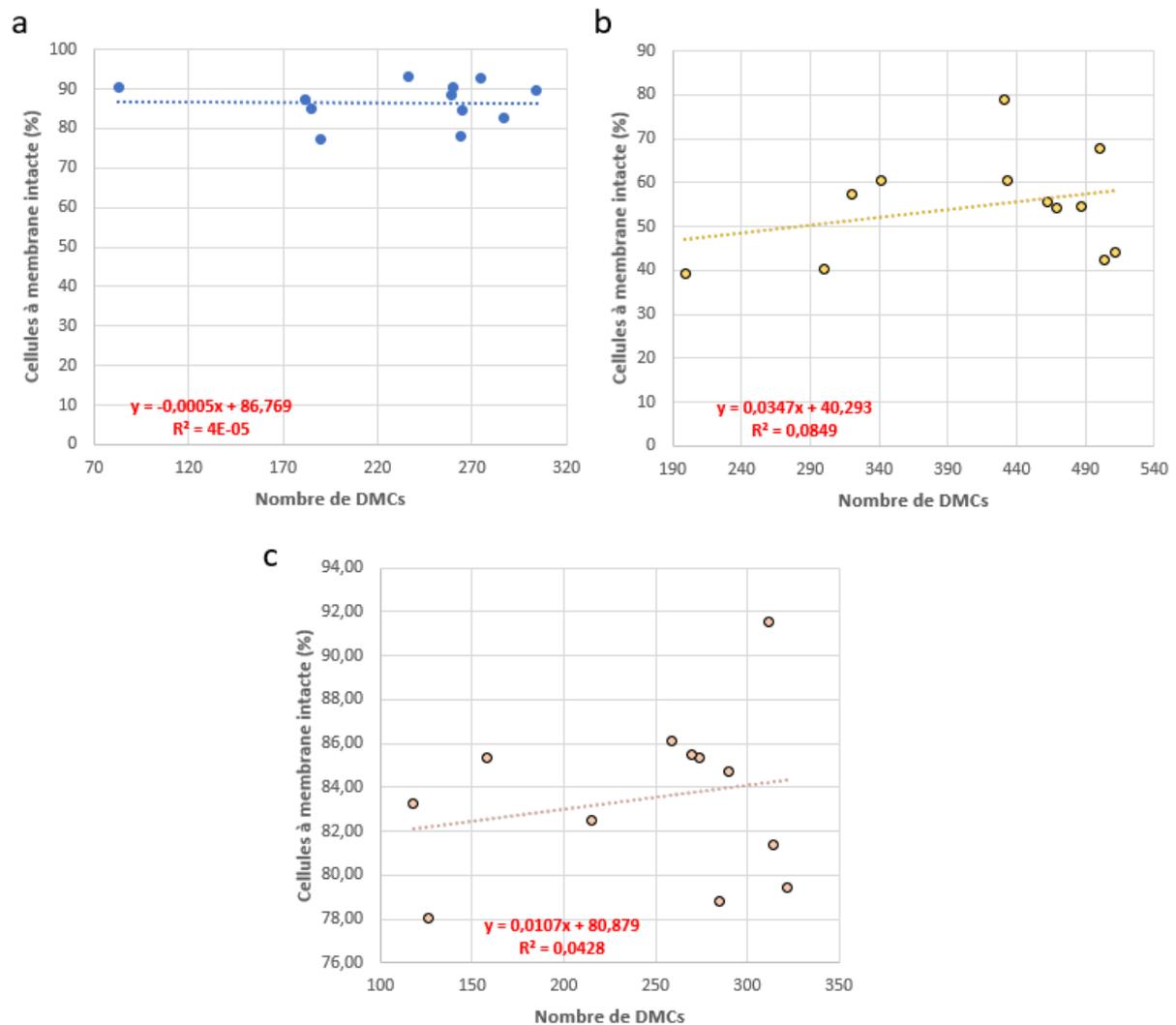
**Table 6: Liste des régions potentiellement sensibles selon le cryoprotecteur.** Les régions séquencées montrant au moins 2 DMCs (cytosines différenciellement méthylées) entre échantillons frais et cryoconservé, dans un intervalle maximum de 100 b (taille du read), sont incluses dans cette liste. La colonne "region" indique le numéro du chromosome et les coordonnées de la région sur le génome de référence. Gly : glycérol. Gène : nom du gène de la base de données ensembl (version 104) selon le génome de référence (Omyk\_1.0 genome version). Promoter 5 kb: région 5 kb en amont du site d'initiation de la transcription ; Exon 1 : premier exon ; Downstream : région 1 kb en aval du site de terminaison de la transcription ; Other : région intergénique ; NA : not available. \*les 2 DMCs appartiennent au premier exon (exon1) de cox1, downstream de nd2, promoter 5 kb de cox2, promoter 5 kb de atp8, promoter 5 kb de atp6, promoter 5 kb de cox3, promoter 5 kb de nd3, promoter 5 kb de nd4l, promoter 5 kb de nd4 ; \*\* : DMR observée suite à la comparaison entre frais et sperme cryoconservé avec glycérol.

**L'ensemble de nos analyses sur la méthylation de l'ADN nous a permis de démontrer que la méthylation globale de l'ADN n'est pas affectée par la cryoconservation quel que soit le cryoprotecteur utilisé. Par contre, nous avons pu détecter un nombre limité de DMCs, dont la plupart sont exclusives d'un cryoprotecteur. Malgré l'absence de DMRs et ce nombre limité de DMCs, nous avons pu identifier des régions potentiellement sensibles aux cryoprotecteurs. D'une manière intéressante, certaines de ces régions sont impliquées dans la régulation de l'expression de gènes annotés.**

### 3.3 Lien entre la méthylation de l'ADN et la qualité cellulaire du sperme décongelé

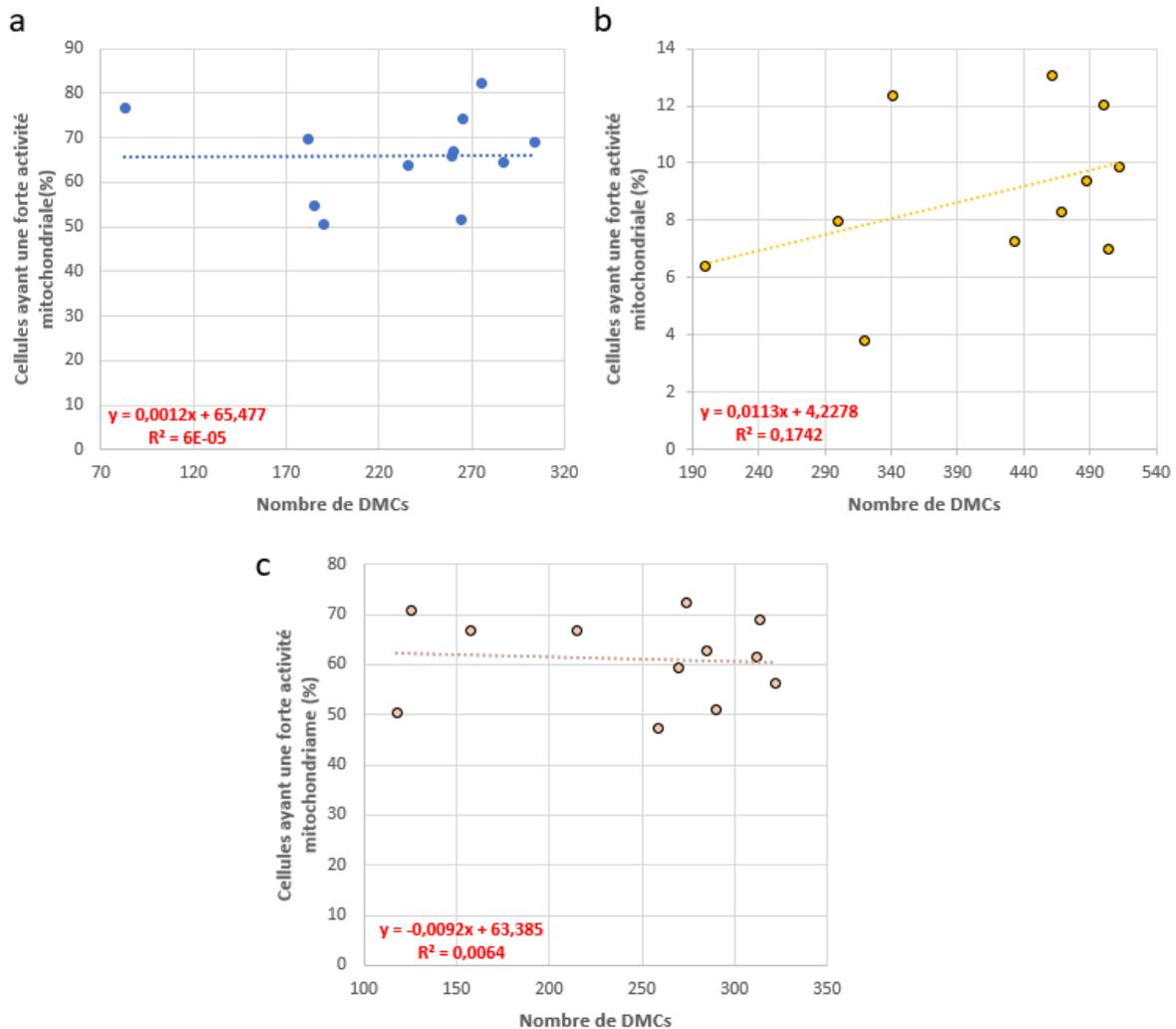
Dans notre stratégie expérimentale, nous avons voulu disposer d'échantillon montrant des altérations cellulaires variables, afin d'étudier s'il existe un lien entre les altérations de la méthylation de l'ADN après la cryoconservation et le niveau d'altérations cellulaires correspondantes des mêmes échantillons. Au vu du faible niveau de dommages à la méthylation de l'ADN quel que soit le cryoprotecteur utilisé, ce lien est difficile à analyser. Nous l'avons recherché en utilisant le nombre de DMCs détecté chez chaque mâle dans les différentes conditions de cryoconservation mises en œuvre. Nous avons étudié s'il existe un lien entre les différents niveaux d'altérations de chacun des paramètres cellulaires et le nombre de DMCs obtenu avec tous les cryoprotecteurs. Nous avons observé que cette étude est biaisée en raison des nombres différents de cytosines pairées analysées et de DMCs entre les différentes comparaisons (résultats non montrés). De plus, une normalisation du nombre de DMCs par le nombre de cytosines pairées induit également un biais dans les résultats (résultats non montrés), car elle sous-représente les DMCs de la condition MeOH. Cela force artificiellement la corrélation dans une condition expérimentale où la qualité cellulaire est par ailleurs assez faible. Pour éviter ces biais, nous avons évalué au niveau d'un même cryoprotecteur s'il existe une corrélation entre les différents niveaux de dommages des mâles pour chacun des paramètres cellulaires étudiés et le nombre de DMCs de ces mâles obtenus. Cela revient à utiliser la variabilité de la réponse des mâles au sein d'un même cryoprotecteur pour essayer de mettre en évidence des corrélations.

Concernant la qualité membranaire, nous n'avons pas observé de lien entre le nombre de cellules ayant une membrane intacte et le nombre de DMCs (**Figure 64**).



**Figure 64 : Etude de la corrélation entre les cellules à membrane intacte (%) et le nombre de DMCs selon le cryoprotecteur.** a. Cellules ayant une membrane plasmique intacte (%) et nombre de DMCs obtenu en DMSO. Corrélation de Spearman (p-value = 0,93) : absence de corrélation. b. Cellules ayant une membrane plasmique intacte (%) et nombre de DMCs obtenu en MeOH. Corrélation de Spearman (p-value = 0,82) : absence de corrélation. c. Cellules ayant une membrane plasmique intacte (%) et nombre de DMCs obtenu en glycérol. Corrélation de Spearman (p-value = 0,93) : absence de corrélation.

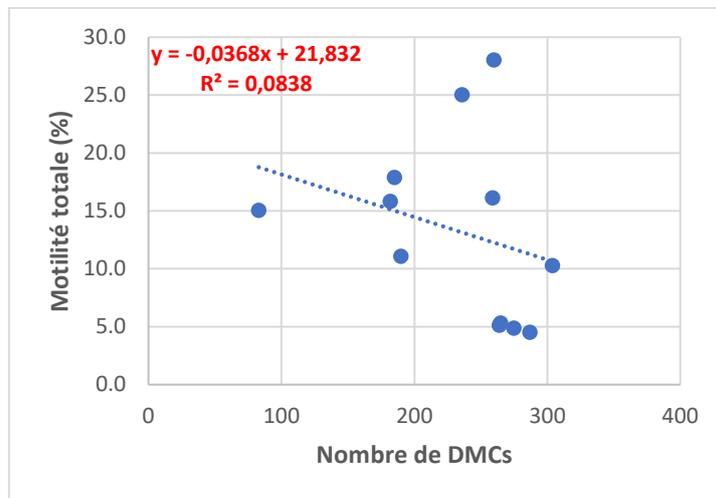
Concernant la qualité des mitochondries, comme pour la qualité membranaire, aucune corrélation n'a été observée entre les cellules ayant une forte activité mitochondriale (cellules de la population de haute qualité) et le nombre de DMCs (**Figure 65**). Cela indique que, indépendamment du nombre de cellules ayant une forte activité mitochondriale, et quel que soit le cryoprotecteur utilisé, la méthylation de l'ADN est altérée au niveau d'un nombre limité de cytosines en contexte CpG.



**Figure 65 : Etude de la corrélation entre les cellules ayant une forte activité mitochondriale et le nombre de DMCs selon le cryoprotecteur.** a. Cellules ayant une forte activité mitochondriale et nombre de DMCs obtenu en DMSO. Corrélation de Spearman ( $p$ -value = 0,72) : absence de corrélation. b. Cellules ayant une forte activité mitochondriale et nombre de DMCs obtenu en MeOH. Corrélation de Spearman ( $p$ -value = 0,15) : absence de corrélation. c. Cellules ayant une forte activité mitochondriale et nombre de DMCs obtenu en glycérol. Corrélation de Spearman ( $p$ -value = 0,94) : absence de corrélation.

En revanche, contrairement à la qualité membranaire et à la qualité des mitochondries, la motilité du sperme décongelé est significativement corrélée au nombre de DMCs obtenu en DMSO (**Figure 66**). Cette corrélation peut être due au fait que les valeurs de motilité obtenues avec le DMSO sont variables augmentant les chances d'observer une corrélation entre la motilité et le nombre de DMCs. Or nous avons observé que les motilités totales d'environ 6 échantillons sont dispersés par rapport à la courbe de tendance. Nous supposons que cette corrélation ne semble pas avoir vraiment un sens biologique. Nous n'avons pas analysé la corrélation entre les motilités totales et le nombre de DMCs en MeOH vu que les motilités en méthanol sont très faibles, ce qui entrainerait un poids important à des petites différences qui

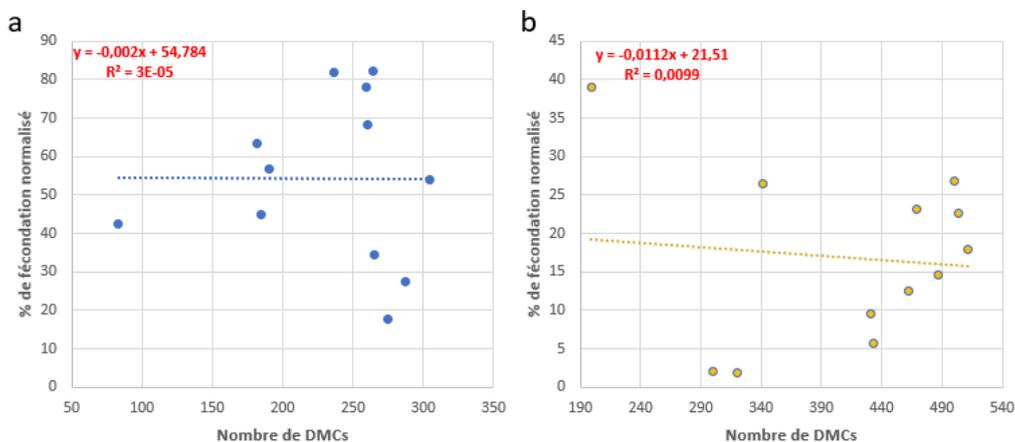
ne sont pas nécessairement significatives biologiquement. Nous n'avons pas non plus réalisé cette analyse en glycérol vu que les motilités totales sont nulles avec ce cryoprotecteur.



**Figure 66: Etude de la corrélation entre la motilité et le nombre de DMCs en DMSO.**

Corrélation de Spearman (p-value = 0,04) : corrélation significative.

Quant à la capacité de fécondation qui révèle l'intégralité de la fonctionnalité des spermatozoïdes, aucune corrélation significative n'a été observée entre les pourcentages de fécondation et le nombre de DMCs en DMSO et en MeOH (**Figure 67**). Cela suggère que quel que soit la capacité de fécondation d'un mâle donné et quel que soit le cryoprotecteur utilisé, la méthylation de l'ADN est altérée au niveau d'un nombre limité de cytosines en contexte CpG. Nous n'avons pas étudié le lien entre les pourcentages de fécondation et le nombre de DMCs en glycérol puisque la capacité de fécondation est nulle avec ce cryoprotecteur.



**Figure 67 : Etude de la corrélation entre la capacité de fécondation et le nombre de DMCs.**

a. Pourcentages de fécondation normalisés et nombre de DMCs obtenu en DMSO. Corrélation de Spearman (p-value = 0,37) : absence de corrélation. b. Pourcentages de fécondation normalisés et nombre de DMCs obtenu en MeOH. Corrélation de Spearman (p-value = 0,48) : absence de corrélation.

Pour conclure, nous montrons que le niveau des altérations cellulaires induites par la cryoconservation n'a pas de lien avec les altérations de la méthylation de l'ADN, sauf pour la motilité avec le DMSO. La cryoconservation altère la qualité cellulaire et la méthylation de l'ADN selon des mécanismes différents qui ne semblent pas liés.

## Conclusion concernant la réponse de la méthylation de l'ADN à la cryoconservation

Notre étude a montré que la cryoconservation du sperme n'affecte pas la méthylation globale de l'ADN. Par contre, à l'échelle de la cytosine individuelle, la cryoconservation n'a pas un effet unique puisqu'un même mâle a des DMCs hypo et hyperméthylées et un cryoprotecteur donné a également des DMCs hypo et hyperméthylées selon les mâles. D'une manière intéressante, la cryoconservation peut altérer des régions qui sont potentiellement plus fragiles que d'autres. Certaines de ces régions étant impliquées dans la régulation de l'expression des gènes, ce processus peut à son tour être endommagé. Notre étude a également montré l'absence de lien entre les altérations cellulaires d'un mâle donné et ses modifications de la méthylation de l'ADN sauf pour la motilité en DMSO.

# Partie IV : Discussion Générale

La cryoconservation du sperme de truite arc-en-ciel avec 3 cryoprotecteurs différents a entraîné différents profils d'altérations de la qualité cellulaire du sperme décongelé dans notre étude. Ainsi, ces résultats ont validé nos choix de cryoprotecteurs qui ont induit différentes réponses cellulaires à la cryoconservation. De plus, des réponses variables vis-à-vis de la cryoconservation entre les différents mâles ont révélé une variabilité biologique intrinsèque. Une telle variabilité a fourni un lot d'échantillons adéquat pour étudier l'effet de la cryoconservation sur notre paramètre moléculaire d'intérêt qui est la méthylation de l'ADN. Nous avons montré que la méthode du RRBS utilisée dans cette étude a généré un nombre limité de cytosines en contexte CpG. Pour autant, ce nombre réduit de données nous a permis de pouvoir incorporer un nombre élevé de réplicats biologiques pour faire une analyse de l'impact de la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN. Nos résultats ont démontré que la cryoconservation n'a pas impacté la méthylation globale de l'ADN, mais plusieurs DMCs ont été détectées entre le sperme frais et cryoconservé. Des régions susceptibles d'être plus sensibles à la cryoconservation ont été proposées, mais peu sont communes entre les cryoprotecteurs.

Un biais commun à toute étude d'une population de cellules est que la qualité cellulaire et les caractéristiques de méthylation du sperme décongelé obtenues dans notre étude correspondent à celles de l'ensemble du sperme décongelé d'un mâle donné. Tous les spermatozoïdes sont analysés sans tenir compte de la sous-population (en bon ou mauvais état) à laquelle ils appartiennent.

### **Stabilité de la méthylation globale de l'ADN du sperme cryoconservé chez la truite arc-en-ciel**

Notre étude a montré que l'ampleur des dommages cellulaires n'avait pas de lien avec celle des variations de méthylation globale. En effet, l'utilisation d'un cryoprotecteur optimal (DMSO), suboptimal (MeOH) ou inadéquat (glycérol) n'a pas affecté la méthylation globale de l'ADN chez la truite arc-en-ciel. Cette stabilité s'oppose à ce qui a été observé chez d'autres espèces de poissons. Chez le poisson rouge (Depincé et al. 2020) et l'anguille (Herranz-Jusado et al. 2019), une cryoconservation avec le cryoprotecteur optimal qui est le MeOH n'a pas altéré la méthylation globale de l'ADN évaluée par le LUMA, alors que le DMSO, suboptimal dans ces espèces, a induit une hypométhylation. Plus généralement, la stabilité de la méthylation globale de l'ADN vis-à-vis de la cryoconservation que nous avons observée chez la truite arc-en-ciel s'oppose à la plupart des autres études disponibles pour les spermatozoïdes. En effet, d'autres espèces de poisson, telles que le tambaqui, ont montré une hypométhylation quel que soit le cryoprotecteur (de Mello et al. 2017), tout comme une étude menée chez le coq (Salehi et al. 2020). Par contre, chez certains mammifères (bélier (Güngör et al. 2021), cheval (Aurich et al. 2016)) une hyperméthylation a été observée suite à la cryoconservation du sperme. Il est difficile de parfaitement comparer ces différentes espèces

dans la mesure où des méthodes de mesure différentes ont été utilisées, mais la stabilité globale que nous avons observée chez la truite arc-en-ciel est une propriété remarquable.

### **Un effet ténu de la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN à l'échelle du nucléotide**

Comme nous avons eu recours au RRBS, cela nous a permis d'aller plus loin que la méthylation globale, et nous avons pu aborder la méthylation de l'ADN à l'échelle des nucléotides. Nos données ont démontré la présence d'un nombre limité de DMCs après la cryoconservation du sperme. De plus, nous n'avons détecté aucune DMR sauf 2 dans le glycérol. Cela souligne l'effet ténu de la cryoconservation sur la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes chez la truite arc-en-ciel. Cette incapacité à détecter un nombre plus important de DMCs et de DMRs n'est pas due à la technique de représentation réduite RRBS utilisée dans notre étude. En effet, dans une étude abordant l'adaptation physiologique de la truite arc-en-ciel à son environnement, 108 DMRs ont été observées dans les spermatozoïdes entre les truites arc-en-ciel mâles domestiqués et d'origine naturelle en utilisant la même technique du RRBS (Gavery et al. 2018). Nous supposons que l'impact de la domestication sur la méthylation de l'ADN était suffisamment important pour induire de nombreuses DMCs conduisant à de nombreuses DMRs. Dans notre étude, comme l'impact de la cryoconservation des spermatozoïdes est ténu, il y a un nombre restreint de DMCs et, par conséquent, les DMCs ne sont pas assez denses pour former des DMRs.

Ces DMCs obtenues dans notre étude semblent peu significatives, du fait même de la variabilité de leurs caractéristiques. En effet, nous avons vu que le statut de chaque DMC diffère selon le mâle, une DMC pouvant être hypo- et hyperméthylée après la cryoconservation. Pour autant, malgré le nombre limité de DMCs obtenues dans notre étude et leur variabilité de méthylation, elles sont reproductibles entre les mâles puisqu'elles étaient observées dans au moins 6 mâles.

Notre analyse a donc révélé que la cryoconservation a induit à la fois une hypométhylation et hyperméthylation selon les DMCs. Ainsi aucune tendance claire peut être proposée quant à l'effet de la cryoconservation. Comme la chromatine des spermatozoïdes est dans un état quiescent au moment où ils sont soumis à la cryoconservation, ces modifications ont peu de chances d'être médiées par les enzymes responsables de la méthylation (DNMTs) et déméthylation (voie des TET). En outre, le processus de congélation-décongélation des spermatozoïdes est trop rapide pour qu'une enzyme soit capable de catalyser la réaction de méthylation et déméthylation. Les hypométhylations et les hyperméthylations observées dans notre étude sont donc plus susceptibles de résulter d'une réaction chimique catalysée par les fortes contraintes physico-chimiques présentes lors du processus de congélation/décongélation. Jusqu'à présent, on ne sait toujours pas cependant comment les

cryoprotecteurs peuvent modifier la méthylation de l'ADN. Le DMSO est une molécule réactive chimiquement et portant 2 groupes méthyl. Il a été montré dans une étude in vitro que l'ADN peut acquérir des groupes méthyls quand il est incubé avec du DMSO et des radicaux hydroxyl (Kawai et al. 2010). Dans le cas de la cryoconservation, on pourrait imaginer que la libération de radicaux libres par des mitochondries de spermatozoïdes endommagés déclencherait la formation de ces radicaux hydroxyles et induirait cet événement de méthylation associé au DMSO. Concernant la déméthylation, il a été montré que la 5-mC peut être oxydée en 5-hmC en présence de radicaux libres (Castro, Gbmez, and Castro, n.d.; Madugundu, Cadet, and Wagner 2014). Il a aussi été montré in vitro (avec des mononucléotides) que les bases hydroxyméthylées pouvaient être déméthylées sous l'unique effet d'un pH élevé (Alegria 1967). Il a en outre été montré que dans certaines solutions tampon, le pH peut augmenter au moment de la congélation (Kolhe, Amend, and K. Singh 2010). Sur la base de ces éléments, on ne peut exclure qu'un changement semblable se produise localement dans les spermatozoïdes lors des contraintes de la congélation/décongélation. En ce sens, la déméthylation pourrait avoir lieu en oxydant chimiquement 5-mC et 5-hmC en une cytosine, sachant que le passage de la 5-hmC en cytosine serait ensuite induite par des changements du pH local durant la cryoconservation. Ce qui est déroutant dans tous ces changements de méthylation induits chimiquement est que la méthylation et la déméthylation ont eu lieu dans le même échantillon de sperme, et il est difficile de comprendre comment cela est possible. Nous ne savons pas non plus comment de tels microréacteurs sont rendus possibles dans le noyau. En l'état, nous n'avons donc pas d'assurance sur le sens réel de ces DMCs, et c'est pourquoi nous avons approfondi leur étude pour voir si elles pouvaient être des signatures de régions plus labiles dans la chromatine des spermatozoïdes, comme nous allons le discuter plus loin.

Enfin, il convient de mentionner qu'une modification possiblement induite par la cryoconservation, l'oxydation de la 5-mC en 5-hmC, échappe à la détection par le RRBS puisque la technique du RRBS n'est pas capable de distinguer entre 5-mC et 5-hmC (Huang et al. 2010; Nestor et al. 2010). Cette modification restera donc transparente dans notre système, puisque les deux bases seront détectées comme des cytosines méthylées.

### **Des régions de l'ADN sensibles à la cryoconservation, mais pas de DMRs**

Malgré l'absence de DMRs avec les cryoprotecteurs d'intérêt dans notre étude, nous avons sélectionné des régions potentiellement sensibles dans lesquelles plusieurs cytosines ont montré des modifications de la méthylation envers un ou deux cryoprotecteurs. Certaines de ces régions sont liées à des promoteurs de gènes, qui sont eux essentiels pour une expression correcte des gènes. Nous nous sommes focalisés sur les gènes affectés par le DMSO et le MeOH puisque le glycérol ne peut pas produire de descendance.

Parmi les gènes dont les promoteurs sont affectés après la cryoconservation avec du DMSO, nous avons identifié *ebf2* (early B cell factor 2) et *p4ha1a* (prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I orthologue a) qui sont impliqués dans les processus d'embryogenèse. Chez le poisson zèbre, *ebf2* est un facteur de transcription impliqué dans la neurogenèse primaire chez l'embryon (L. Bally-Cuif, Dubois, and Vincent 1998) et qui permet de stabiliser les progéniteurs neuronaux. Le gène *p4ha1a* est un gène orthologue de *p4ha1*. Ce gène est impliqué dans la régulation de la croissance précoce dans les tissus osseux chez la carpe à grosse tête (*Hypophthalmichthys nobilis*) (Luo et al. 2021). Concernant les gènes dont les introns ou les promoteurs ont été affectés après la cryoconservation avec MeOH, quelques-uns possèdent des fonctions liées au développement comme *pcdhb*, *slc26a2* et *u2*. Bien qu'aucune fonction de *pcdhb* et *slc26a2* n'ait encore été décrite chez les poissons, il a été démontré chez la souris que *pcdhb* est impliqué dans la régulation du développement neuronal en étant un acteur principal dans l'assemblage axonal (Hasegawa et al. 2017) et dans la convergence en glomérules dans le bulbe olfactive (Mountoufaris et al. 2017). L'inhibition de l'expression de *slc26a2* (transporteur de sulfate de dysplasie diastrophique) chez la souris modifie la croissance osseuse (Forlino et al. 2005) et la méthylation aberrante de *slc26a2* chez l'homme inhibe cette expression génique et réduit son expression protéique (Inoue et al. 2015). Concernant le gène *u2*, il a été démontré chez le poisson zèbre que sa protéine appartient au complexe « pre-mRNA Retention and Splicing (RES) » qui est fondamental lors de l'embryogenèse (Fernandez et al. 2018). Les autres gènes (*cox2*, *cox3*, *nd3*, *nd4*, *nd4l*, *atp6* et *atp8*) sont impliqués dans la réaction de phosphorylation oxydative (OXPHOS) en faisant partie des complexes de la chaîne respiratoire de la mitochondrie chez les poissons. En effet, *nd3*, *nd4* et *nd4l* sont présents dans le complexe I, *cox2* et *cox3* codent pour les sous-unités du complexe IV, et *atp6* et *atp8* codent pour les sous-unités du complexe V chez les poissons (Zhao et al. 2014; Consuegra et al. 2015; Uddin et al. 2020). Etant donné le peu de données obtenues sur chaque région potentiellement affectée, ces gènes représentent des pistes préliminaires de la présence d'un léger impact de la cryoconservation sur la méthylation de l'ADN, et fournissent une base pour d'autres études sur des gènes candidats éventuellement importants, dont il serait rigoureux de confirmer la modification de méthylation par pyroséquençage.

Il est également possible de valider les régions potentiellement sensibles obtenues dans notre étude en réalisant du WGBS (Whole Genome Bisulfite Sequencing) sur du sperme frais et cryoconservé de truite arc-en-ciel, en réduisant le nombre de tests (un seul cryoprotecteur, moins de réplicats biologiques). L'application de cette méthode permettrait de récupérer 92 % des cytosines génomiques en contexte CpG, d'après une étude réalisée par notre équipe (Brionne et al. 2023). Cela entraînerait une augmentation des chances d'obtenir des DMRs ayant le nombre nécessaire de cytosines en contexte CpG dont la plupart sont des DMCs. Si les régions potentiellement sensibles appartiennent aux DMRs, ceci validerait que ces régions sont sensibles à la cryoconservation.

Récemment, une étude a rapporté que des gènes seraient différenciellement méthylés après la cryoconservation du sperme du sébaste noir (*Sebastes schlegelii*) (Niu et al. 2022). Mais les résultats présentés par cette étude ne sont pas exploitables car nous soupçonnons un biais

dans l'utilisation de la méthode MéthylRAD-Seq, notamment quant au bon usage de l'enzyme de coupure).

### **Conséquences chez la descendance**

A ce point, il est difficile d'estimer si les altérations observées dans les spermatozoïdes peuvent avoir des conséquences pour la progéniture. Parmi les spermatozoïdes décongelés, il peut y en avoir certains dont la méthylation de l'ADN n'a pas été affectée par la cryoconservation. Si un de ces spermatozoïdes féconde un ovocyte, aucune transmission d'altérations de la méthylation de l'ADN n'aura lieu. Par contre, si un spermatozoïde avec un profil de méthylation de l'ADN altéré féconde un ovocyte, il existe un risque de transmission de ces altérations à la progéniture. Pour autant, l'étendue de cette transmission ne peut pas être prédite. En effet, il est connu que les cassures de l'ADN peuvent être réparées par la machinerie maternelle chez la truite arc-en-ciel (Pérez-Cereales et al. 2010) mais rien n'est connu autour de la réparation de la méthylation de l'ADN.

Si la progéniture hérite du profil de méthylation altéré du spermatozoïde et que les gènes affectés sont essentiels pour le développement embryonnaire, cela devrait entraîner une augmentation des mortalités embryonnaires. Une autre possibilité peut être qu'entre la fécondation et le stade d'activation du génome embryonnaire (stade de la transition mid blastula, MBT), ces altérations peuvent possiblement être réparées éliminant le risque d'altération de la progéniture.

Si les altérations de la méthylation de l'ADN n'ont pas été réparées, nous supposons qu'après l'activation du génome zygotique (ZGA) ayant lieu à la MBT, le méthylome du sperme qui a été maintenu jusqu'à la MBT (L. Jiang et al. 2013) peut être réparé. Cela pourrait expliquer le fait que la fécondation avec des spermatozoïdes cryoconservés chez la truite arc-en-ciel est inoffensive en ce qui concerne le développement embryonnaire, une fois la fécondation déclenchée (C. Labbe et al. 2001; Young et al. 2009). En cas de non réparation de ces altérations de la méthylation de l'ADN, l'absence d'altération embryonnaire précédemment mentionnée indique que les dommages vont s'exprimer plus tard, après la fin du développement embryonnaire. La conséquence peut être que des effets non létaux à long terme auront été transmis. Il a été décrit que la cryoconservation du sperme entraîne des malformations des larves du poisson chat africain (Horváth and Urbányi 2000) et des altérations de la croissance des larves de la truite fario (Nusbaumer, Marques da Cunha, and Wedekind 2019). Par conséquent, ceci suggère que l'impact de ces altérations n'a pas commencé à la MBT mais après le stade de l'éclosion. Il a été également montré que la cryoconservation du sperme a affecté la performance de la descendance des truite arc-en-ciel en modifiant leur résistance au stress (Hayes et al. 2005). Ainsi, cela indique qu'il y a pu avoir un impact par une modification épigénétique du sperme avec un effet qui s'exprime tardivement.

## Perspectives

Comme l'effet de la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN que nous avons observé est ténu, une analyse des modifications possibles de la méthylation de l'ADN chez la descendance, ainsi que l'étude des conséquences sur leurs performances physiques, semblent être une tâche difficile. Cela nécessiterait un grand nombre d'échantillons à chaque analyse, notamment plusieurs réplicats de sperme cryoconservé et plusieurs réplicats d'embryons issus des mêmes géniteurs. Une étude des gènes candidats identifiés à partir des régions sensibles détectées pourrait être une piste plus pertinente et faisable. Ainsi, nous pourrions envisager d'étudier la méthylation de l'ADN de ces gènes, potentiellement altérés par la cryoconservation du sperme, à différents stades du développement des embryons issus d'une fécondation avec du sperme cryoconservé, pour vérifier s'ils sont bien altérés ou si au contraire ils vont être réparés. Cela nous permettrait également de déterminer à quel stade du développement l'altération de la méthylation de l'ADN ou sa réparation aura lieu. Cependant, cette étude de ces gènes candidats ne peut être entreprise qu'une fois que les gènes affectés auront été validés par pyroséquençage au niveau des spermatozoïdes eux même.

Malgré la forte compaction de la chromatine des spermatozoïdes de poissons, il existe toujours des régions qui sont ouvertes et accessibles. Il a été montré que plusieurs régions hypométhylées ainsi que des marques d'histones répressives correspondant aux promoteurs des gènes exprimés durant le développement embryonnaire précoce persiste chez le spermatozoïde du poisson zèbre (S.-F. Wu, Zhang, and Cairns 2011). Cela indique que l'accessibilité de ces régions est essentielle afin de permettre l'expression des gènes impliqués dans le développement embryonnaire. Nous nous sommes ainsi demandés s'il existe, dans la chromatine des spermatozoïdes cryoconservés, des régions plus ouvertes qui ne sont pas présentes dans la condition contrôle. Dans ce cas-là, nous supposons que c'est la cryoconservation qui a induit l'ouverture de ces régions. Cela indique que la cryoconservation risque ainsi d'entraîner une altération de l'expression des gènes et probablement une altération du développement embryonnaire. Nous supposons que cette altération peut être dû au fait que certains gènes devraient être réprimés, contrairement à d'autres, lors du développement embryonnaire alors que les régions ouvertes suite à la cryoconservation permettent probablement l'expression de ces gènes. Pour étudier les variations de compaction, l'ATAC Seq (assay for transposase-accessible chromatin with sequencing) pourrait être la méthode à privilégier vu que cette technique vise à déterminer l'accessibilité à la chromatine tout au long du génome en séquençant les régions ouvertes de la chromatine. Cette méthode pourrait être appliquée sur les spermatozoïdes de la truite arc-en-ciel.

La truite arc-en-ciel, appartenant au groupe des salmonidés, possède des protamines comme SNBP dans ces spermatozoïdes. Or d'autres espèces de poissons ont des SNBPs différentes des protamines. A titre d'exemple, le poisson zèbre, appartenant aux cyprinidés, possède des

histones particulières et non pas des protamines (Ausió, González-Romero, and Woodcock 2014). Nous nous sommes ainsi demandés quel serait l'impact de la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes du poisson zèbre ayant une organisation nucléaire différente de celle des truites arc-en-ciel. Afin de mener cette étude, nous pourrions réaliser du WGBS (Whole Genome Bisulfite Sequencing) sur du sperme frais et cryoconservé. Contrairement au RRBS, cette méthode assure une meilleure couverture des cytosines en contexte CpG chez la truite arc-en-ciel (92 % d'après Brionne et al. 2023). Cette technique nous permettra de s'affranchir des limites du RRBS.

Une question a été soulevée par les résultats de cette étude, même si ce n'est pas en relation directe avec la méthylation de l'ADN : il s'agit du phénomène de saturation de la fécondance bien que le sperme décongelé soit en excès. Nous nous sommes demandés si les spermatozoïdes morts ou fortement altérés bloquent les spermatozoïdes de bonne qualité de féconder les ovocytes. Pour la suite de l'étude, il pourrait être envisagé de faire un tri des spermatozoïdes pour ne garder que ceux qui sont en meilleur état. Le but de ce tri serait d'étudier si en présence de seulement les spermatozoïdes de bonne qualité, la capacité de fécondance d'un mâle donné sera plus importante. Les conditions de tri restent cependant encore à définir, chez une espèce à durée de motilité tellement courte que le swim up utilisé chez certains mammifères n'est pas envisageable.

# Conclusion générale

À travers notre étude sur la qualité du sperme décongelé, nous avons re-exploré les méthodes d'études de la qualité du sperme. Nous avons ainsi rationalisé et optimisé les procédures existantes. Nous avons également montré les difficultés d'établir des corrélations entre les différents paramètres cellulaires dans une étude avec de nombreux réplicats biologiques.

En réalisant une analyse critique sur des données de séquençage obtenues par le RRBS, nous avons pu démontrer que le RRBS a pu fournir une représentation réduite du génome de la truite arc-en-ciel de plusieurs réplicats biologiques. Mais la représentation des sites CpGs est limitée surtout ceux qui sont communs entre les mâles. Nous avons ainsi mis en relief l'importance de l'analyse pairée. Nous avons également souligné l'importance du choix de l'étude de la méthylation des cytosines en contexte CpG et de travailler sans lissage des données de méthylation en cas de l'évaluation de l'impact des biotechnologies de reproduction sur la méthylation de l'ADN.

L'originalité de notre étude est que nous avons montré à la fois l'impact de la cryoconservation sur la méthylation de l'ADN à l'échelle globale, et à l'échelle de la base pour la première fois, même si nous avons révélé que le RRBS ne fournit qu'une information parcellaire comme évoqué ci-dessus. Cela nous a permis de scanner une grande diversité de conditions expérimentales, à compléter par des approches différentes au niveau de la chromatine.

Nous avons également montré que la cryoconservation a un effet ténu sur la méthylation de l'ADN alors que les altérations cellulaires sont importantes. Nos données ont également révélé l'absence de lien entre les altérations de la méthylation de l'ADN et les altérations cellulaires induites par la cryoconservation sauf pour la cryoconservation avec le DMSO. En conséquence, aucun des paramètres cellulaires utilisés dans cette étude, même la motilité, ne peut être utilisé comme marqueur fiable du risque d'altération de la méthylation de l'ADN.

Nous avons aussi révélé que les modifications de la méthylation de l'ADN sont tellement variables que l'origine moléculaire de ces modifications est difficile à élucider. En plus ce caractère aléatoire des modifications de méthylation, nous laisse soupçonner un impact qui sera très difficile à suivre dans la descendance.

Notre étude a enfin montré la présence de régions potentiellement sensibles à la cryoconservation dans les spermatozoïdes de truite arc-en-ciel. Nous avons également constaté que certaines de ces régions sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes jouant un rôle dans le développement embryonnaire. Comme nous venons de le préciser plus haut, il est nécessaire de valider ces régions.

Les nouvelles données issues de notre travail montrent que l'effet ténu de la cryoconservation sur la méthylation de l'ADN ne permet pas de conclure quant au risque pour la descendance. Les régions potentiellement sensibles que nous avons identifiées ouvrent la possibilité de nouvelles investigations pour mieux caractériser l'impact de la cryoconservation sur la méthylation de l'ADN du spermatozoïde et des descendants issus de sperme cryoconservé.

# Références bibliographiques

- Akhoondi, Maryam, Harriette Oldenhof, Harald Sieme, and Willem F. Wolkers. 2012. "Freezing-Induced Cellular and Membrane Dehydration in the Presence of Cryoprotective Agents." *Molecular Membrane Biology* 29 (6): 197–206. <https://doi.org/10.3109/09687688.2012.699106>.
- Alegria, A. H. 1967. "Hydroxymethylation of Pyrimidine Mononucleotides with Formaldehyde." *Biochimica Et Biophysica Acta* 149 (2): 317–24. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(67\)90159-1](https://doi.org/10.1016/0005-2787(67)90159-1).
- Alonso, Marta Lombó, Audrey Laurent, María Paz Herráez, and Catherine Labbé. 2023. "Epigenetics in Sexual Maturation and Gametes of Fish." In *Epigenetics in Aquaculture*, 175–91. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119821946.ch7>.
- Anchordoguy, T. J., A. S. Rudolph, J. F. Carpenter, and J. H. Crowe. 1987. "Modes of Interaction of Cryoprotectants with Membrane Phospholipids during Freezing." *Cryobiology* 24 (4): 324–31. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(87\)90036-8](https://doi.org/10.1016/0011-2240(87)90036-8).
- Andersen, Ingrid S., Olga Østrup, Leif C. Lindeman, Håvard Aanes, Andrew H. Reiner, Sinnakaruppan Mathavan, Peter Aleström, and Philippe Collas. 2012. "Epigenetic Complexity during the Zebrafish Mid-Blastula Transition." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417 (4): 1139–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.077>.
- Andrews, Simon. n.d. "A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data."
- Aurich, Christine, Bettina Schreiner, Natascha Ille, Marco Alvarenga, and Dragos Scarlet. 2016. "Cytosine Methylation of Sperm DNA in Horse Semen after Cryopreservation." *Theriogenology* 86 (5): 1347–52. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.077>.
- Ausió, Juan, Rodrigo González-Romero, and Christopher L. Woodcock. 2014. "Comparative Structure of Vertebrate Sperm Chromatin." *Journal of Structural Biology* 188 (2): 142–55. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.09.004>.
- Bakhach, Joseph. 2009. "The Cryopreservation of Composite Tissues: Principles and Recent Advancement on Cryopreservation of Different Type of Tissues." *Organogenesis* 5 (3): 119–26. <https://doi.org/10.4161/org.5.3.9583>.
- Bally-Cuif, L., L. Dubois, and A. Vincent. 1998. "Molecular Cloning of Zcoe2, the Zebrafish Homolog of Xenopus Xcoe2 and Mouse EBF-2, and Its Expression during Primary Neurogenesis." *Mechanisms of Development* 77 (1): 85–90. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(98\)00144-0](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(98)00144-0).
- Bardou, Philippe, Jérôme Mariette, Frédéric Escudié, Christophe Djemiel, and Christophe Klopp. 2014. "Jvenn: An Interactive Venn Diagram Viewer." *BMC Bioinformatics* 15 (1): 293. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-293>.
- Billard, Roland. 1983. "Ultrastructure of Trout Spermatozoa: Changes after Dilution and Deep-Freezing." *Cell and Tissue Research* 228 (2): 205–18. <https://doi.org/10.1007/BF00204873>.
- Bird, Adrian. 2002. "DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory." *Genes & Development* 16 (1): 6–21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>.
- Brionne, Aurélien. n.d. "GenomeFeatures: A Convenient Tool for Multiple Genomic Features Annotations."
- Brionne, Aurélien, Anne-Sophie Goupil, Stéphanie Kica, Jean-Jacques Lareyre, Catherine Labbé, and Audrey Laurent. 2023. "Spermatozoa Methylome and Its Sensitivity to Water Temperature in a Teleost Fish." *The Science of the Total Environment*, May, 164077. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164077>.

- Cabrita, E., S. Martínez-Páramo, P. J. Gavaia, M. F. Riesco, D. G. Valcarce, C. Sarasquete, M. P. Herráez, and V. Robles. 2014. "Factors Enhancing Fish Sperm Quality and Emerging Tools for Sperm Analysis." *Aquaculture* 432 (August): 389–401. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.034>.
- Cabrita, E., C. Sarasquete, S. Martínez-Páramo, V. Robles, J. Beirão, S. Pérez-Cerezales, and M.p. Herráez. 2010. "Cryopreservation of Fish Sperm: Applications and Perspectives." *Journal of Applied Ichthyology* 26 (5): 623–35. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x>.
- Candiloro, Ida L. M., Thomas Mikeska, and Alexander Dobrovic. 2011. "Closed-Tube PCR Methods for Locus-Specific DNA Methylation Analysis." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 791: 55–71. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-316-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-316-5_5).
- Cardona, Emilie, Jerome Bugeon, Emilien Segret, and Julien Bobe. 2021. "VisEgg: A Robust Phenotyping Tool to Assess Rainbow Trout Egg Features and Viability." *Fish Physiology and Biochemistry* 47 (3): 671–79. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00844-2>.
- Carvan, Michael J., Thomas A. Kalluvila, Rebekah H. Klingler, Jeremy K. Larson, Matthew Pickens, Francisco X. Mora-Zamorano, Victoria P. Connaughton, Ingrid Sadler-Riggelman, Daniel Beck, and Michael K. Skinner. 2017. "Mercury-Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Abnormal Neurobehavior Is Correlated with Sperm Epimutations in Zebrafish." *PloS One* 12 (5): e0176155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176155>.
- Castro, D, Maria I Diaz Gbmez, and JosC A Castro. n.d. "SMethylcytosine Attack by Hydroxyl Free Radicals and during Carbon Tetrachloride Promoted Liver Microsomal Lipid Peroxidation: Structure of Reaction Products."
- Chatterjee, Aniruddha, Yuichi Ozaki, Peter A. Stockwell, Julia A. Horsfield, Ian M. Morison, and Shinichi Nakagawa. 2013. "Mapping the Zebrafish Brain Methylome Using Reduced Representation Bisulfite Sequencing." *Epigenetics* 8 (9): 979–89. <https://doi.org/10.4161/epi.25797>.
- Chauvaud, Laurent, Jacky Cosson, Marc Suquet, and Roland Billard. 1995. "Sperm Motility in Turbot, *Scophthalmus Marimus*: Initiation of Movement and Changes with Time of Swimming Characteristics." *Environmental Biology of Fishes* 43 (4): 341–49. <https://doi.org/10.1007/BF00001167>.
- Chavanne, Hervé, Kasper Janssen, Johann Hofherr, Franca Contini, Pierrick Haffray, Hans Komen, Einar Eg Nielsen, Luca Bargelloni, and Aquatrace Consortium. 2016. "A Comprehensive Survey on Selective Breeding Programs and Seed Market in the European Aquaculture Fish Industry." *Aquaculture International* 24 (5): 1287–1307. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-9985-0>.
- Chaytor, Jennifer L., Jacqueline M. Tokarew, Luke K. Wu, Mathieu Leclère, Roger Y. Tam, Chantelle J. Capicciotti, Louise Guolla, et al. 2012. "Inhibiting Ice Recrystallization and Optimization of Cell Viability after Cryopreservation." *Glycobiology* 22 (1): 123–33. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr115>.
- Cheer, GN, and WHC Clark. 1985. "Gamete Interaction in the White Sturgeon *Acipenser Transmontanus*: A Morphological and Physiological Review," 1985, *Envir. Biol. Teleost.*, 14: 11-22 edition.
- Ciereszko, A., G. J. Dietrich, J. Nynca, S. Dobosz, and T. Zalewski. 2014. "Cryopreservation of Rainbow Trout Semen Using a Glucose-Methanol Extender." *Aquaculture* 420–421 (January): 275–81. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.014>.

- Conaway, Joan W. 2012. "Introduction to Theme 'Chromatin, Epigenetics, and Transcription.'" *Annual Review of Biochemistry* 81 (July): 61–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-090711-093103>.
- Consuegra, Sofia, Elgan John, Eric Verspoor, and Carlos Garcia de Leaniz. 2015. "Patterns of Natural Selection Acting on the Mitochondrial Genome of a Locally Adapted Fish Species." *Genetics Selection Evolution* 47 (1): 58. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0138-0>.
- Cosson, Jacky. 2019. "Fish Sperm Physiology: Structure, Factors Regulating Motility, and Motility Evaluation." In *Biological Research in Aquatic Science*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85139>.
- Costa, Fabrício F. 2008. "Non-Coding RNAs, Epigenetics and Complexity." *Gene* 410 (1): 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.12.008>.
- Crowe, J. H., L. M. Crowe, J. F. Carpenter, A. S. Rudolph, C. A. Wistrom, B. J. Spargo, and T. J. Anchordoguy. 1988. "Interactions of Sugars with Membranes." *Biochimica Et Biophysica Acta* 947 (2): 367–84. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(88\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0304-4157(88)90015-9).
- De Baulny, B. Ogier, Y. Le Vern, D. Kerboeuf, and G. Maise. 1997. "Flow Cytometric Evaluation of Mitochondrial Activity and Membrane Integrity in Fresh and Cryopreserved Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Spermatozoa." *Cryobiology* 34 (2): 141–49. <https://doi.org/10.1006/cryo.1996.1992>.
- Depincé, Alexandra, Anne Gabory, Katarzyna Dziewulska, Pierre-Yves Le Bail, Hélène Jammes, and Catherine Labbé. 2020. "DNA Methylation Stability in Fish Spermatozoa upon External Constraint: Impact of Fish Hormonal Stimulation and Sperm Cryopreservation." *Molecular Reproduction and Development* 87 (1): 124–34. <https://doi.org/10.1002/mrd.23297>.
- Dreanno, C., J. Cosson, M. Suquet, C. Cibert, C. Fauvel, G. Dorange, and R. Billard. 1999. "Effects of Osmolality, Morphology Perturbations and Intracellular Nucleotide Content during the Movement of Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*) Spermatozoa." *Journal of Reproduction and Fertility* 116 (1): 113–25. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1160113>.
- Dreanno, C., F. Seguin, J. Cosson, M. Suquet, and R. Billard. 2000. "1H-NMR and (31)P-NMR Analysis of Energy Metabolism of Quiescent and Motile Turbot (*Psetta Maxima*) Spermatozoa." *The Journal of Experimental Zoology* 286 (5): 513–22. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x\(20000401\)286:5<513::aid-jez9>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(20000401)286:5<513::aid-jez9>3.0.co;2-5).
- Drobnis, E. Z., L. M. Crowe, T. Berger, T. J. Anchordoguy, J. W. Overstreet, and J. H. Crowe. 1993. "Cold Shock Damage Is Due to Lipid Phase Transitions in Cell Membranes: A Demonstration Using Sperm as a Model." *The Journal of Experimental Zoology* 265 (4): 432–37. <https://doi.org/10.1002/jez.1402650413>.
- Dziewulska, K., A. Rzemieniecki, R. Czerniawski, and J. Domagała. 2011. "Post-Thawed Motility and Fertility from Atlantic Salmon (*Salmo Salar L.*) Sperm Frozen with Four Cryodiluents in Straws or Pellets." *Theriogenology* 76 (2): 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.007>.
- Fauvel, C, and M Suquet. 2008. "Sperm Cryopreservation: An Actual Tool for Seabass (*Dicentrarchus Labrax*) Reproduction and Breeding Control in Research and Production.," 2008, *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Biology Series. E. Cabrita, V. Robles, M. P. Herra´ ez (Eds), CRCPress (Taylor and Francis group), edition.

- Feeney, R. E., T. S. Burcham, and Y. Yeh. 1986. "Antifreeze Glycoproteins from Polar Fish Blood." *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 15: 59–78. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.15.060186.000423>.
- Feng, Hao, Karen N. Conneely, and Hao Wu. 2014. "A Bayesian Hierarchical Model to Detect Differentially Methylated Loci from Single Nucleotide Resolution Sequencing Data." *Nucleic Acids Research* 42 (8): e69. <https://doi.org/10.1093/nar/gku154>.
- Fernandez, Juan Pablo, Miguel Angel Moreno-Mateos, Andre Gohr, Liyun Miao, Shun Hang Chan, Manuel Irimia, and Antonio J. Giraldez. 2018. "RES Complex Is Associated with Intron Definition and Required for Zebrafish Early Embryogenesis." *PLoS Genetics* 14 (7): e1007473. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007473>.
- Forlino, Antonella, Rocco Piazza, Cecilia Tiveron, Sara Della Torre, Laura Tatangelo, Luisa Bonafè, Benedetta Gualeni, et al. 2005. "A Diastrophic Dysplasia Sulfate Transporter (SLC26A2) Mutant Mouse: Morphological and Biochemical Characterization of the Resulting Chondrodysplasia Phenotype." *Human Molecular Genetics* 14 (6): 859–71. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi079>.
- Frehlick, Lindsay J., José María Eirín-López, Adelina Prado, Hua Wei Harvey Su, Harold E. Kasinsky, and Juan Ausió. 2006. "Sperm Nuclear Basic Proteins of Two Closely Related Species of Scorpaeniform Fish (*Sebastes Maliger*, *Sebastolobus* Sp.) with Different Sexual Reproduction and the Evolution of Fish Protamines." *Journal of Experimental Zoology. Part A, Comparative Experimental Biology* 305 (3): 277–87. <https://doi.org/10.1002/jez.a.239>.
- Frommer, M, L E McDonald, D S Millar, C M Collis, F Watt, G W Grigg, P L Molloy, and C L Paul. 1992a. "A Genomic Sequencing Protocol That Yields a Positive Display of 5-Methylcytosine Residues in Individual DNA Strands." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (5): 1827–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1827>.
- Fuller, Barry J. 2004. "Cryoprotectants: The Essential Antifreezes to Protect Life in the Frozen State." *Cryo Letters* 25 (6): 375–88.
- Gavery, Mackenzie R, Krista M Nichols, Giles W Goetz, Mollie A Middleton, and Penny Swanson. 2018. "Characterization of Genetic and Epigenetic Variation in Sperm and Red Blood Cells from Adult Hatchery and Natural-Origin Steelhead, *Oncorhynchus Mykiss*." *G3 Genes/Genomes/Genetics* 8 (11): 3723–36. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200458>.
- Geffen, A. J. 1999. "Variations in Sperm Motility of the Atlantic Herring *Clupea Harengus*." *Marine Biology* 134 (4): 637–43. <https://doi.org/10.1007/s002270050579>.
- Goll, Mary G., and Marnie E. Halpern. 2011. "Chapter 5 - DNA Methylation in Zebrafish." In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, edited by Xiaodong Cheng and Robert M. Blumenthal, 101:193–218. Modifications of Nuclear DNA and Its Regulatory Proteins. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387685-0.00005-6>.
- Goll, Mary Grace, and Timothy H. Bestor. 2005. "Eukaryotic Cytosine Methyltransferases." *Annual Review of Biochemistry* 74: 481–514. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721>.
- González-Rojo, S., M. Lombó, C. Fernández-Díez, and M. P. Herráez. 2019. "Male Exposure to Bisphenol a Impairs Spermatogenesis and Triggers Histone Hyperacetylation in Zebrafish Testes." *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 248 (May): 368–79. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.127>.
- González-Rojo, Silvia, Cristina Fernández-Díez, Susana M. Guerra, Vanesa Robles, and Maria Paz Herraéz. 2014. "Differential Gene Susceptibility to Sperm DNA Damage: Analysis

- of Developmental Key Genes in Trout." *PloS One* 9 (12): e114161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114161>.
- Grimanelli, Daniel, and Mathieu Ingouff. 2020. "DNA Methylation Readers in Plants." *Journal of Molecular Biology*, January, S0022-2836(20)30027-9. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.12.043>.
- Gu, Hongcang, Christoph Bock, Tarjei S. Mikkelsen, Natalie Jäger, Zachary D. Smith, Eleni Tomazou, Andreas Gnirke, Eric S. Lander, and Alexander Meissner. 2010. "Genome-Scale DNA Methylation Mapping of Clinical Samples at Single-Nucleotide Resolution." *Nature Methods* 7 (2): 133–36. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1414>.
- Güngör, Brahim Halil, Ahmet Tektemur, Gözde Arkali, Serap Dayan Cinkara, Tutku Can Acisu, Recep Hakki Koca, Ebru Etem Önalán, et al. 2021. "Effect of Freeze-Thawing Process on Lipid Peroxidation, MiRNAs, Ion Channels, Apoptosis and Global DNA Methylation in Ram Spermatozoa." *Reproduction, Fertility, and Development* 33 (14): 747–59. <https://doi.org/10.1071/RD21091>.
- Gutiérrez, L., G. Stepien, L. Gutiérrez, M. Pérez-Hernández, J. Pardo, J. Pardo, V. Grazú, and J. M. de la Fuente. 2017. "1.09 - Nanotechnology in Drug Discovery and Development." In *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, edited by Samuel Chackalamannil, David Rotella, and Simon E. Ward, 264–95. Oxford: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12292-9>.
- Hammoud, Saher Sue, David A. Nix, Haiying Zhang, Jahnvi Purwar, Douglas T. Carrell, and Bradley R. Cairns. 2009. "Distinctive Chromatin in Human Sperm Packages Genes for Embryo Development." *Nature* 460 (7254): 473–78. <https://doi.org/10.1038/nature08162>.
- Harvey, Brian, R. Norman Kelley, and M. J. Ashwood-Smith. 1982. "Cryopreservation of Zebra Fish Spermatozoa Using Methanol." *Canadian Journal of Zoology* 60 (8): 1867–70. <https://doi.org/10.1139/z82-242>.
- Hasegawa, Sonoko, Hiroaki Kobayashi, Makiko Kumagai, Hiroshi Nishimaru, Etsuko Tarusawa, Hiro Kanda, Makoto Sanbo, et al. 2017. "Clustered Protocadherins Are Required for Building Functional Neural Circuits." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10: 114. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00114>.
- Hayes, Michael C., Stephen P. Rubin, Jay E. Hensleigh, Reginald R. Reisenbichler, and Lisa A. Wetzel. 2005. "Performance of Juvenile Steelhead Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Produced from Untreated and Cryopreserved Milt." *Aquaculture* 249 (1): 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.035>.
- He, Yu-Fei, Bin-Zhong Li, Zheng Li, Peng Liu, Yang Wang, Qingyu Tang, Jianping Ding, et al. 2011. "Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA." *Science (New York, N.Y.)* 333 (6047): 1303–7. <https://doi.org/10.1126/science.1210944>.
- Henderson, Ian R., and Steven E. Jacobsen. 2007. "Epigenetic Inheritance in Plants." *Nature* 447 (7143): 418–24. <https://doi.org/10.1038/nature05917>.
- Herman, J. G., J. R. Graff, S. Myöhänen, B. D. Nelkin, and S. B. Baylin. 1996. "Methylation-Specific PCR: A Novel PCR Assay for Methylation Status of CpG Islands." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (18): 9821–26. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9821>.
- Herráez, María Paz, Juan Ausió, Alain Devaux, Silvia González-Rojo, Cristina Fernández-Díez, Sylvie Bony, Núria Saperas, and Vanesa Robles. 2017. "Paternal Contribution to

- Development: Sperm Genetic Damage and Repair in Fish.” *Aquaculture* 472: 45. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.007>.
- Herranz-Jusado, J. G., V. Gallego, M. Morini, C. Rozenfeld, L. Pérez, E. Kása, T. Kollár, et al. 2019. “Comparison of European Eel Sperm Cryopreservation Protocols with Standardization as a Target.” *Aquaculture* 498 (January): 539–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.006>.
- Ho, Shuk-mei, and Wan-ye Tang. 2007. “Techniques Used in Studies of Epigenome Dysregulation Due to Aberrant DNA Methylation: An Emphasis on Fetal-Based Adult Diseases.” *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 23 (3): 267–82. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.01.004>.
- Horváth, Á., C. Labbé, D. Jesenšek, G. Hoitsy, G. Bernáth, D. Kaczkó, Z. Bokor, and B. Urbányi. 2015. “Post-Thaw Storage of Sperm from Various Salmonid Species.” *Journal of Applied Ichthyology* 31 (S1): 119–24. <https://doi.org/10.1111/jai.12741>.
- Horváth, Á., and B. Urbányi. 2000. “The Effect of Cryoprotectants on the Motility and Fertilizing Capacity of Cryopreserved African Catfish *Clarias Gariepinus* (Burchell 1822) Sperm.” *Aquaculture Research* 31 (3): 317–24. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00444.x>.
- Huang, Yun, William A. Pastor, Yinghua Shen, Mamta Tahiliani, David R. Liu, and Anjana Rao. 2010. “The Behaviour of 5-Hydroxymethylcytosine in Bisulfite Sequencing.” *PLoS One* 5 (1): e8888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008888>.
- Huo, Ying, Zhi Qiang Yan, Peng Yuan, Meng Qin, Ying Kuo, Rong Li, Li Ying Yan, Huai Liang Feng, and Jie Qiao. 2020. “Single-Cell DNA Methylation Sequencing Reveals Epigenetic Alterations in Mouse Oocytes Superovulated with Different Dosages of Gonadotropins.” *Clinical Epigenetics* 12 (1): 75. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00866-w>.
- Ilieva, A., A. G. Ivanov, K. Kovachev, and H. P. Richter. 1992. “Cryodamage in Ram Sperm Plasma Membranes: Energy Transfer and Freeze-Fracture Studies.” *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 27 (1): 41–44. [https://doi.org/10.1016/0302-4598\(92\)85008-4](https://doi.org/10.1016/0302-4598(92)85008-4).
- Ingerslev, Lars R., Ida Donkin, Odile Fabre, Soetkin Versteijhe, Mie Mehta, Pattarawan Pattamaprapanont, Brynjulf Mortensen, Nikolaj Thure Krarup, and Romain Barrès. 2018. “Endurance Training Remodels Sperm-Borne Small RNA Expression and Methylation at Neurological Gene Hotspots.” *Clinical Epigenetics* 10 (1): 12. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0446-7>.
- Inoue, A., K. Okamoto, Y. Fujino, T. Nakagawa, N. Muguruma, K. Sannomiya, Y. Mitsui, et al. 2015. “B-RAF Mutation and Accumulated Gene Methylation in Aberrant Crypt Foci (ACF), Sessile Serrated Adenoma/Polyp (SSA/P) and Cancer in SSA/P.” *British Journal of Cancer* 112 (2): 403–12. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.545>.
- Ito, Shinsuke, Ana C. D’Alessio, Olena V. Taranova, Kwonho Hong, Lawrence C. Sowers, and Yi Zhang. 2010. “Role of Tet Proteins in 5mC to 5hmC Conversion, ES-Cell Self-Renewal and Inner Cell Mass Specification.” *Nature* 466 (7310): 1129–33. <https://doi.org/10.1038/nature09303>.
- Ito, Shinsuke, Li Shen, Qing Dai, Susan C. Wu, Leonard B. Collins, James A. Swenberg, Chuan He, and Yi Zhang. 2011. “Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine.” *Science (New York, N.Y.)* 333 (6047): 1300–1303. <https://doi.org/10.1126/science.1210597>.

- Jaenisch, Rudolf, and Adrian Bird. 2003. "Epigenetic Regulation of Gene Expression: How the Genome Integrates Intrinsic and Environmental Signals." *Nature Genetics* 33 (3): 245–54. <https://doi.org/10.1038/ng1089>.
- Jaroudi, Souraya, Georgia Kakourou, Suzanne Cawood, Alpesh Doshi, Domenico M. Ranieri, Paul Serhal, Joyce C. Harper, and Sioban B. SenGupta. 2009. "Expression Profiling of DNA Repair Genes in Human Oocytes and Blastocysts Using Microarrays." *Human Reproduction (Oxford, England)* 24 (10): 2649–55. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep224>.
- Jenkins, Timothy G., and Douglas T. Carrell. 2012. "The Sperm Epigenome and Potential Implications for the Developing Embryo." *Reproduction (Cambridge, England)* 143 (6): 727–34. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0450>.
- Jiang, Lan, Jing Zhang, Jing-Jing Wang, Lu Wang, Li Zhang, Guoqiang Li, Xiaodan Yang, et al. 2013. "Sperm, but Not Oocyte, DNA Methylome Is Inherited by Zebrafish Early Embryos." *Cell* 153 (4): 773–84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.041>.
- John Morris, G., Elizabeth Acton, Benjamin J. Murray, and Fernanda Fonseca. 2012. "Freezing Injury: The Special Case of the Sperm Cell." *Cryobiology* 64 (2): 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.12.002>.
- Judycka, S., M. Szczepkowski, A. Ciereszko, and G. J. Dietrich. 2015. "New Extender for Cryopreservation of Siberian Sturgeon (*Acipenser Baerii*) Semen." *Cryobiology* 70 (2): 184–89. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.02.005>.
- Kaikkonen, Minna U., Michael T. Y. Lam, and Christopher K. Glass. 2011. "Non-Coding RNAs as Regulators of Gene Expression and Epigenetics." *Cardiovascular Research* 90 (3): 430–40. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr097>.
- Kamstra, Jorke H., Marianne Løken, Peter Aleström, and Juliette Legler. 2015. "Dynamics of DNA Hydroxymethylation in Zebrafish." *Zebrafish* 12 (3): 230–37. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1033>.
- Karimi, Mohsen, Sofia Johansson, Dirk Stach, Martin Corcoran, Dan Grandér, Martin Schalling, Georgy Bakalkin, Frank Lyko, Catharina Larsson, and Tomas J. Ekström. 2006. "LUMA (LUminometric Methylation Assay)--a High Throughput Method to the Analysis of Genomic DNA Methylation." *Experimental Cell Research* 312 (11): 1989–95. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.03.006>.
- Karlsson, J. O., and M. Toner. 1996. "Long-Term Storage of Tissues by Cryopreservation: Critical Issues." *Biomaterials* 17 (3): 243–56. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85562-1](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85562-1).
- Kawai, Kazuaki, Yun-Shan Li, Ming-Fen Song, and Hiroshi Kasai. 2010a. "DNA Methylation by Dimethyl Sulfoxide and Methionine Sulfoxide Triggered by Hydroxyl Radical and Implications for Epigenetic Modifications." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 (1): 260–65. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.10.124>.
- Kent, W. J., A. S. Zweig, G. Barber, A. S. Hinrichs, and D. Karolchik. 2010. "BigWig and BigBed: Enabling Browsing of Large Distributed Datasets." *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (17): 2204–7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq351>.
- Khosravizadeh, Zahra, Gholamreza Hassanzadeh, Javad Tavakkoly Bazzaz, Fatemeh Alizadeh, Mehdi Totonchi, Ensieh Salehi, Kajal Khodamoradi, Maryam Khanehzad, Seyed Reza Hosseini, and Farid Abolhassani. 2020. "The Effect of Cryopreservation on DNA Methylation Patterns of the Chromosome 15q11-Q13 Region in Human Spermatozoa." *Cell and Tissue Banking* 21 (3): 433–45. <https://doi.org/10.1007/s10561-020-09828-1>.

- Khosronezhad, Nahid, Vahideh Hassanzadeh, Maryam Hezavehei, Abdolhossein Shahverdi, and Maryam Shahhoseini. 2023. "Comparative Epigenetic Analysis of Imprinting Genes Involved in Fertility, in Cryopreserved Human Sperms with Rapid Freezing versus Vitrification Methods." *Cell Journal (Yakhteh)* 25 (4): 238–46. <https://doi.org/10.22074/cellj.2023.1974291.1171>.
- Kläver, Ruth, Andreas Bleiziffer, Klaus Redmann, Con Mallidis, Sabine Kliesch, and Jörg Gromoll. 2012. "Routine Cryopreservation of Spermatozoa Is Safe — Evidence from the DNA Methylation Pattern of Nine Spermatozoa Genes." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 29 (9): 943–50. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9813-z>.
- Kohli, Rahul M., and Yi Zhang. 2013. "TET Enzymes, TDG and the Dynamics of DNA Demethylation." *Nature* 502 (7472): 472–79. <https://doi.org/10.1038/nature12750>.
- Kolhe, Parag, Elizabeth Amend, and Satish K. Singh. 2010. "Impact of Freezing on PH of Buffered Solutions and Consequences for Monoclonal Antibody Aggregation." *Biotechnology Progress* 26 (3): 727–33. <https://doi.org/10.1002/btpr.377>.
- Kopeika, J., E. Kopeika, T. Zhang, and D. M. Rawson. 2003. "Studies on the Toxicity of Dimethyl Sulfoxide, Ethylene Glycol, Methanol and Glycerol to Loach (*Misgurnus Fossilis*) Sperm and the Effect on Subsequent Embryo Development." *Cryo Letters* 24 (6): 365–74.
- Kouzarides, Tony. 2007. "Chromatin Modifications and Their Function." *Cell* 128 (4): 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.
- Krueger, Felix. n.d. "A Wrapper Tool around Cutadapt and FastQC to Consistently Apply Quality 536 and Adapter Trimming to FastQ Files."
- Krueger, Felix, and Simon R. Andrews. 2011a. "Bismark: A Flexible Aligner and Methylation Caller for Bisulfite-Seq Applications." *Bioinformatics (Oxford, England)* 27 (11): 1571–72. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr167>.
- Kumar, Ashish, Emma Dalan, and Melanie A. Carless. 2020. "Analysis of DNA Methylation Using Pyrosequencing." In *Epigenetics Methods*, 37–62. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819414-0.00003-3>.
- Kurdyukov, Sergey, and Martyn Bullock. 2016a. "DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method." *Biology* 5 (1): 3. <https://doi.org/10.3390/biology5010003>.
- Kurtz, Kathryn, Núria Saperas, Juan Ausió, and Manel Chiva. 2009. "Spermiogenic Nuclear Protein Transitions and Chromatin Condensation. Proposal for an Ancestral Model of Nuclear Spermiogenesis." *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution* 312B (3): 149–63. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21271>.
- L, Marandel, Heraud C, Véron V, Laithier J, Marchand M, Quillet E, Callet T, Dupont-Nivet M, and Médale F. 2022. "A Plant-Based Diet Differentially Affects the Global Hepatic Methylome in Rainbow Trout Depending on Genetic Background." *Epigenetics* 17 (12): 1726–37. <https://doi.org/10.1080/15592294.2022.2058226>.
- Labbe, C., G. Maise, K. Müller, A. Zachowski, S. Kaushik, and M. Loir. 1995. "Thermal Acclimation and Dietary Lipids Alter the Composition, but Not Fluidity, of Trout Sperm Plasma Membrane." *Lipids* 30 (1): 23–33. <https://doi.org/10.1007/BF02537038>.
- Labbe, C., A. Martoriati, A. Devaux, and G. Maise. 2001. "Effect of Sperm Cryopreservation on Sperm DNA Stability and Progeny Development in Rainbow Trout." *Molecular Reproduction and Development* 60 (3): 397–404. <https://doi.org/10.1002/mrd.1102>.
- Labbé, C., V. Robles, and M. P. Herraéz. 2013. "3 - Cryopreservation of Gametes for Aquaculture and Alternative Cell Sources for Genome Preservation." In *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*, edited by Geoff Allan and Gavin Burnell, 76–116.

- Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857097460.1.76>.
- Labbe, Catherine. 2013a. "Spécificités de La Cryoconservation Des Ressources Génétiques Chez Les Espèces Aquacoles." *STAL. Sciences et Techniques de l'animal de Laboratoire* 39 (January): 67–69.
- Labbe, Catherine. 2013b. "Stress Subi Par Les Cellules Au Cours de La Congélation-Décongélation et Méthodes de Cryoconservation." *STAL. Sciences et Techniques de l'animal de Laboratoire* 19 (January): 15–20.
- Labbe, Catherine, Lois M. Crowe, and John H. Crowe. 1997. "Stability of the Lipid Component of Trout Sperm Plasma Membrane during Freeze–Thawing." *Cryobiology* 34 (2): 176–82. <https://doi.org/10.1006/cryo.1996.1996>.
- Labbé, Catherine, Vanesa Robles, and Maria Paz Herraéz. 2017. "Epigenetics in Fish Gametes and Early Embryo." *Aquaculture, Recent advances in fish gametes and embryo research*, 472 (April): 93–106. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.026>.
- Lahnsteiner, F., and Robert Patzner. 2008. "Sperm Morphology and Ultrastructure in Fish." In *Fish Spermatology (Eds.: S.M.H. Alavi, J. Cosson, K. Coward, G. Rafiee. Alpha Science International Ltd. Oxford, UK, 1–61. Alpha Science International Ltd.* <https://unizalzburg.elsevierpure.com/en/publications/sperm-morphology-and-ultrastructure-in-fish>.
- Laing, L. V., J. Viana, E. L. Dempster, M. Trznadel, L. A. Trunkfield, T. M. Uren Webster, R. van Aerle, et al. 2016. "Bisphenol A Causes Reproductive Toxicity, Decreases Dnmt1 Transcription, and Reduces Global DNA Methylation in Breeding Zebrafish (Danio Rerio)." *Epigenetics* 11 (7): 526–38. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1182272>.
- Lallias, Delphine, Maria Bernard, Céline Ciobotaru, Nicolas Dechamp, Laurent Labbé, Lionel Goardon, Jean-Michel Le Calvez, et al. 2021. "Sources of Variation of DNA Methylation in Rainbow Trout: Combined Effects of Temperature and Genetic Background." *Epigenetics* 16 (9): 1031–52. <https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1834924>.
- Leitwein, Maeva, Martin Laporte, Jeremy Le Luyer, Kayla Mohns, Eric Normandeau, Ruth Withler, and Louis Bernatchez. 2021. "Epigenomic Modifications Induced by Hatchery Rearing Persist in Germ Line Cells of Adult Salmon after Their Oceanic Migration." *Evolutionary Applications* 14 (10): 2402–13. <https://doi.org/10.1111/eva.13235>.
- Lemma, Alemayehu. 2011. "Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility." In *Artificial Insemination in Farm Animals*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/16563>.
- Li, E., T. H. Bestor, and R. Jaenisch. 1992. "Targeted Mutation of the DNA Methyltransferase Gene Results in Embryonic Lethality." *Cell* 69 (6): 915–26. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90611-f](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90611-f).
- Li, En. 2002. "Chromatin Modification and Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development." *Nature Reviews Genetics* 3 (9): 662–73. <https://doi.org/10.1038/nrg887>.
- Li, Shizhao, and Trygve O. Tollefsbol. 2021. "DNA Methylation Methods: Global DNA Methylation and Methylomic Analyses." *Methods, Advance Epigenetics Methods in Biomedicine*, 187 (March): 28–43. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.10.002>.
- Lindeman, Leif C., Ingrid S. Andersen, Andrew H. Reiner, Nan Li, Håvard Aanes, Olga Østrup, Cecilia Winata, et al. 2011. "Prepatterning of Developmental Gene Expression by Modified Histones before Zygotic Genome Activation." *Developmental Cell* 21 (6): 993–1004. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.008>.

- Lister, Ryan, Mattia Pelizzola, Robert H. Downen, R. David Hawkins, Gary Hon, Julian Tonti-Filippini, Joseph R. Nery, et al. 2009. "Human DNA Methylomes at Base Resolution Show Widespread Epigenomic Differences." *Nature* 462 (7271): 315–22. <https://doi.org/10.1038/nature08514>.
- Liu, Guifen, Wen Wang, Shengen Hu, Xiangxiu Wang, and Yong Zhang. 2018. "Inherited DNA Methylation Primes the Establishment of Accessible Chromatin during Genome Activation." *Genome Research* 28 (7): 998–1007. <https://doi.org/10.1101/gr.228833.117>.
- Lombó, Marta, Cristina Fernández-Díez, Silvia González-Rojo, and María Paz Herráez. 2019. "Genetic and Epigenetic Alterations Induced by Bisphenol A Exposure during Different Periods of Spermatogenesis: From Spermatozoa to the Progeny." *Scientific Reports* 9 (1): 18029. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54368-8>.
- Lombó, Marta, Lidia Getino-Álvarez, Alexandra Depincé, Catherine Labbé, and María Paz Herráez. 2019. "Embryonic Exposure to Bisphenol A Impairs Primordial Germ Cell Migration without Jeopardizing Male Breeding Capacity." *Biomolecules* 9 (8): 307. <https://doi.org/10.3390/biom9080307>.
- Lopes, Jordana S., Elena Ivanova, Salvador Ruiz, Simon Andrews, Gavin Kelsey, and Pilar Coy. 2022. "Effect of Superovulation Treatment on Oocyte's DNA Methylation." *International Journal of Molecular Sciences* 23 (24): 16158. <https://doi.org/10.3390/ijms232416158>.
- Luger, Karolin, Armin W. Mäder, Robin K. Richmond, David F. Sargent, and Timothy J. Richmond. 1997. "Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution." *Nature* 389 (6648): 251–60. <https://doi.org/10.1038/38444>.
- Luo, Weiwei, Ying Zhou, Junru Wang, Xiaomu Yu, and Jingou Tong. 2021. "Identifying Candidate Genes Involved in the Regulation of Early Growth Using Full-Length Transcriptome and RNA-Seq Analyses of Frontal and Parietal Bones and Vertebral Bones in Bighead Carp (*Hypophthalmichthys Nobilis*)." *Frontiers in Genetics* 11 (January): 603454. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.603454>.
- Ma, Shanshan, Wanxu Huang, Lei Zhang, Shufang Zhao, Ying Tong, Zhenghua Liu, Lei Sun, Haiyan Chen, and Chen Luo. 2011. "Germ Cell-Specific DNA Methylation and Genome Diploidization in Primitive Vertebrates." *Epigenetics* 6 (12): 1471–80. <https://doi.org/10.4161/epi.6.12.18177>.
- Madugundu, Guru S., Jean Cadet, and J. Richard Wagner. 2014. "Hydroxyl-Radical-Induced Oxidation of 5-Methylcytosine in Isolated and Cellular DNA." *Nucleic Acids Research* 42 (11): 7450–60. <https://doi.org/10.1093/nar/gku334>.
- Maisse, Gérard. 1994. "Comparaison de l'effet cryoprotecteur de différents glucides sur le sperme de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)." *Aquatic Living Resources* 7 (3): 217–19. <https://doi.org/10.1051/alr:1994024>.
- Maiti, Atanu, and Alexander C. Drohat. 2011. "Thymine DNA Glycosylase Can Rapidly Excise 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine: Potential Implications for Active Demethylation of CpG Sites." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (41): 35334–38. <https://doi.org/10.1074/jbc.C111.284620>.
- Marandel, Lucie, Olivier Lepais, Eva Arbenoits, Vincent Véron, Karine Dias, Marie Zion, and Stéphane Panserat. 2016. "Remodelling of the Hepatic Epigenetic Landscape of Glucose-Intolerant Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) by Nutritional Status and Dietary Carbohydrates." *Scientific Reports* 6 (1): 32187. <https://doi.org/10.1038/srep32187>.

- Martínez-Páramo, Sonia, Ákos Horváth, Catherine Labbé, Tiantian Zhang, Vanesa Robles, Paz Herráez, Marc Suquet, et al. 2017. "Cryobanking of Aquatic Species." *Aquaculture*, Recent advances in fish gametes and embryo research, 472 (April): 156–77. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042>.
- Martoriati, A., A. Devaux, G. Maise, and C. Labbe. 1999. "Genome Alteration after Cryopreservation of Rainbow Trout Sperm : Use of the Comet Assay to Detect DNA Breakdown.," 1999.
- Mattei, Xavier. 1991. "Spermatozoon Ultrastructure and Its Systematic Implications in Fishes." *Canadian Journal of Zoology* 69 (12): 3038–55. <https://doi.org/10.1139/z91-428>.
- Mazur, P. 1984. "Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications." *The American Journal of Physiology* 247 (3 Pt 1): C125-142. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>.
- McGowan, R. A., and C. C. Martin. 1997. "DNA Methylation and Genome Imprinting in the Zebrafish, *Danio Rerio*: Some Evolutionary Ramifications." *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 75 (5): 499–506.
- Meissner, Alexander, Andreas Gnirke, George W. Bell, Bernard Ramsahoye, Eric S. Lander, and Rudolf Jaenisch. 2005. "Reduced Representation Bisulfite Sequencing for Comparative High-Resolution DNA Methylation Analysis." *Nucleic Acids Research* 33 (18): 5868–77. <https://doi.org/10.1093/nar/gki901>.
- Meissner, Alexander, Tarjei S. Mikkelsen, Hongcang Gu, Marius Wernig, Jacob Hanna, Andrey Sivachenko, Xiaolan Zhang, et al. 2008. "Genome-Scale DNA Methylation Maps of Pluripotent and Differentiated Cells." *Nature* 454 (7205): 766–70. <https://doi.org/10.1038/nature07107>.
- Mello, Fernanda de, Juliana Saraiva Garcia, Leandro C. Godoy, Alexandra Depincé, Catherine Labbé, and Danilo P. Streit. 2017. "The Effect of Cryoprotectant Agents on DNA Methylation Patterns and Progeny Development in the Spermatozoa of *Colossoma Macropomum*." *General and Comparative Endocrinology* 245 (May): 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.003>.
- Meryman, Harold T. 2007. "Cryopreservation of Living Cells: Principles and Practice." *Transfusion* 47 (5): 935–45. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01212.x>.
- Moore, Lisa D., Thuc Le, and Guoping Fan. 2013. "DNA Methylation and Its Basic Function." *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 38 (1): 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>.
- Morris, J. P. IV, A Hagen, and J. P. Kaken. 2008. "Zebrafish Sperm Cryopreservation with N,N-Dimethylacetamide." *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species Biology Series. E. Cabrita, V. Robles, M. P. Herra' Ez (Eds), CRC Press (Taylor and Francis Group), Pp. 329–338., 2008.*
- Mountoufari, George, Weisheng V. Chen, Yusuke Hirabayashi, Sean O'Keeffe, Maxime Chevee, Chiamaka L. Nwakeze, Franck Polleux, and Tom Maniatis. 2017. "Multicluster Pcdh Diversity Is Required for Mouse Olfactory Neural Circuit Assembly." *Science (New York, N.Y.)* 356 (6336): 411–14. <https://doi.org/10.1126/science.aai8801>.
- Muñoz-Guerra, S., F. Azorín, M.T. Casas, X. Marcet, M.A. Maristany, J. Roca, and J.A. Subirana. 1982. "Structural Organization of Sperm Chromatin from the Fish *Carassius Auratus*." *Experimental Cell Research* 137 (1): 47–53. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(82\)90006-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(82)90006-4).
- Murphy, Patrick J., Shan Fu Wu, Cody R. James, Candice L. Wike, and Bradley R. Cairns. 2018a. "Placeholder Nucleosomes Underlie Germline-to-Embryo DNA Methylation

- Reprogramming." *Cell* 172 (5): 993-1006.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.022>.
- Musselman, Catherine A., Marie-Eve Lalonde, Jacques Côté, and Tatiana G. Kutateladze. 2012. "Perceiving the Epigenetic Landscape through Histone Readers." *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (12): 1218–27. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2436>.
- Nestor, Colm, Alexey Ruzov, Richard Meehan, and Donncha Dunican. 2010. "Enzymatic Approaches and Bisulfite Sequencing Cannot Distinguish between 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine in DNA." *BioTechniques* 48 (4): 317–19. <https://doi.org/10.2144/000113403>.
- Nilsson, Eric, Ingrid Sadler-Riggelman, Daniel Beck, and Michael K Skinner. 2021. "Differential DNA Methylation in Somatic and Sperm Cells of Hatchery vs Wild (Natural-Origin) Steelhead Trout Populations." *Environmental Epigenetics* 7 (1): dvab002. <https://doi.org/10.1093/eep/dvab002>.
- Niu, Jingjing, Xuliang Wang, Pingping Liu, Huaxiang Liu, Rui Li, Ziyi Li, Yan He, and Jie Qi. 2022. "Effects of Cryopreservation on Sperm with Cryodiluent in Viviparous Black Rockfish (*Sebastes Schlegelii*)." *International Journal of Molecular Sciences* 23 (6): 3392. <https://doi.org/10.3390/ijms23063392>.
- Nusbaumer, David, Lucas Marques da Cunha, and Claus Wedekind. 2019. "Sperm Cryopreservation Reduces Offspring Growth." *Proceedings. Biological Sciences* 286 (1911): 20191644. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1644>.
- Ogier de Baulny, Bénédicte. 1997. "Cryoconservation Du Sperme de Poissons: Truite Arc-En-Ciel, Turbot, Silure Glane et Tilapia." Thèse - Ecole nationale supérieure agronomique de Rennes.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber, and E. Li. 1999. "DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for de Novo Methylation and Mammalian Development." *Cell* 99 (3): 247–57. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81656-6).
- Pagès, Hervé, Patrick Aboyoun, Robert Gentleman, Saikat DebRoy, Vince Carey, Nicolas Delhomme, Felix Ernst, et al. 2023. "Biostrings: Efficient Manipulation of Biological Strings." *Bioconductor* version: Release (3.17). <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.Biostrings>.
- Pauli, Andrea, John L. Rinn, and Alexander F. Schier. 2011. "Non-Coding RNAs as Regulators of Embryogenesis." *Nature Reviews. Genetics* 12 (2): 136–49. <https://doi.org/10.1038/nrg2904>.
- Pearse, Devon E., Nicola J. Barson, Torfinn Nome, Guangtu Gao, Matthew A. Campbell, Alicia Abadía-Cardoso, Eric C. Anderson, et al. 2019. "Sex-Dependent Dominance Maintains Migration Supergene in Rainbow Trout." *Nature Ecology & Evolution* 3 (12): 1731–42. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1044-6>.
- Perchec, Par, Jacky Cosson, and F. Billard. 2007. "La Motilité Des Spermatozoés de Truite (*Oncorhynchus Mykiss*) et de Carpe (*Cyprinus Carpio*)." *Journal of Applied Ichthyology* 9 (July): 129–49. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1993.tb00389.x>.
- Pérez-Cereales, S., A. Gutiérrez-Adán, S. Martínez-Páramo, J. Beirão, and M. P. Herráez. 2011. "Altered Gene Transcription and Telomere Length in Trout Embryo and Larvae Obtained with DNA Cryodamaged Sperm." *Theriogenology* 76 (7): 1234–45. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.028>.
- Pérez-Cereales, S., S. Martínez-Páramo, J. Beirão, and M. P. Herráez. 2010. "Fertilization Capacity with Rainbow Trout DNA-Damaged Sperm and Embryo Developmental

- Success." *Reproduction (Cambridge, England)* 139 (6): 989–97. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0037>.
- Potok, Magdalena E., David A. Nix, Timothy J. Parnell, and Bradley R. Cairns. 2013a. "Reprogramming the Maternal Zebrafish Genome after Fertilization to Match the Paternal Methylation Pattern." *Cell* 153 (4): 759–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.030>.
- Prokopchuk, Galina, Jacky Cosson, Galina Prokopchuk, and Jacky Cosson. 2017. "Biophysics of Fish Sperm Flagellar Movement: Present Knowledge and Original Directions." In *Cytoskeleton - Structure, Dynamics, Function and Disease*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/66863>.
- Ramsahoye, B. H. 2002. "Measurement of Genome Wide DNA Methylation by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography." *Methods (San Diego, Calif.)* 27 (2): 156–61. [https://doi.org/10.1016/s1046-2023\(02\)00069-5](https://doi.org/10.1016/s1046-2023(02)00069-5).
- Rana, K. J., and B. J. McAndrew. 1989. "The Viability of Cryopreserved Tilapia Spermatozoa." *Aquaculture* 76 (3): 335–45. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90085-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90085-9).
- Richardson, Gavin F, Connie E Wilson, Laurence W Crim, and Zuxu Yao. 1999. "Cryopreservation of Yellowtail Flounder (*Pleuronectes Ferrugineus*) Semen in Large Straws." *Aquaculture* 174 (1): 89–94. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00509-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00509-2).
- Riggs, A. D. 1975. "X Inactivation, Differentiation, and DNA Methylation." *Cytogenetics and Cell Genetics* 14 (1): 9–25. <https://doi.org/10.1159/000130315>.
- Robinson, James T., Helga Thorvaldsdóttir, Wendy Winckler, Mitchell Guttman, Eric S. Lander, Gad Getz, and Jill P. Mesirov. 2011. "Integrative Genomics Viewer." *Nature Biotechnology* 29 (1): 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>.
- Rodriguez Barreto, Deiene, Carlos Garcia de Leaniz, Eric Verspoor, Halina Sobolewska, Mark Coulson, and Sofia Consuegra. 2019. "DNA Methylation Changes in the Sperm of Captive-Reared Fish: A Route to Epigenetic Introgression in Wild Populations." *Molecular Biology and Evolution* 36 (10): 2205–11. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz135>.
- Rose, Nathan R., and Robert J. Klose. 2014. "Understanding the Relationship between DNA Methylation and Histone Lysine Methylation." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1839 (12): 1362–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.02.007>.
- Rothbart, Scott B., and Brian D. Strahl. 2014. "Interpreting the Language of Histone and DNA Modifications." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1839 (8): 627–43. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.001>.
- Rurangwa, E., F. A. M. Volckaert, G. Huyskens, D. E. Kime, and F. Ollevier. 2001. "Quality Control of Refrigerated and Cryopreserved Semen Using Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA), Viable Staining and Standardized Fertilization in African Catfish (*Clarias Gariepinus*)." *Theriogenology* 55 (3): 751–69. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00441-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00441-1).
- Salehi, Masoumeh, Amir Hossein Mahdavi, Mohsen Sharafi, and Abdolhossein Shahverdi. 2020. "Cryopreservation of Rooster Semen: Evidence for the Epigenetic Modifications of Thawed Sperm." *Theriogenology* 142 (January): 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.030>.
- Saperas, N., E. Ribes, C. Buesa, F. García-Hegart, and M. Chiva. 1993. "Differences in Chromatin Condensation during Spermiogenesis in Two Species of Fish with Distinct Protamines."

- The Journal of Experimental Zoology* 265 (2): 185–94. <https://doi.org/10.1002/jez.1402650210>.
- Saperas, Núria, Manel Chiva, M. Teresa Casas, J. Lourdes Campos, José M. Eirín-López, Lindsay J. Frehlick, Cèlia Prieto, Juan A. Subirana, and Juan Ausió. 2006. “A Unique Vertebrate Histone H1-Related Protamine-like Protein Results in an Unusual Sperm Chromatin Organization.” *The FEBS Journal* 273 (19): 4548–61. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05461.x>.
- Serre, David, Byron H. Lee, and Angela H. Ting. 2010. “MBD-Isolated Genome Sequencing Provides a High-Throughput and Comprehensive Survey of DNA Methylation in the Human Genome.” *Nucleic Acids Research* 38 (2): 391–99. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp992>.
- Shimoda, Nobuyoshi, Kimi Yamakoshi, Akimitsu Miyake, and Hiroyuki Takeda. 2005. “Identification of a Gene Required for de Novo DNA Methylation of the Zebrafish No Tail Gene.” *Developmental Dynamics* 233 (4): 1509–16. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20455>.
- Singer, Benjamin D. 2019. “A Practical Guide to the Measurement and Analysis of DNA Methylation.” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 61 (4): 417–28. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2019-0150TR>.
- Smith, Zachary D., Hongcang Gu, Christoph Bock, Andreas Gnirke, and Alexander Meissner. 2009a. “High-Throughput Bisulfite Sequencing in Mammalian Genomes.” *Methods (San Diego, Calif.)* 48 (3): 226–32. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.05.003>.
- Soubry, Adelheid, Susan K. Murphy, Greet Vansant, Yang He, Thomas M. Price, and Cathrine Hoyo. 2021. “Opposing Epigenetic Signatures in Human Sperm by Intake of Fast Food Versus Healthy Food.” *Frontiers in Endocrinology* 12: 625204. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.625204>.
- Strahl, Brian D., and C. David Allis. 2000. “The Language of Covalent Histone Modifications.” *Nature* 403 (6765): 41–45. <https://doi.org/10.1038/47412>.
- Suquet, M, O Cherehuini, and C Fauvel. 2008. “Cryopreservation of Sperm in Turbot (Psetta Maxima).,” 2008, *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species Biology Series*. E. Cabrita, V. Robles, M. P. Herra´ ez (Eds), CRC Press (Taylor and Francis group), edition.
- Suvorov, Alexander, Alex Shershebnov, Haotian Wu, Yulia Medvedeva, Oleg Sergeyev, and J. Richard Pilsner. 2018. “Perinatal Exposure to Low Dose 2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl Ether (BDE-47) Alters Sperm DNA Methylation in Adult Rats.” *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 75 (January): 136–43. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.10.009>.
- Tahiliani, Mamta, Kian Peng Koh, Yinghua Shen, William A. Pastor, Hozefa Bandukwala, Yevgeny Brudno, Suneet Agarwal, et al. 2009. “Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1.” *Science (New York, N.Y.)* 324 (5929): 930–35. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>.
- Tai, Zhipeng, Pengpeng Guan, Ting Zhang, Wenye Liu, Lingya Li, You Wu, Guoliang Li, and Jing-Xia Liu. 2022. “Effects of Parental Environmental Copper Stress on Offspring Development: DNA Methylation Modification and Responses of Differentially Methylated Region-Related Genes in Transcriptional Expression.” *Journal of Hazardous Materials* 424 (Pt C): 127600. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127600>.
- Taiwo, Oluwatosin, Gareth A. Wilson, Tiffany Morris, Stefanie Seisenberger, Wolf Reik, Daniel Pearce, Stephan Beck, and Lee M. Butcher. 2012. “Methylome Analysis Using MeDIP-

- Seq with Low DNA Concentrations." *Nature Protocols* 7 (4): 617–36. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.012>.
- Takayama, Kazuya, Nobuyoshi Shimoda, Shunsuke Takanaga, Shunya Hozumi, and Yutaka Kikuchi. 2014. "Expression Patterns of Dnmt3aa, Dnmt3ab, and Dnmt4 during Development and Fin Regeneration in Zebrafish." *Gene Expression Patterns: GEP* 14 (2): 105–10. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2014.01.005>.
- Teletchea, Fabrice, and Pascal Fontaine. 2014. "Levels of Domestication in Fish: Implications for the Sustainable Future of Aquaculture." *Fish and Fisheries* 15 (2): 181–95. <https://doi.org/10.1111/faf.12006>.
- Teperek, Marta, Angela Simeone, Vincent Gaggioli, Kei Miyamoto, George E. Allen, Serap Erkek, Taejoon Kwon, et al. 2016. "Sperm Is Epigenetically Programmed to Regulate Gene Transcription in Embryos." *Genome Research* 26 (8): 1034–46. <https://doi.org/10.1101/gr.201541.115>.
- Townsend, Jessica, Camila U. Braz, Todd Taylor, and Hasan Khatib. 2023. "Effects of Paternal Methionine Supplementation on Sperm DNA Methylation and Embryo Transcriptome in Sheep." *Environmental Epigenetics* 9 (1): dvac029. <https://doi.org/10.1093/eep/dvac029>.
- Turner, B. M. 1998. "Histone Acetylation as an Epigenetic Determinant of Long-Term Transcriptional Competence." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 54 (1): 21–31. <https://doi.org/10.1007/s000180050122>.
- Uddin, Arif, Tarikul H. Mazumder, Parvin A. Barbhuiya, and Supriyo Chakraborty. 2020. "Similarities and Dissimilarities of Codon Usage in Mitochondrial ATP Genes among Fishes, Aves, and Mammals." *IUBMB Life* 72 (5): 899–914. <https://doi.org/10.1002/iub.2231>.
- Ulloa-Rodríguez, Patricio, Elías Figueroa, Rommy Díaz, Manuel Lee-Estevez, Stefania Short, and Jorge G. Farías. 2017. "Mitochondria in Teleost Spermatozoa." *Mitochondrion* 34 (May): 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.01.001>.
- Vandeputte, Marc, Geneviève Corraze, Jérôme Doerflinger, Florian Enez, Frédéric Clota, Frédéric Terrier, Mathilde Horat, et al. 2022. "Realised Genetic Gains on Growth, Survival, Feed Conversion Ratio and Quality Traits after Ten Generations of Multi-Trait Selection in Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss*, Fed a Standard Diet or a 'Future' Fish-Free and Soy-Free Diet." *Aquaculture Reports* 27 (December): 101363. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101363>.
- Velden, V. H. J. van der, A. Hochhaus, G. Cazzaniga, T. Szczepanski, J. Gabert, and J. J. M. van Dongen. 2003. "Detection of Minimal Residual Disease in Hematologic Malignancies by Real-Time Quantitative PCR: Principles, Approaches, and Laboratory Aspects." *Leukemia* 17 (6): 1013–34. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402922>.
- Vezzani, Bianca, Marianna Carinci, Maurizio Previati, Stefania Giacobazzi, Mario Della Sala, Roberta Gafà, Giovanni Lanza, Mariusz R. Wieckowski, Paolo Pinton, and Carlotta Giorgi. 2022. "Epigenetic Regulation: A Link between Inflammation and Carcinogenesis." *Cancers* 14 (5): 1221. <https://doi.org/10.3390/cancers14051221>.
- Waddington, Conrad Hal. 1940. *Organisers and Genes* by C. H. Waddington. The University Press.
- Wales, R. G., and I. G. White. 1959. "THE SUSCEPTIBILITY OF SPERMATOZOA TO TEMPERATURE SHOCK." *Journal of Endocrinology* 19 (3): 211–20. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0190211>.

- Wang, Simon Yuan, Karen Lau, Keng-Po Lai, Jiang-Wen Zhang, Anna Chung-Kwan Tse, Jing-Woei Li, Yin Tong, et al. 2016. "Hypoxia Causes Transgenerational Impairments in Reproduction of Fish." *Nature Communications* 7 (July): 12114. <https://doi.org/10.1038/ncomms12114>.
- Wang, Xuegeng, and Ramji Kumar Bhandari. 2019. "DNA Methylation Dynamics during Epigenetic Reprogramming of Medaka Embryo." *Epigenetics* 14 (6): 611–22. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1605816>.
- Weber, Alain R., Claudia Krawczyk, Adam B. Robertson, Anna Kuśnierczyk, Cathrine B. Vågbø, David Schuermann, Arne Klungland, and Primo Schär. 2016. "Biochemical Reconstitution of TET1–TDG–BER-Dependent Active DNA Demethylation Reveals a Highly Coordinated Mechanism." *Nature Communications* 7 (1): 10806. <https://doi.org/10.1038/ncomms10806>.
- Wellband, Kyle, David Roth, Tommi Linnansaari, R. Allen Curry, and Louis Bernatchez. 2021. "Environment-Driven Reprogramming of Gamete DNA Methylation Occurs during Maturation and Is Transmitted Intergenerationally in Atlantic Salmon." *G3 (Bethesda, Md.)* 11 (12): jkab353. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab353>.
- Wright, Erik. 2023. "DECIPHER: Tools for Curating, Analyzing, and Manipulating Biological Sequences." *Bioconductor* version: Release (3.17). <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.DECIPHER>.
- Wu, Hao, Tianlei Xu, Hao Feng, Li Chen, Ben Li, Bing Yao, Zhaohui Qin, Peng Jin, and Karen N. Conneely. 2015. "Detection of Differentially Methylated Regions from Whole-Genome Bisulfite Sequencing Data without Replicates." *Nucleic Acids Research* 43 (21): e141. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv715>.
- Wu, Shan-Fu, Haiying Zhang, and Bradley R. Cairns. 2011. "Genes for Embryo Development Are Packaged in Blocks of Multivalent Chromatin in Zebrafish Sperm." *Genome Research* 21 (4): 578–89. <https://doi.org/10.1101/gr.113167.110>.
- Wu, Susan C., and Yi Zhang. 2010. "Active DNA Demethylation: Many Roads Lead to Rome." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (9): 607–20. <https://doi.org/10.1038/nrm2950>.
- Wyatt, G. R. 1951. "Recognition and Estimation of 5-Methylcytosine in Nucleic Acids." *Biochemical Journal* 48 (5): 581–84.
- Xie, Ningning, Juan Tian, Xiaolin Meng, Lixue Dong, Ming Jiang, Hua Wen, and Xing Lu. 2023. "DNA Methylation Profiling and Transcriptome Sequencing Reveal the Molecular Mechanism of the High-Carbohydrate Diet on Muscle Growth of Grass Carp (*Ctenopharyngodon Idella*)." *Aquaculture Reports* 30 (June): 101545. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101545>.
- Young, William P., Kathryn Frenyea, Paul A. Wheeler, and Gary H. Thorgaard. 2009. "No Increase in Developmental Deformities or Fluctuating Asymmetry in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Produced with Cryopreserved Sperm." *Aquaculture* 289 (1): 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.031>.
- Zhao, Yanyan, Ping Xie, Huihui Fan, and Sujuan Zhao. 2014. "Impairment of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System and Oxidative Stress in Liver of Crucian Carp (*Carassius Auratus* L.) Exposed to Microcystins." *Environmental Toxicology* 29 (1): 30–39. <https://doi.org/10.1002/tox.20770>.
- Zhu, Jian-Kang. 2009. "Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases." *Annual Review of Genetics* 43: 143–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134205>.

- Zhu, Long, Lihong Wang, Xiaoteng Fan, Chenglong Dong, Gaoxue Wang, and Zaizhao Wang. 2021. "Chronic Exposure to Bisphenol A Resulted in Alterations of Reproductive Functions via Immune Defense, Oxidative Damage and Disruption DNA/Histone Methylation in Male Rare Minnow *Gobiocypris Rarus*." *Aquatic Toxicology* 236 (July): 105849. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105849>.
- Zilli, L., R. Schiavone, V. Zonno, C. Storelli, and S. Vilella. 2003. "Evaluation of DNA Damage in *Dicentrarchus Labrax* Sperm Following Cryopreservation." *Cryobiology* 47 (3): 227–35. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.10.002>.

## Annexe 1 : Publication N° 2



OPEN

## Cryopreservation effect on DNA methylation profile in rainbow trout spermatozoa

Marina El Kamouh<sup>1</sup>, Aurélien Brionne<sup>1</sup>, Amin Sayyari<sup>2</sup>, Audrey Laurent<sup>1</sup>✉ & Catherine Labbé<sup>1</sup>✉

Spermatozoa are the cells that are most commonly used for cryopreservation of valuable genetic resources in aquaculture. It is known that fish spermatozoa transmit to the embryo not only their genetic but also their epigenetic profile, especially DNA methylation. Therefore, any alteration of the DNA methylation profile in spermatozoa induces the risk of transmitting epigenetic alterations to the offspring. The aim of this study was to assess the effect of cryopreservation on DNA methylation in rainbow trout spermatozoa. To trigger variable cellular response after freezing–thawing, spermatozoa from mature males were cryopreserved with dimethyl sulfoxide, methanol or glycerol as cryoprotectant. We observed that dimethyl sulfoxide was the best to preserve thawed spermatozoa functions. Methanol only slightly preserved all the cellular parameters, while glycerol failed to protect motility and fertilization ability. The consequences on DNA methylation were assessed using Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS). Sperm cryopreservation did not thoroughly impact DNA methylation, although 335–564 differentially methylated cytosines were characterized depending on the cryoprotectant. Very few of them were shared between cryoprotectants, and no correlation with the extent of cellular damage was found. Our study showed that DNA methylation was only slightly altered after sperm cryopreservation, and this may render further analysis of the risk for the progeny very challenging.

Cryopreservation of fish spermatozoa is widely used to secure genetic selection programs and to preserve rare or endangered species. It is known that besides conveying the genetic background of the breeders to the progeny, fish spermatozoa also bear a specific epigenetic profile, particularly DNA methylation. This profile is important for the offspring as it has been shown in zebrafish that some features of the sperm methylome are inherited and maintained during early embryogenesis, and that they contribute to the regulation of zebrafish embryo development<sup>1–3</sup>. Such sperm methylome inheritance by the embryos raises the concern that any alteration of DNA methylation in spermatozoa bears the risk of transmitting epigenetic alterations to the offspring. The effect of cryopreservation on sperm DNA methylation has received limited attention yet, and the studies are reduced to few species, using very different methylation analysis methods. In human, two candidate analyses of parentally imprinted genes showed that sperm cryopreservation had no effect on the maternally imprinted genes LIT1, SNRPN, MEST and SNURF-SNRPN, on the paternally ones MEG3, H19, and UBE3A, nor on repetitive elements (ALU, LINE1), on a spermatogenesis-specific gene (VASA) or on a gene associated with male infertility (MTHFR)<sup>4,5</sup>. However, a third candidate gene study showed more recently that sperm cryopreservation induced an increased methylation in the promoter regions of three other paternally imprinted genes (PAX8, PEG3 and RTL1)<sup>6</sup>. More global analyses in ram<sup>7</sup> and stallion<sup>8</sup> using ELISA showed an increased DNA methylation in frozen-thawed spermatozoa, but the affected genomic regions were not explored. In fish, some studies also evaluated the global DNA methylation of cryopreserved spermatozoa, using LUMA (Luminometric assay) which provides information on the overall DNA methylation, without providing information on the identity of the altered sites<sup>9,10</sup>. These studies showed intricate species-related effects and cryoprotectant-related ones. Indeed, methanol (MeOH) did not alter DNA methylation in European eel and in goldfish, but it triggered a slight hypermethylation in zebrafish. Goldfish DNA methylation was not completely insensitive to cryopreservation since dimethyl sulfoxide (DMSO) and 1,2-propanediol did induce some DNA hypomethylation in this species<sup>10</sup>. Cryopreservation also induced a global hypomethylation (assessed with LUMA) of tambaqui spermatozoa whatever the tested cryoprotectants, including MeOH, DMSO

<sup>1</sup>INRAE, Fish Physiology and Genomics, UR 1037, Rennes, France. <sup>2</sup>Department of Production Animal Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway. ✉email: audrey.laurent@inrae.fr; catherine.labbe@inrae.fr

and glycerol<sup>11</sup>. In all, cryopreservation might induce a risk of DNA methylation alteration in spermatozoa, but the extent of the damages at the scale of the genome and its functional regions has not been addressed yet.

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is important in aquaculture and it has been an ever-present species in selective breeding programs in the past decades<sup>12,13</sup>. Cryobanking of the improved commercial strains using cryopreserved sperm is operational in France<sup>14</sup>, but to date, the impact of sperm cryopreservation on DNA methylation has never been studied in rainbow trout. Therefore, testing the risk of DNA methylation changes at the spermatozoa level is the first step to be carried on before the consequences on the progeny can be considered. The aim of our study was then to assess whether cryopreservation of rainbow trout spermatozoa can alter their DNA methylation profile and whether alterations of the cellular quality of thawed sperm is related to possible DNA methylation alterations. To this end, we used different cryoprotectant molecules in order to induce some variability in cellular cryoprotection, namely DMSO, MeOH and glycerol. DMSO and MeOH are the most commonly used molecules for sperm cryopreservation in salmonids. However, DMSO is a highly chemically reactive molecule comparing to MeOH. Glycerol does not protect spermatozoa functionality as do DMSO and MeOH, but it still provides some structural protection. Thawed spermatozoa quality was evaluated from their membrane quality, mitochondria quality, motility and fertilization ability. DNA methylation was assessed at the genome-wide level using reduced representation bisulfite sequencing (RRBS), a method that allows a partial genome representation, thereby allowing the assessment of many biological replicates for each cryoprotectant.

## Results

### Cellular quality of the thawed spermatozoa according to the cryoprotectant

Plasma membrane quality of the thawed spermatozoa was deduced from spermatozoa ability to exclude the membrane impermeant propidium iodide. As shown Fig. 1a, DMSO provided a good protection of the plasma membrane, since all samples had more than 75% of the cells with intact plasma membrane. Glycerol was also able to preserve the plasma membrane quality with an efficiency similar to that of DMSO. On the contrary, MeOH yielded the lowest percentages of cells with intact plasma membranes, and the highest variability in plasma membrane quality among the spermatozoa of the different males. Mitochondria quality of the spermatozoa was estimated from their JC-1 staining intensity (Fig. 1b). Again, DMSO and glycerol showed the best ability to preserve the mitochondria quality, with more than 50% of the cells having mitochondria with a high activity, while the spermatozoa cryopreserved with MeOH had a very low mitochondria quality.

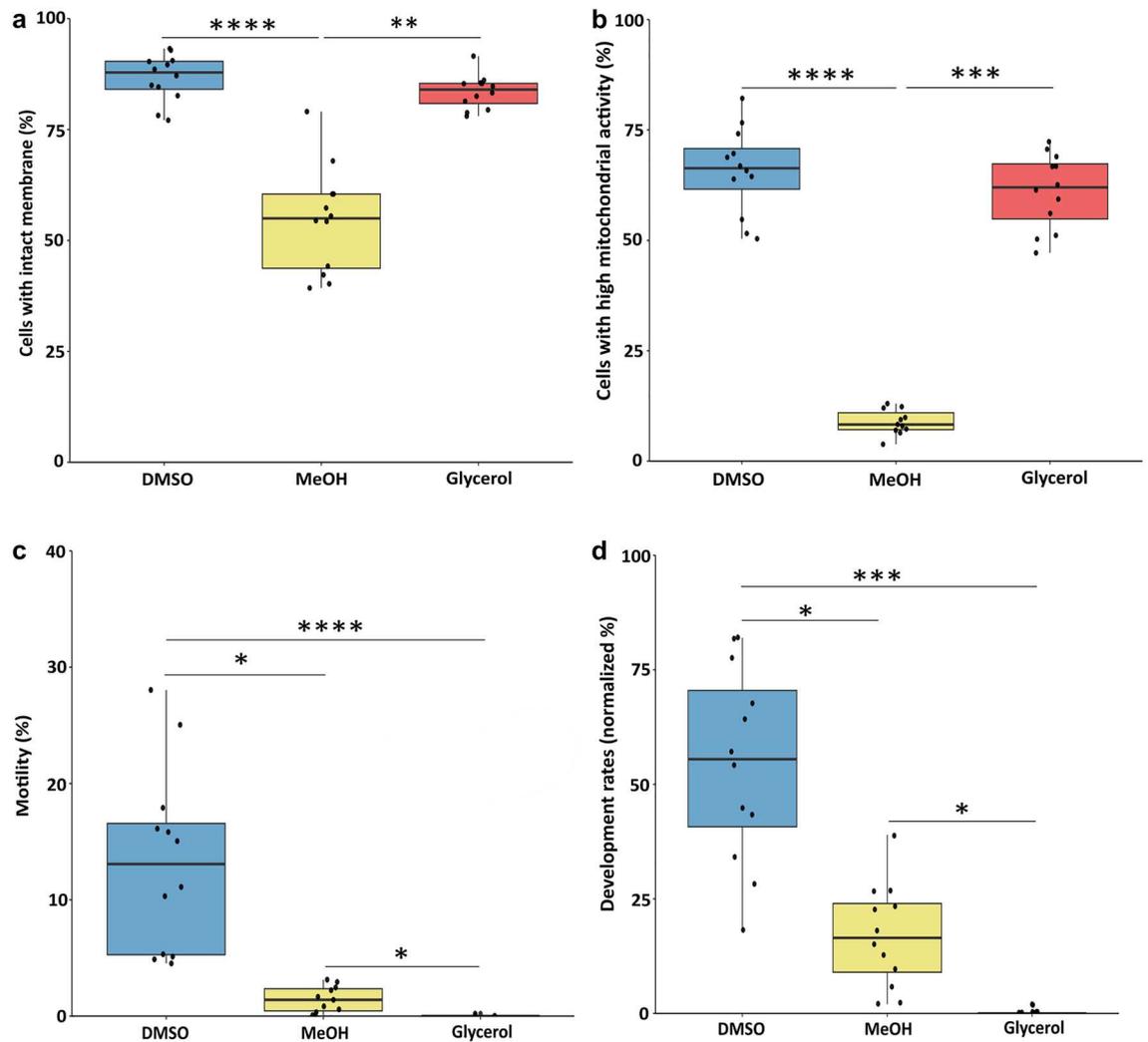
Regarding motility, despite the overall low sperm motility after thawing (Fig. 1c), the highest values were obtained with DMSO. The spermatozoa cryopreserved in MeOH retained very little motility while glycerol completely fail to protect sperm motility ability. The same trend was observed with the fertilization ability of the cryopreserved spermatozoa (Fig. 1d). Our results showed that the best fertilization ability was obtained with DMSO. MeOH yielded lower performances, with no fertilization rates above 50%. After cryopreservation in glycerol, the spermatozoa completely lost their fertilization ability, which was to be expected when considering the total loss of motility of these samples. These fertilization results were confirmed in another fertilization test in which other straws from the same sperm samples were used, with another batch of oocytes (results not shown).

In all, cryopreservation with different cryoprotectants altered the functionality of the thawed spermatozoa, and the different cryoprotectants yielded different cellular response to cryopreservation. We observed that DMSO preserved the membrane quality and the mitochondria quality, and protected to some extent the motility and the fertilization ability. MeOH was less efficient at protecting whatever cellular quality level, while interestingly, glycerol was able to preserve the membrane quality and mitochondria quality, but was completely inefficient regarding the motility or the fertilization ability. This wide set of alterations depending on the samples provided us with a very variable biological material to explore further the risks of changes in DNA methylation after cryopreservation.

### Validation of the RRBS sequencing data for DNA methylation analysis

Because RRBS yields a reduced representation of the analyzed genomes, we assessed whether our sequencing data still had enough cytosines in CpG sites to provide an acceptable representation of those in the whole rainbow trout genome. As a reference, we used a total number of cytosines (in CpG sites) of  $70.6 \times 10^6$ , although the reference trout genome contains  $35.3 \times 10^6$  CpG dinucleotides (Omyk\_1.0 genome version). Indeed, cytosines of both forward and reverse strands can be sequenced (named plus and minus strands depending on their sense on the reference genome), and this can result in the sequencing of the same CpG site twice. We did not remove this redundancy (+ and - CpGs) from our data, because we do not know whether a CpG site can be altered symmetrically by cryopreservation or not. As a consequence, the whole information was kept, and each sequenced cytosine (in a CpG site) in our conditions is one out of the  $70.6 \times 10^6$  genomic cytosines (twice the number of genomic CpG sites). We found an average of  $2.9 \times 10^6$  cytosines in CpG sites per sample (fresh and cryopreserved sperm), that represent 4% of the  $70.6 \times 10^6$  genomic cytosines in CpG sites (Table 1). This representation was slightly higher in MeOH, likely because these samples also had more reads than those in the other conditions, leading to more successful extraction of the cytosines. It is noteworthy that when combining all the cytosines of all the males from one condition, the representation of the genomic cytosines in CpG sites was doubled (9%). Hence, the reduced representation of the genomic cytosines in CpG sites by the data at the sample level was compensated by the large number of biological replicates in this study.

To investigate whether these 9% of genomic cytosines in CpG sites were homogeneously distributed over the entire reference genome, we analyzed their individual location. We observed a homogeneous distribution of the cytosines all along the chromosomes of the rainbow trout genome, with never more than 150 kb between two consecutive cytosines (Fig. 2). The same homogeneous distribution of the sequenced cytosines in CpG sites was found within each sample of each cryopreservation condition. Therefore, this distribution indicates that



**Figure 1.** Cellular quality of the thawed spermatozoa according to the cryoprotectant. (a) Cells with an intact plasma membrane, analyzed from the percentage of cells which excluded the impermeant fluorochrome propidium iodide; (b) Cells with high mitochondrial activity, analyzed from the percentage of cells which had the highest fluorescence intensity after JC-1 labelling; (c) Motile cells calculated from the percentage of cells which had an average path velocity  $\geq 30 \mu\text{m/s}$ ; (d) Development at eyed stage after fertilization with cryopreserved spermatozoa. The percentages were normalized according to the development rate of the egg quality controls (fertilized with standard fresh sperm). In the boxplot representation (a–d), each dot corresponds to individual value for one sperm ( $n = 12$  biological replicates in each condition). The boxplots show (from the bottom to the top): minimum, 25% percentile, median, 75% percentile and maximum. Significant differences between cryoprotectants (Kruskall and Wallis test) are indicated by \*p value  $< 0.05$ ; \*\*p value  $< 0.01$ ; \*\*\*p value  $< 0.001$ , \*\*\*\*p value  $< 0.0001$ .

the captured cytosines in CpG sites provided a reduced but homogeneously distributed representation of the rainbow trout reference genome.

### Global DNA methylation after cryopreservation

Cryopreservation had little effect on the sperm global DNA methylation. Indeed, we found that the average DNA methylation percentage of cryopreserved sperm (DMSO:  $86.60 \pm 1.05$ , MeOH:  $87.34 \pm 0.11$  and glycerol:  $85.93 \pm 2.06$ ) were not significantly different ( $p > 0.05$ , Kruskal–Wallis test) from the fresh control one ( $86.34 \pm 1.76$ ). This indicates that cryopreservation did not impact DNA methylation at a global scale. In a further analysis of the data, instead of using only the average methylation ratio of each sample, we compared all the samples to each other based on the methylation ratio of every sequenced cytosine (PCA, Fig. 3a). We found no clear segregation between fresh and cryopreserved sperm regardless of the cryoprotectant used. Only four samples were distant from the others to some extent (on the first axis of the PCA), but they did not share any treatment similarities (2 fresh samples, one DMSO, and one glycerol). Their separation from the others can be explained by the lower number of cytosines in CpG sites of these specific samples. This result enforces the fact that cryopreservation did not thoroughly affect DNA methylation, and that if any alteration has been induced by cryopreservation, it should be sought at a more discrete level.

Condition	Total raw reads $\times 10^6$	Reads with adapter $\times 10^6$ (% of total)	% mapping efficiency	Median sequencing depth of cytosines	Number of identified cytosines $\times 10^6$	% total genomic cytosines in CpG sites
Fresh	137.0 $\pm$ 34.4	72.0 $\pm$ 16.5	51.3 $\pm$ 1.1	39.8	2.8 $\pm$ 1.0	4.0 $\pm$ 1.5
		(53.0 $\pm$ 3.5)				
DMSO	109.9 $\pm$ 15.4	57.4 $\pm$ 7.2	50.6 $\pm$ 0.5	29.1	2.9 $\pm$ 0.8	4.0 $\pm$ 1.1
		(52.4 $\pm$ 2.3)				
MeOH	151.4 $\pm$ 45.6	77.9 $\pm$ 21.2	50.8 $\pm$ 0.6	26.7	3.6 $\pm$ 0.2	5.1 $\pm$ 0.3
		(51.9 $\pm$ 2.2)				
Glycerol	134.1 $\pm$ 49.0	71.0 $\pm$ 25.8	50.7 $\pm$ 0.9	36.1	2.7 $\pm$ 1.0	3.8 $\pm$ 1.4
		(53.1 $\pm$ 3.3)				

**Table 1.** Summary of the sequencing data obtained in the RRBS analysis. Total raw reads number includes reads 1 and reads 2 (paired end sequencing). Reads with adapter is the number of reads whose insert is shorter than 100 bp. The % mapping efficiency = (number of reads that mapped only once on the trout genome/ trimmed reads number)  $\times$  100. Sequencing depth is the number of times a cytosine has been sequenced, mapped to the reference genome and extracted as a cytosine in CpG sites. The % total genomic cytosines in CpG sites refers to (number of identified cytosines in CpG sites/number of cytosines in CpG sites in the reference genome—i.e.  $70.6 \times 10^6$ )  $\times$  100. Values are expressed as mean  $\pm$  SD of the 12 males in each condition (Fresh, Cryopreserved in DMSO, MeOH, or Glycerol).

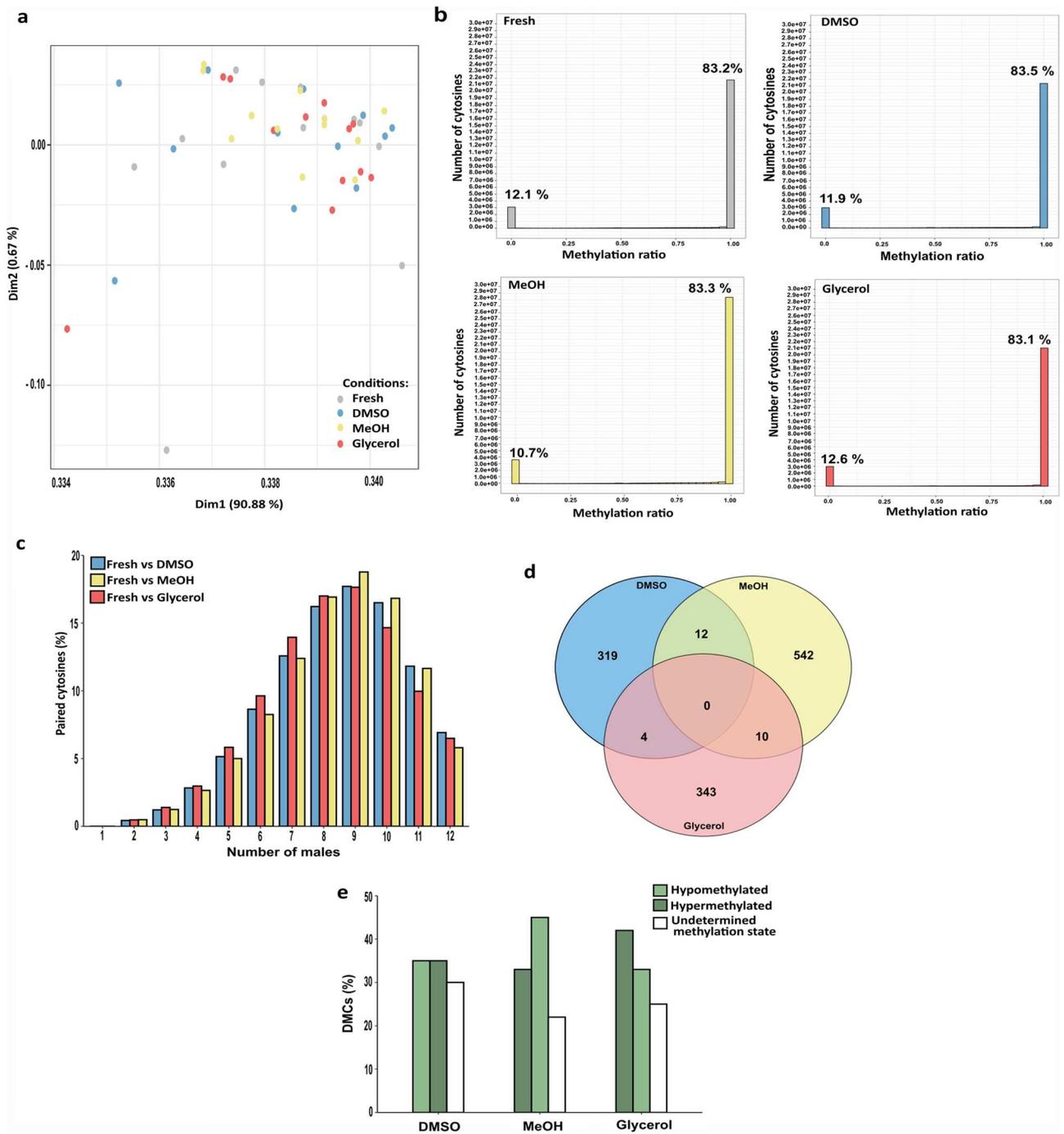


**Figure 2.** Example of the homogeneous distribution of the sequenced cytosines in CpG sites over the reference genome. The displayed region is representative of the pattern observed with all the sequenced data over the whole genome. The chart was obtained with IGV\_2.8.13 and shows the distribution on the chromosome 1 from the position 58,234,274–59,476,270 ( $1.2 \times 10^6$  bases) of the rainbow trout reference genome “Omyk\_1.0 genome version”. Each line corresponds to a different condition in which all the sequenced cytosines (in CpG sites) of all 12 males are represented. Each sequenced cytosine in a CpG site is represented by a bar. The bottom line represents the genes (dark blue) associated to this genomic fraction.

We thus studied the individual methylation ratio of all the cytosines with a sequencing depth  $N \geq 10$ . For all treatments, more than 80% of the analyzed cytosines in CpG sites had a methylation ratio of 1 (Fig. 3b, class 0.95–1). This confirms the highly methylated status of the cytosines in all samples, as shown above in the global results. The second most represented category encompassed the cytosines with a methylation ratio of 0. Only a very small proportion of cytosines had intermediate methylation values, meaning that there is very little variability in the methylation status of the cytosines between spermatozoa within a sample (most are in the binary status of either methylated or unmethylated). When we compared the fresh to the cryopreserved samples, we did not observe any shift between the 3 categories (Fig. 3b, percentages) that would have indicated that some cytosines would have acquired a more variable status among spermatozoa. Besides, no significant difference was found when comparing the 12 fresh samples to any of the cryopreserved ones ( $p > 0.05$ , Kruskal–Wallis test). Thus, if sperm cryopreservation has induced some subtle alterations of the cytosine methylation ratio, it was not detected from this representation.

### Characterization of differentially methylated cytosines (DMCs) after sperm cryopreservation

The differential methylation of cytosines in CpG sites between fresh and cryopreserved samples was characterized using a paired-driven analysis, in order to focus on the cytosines within each male that were read in both the fresh and respectively the DMSO, MeOH and glycerol conditions. This prevented any statistical bias where neighboring cytosines are used in the comparison to compensate for the lack of information at a given site. These cytosines will be referred to as paired cytosines (i.e. a cytosine at a genomic position that is present in both the fresh sperm and the corresponding cryopreserved one). In this analysis, all cytosines with a sequencing depth  $N \geq 1$  were included. We first assessed how many paired cytosines would be shared between the different males. Surprisingly, the highest proportion of these cytosines ( $> 15\%$ ) were shared by 8–10 males (Fig. 3c) whereas fewer



**Figure 3.** Analysis of sperm DNA methylation according to the cryoprotectant. **(a)** Principal Component Analysis showing the distribution of the fresh and cryopreserved sperm samples according to the DNA methylation ratio of each cytosine within each individual sample ( $n = 12$  sperm samples per condition). No clear segregation was observed among the different treatments. **(b)** Frequency plot showing the number of cytosines in CpG sites according to their methylation ratio (0–1) for each condition (fresh and cryopreserved with DMSO, MeOH and glycerol). The x axis shows 20 equal interval values (methylation ratios ranging from 0–0.05 to 0.95–1.0). The percentages written above the classes 0–0.05 and 0.95–1.0 indicate the percentage of the total cytosines in CpG sites in these 2 classes. **(c)** Histogram showing the distribution of the number of paired cytosines according to the number of males sharing them, in each comparison between fresh and cryopreservation with a given cryoprotectant. Results are expressed as a percentage of the total number of paired cytosines (fresh vs DMSO: 748,770; fresh vs MeOH: 1,645,797; fresh vs glycerol: 714,554). **(d)** Venn diagram of differentially methylated cytosines (DMCs) obtained in each comparison between fresh and each cryoprotectant. The numbers indicate the number of DMCs in each group. **(e)** Histogram showing the distribution of the different classes of DMCs in each comparison: hypomethylated (> 50% of males having this DMC as hypomethylated), hypermethylated (> 50% of males having this DMC as hypermethylated) and unclassified methylation status (DMCs whose methylation status between males was too variable to be included into one of the first two classes). Values are expressed as a percentage of total DMCs: (335 in DMSO, 564 in MeOH and 357 in glycerol).

cytosines (<6%) were present in only 1–5 males. Furthermore, the number of paired cytosines shared from 6 to 12 males represented 90% of the total number of paired cytosines. That paired cytosines were found as being more abundant in more males would indicate that some fragments were more prone to be sequenced than others in the majority of the males, although the origin of this phenomenon regarding a possible sequencing bias is difficult to understand. In all, since we wanted to select the highest proportion of paired cytosines, we selected the paired cytosines present in at least 6 males ( $n \geq 6$ ). This threshold also allowed us to strengthen the biological meaning of the DMCs that we may obtain.

When comparing DMSO, MeOH and glycerol to fresh sperm, we found 335, 564 and 357 DMCs, respectively (Fig. 3d). No DMCs were common to the three cryopreservation conditions, and only few DMCs were common to 2 cryoprotectants. None of these DMCs had a straightforward status as we observed that depending on the males, a given DMC could be hyper- or hypomethylated after cryopreservation. In order to sort out some trends in the methylation changes, the DMCs were classified as hypermethylated, or hypomethylated, when they had the same trend in > 50% of the males. As shown in Fig. 3e, cryopreservation with DMSO triggered the same number of hypomethylated and hypermethylated DMCs (35%) whereas in MeOH, more DMCs were hypomethylated (45%) than hypermethylated (33%). A reverse tendency was observed after cryopreservation with glycerol where more DMCs were hypermethylated (42%) than hypomethylated (32%). Some DMCs remained unclassified because they did not show a clear trend among the corresponding males. This emphasizes the fact that cryopreservation did not trigger a homogeneous effect in all the males, and that sperm cryopreservation impact on DNA methylation was different depending on the cryoprotectant.

### Characterization of regions potentially sensitive to cryopreservation

Despite the low DMCs numbers obtained in our cryopreservation conditions, we investigated whether there were any DMRs (differentially methylated regions) between fresh and each cryoprotectant. No DMRs were found after cryopreservation with DMSO and MeOH, whereas only 2 DMRs were observed after cryopreservation with glycerol. Some potentially sensitive regions could have escaped detection by DSS because of the stringency of the chosen settings, where a DMR search requires that at least five consecutive CpGs are present in a sliding 50 bases window. In an empirical approach focused on the DMCs that we have identified, we sought for regions with at least two DMCs separated by no more than 100 bp (our maximum read size). These regions were referred to as potentially sensitive regions. We found 60 of these potentially sensitive regions, present in at least one comparison between cryopreserved sperm and fresh controls. Among them, 17 were sensitive to DMSO, i.e. they contained at least 2 DMCs in the DMSO-fresh comparison, 33 were sensitive to MeOH, and 16 were sensitive to glycerol. One region was affected by all 3 cryoprotectants, and 3 regions were sensitive to both DMSO and MeOH, but not to glycerol.

These regions found to be sensitive to the cryoprotectants were distributed in all genomic regions and these included features such as introns, exons, promoter 5kb (Table 2) and intergenic regions (33 regions, Supplementary Table S1). Some annotated genes were identified in these regions, although the only region common to the 3 cryoprotectants belonged to an intergenic region (8: 79,446,507–591). It is noteworthy that among the regions related to annotated genes (promoters, introns and exons), only 4 of them were affected by DMSO while 12 were affected by MeOH and 12 by glycerol. We found that the distal promoters of *ebf2* and *p4ha1a* genes were affected by cryopreservation with DMSO. Among the promoter regions affected by MeOH, one regulates *u2* gene. The other affected distal promoters were localized in the mitochondrial chromosome. These promoters are related to *cox2*, *cox3*, *nd3*, *nd4*, *nd4l*, *atp6* and *atp8* genes. The *pcdhub* and *slc26a2* genes had their first intron affected as well. We also found that among the distal promoters affected by glycerol, one was associated to *znf385d* gene and another one was associated to *osbpl10* gene. Other genes such as *ptprub* and *ndufs8a* were also affected at their introns by glycerol.

### Relationship between DNA methylation changes and cellular alterations

To explore the possible link between DNA methylation changes after cryopreservation and the corresponding cellular alterations of the same samples, we assessed whether there was a correlation between the number of DMCs and the fertilization rate. Indeed, fertilization ability is a cellular quality parameter that combines several functions of the spermatozoa. This includes its motility capacity, its ability to reach the egg micropyle, its plasma membrane ability to fuse with the egg membrane, its nucleus ability to decondense and to fuse with the female pronucleus, and finally the paternal DNA ability to sustain development up to eyed stage, far later than embryonic genome activation. No significant correlation ( $p > 0.05$ ) was found between the 2 parameters. Because glycerol did not yield any fertilization, thus preventing the testing of some correlation, two other cellular parameters that are plasma membrane quality and mitochondrial activity were also tested. No correlation with DMCs number was found either, whatever the cryoprotectant. Surprisingly, a significant negative correlation was found between DMC number and motility after cryopreservation with DMSO ( $p = 0.04$ , not shown).

### Discussion

Cryopreservation of rainbow trout sperm with 3 different cryoprotectants led to varying pattern of cellular alterations of thawed spermatozoa in our study. Although cryoprotectant comparison for rainbow trout sperm cryopreservation was not the scope of this study, the hierarchy between cryoprotectants that we observed in our study deserves some comments, especially regarding the poor performances of MeOH and glycerol. Indeed, fertilization rates (at eyed stage or at hatching) above 80% have been reported after cryopreservation with MeOH<sup>15–17</sup>, yielding performances comparable to those with DMSO<sup>18–20</sup>. In their thorough comparison, Babiak et al.<sup>21</sup> were proposing that dimethyl acetamide was yielding the best fertilization rates, followed by glycerol, then methanol, but they were also showing that the best cryoprotectant could lose its rank depending on the additives.

Regions	Nb DMCs DMSO	Nb DMCs MeOH	Nb DMCs Gly	Genomic feature	Gene	Gene ID
2: 84,969,754–757	2	0	NA	Introns	NA	ENSOMYG00000033911
3: 28,999,827–911	0	0	4	Promoter 5kb	znf385d	ENSOMYG00000007065
3: 38,641,242–260	0	0	2	Intron 1	ptprub	ENSOMYG00000000944
6: 27,006,900–938	3	0	NA	Promoter 5kb	ebf2	ENSOMYG00000007222
6: 63,230,513–563	0	3	0	Introns	adam10a	ENSOMYG00000010593
9: 13,905,316–359	0	0	2	Exons	NA	ENSOMYG00000012701
9: 40,751,199–319	0	3	0	Promoter 5kb	NA	ENSOMYG00000007596
10: 58,822,172–181	2	NA	NA	Intron 1	NA	ENSOMYG00000026688; ENSOMYG00000026627; ENSOMYG00000026688; ENSOMYG00000026627
14: 50,325,080–136	0	2	0	Intron 1	pcdhh	ENSOMYG00000014270
16: 13,278,338–342	NA	2	NA	Introns	SLC39A11	ENSOMYG00000033173
17: 57,694,790–858	0	2	0	Introns	cdh4	ENSOMYG00000044618
18: 26,437,868–930	NA	NA	7	Promoter 5kb	OSBPL10	ENSOMYG00000025071
19: 14,572,357–390	0	0	2	Exons; intron 1	ndufs8a	ENSOMYG00000005413
19: 43,252,495–511	0	0	2	Promoter 5kb	Ick	ENSOMYG00000032229
19: 45,634,077–080	NA	2	NA	Introns	col12a1a	ENSOMYG00000006853
20: 20,273–301	0	3	1	Downstream	5_8S_rRNA	ENSOMYG00000008170
20: 3,482,719–759	3	NA	0	Introns	cdhr1	ENSOMYG00000009577
20: 13,286,267–314	2	0	1	Promoter 5kb	p4ha1a	ENSOMYG00000043711
20: 30,738,907–987	0	0	3	Introns	khdrbs2	ENSOMYG00000043413
25: 19,063,744–823	0	4	NA	Intron 1	slc26a2	ENSOMYG00000017229
25: 82,566,468–493	NA	1	2	Introns	smoc1	ENSOMYG00000037447
29: 15,383,450–576	NA	11	0	Exon 1	NA	ENSOMYG00000042159
MSJN01,019,798.1: 257,543–574	NA	0	2	Intron 1	NA	ENSOMYG00000040507
MSJN01,053,808.1: 39,504–747	0	0	8	Introns	NA	ENSOMYG00000030867
MSJN01,068,470.1: 831–873	0	2	0	Exon 1; Promoter 5kb	U2	ENSOMYG00000041560; ENSOMYG00000041563
MT: 6657–6754	0	2	0	*:See legend		

**Table 2.** List of the potentially sensitive regions according to the cryoprotectant. The sequenced regions which displayed at least 2 DMCs (differentially methylated cytosines) between fresh and cryopreserved samples within 100 b (read size) in regions others than intergenic were included in this list. Gly: glycerol. Regions: chromosome number and region coordinates on the reference genome. Gene: name from the ensembl database (version 104) according to the reference genome (Omyk\_1.0 genome version). Promoter 5 kb: region 5 kb upstream of the transcription starting site; Exon 1: first exon; Downstream: region 1 kb downstream of the transcription end site; NA: not available. \*the 2 DMCs belonged to the exon1 of *cox1*, downstream of *nd2*, promoter 5 kb of *cox2*, promoter 5kb of *atp8*, promoter 5kb of *atp6*, promoter 5kb of *cox3*, promoter 5kb of *nd3*, promoter 5kb of *nd4l*, promoter 5kb of *nd4*.

It is also known from a model study that the extender composition can reverse the cryoprotectant efficiency<sup>22</sup>. In a previous work, we had observed that MeOH was yielding higher fertilization rates than DMSO<sup>23</sup>, but the additives were different (egg yolk instead of liposomes), and we have never been able to repeat this results with the conditions of the present work. Why MeOH yielded such low sperm motility and fertilization performances after thawing in our study might indeed be due to the composition of our extender (containing liposomes and sucrose). Regarding the plasma membrane integrity parameter, MeOH<sup>24</sup> and DMSO<sup>25,26</sup> are known to alter plasma membrane fluidity and permeability. This is why the spermatozoa were washed before the tests, but it cannot be excluded that propidium iodide exclusion was lessened in membranes previously exposed to MeOH, and this would misleadingly increase the percentage of cells with altered membranes. However, it is difficult to ascertain why the sperm plasma membranes would be more affected by the remnants of MeOH than by those of DMSO, as both are short acyl chain molecules.

Despite our inability to clearly understand the roots of the differences between the tested cryoprotectants, these differences validated our choice of the cryoprotectants, as they induced different cellular responses to cryopreservation. In addition, the variable response towards cryopreservation among fish males revealed an intrinsic biological variability. Such overall variability provided us with a set of samples that was suitable to study the effect of cryopreservation on the molecular parameter that is DNA methylation. The RRBS method used in this study yielded a limited number of cytosines in CpG sites, and this reduced set of data made possible the use

of many biological replicates to explore the impact of sperm cryopreservation on DNA methylation. Our results demonstrated that cryopreservation had no straightforward impact on the global DNA methylation, although it yielded some DMCs between cryopreserved and fresh sperm. Presumed regions that would be more sensitive to cryopreservation were proposed, but few were shared between cryoprotectants.

Our study showed that the extent of the cellular cryoprotection provided by the different cryoprotectants had no related consequence on DNA methylation alteration. Indeed, using either an optimal (DMSO), non-optimal (MeOH) or the worst cryoprotectant (glycerol) did not affect the global DNA methylation in rainbow trout. This is at odds with some other species such as goldfish<sup>10</sup> and European eel<sup>9</sup>, where the optimal cryoprotectant which is MeOH did not alter global DNA methylation assessed by LUMA, while DMSO induced a hypomethylation. Therefore, our study revealed the stability of global DNA methylation towards the cryopreservation whatever the cryoprotectant used in rainbow trout. However, since we used RRBS technique, this allowed us to go further than global methylation and to assess DNA methylation at the nucleotide level.

We observed a limited number of DMCs after sperm cryopreservation, although a high number of paired cytosines was analyzed in each comparison. Besides, we were not able to find any DMR except 2 in glycerol. This further emphasizes how slight is the impact of cryopreservation on sperm DNA methylation in rainbow trout. This failure to detect more DMCs and DMRs is not due to the reduced representation of RRBS used here. Indeed, in a study dealing with rainbow trout physiological adaptation to its environment, 108 DMRs were found in spermatozoa between hatchery and natural origin rainbow trout using the same RRBS technique<sup>27</sup>. We surmise that the impact of hatchery on DNA methylation was important enough to induce many DMCs leading to many DMRs. In our study, since the impact of sperm cryopreservation is tenuous, it yielded a restricted number of DMCs and as a consequence the DMCs were not dense enough to form DMRs. However, despite the limited number of DMCs found in our study, these DMCs are reproducible among the males since they were found in at least 6 males. This reveals the importance of having many biological replicates when assessing the impact of cryopreservation in order to validate the slight impact that can be observed.

Our analysis revealed that cryopreservation induced both hypomethylation and hypermethylation depending on the DMCs. As a consequence, no clear trend could be proposed as to the effect of cryopreservation. In addition, the status of the same DMC differs among the males, and the same male has DMCs with different status. Because of the quiescent state of sperm chromatin, the methylation changes were unlikely mediated by the enzymes responsible for methylation (the DNMTs) and demethylation (the TET pathway). Besides, the process of freezing–thawing of the spermatozoa is too fast for any enzyme being able to catalyze the methylation or demethylation reaction. The hypomethylations and hypermethylations observed in our study were more likely resulting from chemical impact on DNA methylation. Until now, it is still unclear how the cryoprotectants are able to modify the DNA methylation. DMSO is a chemically reactive molecule bearing 2 methyl groups, and it has been shown in an in vitro study that DNA can acquire methyl groups when incubated with DMSO and hydroxyl radicals<sup>28</sup>. In the case of cryopreservation, the releasing of reactive oxygen species by damaged sperm mitochondria may trigger the formation of these hydroxyl radicals and induce this DMSO-associated methylation event. Regarding the demethylation event, it has been shown that 5-mC can be oxidized into 5-hmC in the presence of reactive oxygen species<sup>29,30</sup>. The further transformation of 5-hmC into cytosine was shown to be made possible at high pH<sup>31</sup>. It is known that pH can increase upon freezing of buffered solutions<sup>32</sup>, and it cannot be excluded that a similar change is occurring locally within the cryopreserved spermatozoa. Therefore, demethylation may take place by chemically oxidizing 5-mC, and 5-hmC transformation into a cytosine may be linked to local pH changes during cryopreservation. The puzzling part in all these chemically-induced methylation changes is that both methylation and demethylation took place in the same sperm sample, and we have no clue as how such microreactors are made possible, either within the same nucleus or between nuclei.

Despite the lack of DMRs in our study, we could identify potential sensitive regions in which several cytosines showed methylation changes in one or two cryoprotectants. Some of these regions are related to gene promoter regions that are instrumental to gene proper expression pattern. We focused our discussion on the genes affected by DMSO and MeOH, as glycerol cannot produce any offspring. Interestingly, the genes of promoter regions affected by cryopreservation with DMSO (*ebf2*, *p4ha1a*) are involved in specific processes of embryogenesis. In zebrafish, *ebf2* (early B cell factor 2) is a transcription factor involved in primary neurogenesis in the embryo<sup>33</sup>, where it stabilizes the commitment of the neuronal progenitors. The *p4ha1a* gene (prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I orthologue a) is an ortholog of *p4ha1* whose protein is involved in the regulation of early growth in bone tissues in bighead carp<sup>34</sup>. Regarding the genes whose introns or promoters were affected after cryopreservation with MeOH, some had developmental functions as well (*pcdhb*, *slc26a2*, *u2*). While no function of *pcdhb* and *slc26a2* was described yet in fish, it has been shown in mice that *pcdhb* is involved in the regulation of neural development during the axonal assembly<sup>35</sup> and the axonal convergence into glomeruli in the olfactory bulb<sup>36</sup>. Expression inhibition of *slc26a2* (diastrophic dysplasia sulphate transporter) in mice is altering bone growth<sup>37</sup>, and aberrant methylation of *slc26a2* in human inhibits this gene expression and reduces its protein expression<sup>38</sup>. Concerning *u2*, it has been shown in zebrafish that its protein belongs to the pre-mRNA Retention and Splicing (RES) complex that is fundamental during zebrafish embryogenesis<sup>39</sup>. The other genes (*cox2*, *cox3*, *nd3*, *nd4*, *nd4l*, *atp6* and *atp8*) are involved in the oxidative phosphorylation (OXPHOS) reaction in fish as they belong to different mitochondria respiratory complexes<sup>40–42</sup>. In light of the limited amount of data that was collected for each region, these affected genes represent preliminary clues about a slight impact of cryopreservation on DNA methylation, and provide a basis for further studies on important candidate genes. Recently, one study claimed that differentially methylated genes would be found after cryopreservation of Black Rockfish sperm<sup>43</sup>, but the authors studied CpC dinucleotides instead of CpGs. These dubious methylation results on sites which are not supposed to be methylated in vertebrates unfortunately prevent any comparison with our present data. Indeed, our study was focused on the CpG sites, the only sites whose changes in methylation status are known to have functional consequences in vertebrates.

Our data revealed the absence of a link between alteration of DNA methylation and fertilization ability. The males that had the worst quality for a cellular quality parameter did not necessarily have the highest number of DMCs. This indicates that the damages which altered the spermatozoa functions to a great extent, such as cell dehydration and ice crystal formation<sup>44</sup>, had little effect at the chromatin level. As a consequence, none of the cellular parameters used in this study can be used as markers of the risk of DNA methylation alterations. This lack of correlation can be explained by the general stability of the DNA methylation, validated by the low number of DMCs and the overall maintenance of the global DNA methylation level in all samples.

At this point, it is difficult to estimate whether the slight alterations observed in our study bear any consequence for the progeny. Indeed, our sequencing data reveal the DNA methylation pattern of the whole spermatozoa population, whereas fertilization selects a minor proportion in this population. Among the thawed spermatozoa, there may be some whose DNA methylation was not affected by cryopreservation. If one of these spermatozoa is the one which fertilizes an oocyte, there will be no transmission of any DNA methylation alteration. Nevertheless, if a spermatozoon with an altered DNA methylation pattern did fertilize an oocyte, there may be a risk of transmitting this alteration to the progeny, although the extent of such transmission cannot be predicted. It is known that DNA strand breaks can be repaired by the maternal machinery in rainbow trout, and that in some cases, inhibiting the repair mechanism will increase the post-hatching mortality rate<sup>45</sup>. However, nothing is known yet about DNA methylation repair after fertilization, and what would be the template to direct this repair. It was shown in zebrafish that specific histone variants in the spermatozoa (H2AFV) transmit the hypomethylated status of some DNA loci to the early embryo<sup>3</sup>. These variants stabilize the DNA hypomethylated status of these loci by deterring DNA methylation. However, we do not know whether these variants can protect their DNA loci from the spurious methylation induced by cryopreservation. If not, these variants may still be able to redirect a proper DNA demethylation in the embryo, as they did in maternal haploids<sup>3</sup>. The existence of such a speculative DNA methylation repair mechanism in the embryo would be strengthened if demonstrations were made that spermatozoa with experimentally altered DNA methylation do not sire abnormal or unviable embryos. However, to the best of our knowledge, we could not find such evidences, apart from the study on xenopus embryos sired with spermatids, whose DNA methylation profile differs from that of the spermatozoa, and where abnormal and reduced developments were observed<sup>46</sup>.

Regarding the slight modifications obtained after cryopreservation in our study, if the offspring is to inherit the altered DNA methylation pattern of the spermatozoa due to the lack of repair mechanism, and that the affected genes are essential for embryo development, this should induce some increased embryonic mortalities. However, fertilization with cryopreserved sperm in rainbow trout was reported to be harmless regarding embryo development, once fertilization is triggered<sup>47,48</sup>. It cannot be excluded however that non-lethal long-term effect could be transmitted. For example, rainbow trout embryos sired with cryopreserved spermatozoa had altered expression of several marker genes<sup>49</sup>, reduced growth two weeks after hatching<sup>50</sup>, and their stress resistance was modified at later stages<sup>51</sup>. In all, the effect of sperm DNA methylation changes on the progeny is utterly difficult to assess. Indeed, when the effect is not immediately made visible by increased embryonic mortalities, or by obviously reduced growth rates after hatching, the biological targets can be multiparametric, or adopt a wide range of symptoms in a wide range of tissues over the whole life of the individual. This is the case for example with artificial reproductive technologies (ART) in human (reviewed in<sup>52</sup>), including when in some cases, ART-induced epigenetic defects resolves at later age<sup>53</sup>. In another context, changes in zebrafish sperm DNA methylation (induced by F0 male exposure to mercury) were associated with far off symptoms that were hyperactivity and retinal dysfunction of their adult progeny (F2)<sup>54</sup>. Farmers may be more interested in checking stress and disease coping abilities, feed conversion and growth ability etc., but such criteria, already assessed in selective breeding schemes, are often very difficult to separate from the environmental specificities the individual were reared in<sup>55</sup>. Besides, it is now accepted that spermatozoa is transmitting a large variety of information to the progeny, including clues on the life of the father (reviewed in<sup>56</sup>), thereby adding another difficulty to assess the extent of the transmission that may not be solely related to DNA methylation alteration. Additionally, it was shown in Atlantic salmon that small changes in the fertilization procedure, for example spermatozoa number, induced some changes in the offspring characteristics<sup>57</sup>, likely by changing the fertilizing sub-population of spermatozoa. Another unexpected difficulty to sort out epigenetic effect was shown in cattle, where sperm DNA was experimentally damaged (oxidative stress)<sup>58</sup>. The authors showed that, although the damage had no link with DNA methylation changes in the spermatozoon, it reduced the paternal chromatin ability to be demethylated during early development of the embryo.

In all, as long as epidemiological studies are not set up, it is only when altered genes are identified in the gametes that a candidate analysis can be performed in the progeny. This enforces the strategy chosen in the present work, that was to test in the spermatozoa first whether some important genomic sites would be repeatedly and consistently affected by cryopreservation. We observed only marginal modifications, that were variable in their expression between individuals, and that were not related to the intensity of the cellular damages induced by cryopreservation. At this stage of our knowledge, this would indicate that cryopreservation of rainbow trout spermatozoa is not triggering DNA methylation damages that would bear a high risk for the progeny.

## Material and methods

### Ethics statement

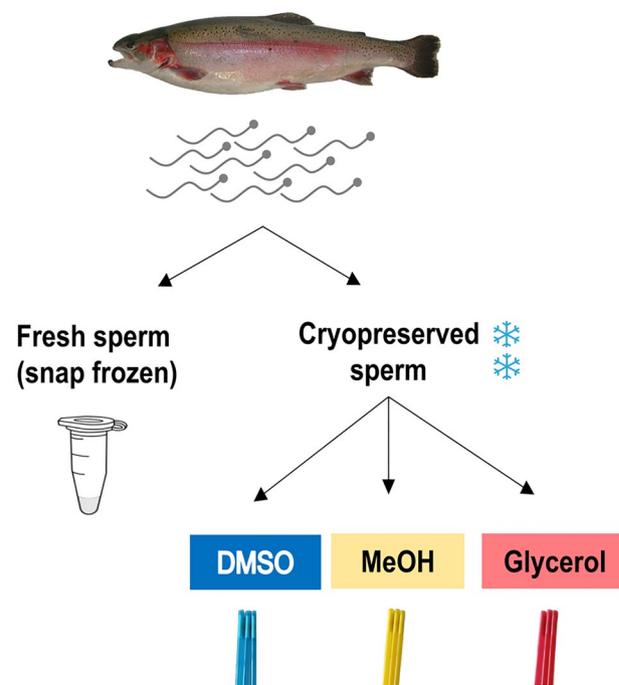
Rainbow trout males from the synthetic strain were kept in the experimental fish facilities ISC LPGP of INRAE (Agreement number D-35-238-6) with full approval for experimental fish rearing in strict line with French and European Union Directive 2010/63/EU for animal experimentation. The Institutional Animal Care and Use Ethical Committee in Rennes LPGP (Fish Physiology and Genomics Department) specifically approved this study (n° T-2020-37-CL). All fish were handled for gamete collection in strict accordance with the guidelines

of the Institutional Animal Care and Use Ethical Committee in Rennes LPGP (Fish Physiology and Genomics Department). CL is accredited by the French Veterinary Authority for fish experimentation (no. 005239). The animal study is reported in accordance with ARRIVE guidelines (<https://arriveguidelines.org>) for animal research.

### Sperm collection and cryopreservation

Rainbow trout from the SYNTHETIC INRAE strain were sired in January 2019 at the experimental fish farm UE PEIMA of INRAE. After development in natural spring water in the dark up to hatching, they were transferred into indoor tanks supplied with the same water, under natural photoperiod. At 4 months post fertilization, they were transferred into outdoor tanks supplied with dam water. They were fed ad libitum with commercial pellets (Le Gouessant B-Repro 32 ASTX—semi F7). After 2 years (January 2021) the males (average weight 1.2 kg) were transferred to the ISC LPGP fish facility. After 2 weeks in recirculated water tanks (fiberglass, 12 °C, winter photoperiod, same feeding as in the fish farm), 12 fish were anaesthetized, and their sperm was collected by gentle stripping and stored individually on ice. All sperm samples were treated individually (12 biological replicates in every analyses). They all had high motility and high membrane quality percentages (mean of the 12 males:  $99.92 \pm 0.2$  and  $98.05 \pm 0.84$  respectively). Fresh sperm concentration was adjusted to  $6 \times 10^9$  spermatozoa/mL in SFMM (Seminal Fluid-like Mineral Medium: 110 mM NaCl, 28.3 mM KCl, 1.1 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.8 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM Bicine, 10mM Hepes sodium salt, pH 8), and a fraction ( $50 \times 10^6$  spermatozoa) was snap-frozen in liquid nitrogen prior to storage at  $-80$  °C. This fraction was referred to as fresh sample, as it was not submitted to the whole cryopreservation process (no exposure to cryoprotectant, no slow freezing and thawing and no associated cellular constraints<sup>44</sup>). The remaining sperm sample was split into 3 fractions to be cryopreserved with one of the three penetrating cryoprotectants dimethylsulfoxide (DMSO), methanol (MeOH) and glycerol (Fig. 4).

Sperm cryopreservation was carried out with the FreezeFish kit (IMV Technologies ref 026913). One volume of sperm at  $6 \times 10^9$  cells/ml was mixed with one volume of each cryopreservation solution (buffered saline with sucrose and liposomes and one of the three penetrating cryoprotectant: DMSO, MeOH or glycerol). The final cryoprotectant concentration with the spermatozoa was 7.5% (vol %) and the final concentration of liposomes (Freezelip) was 1.75% (vol %). The mix of sperm suspension with each cryopreservation solution was loaded into 500  $\mu\text{L}$  French straws (36–48 straws per male and 144–192 per condition). Straws were cryopreserved in the programmable freezer Micro DigitCool according to a fast-freezing curve (bovine curve, IMV Technology,  $-4^\circ/\text{min}$  up to  $-12$  °C,  $-40^\circ/\text{min}$  up to  $-110$  °C, and  $-20^\circ/\text{min}$  up to  $-140$  °C) and were then stored into liquid nitrogen until use. All males were treated at the same time in the same cryopreservation session. Thus, the time between sperm collection and sperm treatment (60 min), and between sperm mixing with each of the 3 cryoprotectant and cryopreservation (40 min) was the same for all males.



**Figure 4.** Experimental design. One sperm sample from each rainbow trout male ( $n = 12$ ) was split into 4 fractions: one fraction was snap frozen in liquid nitrogen and used as fresh control. The 3 other fractions were cryopreserved, each one with a different cryoprotectant: dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol (MeOH), and glycerol.

When needed, the straws were thawed in a water bath at 37 °C for 10 s. Thawed sperm was then washed by dilution with SFMM (1 vol + 20 vol) and centrifugation at 200 g for 10 min at 4 °C. The pellet was resuspended at  $100 \times 10^6$  cells/mL in SFMM unless otherwise stated, and maintained on ice before use.

### Membrane quality

Membrane integrity of the spermatozoa was assessed from their ability to exclude the fluorescent probe propidium iodide. Fresh and washed frozen-thawed sperm samples diluted at  $1 \times 10^6$  cells/mL were incubated with propidium iodide (final concentration 12  $\mu$ M) for 2 min and the percentage of unstained cells (cells with intact plasma membranes) was assessed by flow cytometry (MACSQuant Analyzer 10, Ref 130-096-343). Measurements were performed in duplicate on each sperm sample, using two different sperm suspensions in propidium iodide, within 1 h after thawing.

### Mitochondria quality

Mitochondrial membrane potential of the sperm samples was assessed with the JC-1 fluorescent probe using the kit "MitoProbe™ JC-1 Assay Kit for Flow Cytometry (M34152, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Diluted sperm in SFMM was incubated for 15 min at 20 °C with JC-1 at a final concentration of 0.5  $\mu$ M. JC-1 fluorescence was then measured by flow cytometry (MACSQuant Analyzer 10). The population with the highest red and green fluorescence was selected as the one whose spermatozoa had high quality mitochondria, and its representation was given as a percentage of the whole sperm population. Each sperm sample was measured in triplicates within 1 h after thawing.

### Motility

Thawed spermatozoa motility was assessed using a Computer-assisted Sperm Analysis (CASA) IVOS II using the software HTCasaII (IMV Technologies). The measurements were performed in triplicates for each sperm sample within 3 min post thawing on unwashed spermatozoa. For each replicate, 10  $\mu$ L of thawed sperm ( $2.4 \times 10^9$  spz/mL) were activated with 600  $\mu$ L of Actifish (IMV Technologies), and a fraction (2.8  $\mu$ L) was loaded within 10 s into the chamber of a Leja slide (Leja®, REF. 025107-025108). Motility was recorded from 10 to 15 s post activation (8 movies of 30 pictures at a speed of 60 pictures/min), and spermatozoa with an average path velocity (VAP)  $\geq 30$   $\mu$ m/s were counted as motile. Results are expressed as a percentage of motile spermatozoa.

### Fertilization ability

The fertilization test was conducted by adding 100  $\mu$ L of thawed unwashed spermatozoa and 10 mL of Actifish (IMV Technologies) to approximately 150 oocytes ( $2 \times 10^6$  spermatozoa/oocyte). As a control for the quality of the oocytes, 25  $\mu$ L of fresh sperm and 10 mL of Actifish (IMV Technologies) were added to approximately 150 oocytes every 8 fertilization tests. All sperm samples (12 males  $\times$  3 cryopreservation conditions and the fresh controls) were tested for fertilization on the same egg batch obtained from the pool of 30 spawns (spring strain females from UE PEIMA, 3 years old). The spawns were collected one day before the experiment and transported over night at 4 °C under oxygen to ISC LPGP. After fertilization, eggs were incubated in the dark at 10 °C in recirculated water at the fish facility ISC LPGP. Fertilization rates were assessed from the development rates at eyed stage (about 20 days post fertilization). To do so, the eggs of each fertilization test were transferred into a petri dish and a picture was taken. The total number of eggs was counted with the macro VisEgg<sup>59</sup> on Fiji-ImageJ while the number of fertilized oocytes (embryos with developed eyes) was manually counted with the Fiji-ImageJ counter. Fertilization percentage was calculated by the following formula: (number of fertilized eggs/total number of eggs  $\times$  100). The normalized fertilization percentage used in the results correspond to: fertilization rate of each sample/average fertilization rate of fresh sperm  $\times$  100.

### Statistical analyses

Significant differences between cryoprotectants were assessed with the non-parametric Kruskal and Wallis test (multiparametric) followed by a two ways comparison with the Mann and Whitney test. Significance threshold are indicated in the figures, but the highest p value accepted is 0.05. Data representation was made using the non-parametric whisker box-plots, the whiskers indicating the minimum and maximum values, and the box showing, from bottom to top, the first quartile, the median, and the third quartile.

### DNA extraction

Fresh spermatozoa previously snap-frozen ( $50 \times 10^6$  spermatozoa) were thawed by adding 800  $\mu$ L of warm (42 °C) DNA releasing medium containing TNES buffer (125 mM NaCl, 10 mM EDTA, 17 mM SDS, 4 M urea, 10 mM Tris-HCl, pH 8) and proteinase k (P6556; Sigma-Aldrich) at 75  $\mu$ g/mL (final concentration). Thawed washed spermatozoa ( $4 \times 10^6$  spermatozoa) were mixed with 800  $\mu$ L of DNA releasing medium. All samples were digested overnight at 42 °C. After cooling, 800  $\mu$ L of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1 vol) were added to the 800  $\mu$ L of digested spermatozoa. After gentle shaking for 15 min at room temperature, the two phases were separated by centrifugation for 15 min at 8000g at 4 °C. A fraction of 400  $\mu$ L of the upper aqueous phase was mixed with 100  $\mu$ L NaCl 5 M in water and 1 mL cold 100% ethanol and incubated for 15 min at room temperature prior to centrifugation for 15 min at 12,000g at 4 °C. The DNA pellet was washed with 100  $\mu$ L 75% ethanol and centrifuged for 15 min at 12,000g at 4 °C. The new DNA pellet was left to air dry. It was then resuspended in RNase (A7973; Promega) 100  $\mu$ g/mL final concentration in nuclease-free water and incubated for 1 h at 37 °C. DNA concentration was measured with the Qubit3 Fluorometer-Invitrogen by Thermo Fisher Scientific

using the Qubit™ dsDNA BR Assay kit (REF Q32853, invitrogen by Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

For practical reasons, the same thawed sperm was used for membrane quality assessment and for DNA extraction. In parallel, the same thawed sperm but from different straws was used for motility and mitochondria quality assessment.

### RRBS library preparation, sequencing and data processing

DNA digestion with MspI, library preparation and bisulfite conversion of the 48 samples (12 males × 4 conditions) using Diagenode Premium RRBS kit were performed by the Integragen company (Evry, France). Paired-end sequencing (100 b read length) was carried out by the company on Illumina NovaSeq™ 6000, with S2 patterned flow cells. Because of some difficulties with the first sequencing round (too many reads with adapters, indicating too short inserts), some samples have been resequenced after some changes in fragment size selection. These yielded an average of  $66.5 \times 10^6$  paired end raw reads ( $133 \times 10^6$  total raw reads). The sequencing quality of the raw data was checked with FastQC program (version: FastQC\_v0.11.7) (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Raw reads were trimmed using Trim Galore to remove adaptor sequences, the bases added during RRBS library preparation, and the bases with a phred score < 30 (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore> version: TrimGalore-0.6.5). In order to exclude any risk of overestimation of DNA methylation due to a low bisulfite conversion (< 98%), we calculated the bisulfite conversion rate and found a mean value 99.6%.

Using bowtie2 aligner (version: bowtie 2-2.3.5.1) available in Bismark bio-informatic software<sup>60</sup>, trimmed reads were aligned to the reference genome (Omyk\_1.0 genome version). Methylation status of every cytosine in CpG sites was extracted using “bismark\_methylation\_extractor”. These steps are available in the workflow which agrees to FAIR principles and is accessible online (<https://forgemia.inra.fr/lpgp/methylome>). All the samples had a median sequencing depth of the cytosines in CpG sites above 18 (Table 1) indicating that the data per sample was sufficient. To visualize methylation levels distribution on the reference genome, BigWig files were obtained with bedGraphToBigWig<sup>61</sup> and methylation values were visualized with Integrative Genome Viewer<sup>62</sup>. Because both 5-mC and 5-hmC are protected from bisulfite conversion into uracil<sup>63,64</sup>, the cytosines claimed to be methylated in this RRBS study are in fact either methylated or hydroxy methylated, and the information about the proportion of 5-hmC is not available. However, because 5-hmC are mainly found at an early step of the demethylation process (reviewed by Kohli and colleagues<sup>65</sup>), we consider that their merging with 5-mC did not induce any bias in the interpretation of the data.

For the identification of differentially methylated cytosines (DMCs), the paired design of DSS general experimental design from DSS<sup>66,67</sup> was used. For the DMCs detection, all cytosines with a sequencing depth  $N \geq 1$  were included in the analysis. Indeed, almost all cytosine sites are either completely methylated or unmethylated (Fig. 3b), meaning that averaging the methylation status of several cytosines at the same site is not absolutely mandatory. In addition, DSS was also used to detect the differentially methylated regions (DMRs). The criteria used to determine the DMRs were to have a sliding sequence of at least 50 bases with  $\geq 5$  CpGs with a minimum of 75% DMCs (with p-value < 0.001). Ven diagram was created using Jvarkit<sup>68</sup>, a web-based tool. The position of the DMCs within genomic features and the identity of the genes corresponding to regions potentially sensitive to cryopreservation was obtained by annotating DMCs with GenomeFeatures<sup>69</sup> and ensembl v104.1 annotation.

### Data availability

The data for this study has been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI under accession number PRJEB60579 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB60579>).

Received: 11 August 2023; Accepted: 12 October 2023

Published online: 03 November 2023

### References

- Potok, M. E., Nix, D. A., Parnell, T. J. & Cairns, B. R. Reprogramming the maternal zebrafish genome after fertilization to match the paternal methylation pattern. *Cell* **153**, 759–772 (2013).
- Jiang, L. *et al.* Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell* **153**, 773–784 (2013).
- Murphy, P. J., Wu, S. F., James, C. R., Wike, C. L. & Cairns, B. R. Placeholder nucleosomes underlie germline-to-embryo DNA methylation reprogramming. *Cell* **172**, 993–1006.e13 (2018).
- Kläver, R. *et al.* Routine cryopreservation of spermatozoa is safe—Evidence from the DNA methylation pattern of nine spermatozoa genes. *J. Assist. Reprod. Genet.* **29**, 943–950 (2012).
- Khosravizadeh, Z. *et al.* The effect of cryopreservation on DNA methylation patterns of the chromosome 15q11–q13 region in human spermatozoa. *Cell Tissue Bank.* **21**, 433–445 (2020).
- Khosronezhad, N., Hassanzadeh, V., Hezavehei, M., Shahverdi, A. & Shahhoseini, M. Comparative epigenetic analysis of imprinting genes involved in fertility, in cryopreserved human sperms with rapid freezing versus vitrification methods. *Cell J. Yakhteh* **25**, 238–246 (2023).
- Güngör, B. H. *et al.* Effect of freeze-thawing process on lipid peroxidation, miRNAs, ion channels, apoptosis and global DNA methylation in ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* **33**, 747–759 (2021).
- Aurich, C., Schreiner, B., Ille, N., Alvarenga, M. & Scarlet, D. Cytosine methylation of sperm DNA in horse semen after cryopreservation. *Theriogenology* **86**, 1347–1352 (2016).
- Herranz-Jusado, J. G. *et al.* Comparison of European eel sperm cryopreservation protocols with standardization as a target. *Aquaculture* **498**, 539–544 (2019).
- Depincé, A. *et al.* DNA methylation stability in fish spermatozoa upon external constraint: Impact of fish hormonal stimulation and sperm cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* **87**, 124–134 (2020).
- de Mello, F. *et al.* The effect of cryoprotectant agents on DNA methylation patterns and progeny development in the spermatozoa of *Colossoma macropomum*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **245**, 94–101 (2017).
- Chavanne, H. *et al.* A comprehensive survey on selective breeding programs and seed market in the European aquaculture fish industry. *Aquac. Int.* **24**, 1287–1307 (2016).

13. Vandeputte, M. *et al.* Realised genetic gains on growth, survival, feed conversion ratio and quality traits after ten generations of multi-trait selection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, fed a standard diet or a “future” fish-free and soy-free diet. *Aquac. Rep.* **27**, 101363 (2022).
14. Martínez-Páramo, S. *et al.* Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture* **472**, 156–177 (2017).
15. Ciereszko, A., Dietrich, G. J., Nynca, J., Dobosz, S. & Zalewski, T. Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. *Aquaculture* **420–421**, 275–281 (2014).
16. Judycka, S., Ciereszko, A., Dobosz, S., Zalewski, T. & Dietrich, G. J. Effect of dilution in sperm maturation media and time of storage on sperm motility and fertilizing capacity of cryopreserved semen of sex-reversed female rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **245**, 89–93 (2017).
17. Judycka, S., Nynca, J., Hliwa, P. & Ciereszko, A. Characteristics and cryopreservation of semen of sex-reversed females of salmonid fish. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 964 (2021).
18. Ciereszko, A. & Dabrowski, K. Effect of a sucrose-DMSO extender supplemented with pentoxifylline or blood plasma on fertilizing ability of cryopreserved rainbow trout spermatozoa. *Progress. Fish-Cult.* **58**, 143–145 (1996).
19. Kutluyer, F., Kayim, M., Ögretmen, F., Büyükleblebici, S. & Tuncer, P. B. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: Effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. *Cryobiology* **69**, 462–466 (2014).
20. Cabrita, E., Robles, V., Alvarez, R. & Herraes, M. P. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: Application to large scale fertilization. *Aquaculture* **201**, 301–314 (2001).
21. Babiak, I. *et al.* Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology* **56**, 177–192 (2001).
22. Labbe, C., Crowe, L. M. & Crowe, J. H. Stability of the lipid component of trout sperm plasma membrane during freeze-thawing. *Cryobiology* **34**, 176–182 (1997).
23. Horvath, A. *et al.* Post-thaw storage of sperm from various salmonid species. *J. Appl. Ichthyol.* **31**, 119–124 (2015).
24. Ly, H. V. & Longo, M. L. The influence of short-chain alcohols on interfacial tension, mechanical properties, area/molecule, and permeability of fluid lipid bilayers. *Biophys. J.* **87**, 1013–1033 (2004).
25. Notman, R., Noro, M., O'Malley, B. & Anwar, J. Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 13982–13983 (2006).
26. Gironi, B. *et al.* Effect of DMSO on the mechanical and structural properties of model and biological membranes. *Biophys. J.* **119**, 274–286 (2020).
27. Gavery, M. R., Nichols, K. M., Goetz, G. W., Middleton, M. A. & Swanson, P. Characterization of Genetic and Epigenetic Variation in Sperm and Red Blood Cells from Adult Hatchery and Natural-Origin Steelhead, *Oncorhynchus mykiss*. *G3 Bethesda Md* **8**, 3723–3736 (2018).
28. Kawai, K., Li, Y.-S., Song, M.-F. & Kasai, H. DNA methylation by dimethyl sulfoxide and methionine sulfoxide triggered by hydroxyl radical and implications for epigenetic modifications. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 260–265 (2010).
29. Castro, D., Gbmez, M. I. D. & Castro, J. A. S. Methylcytosine attack by hydroxyl free radicals and during carbon tetrachloride promoted liver microsomal lipid peroxidation: structure of reaction products.
30. Madugundu, G. S., Cadet, J. & Wagner, J. R. Hydroxyl-radical-induced oxidation of 5-methylcytosine in isolated and cellular DNA. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7450–7460 (2014).
31. Alegria, A. H. Hydroxymethylation of pyrimidine mononucleotides with formaldehyde. *Biochim. Biophys. Acta* **149**, 317–324 (1967).
32. Kolhe, P., Amend, E. & K. Singh, S. Impact of freezing on pH of buffered solutions and consequences for monoclonal antibody aggregation. *Biotechnol. Prog.* **26**, 727–733 (2010).
33. Bally-Cuif, L., Dubois, L. & Vincent, A. Molecular cloning of *Zco2*, the zebrafish homolog of *Xenopus Xco2* and mouse *EBF-2*, and its expression during primary neurogenesis. *Mech. Dev.* **77**, 85–90 (1998).
34. Luo, W., Zhou, Y., Wang, J., Yu, X. & Tong, J. Identifying candidate genes involved in the regulation of early growth using full-length transcriptome and RNA-Seq analyses of frontal and parietal bones and vertebral bones in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Front. Genet.* **11**, 603454 (2021).
35. Hasegawa, S. *et al.* Clustered protocadherins are required for building functional neural circuits. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 114 (2017).
36. Mountoufaris, G. *et al.* Multicuster *Pcdh* diversity is required for mouse olfactory neural circuit assembly. *Science* **356**, 411–414 (2017).
37. Forlino, A. *et al.* A diastrophic dysplasia sulfate transporter (SLC26A2) mutant mouse: Morphological and biochemical characterization of the resulting chondrodysplasia phenotype. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 859–871 (2005).
38. Inoue, A. *et al.* B-RAF mutation and accumulated gene methylation in aberrant crypt foci (ACF), sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) and cancer in SSA/P. *Br. J. Cancer* **112**, 403–412 (2015).
39. Fernandez, J. P. *et al.* RES complex is associated with intron definition and required for zebrafish early embryogenesis. *PLoS Genet.* **14**, e1007473 (2018).
40. Zhao, Y., Xie, P., Fan, H. & Zhao, S. Impairment of the mitochondrial oxidative phosphorylation system and oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus* L.) exposed to microcystins. *Environ. Toxicol.* **29**, 30–39 (2014).
41. Consuegra, S., John, E., Verspoor, E. & de Leaniz, C. G. Patterns of natural selection acting on the mitochondrial genome of a locally adapted fish species. *Genet. Sel. Evol.* **47**, 58 (2015).
42. Uddin, A., Mazumder, T. H., Barbhuiya, P. A. & Chakraborty, S. Similarities and dissimilarities of codon usage in mitochondrial ATP genes among fishes, aves, and mammals. *IUBMB Life* **72**, 899–914 (2020).
43. Niu, J. *et al.* Effects of cryopreservation on sperm with cryodiluent in viviparous Black Rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 3392 (2022).
44. Labbé, C., Robles, V. & Herraes, M. P. 3—Cryopreservation of gametes for aquaculture and alternative cell sources for genome preservation. in *Advances in Aquaculture Hatchery Technology* (eds. Allan, G. & Burnell, G.) 76–116 (Woodhead Publishing, 2013). <https://doi.org/10.1533/9780857097460.1.76>.
45. Pérez-Cereales, S., Martínez-Páramo, S., Beirão, J. & Herráez, M. P. Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. *Reprod. Camb. Engl.* **139**, 989–997 (2010).
46. Teperek, M. *et al.* Sperm is epigenetically programmed to regulate gene transcription in embryos. *Genome Res.* **26**, 1034–1046 (2016).
47. Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A. & Maise, G. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol. Reprod. Dev.* **60**, 397–404 (2001).
48. Young, W. P., Frenyea, K., Wheeler, P. A. & Thorgaard, G. H. No increase in developmental deformities or fluctuating asymmetry in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced with cryopreserved sperm. *Aquaculture* **289**, 13–18 (2009).
49. Pérez-Cereales, S., Gutiérrez-Adán, A., Martínez-Páramo, S., Beirão, J. & Herráez, M. P. Altered gene transcription and telomere length in trout embryo and larvae obtained with DNA cryodamaged sperm. *Theriogenology* **76**, 1234–1245 (2011).
50. Nusbaumer, D., Marques Da Cunha, L. & Wedekind, C. Sperm cryopreservation reduces offspring growth. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **286**, 20191644 (2019).

51. Hayes, M. C., Rubin, S. P., Hensleigh, J. E., Reisenbichler, R. R. & Wetzel, L. A. Performance of juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced from untreated and cryopreserved milt. *Aquaculture* **249**, 291–302 (2005).
52. Chen, M. & Heilbronn, L. K. The health outcomes of human offspring conceived by assisted reproductive technologies (ART). *J. Dev. Orig. Health Dis.* **8**, 388–402 (2017).
53. Novakovic, B. *et al.* Assisted reproductive technologies are associated with limited epigenetic variation at birth that largely resolves by adulthood. *Nat. Commun.* **10**, 3922 (2019).
54. Iii, M. J. C. *et al.* Mercury-induced epigenetic transgenerational inheritance of abnormal neurobehavior is correlated with sperm epimutations in zebrafish. *PLOS ONE* **12**, e0176155 (2017).
55. Dupont-Nivet, M. *et al.* Heritabilities and GxE interactions for growth in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) using a marker-based pedigree. *Aquaculture* **275**, 81–87 (2008).
56. Evans, J. P., Wilson, A. J., Pilastro, A. & Garcia-Gonzalez, F. Ejaculate-mediated paternal effects: Evidence, mechanisms and evolutionary implications. *Reproduction* **157**, R109–R126 (2019).
57. Immler, S., Hotzy, C., Alavioon, G., Petersson, E. & Arnqvist, G. Sperm variation within a single ejaculate affects offspring development in Atlantic salmon. *Biol. Lett.* **10**, 20131040 (2014).
58. Wyck, S. *et al.* Oxidative stress in sperm affects the epigenetic reprogramming in early embryonic development. *Epigenetics Chromatin* **11**, 60 (2018).
59. Cardona, E., Bugeon, J., Segret, E. & Bobe, J. VisEgg: A robust phenotyping tool to assess rainbow trout egg features and viability. *Fish Physiol. Biochem.* **47**, 671–679 (2021).
60. Krueger, F. & Andrews, S. R. Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* **27**, 1571–1572 (2011).
61. Kent, W. J., Zweig, A. S., Barber, G., Hinrichs, A. S. & Karolchik, D. BigWig and BigBed: Enabling browsing of large distributed datasets. *Bioinform. Oxf. Engl.* **26**, 2204–2207 (2010).
62. Robinson, J. T. *et al.* Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* **29**, 24–26 (2011).
63. Huang, Y. *et al.* The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS One* **5**, e8888 (2010).
64. Nestor, C., Ruzov, A., Meehan, R. & Dunican, D. Enzymatic approaches and bisulfite sequencing cannot distinguish between 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in DNA. *BioTechniques* **48**, 317–319 (2010).
65. Kohli, R. M. & Zhang, Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* **502**, 472–479 (2013).
66. Feng, H., Conneely, K. N. & Wu, H. A Bayesian hierarchical model to detect differentially methylated loci from single nucleotide resolution sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **42**, e69 (2014).
67. Wu, H. *et al.* Detection of differentially methylated regions from whole-genome bisulfite sequencing data without replicates. *Nucleic Acids Res.* **43**, e141 (2015).
68. Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, C. & Klopp, C. jvenn: An interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinf.* **15**, 293 (2014).
69. Brionne, A. GenomeFeatures: A convenient tool for multiple genomic features annotations.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the skillful involvement of the staff from the ISC LPGP and UE PEIMA at INRAE for animal rearing and care. The authors gratefully acknowledge the help of Jerome Bugeon who devised the automatic counting of eggs. MEK is recipient of a PhD fellowship ARED from region Bretagne and INRAE PHASE (EPICRYSP 2020-2023). AS is recipient of the internal funding scheme at Norwegian University of Life Sciences (project number 1211130114), which financed his international stay at INRAE LPGP, France. This work was funded by the French CRB Anim project ANR-11-INBS-0003 and the European FEAMP BIOGERM measure 47 (Innovation Aquaculture).

## Author contributions

M.E.K. organized and carried out the study, analyzed and interpreted the data, and drafted the manuscript. A.B. taught and supervised the bioinformatic work of M.E.K., and contributed to the bio-informatic analyses. A.S. contributed to the wet lab experiments. A.L. and C.L. conceived, designed and supervised the study. C.L. supervised the writing of the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44803-2>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to A.L. or C.L.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

## Annexe 2 : Communications orales

Les avancés des travaux de la thèse ont été présentées sous forme de communication orale lors d'un congrès et des journées scientifiques :

- 1) 7<sup>ème</sup> journée d'animation scientifique autour de l'épigénétique (épiPHASE) : 20-21 juin 2022, Rennes, France.
- 2) Journée scientifique de l'école doctorale EGAAL : 1<sup>e</sup> juillet 2022, Rennes, France
- 3) Congrès « 8<sup>th</sup> International Workshop on the Biology of Fish Gametes, 19<sup>th</sup>–23<sup>th</sup> September 2022, Gdansk, Pologne ». J'ai également reçu le 2<sup>e</sup> prix pour la meilleure présentation orale.

Le résumé ci-dessous offre un aperçu des résultats qui ont été présentés au cours de ces communications orales.

### **CRYOPRESERVATION AFFECTS CELLULAR QUALITY BUT NOT DNA METHYLATION PROFILE IN RAINBOW TROUT SPERMATOZOA.**

**Marina EL KAMOUH<sup>1\*</sup>**, Aurélien BRIONNE<sup>1</sup>, Audrey LAURENT<sup>1</sup>, Catherine LABBÉ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRAE, Fish Physiology and Genomics, UR 1037, Rennes, France

[marina.el-kamouh@inrae.fr](mailto:marina.el-kamouh@inrae.fr); [aurelien.brionne@inrae.fr](mailto:aurelien.brionne@inrae.fr); [audrey.laurent@inrae.fr](mailto:audrey.laurent@inrae.fr); [catherine.labbe@inrae.fr](mailto:catherine.labbe@inrae.fr)

Sperm cryopreservation is a widely used biotechnology in fish. In the spermatozoa, DNA bears the genotype of the donor male, whose transmission to the progeny will allow the restoration of valuable genetic resources. Additionally, it is now known that fish spermatozoa epigenetic profile, particularly DNA methylation, is transmitted to the embryo. As a consequence, any alteration of DNA methylation in spermatozoa induces the risk of transmitting epigenetic alterations to the offspring leading to altering the progeny. Published data on cryopreservation impact on DNA methylation are limited and contradictory because they are species and cryoprotectant dependent. The aim of this study is to assess whether cryopreservation of rainbow trout spermatozoa can alter their DNA methylation profile and whether the thawed sperm cellular quality is related to DNA methylation alterations. We also wanted to investigate whether the cryoprotectant molecules play a role in DNA methylation alterations. Sperm from rainbow trout mature males (n=12) was cryopreserved with dimethylsulfoxide (DMSO), methanol (MeOH) or glycerol and compared to fresh sperm. Thawed spermatozoa quality was assessed from their plasma membrane integrity and fertilization ability. DNA methylation was studied by Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS). Our results showed that membrane integrity is best preserved with DMSO and very well preserved with glycerol whereas methanol provided a lower membrane integrity

protection. Fertilization ability data confirmed that DMSO is the best cryoprotectant and that methanol spermatozoa protection is variable. However, glycerol did not preserve thawed spermatozoa fertilization ability. Despite the variability in thawed spermatozoa quality depending on the cryoprotectant, our data demonstrated that cryopreservation did not alter DNA methylation of cryopreserved spermatozoa regardless of the cryoprotectant used. This result was observed at the global scale and confirmed at the base resolution. To conclude, DNA methylation is a robust epigenetic actor unaffected by cryopreservation regardless of the cryoprotectant used. This reveals that fish farming of rainbow trout can safely use sperm cryopreservation.

Keywords: biotechnology, epigenetics, gamete, fish

Acknowledgements: Marina El Kamouh was recipient of a doctoral fellowship from INRAE and “région Bretagne”. This work was funded by PIA CRB Anim ANR-11-INBS-0003

## Annexe 3 : Séjour en Italie

J'ai réalisé un stage à l'« Università politecnica delle Marche » à Ancône au sein du laboratoire de Prof. Oliana Carnevali (09/2023 à 12/2023) dans le cadre de l'Ecole Internationale de Recherche d'Agreenium. Ce parcours me confèrera le label international Agreenium.

Pendant ce stage, j'ai réalisé des expériences qui font partie des résultats présentés dans cet abstract soumis au congrès « 12th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish » et présenté à l'oral par Marta Lombo.

### Glyphosate exposure disrupts zebrafish spermatogenesis

**Lombó, Marta** <sup>(1,2,5)</sup>, **Giommi Christian** <sup>(1,5)</sup>, **El Kamouh, Marina** <sup>(3)</sup>, **Habibi, Hamid, R.** <sup>(4)</sup>, **Maradonna, Francesca** <sup>(1,5)</sup>, **Carnevali, Oliana** <sup>(1,5)</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Via Breccie Bianche, 60131, Ancona, Italy

<sup>2</sup> Departamento de Biología Molecular Universidad de León, Campus de Vegazana, 24071, León, Spain

<sup>3</sup> INRAE, Fish Physiology and Genomics, UR 1037, Rennes, France

<sup>4</sup> Department of Biological Sciences, University of Calgary, Calgary, AB T2N 1N4, Canada

<sup>5</sup> INBB - Consorzio Interuniversitario di Biosistemi e Biostrutture, 00136, Roma, Italy

E-mail: [mloma@unileon.es](mailto:mloma@unileon.es)

#### INTRODUCTION

Glyphosate is an active component of most herbicides largely used in conventional agricultural practices worldwide. Growing evidence has reported that glyphosate disrupts the homeostasis of the endocrine system mainly due to its estrogen-like properties, thus having deleterious consequences for the reproductive health. In addition, this herbicide has been reported to promote epimutations in mammals, pointing to potential inheritance of its effects to the following generations. Since the environmental levels of glyphosate are alarmingly increased and, considering that the safety of this compound remains a controversial issue, more information is still needed. In this study, we used zebrafish as model species to have a deeper insight into the molecular changes affecting spermatogenesis and male breeding capacity.

#### METHODS

Zebrafish adult males were dietary exposed to three different doses of glyphosate: 0.5 mg/kg bw day (defined as acute reference dose by the EFSA), 5 mg/kg bw day and 50 mg/kg bw day (defined as the no observable adverse effect level dose) for three weeks. Fishes were fed twice a day using dry commercial food with or without glyphosate (control group). After the treatment, males were euthanized and testicles were immediately excised to assess the potential changes in their structure at histological level, whereas in testicular cells apoptosis was evaluated by TUNEL assay, the alterations at protein level by western blot, and the histone modifications by immunohistochemistry.

#### RESULTS & DISCUSSION

The results revealed that, although the gonadosomatic index of males was similar between control and glyphosate-exposed ones, testicles of males exposed to the highest dose displayed abnormal cystic

structures, whereas those exposed to the lowest dose of glyphosate showed a higher frequency of spermatogonia. The TUNEL assay allowed the detection of an increased number of apoptotic cells in the testicles from males treated with 50 mg/kg bw day, but no changes were observed in the Casp3 levels in the whole gonads. Bearing in mind the crucial role of the endocannabinoid system in reproduction, the levels of the cannabinoid receptor CB1 were evaluated. In this case, exposure to both 0.5 and 5 mg/kg bw day decreased the levels of CB1, thus likely affecting different processes occurring during spermatogenesis, such as cell differentiation, chromatin remodeling, and sperm maturation. For this reason, immunohistochemistry was performed to study proteins involved in cell proliferation and differentiation as well as two epigenetic marks: the acetylation of K9 in H3 (H3K9ac) and the acetylation of K12 in H4 (H4K12ac). Altogether, these results suggest that male exposure to glyphosate promotes genotoxic and epigenotoxic effects in the testicular cells in a dose-dependent manner. Considering the lack of consensus about the toxic effects of glyphosate, these data could be of the utmost interest to agencies, such as the EFSA and EPA, and lawmakers to better regulate the use of this pesticide in areas devoted to crop production.

The project received funding from the Fondo Ateneo 2022 to FM and OC The project received funding from the Fondo Ateneo 2022 to FM and OC

## Annexe 4 : Fiche protocole

<b>INRA – RENNES Beaulieu</b> <b>LPGP</b>	<b>MODE OPERATOIRE</b>	Version : 1 Date : 27/09/2011
<i>Procédure expérimentale</i>		Nombre de pages : 11
<b>Type de technique : Biologie moléculaire</b>		
<b>Marquage du potentiel membranaire mitochondrial au JC-1 du sperme décongelé lavé.</b>		

### I. **Objet, domaine d'application et limites d'utilisations**

Le marquage au JC-1 permet d'étudier le potentiel membranaire mitochondrial.

Il permet d'étudier la qualité cellulaire du sperme frais et du sperme décongelé en étudiant la qualité de leurs mitochondries (fonctionnalité des mitochondries)

La concentration du JC-1 recommandée par le fabricant est de 2 $\mu$ M. Mais le JC-1 à cette concentration entraîne des pertes de 64 à 85% des spermatozoïdes dans la population à étudier. Par contre, un marquage avec du JC-1 1 $\mu$ M entraîne des pertes autour de 45% des spermatozoïdes et un marquage avec du JC-1 0,5 $\mu$ M entraîne des pertes autour de 28% des spermatozoïdes. La concentration retenue pour le marquage JC-1 est 0,5 $\mu$ M.

Rédigée par : Marina EL KAMOUH Fonction : Visa	Revue par: Catherine Labbé Fonction: Visa:	Approuvée par: Visa:
---	--	-------------------------

## II. Principe et références

Le JC-1 est un fluorochrome cationique bicolore. Il est excité à 488 nm. Il existe sous forme de monomères de fluorescence verte (~529 nm) et marque toutes les mitochondries indépendamment de leur activité. Quand le potentiel membranaire mitochondrial est élevé, le JC-1 se concentre et forme des agrégats de JC-1 de fluorescence rouge (~590 nm). On suppose que c'est le potentiel de membrane qui assure la séquestration des cations dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Il existe donc un shift d'émission de la fluorescence verte au rouge. En pratique, il semble qu'il faille rechercher des valeurs stables du vert, et que les variations du rouge rendent compte de la fonctionnalité des mitochondries. Les résultats sont exprimés par le ratio rouge/vert. Le ratio de fluorescence rouge/vert dépend uniquement du potentiel membranaire mitochondrial et non-pas d'autres facteurs comme la taille des mitochondries, leurs formes et leur densité qui peuvent influencer signaux de fluorescence à un seul composant

Notice JC-1:

"MitoProbe™ JC-1 Assay Kit for Flow Cytometry (M34152)"

## III. Matériel, produits, solutions et échantillons

### III.1. Matériel :

- Tubes Eppendorf 1.5 ml (autoclavés)
- Tubes Eppendorf 5 ml (autoclavés)
- Tubes 5 ml
- Tubes falcons 15 ml
- Tubes falcons 50 ml
- Centrifugeuse eppendorf 5804R (salle centri)
- Cytomètre (labo Audrey)
- Ministat (labo Audrey)

Rédigée par : Marina EL KAMOUH Fonction : Visa	Revue par: Catherine Labbé Fonction: Visa:	Approuvée par: Visa:
---	--	-------------------------

### III.2. Produits

- JC-1 (30µg de JC-1 ; MW=652,23 g/mol)  
"MitoProbe™ JC-1 Assay Kit for Flow Cytometry (M34152)":

Invitrogen by Thermo Fisher Scientific

- DMSO (du kit)

### III.3. Solutions

#### - SFMM

Milieu utilisé pour la dilution des spermatozoïdes de truite et de poisson rouge. Permet de contrôler le pH et la PO dans lequel baignent les spermatozoïdes, permet la conservation du sperme pendant au moins 24h (testé sur truite et poissons rouge).

pour 500 ml :

NaCl	(58.44 g/mol)	110 mM	3.2 g
KCl	(74.55 g/mol)	28.3 mM	1.05 g
MgSO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	(246.47 g/mol)	1.1 mM	0.15g
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	(147.02 g/mol)	1.8 mM	0.13g
Bicine	(163.2 g/mol)	10 mM	0.82 g
Hepes de Na	(260.3 g/mol)	10 mM	1.3 g

Le pH est de 8 (pas besoin de l'ajuster), PO 290 mOsm/kg

Rédigée par : Marina EL KAMOUH Fonction : Visa	Revue par: Catherine Labbé Fonction: Visa:	Approuvée par: Visa:
---	--	-------------------------

### III.4. Echantillons

Sperme cryoconservé (paillettes) : 2 paillettes bleues de HD 8 (1 mâle) sont à  $3 \cdot 10^9$  spz/mL

## IV. Mode opératoire

### IV.1. Décongélation et lavage du sperme

- Noter l'heure : t pré décongélation=
- Décongeler 2 paillettes/condition (bain marie 10 s à 37°C) et verser leur contenu (environ 800 µL total) dans un tube Falcon de 50 mL.
- Noter l'heure : t post décongélation=
- Ajouter doucement 10 mL de SFMM froid (4°C) pour dilution du cryoprotecteur
- Incuber à 4°C pendant 5 min pour équilibration de la PO intracellulaire (le cryoprotecteur est hyperosmotique par rapport au SFMM)
- Centrifuger 10 min 200 g (rotor swing : centri 5804R ; rcf = g)
- Eliminer le surnageant (trompe à eau ou pipette)

Reprendre le culot dans 1,6 mL de SFMM ( $V_{SFMM} = 2 \cdot V_{spz-cryoprotecteur}$ ) à 4°C, par homogénéisation douce (agitation manuelle puis aspiration/refoulement avec pastette ou P1000 + cône coupé)

*A ce stade, pour un sperme congelé à  $3 \cdot 10^9$  spz/mL dans les paillettes, le sperme lavé est à une concentration approximative de  **$1,5 \cdot 10^9$  spz/mL** (estimation de 800 µL de sperme décongelé, et de 50 % de pertes dues à l'éclatement de cellules et à l'aspiration de cellules dans le surnageant).*

- Noter l'heure : t post lavage =

Rédigée par : Marina EL KAMOUH Fonction : Visa	Revue par: Catherine Labbé Fonction: Visa:	Approuvée par: Visa:
---	--	-------------------------

**Remarques :**

**Le marquage du sperme décongelé lavé au JC-1 doit être mesuré le plus tôt possible après le lavage du sperme décongelé car après 2h15 post lavage (expérimentation 15/09/2021), on retrouve une perte de cellules de 46,34% (éclatement des cellules ?)**

**Pour comparer des conditions différentes (ex : différentes conditions de cryoconservation du sperme), il faut strictement mesurer le marquage au même temps post lavage du sperme décongelé pour chaque condition. Pour un écart du début d'incubation de 8min30s entre 2 échantillons, on retrouve le même marquage au JC-1 et les mêmes pertes. Mais les sous populations P2 et P3 (cf analyse des résultats) , qui sont répétables, sont plus labiles.**

**IV.2. Déterminer la concentration du sperme décongelé et lavé**

- **Dilution 1/100 :**

**Préparer 3 tubes** au Vf=1 ml à partir de spz décongelé lavé

**Tube a :** 10 µL spz décong lavé + 990 µL SFMM

**Tube b :** 10 µL spz décong lavé + 990 µL SFMM

**Tube c :** 10 µL spz décong lavé + 990 µL SFMM

**Astuces :**

- **Homogénéiser le spz décongelé lavé**
- **Se mettre à la surface en pipetant le spz décongelé lavé**

- **Dilution 1/10 :**

**Tube a' :** 100 µL spz a (spz 1/100) + 900 µL SFMM

**Tube b' :** 100 µL spz b (spz 1/100) + 900 µL SFMM

**Tube c' :** 100 µL spz c (spz 1/100) + 900 µL SFMM

- **Mesurer la concentration au cytomètre :**

Rédigée par : Marina EL KAMOUH Fonction : Visa	Revue par: Catherine Labbé Fonction: Visa:	Approuvée par: Visa:
---	--	-------------------------

Nommer l'échantillon au cytomètre : ex : spz a NM

- Calculer la moyenne des concentrations
- Faire le calcul de la dilution nécessaire pour être à  $1 \cdot 10^6$  spz/mL lors du marquage avec JC1 :

Modifier la 1<sup>e</sup> dilution et garder la 2<sup>e</sup> dilution en tant que dilution au 1/10

- **Nouvelle dilution 1/.... :**

.... $\mu$ L spz décong lavé + .... $\mu$ L SFMM

- **Dilution 1/10 :**

.... $\mu$ L spz 1/... + .... $\mu$ L SFMM

- **Noter l'heure : t post ajustement conc=**

#### IV.3. Marquage avec JC1 0,5 $\mu$ M final

- Reconstituer une solution mère de JC-1 à 200 $\mu$ M dans DMSO :  
30  $\mu$ g de JC-1 (MW=652,23 g/mol) + 230  $\mu$ l DMSO du kit
- Préparer une solution travail de JC-1 dans DMSO à 50  $\mu$ M à partir de la solution mère JC-1 200 $\mu$ M
- Déposer **5  $\mu$ l DMSO** dans tubes « DMSO+ spz-SFMM » à mesurer
- Déposer **5  $\mu$ l JC-1 50 $\mu$ M (solution de travail)** dans chacun des tubes à mesurer **sauf celui avec du DMSO**
- Ajouter 495  $\mu$ l spz 1/10 (spz à  $1 \cdot 10^6$  spz/ml) au tube qui sera utilisé pour caler les fenêtres
- Mettre à incuber à 20°C pendant 15min

Rédigée par : Marina EL KAMOUEH Fonction : Visa	Revue par: Catherine Labbé Fonction: Visa:	Approuvée par: Visa:
--	--	-------------------------

- Lancer le chronomètre
- A 5min, Ajouter 495 µl spz de 1/10 (spz à  $1 \cdot 10^6$  spz/ml) au tube avec DMSO
  - ➔ Mettre à incuber à 20°C pendant 15min
- A 6min30s, Ajouter 495 µl spz de 1/10 (spz à  $1 \cdot 10^6$  spz/ml) au 1<sup>e</sup> tube du triplicat
  - ➔ Mettre à incuber à 20°C pendant 15min
- A 8min, Ajouter 495 µl spz de 1/10 (spz à  $1 \cdot 10^6$  spz/ml) au 2<sup>e</sup> tube du triplicat
  - ➔ Mettre à incuber à 20°C pendant 15min
- A 9min30s, Ajouter 495 µl spz de 1/10 (spz à  $1 \cdot 10^6$  spz/ml) au 3<sup>e</sup> tube du triplicat
  - ➔ Mettre à incuber à 20°C pendant 15min

Chaque échantillon à mesurer contient :

**5µl JC-1 50µM (solution de travail) + 495 µl spz de 1/10** (spz à  $1 \cdot 10^6$  spz/ml)

#### IV.4. Mesure au cytomètre

- **Paramètres (septembre 2021) :**
- **Pour JC-1 0,5µM :**
  - (FSC ; SSC ; B1 ; B2) (415V ;524V ;435V ;445V)
- **Pour JC-1 1µM (si utilisation de cette concentration) :**
  - (FSC ; SSC ; B1 ; B2) (415V ;524V ;396V ;365V)
- **Trigger pour JC-1 0,5µM et 1µM : (FSC ; SSC) (50 ; 100)**
- **Vitesse :** medium (passer en high en cas de besoin)
- Afficher dans le tableau de la fenêtre de l'échantillon :
- Count ; count/mL ; mean et %-#

Mesurer les tubes à respectivement : 15 min, 20 min, 21min30s, 23min et 24min30s

Rédigée par : Marina EL KAMOUH Fonction : Visa	Revue par: Catherine Labbé Fonction: Visa:	Approuvée par: Visa:
---	--	-------------------------

## IV.5. Analyse des résultats

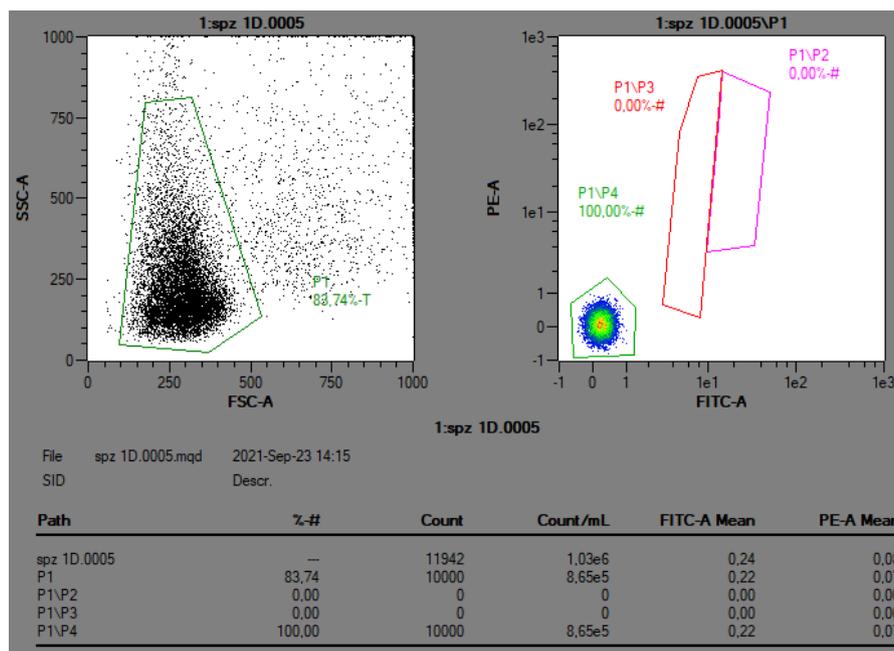
### 1) Le contrôle de l'expérimentation : DMSO + spermatozoïdes-SFMM

Le « contrôle » de cette expérimentation est le tube contenant le DMSO avec spz-SFMM. Suite à sa mesure au cytomètre, on retrouve les profils ci-dessous.

La fenêtre P1 représente une grande proportion de la population totale. La population d'intérêt, population à étudier, est celle qui est présente dans la fenêtre P1. On n'a pas sélectionné la population présente à droite de la fenêtre P1 car elle a une taille et une structure plus grande. Elle correspond à des agrégats.

Concernant le profil de fluorescence, l'intensité de la fluorescence verte et celle du rouge sont nulles. Ceci est cohérent étant donné que le DMSO n'est pas un fluorochrome.

Ce contrôle permet de déterminer la concentration de P1 en absence du JC1

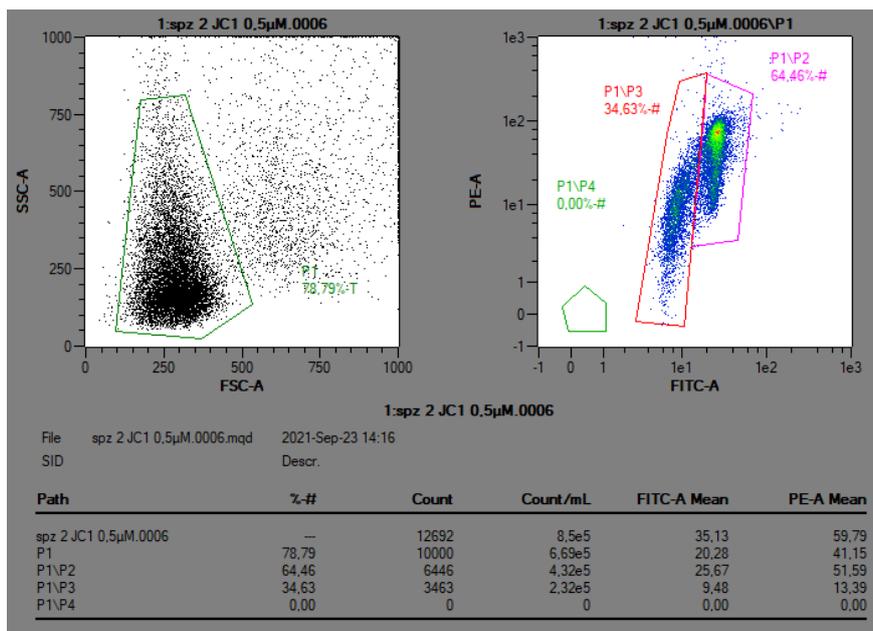


Rédigée par : Marina EL KAMOUH Fonction : Visa	Revue par: Catherine Labbé Fonction: Visa:	Approuvée par: Visa:
---	--	-------------------------

## 2) Les échantillons marqués avec JC-1 : JC-1 0,5µM final + spermatozoïdes-SFMM

- Suite à la mesure de l'échantillon marqué avec JC-1 0,5 µM final, on retrouve la population d'intérêt dans la fenêtre P1.
- **Concernant la concentration de P1**, « count /mL », on la compare à celle du DMSO avec spermatozoïdes-SFMM pour évaluer les pertes de cellules due à l'agglutination provoquée par le JC-1.
- **Concernant le profil de fluorescence,**
  - On retrouve 2 populations : une population moins marquée en vert présente dans la fenêtre P3 et une autre plus marquée en vert présente dans la fenêtre P2. La population moins marquée en vert possède une moindre capacité à absorber le vert alors que la population plus marquée en vert est en meilleur état et arrive à mieux absorber le vert.
  - On affiche dans le tableau les moyennes des intensités de la fluorescence rouge et de la fluorescence verte pour calculer par la suite le ratio moyenne de l'intensité de fluorescence rouge/moyenne de l'intensité de la fluorescence verte. Le ratio étant toujours rouge/vert. L'intensité de la fluorescence verte est censée être stable entre les différents échantillons. Le calcul du ratio nous permet de comparer entre les échantillons et de déterminer ainsi les échantillons avec une meilleure qualité mitochondriale des spermatozoïdes.
- **Concernant les populations présentes dans P2 et P3**, on affiche dans le tableau le % de P2 et le % de P3 par rapport à P1. Il est important d'afficher le % de ces populations afin d'étudier l'état des sous populations de spermatozoïdes présentes dans notre population d'intérêt.

Rédigée par : Marina EL KAMOUH Fonction : Visa	Revue par: Catherine Labbé Fonction: Visa:	Approuvée par: Visa:
---	--	-------------------------



### 3) Points de vigilance :

#### A- Répétabilité des mesures

#### Exemple : marquage avec JC-1 0,5 µM final (expérimentation 23/09/2021)

1e série: Mesures avec marquage JC1 0,5µM final après 50 min post lavage														
Ech	Tube	[JC1]	[P1] (*10 <sup>6</sup> spz/mL)	%P3/P1	% P2/P1	lv-P3	lr-P3	ratio Rouge/vert P3	lv-P2	lr-P2	ratio Rouge/vert P2	% récupération	% pertes	heure de mesure
0005	1D	5µL DMSO	0,865	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	14:15
0006	2	0,5µM final	0,669	34,63	64,46	9,48	13,39	1,41	25,67	51,59	2,01	77,3	22,7	14:16
0007	3	0,5µM final	0,625	33,75	65,53	9,78	14,49	1,48	25,72	53,67	2,09	72,3	27,7	14:17
0008	4	0,5µM final	0,654	36,81	62,55	9,57	13,46	1,41	24,72	48,99	1,98	75,6	24,4	14:18
		moyenne	0,649	35,06	64,18	9,61	13,78	1,43	25,37	51,42	2,03	75,07	24,93	
		écart type	0,022	1,58	1,51	0,15	0,62	0,04	0,56	2,34	0,05	2,59	2,59	

Les mesures de [P1], % P2/P1, % P3/P1, ratio rouge/vert P2, ratio rouge/vert P3 sont répétables.

#### Exemple : marquage avec JC-1 1 µM final (expérimentation 15/09/2021)

Rédigée par : Marina EL KAMOUH Fonction : Visa	Revue par: Catherine Labbé Fonction: Visa:	Approuvée par: Visa:
---	--	-------------------------

Mesures avec marquage JC1 1µM final à partir de 15min du début d'incubation														
Ech	Tube	[JC1]	[P1] (*10 <sup>6</sup> spz/mL)	% P3/P1	% P2/P1	lv-P3	lr-P3	ratio Rouge/vert P3	lv-P2	lr-P2	ratio Rouge/vert t P2	% récupér ation	% pertes	heure de mesure
5	2D	10µL DMSO	0,842	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	10:24
6	3	1µM final	0,459	47,43	52,76	7,69	20,76	2,70	17,15	46,22	2,70	54,5	45,5	10:26
7	4	1µM final	0,456	49,94	50,07	7,74	18,57	2,40	17,44	44,5	2,55	54,2	45,8	10:28
8	5	1µM final	0,458	50,48	49,81	7,71	20,77	2,69	17,36	47,15	2,72	54,4	45,6	10:29
		moyenne	0,458	49,28	50,88	7,71	20,03	2,60	17,32	45,96	2,65	54,35	45,65	
		écart type	0,002	1,63	1,63	0,03	1,27	0,17	0,15	1,34	0,09	0,18	0,18	

Les mesures de [P1], % P2/P1, % P3/P1, ratio rouge/vert P2, ratio rouge/vert P3 ainsi que le % de pertes sont répétables.

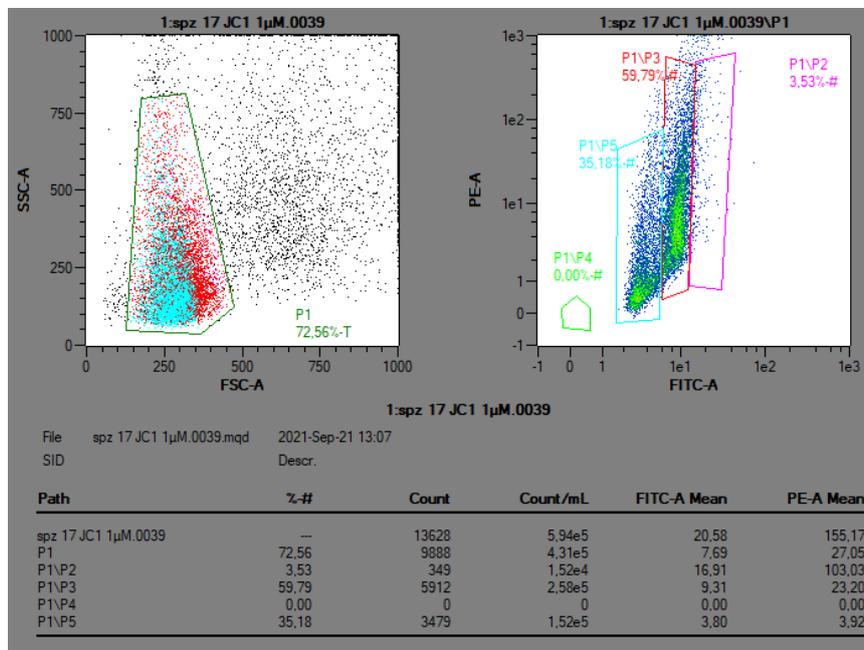
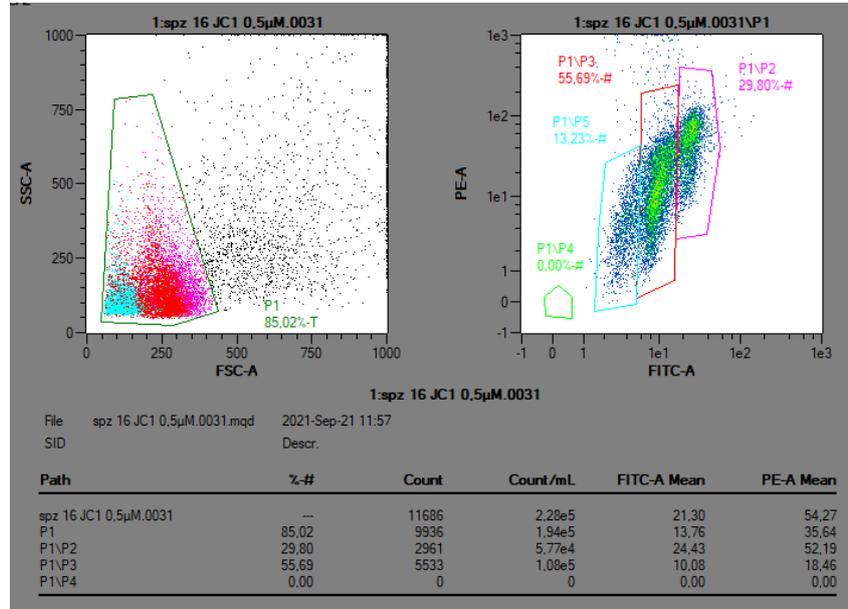
La répétabilité des mesures permet de valider la valeur obtenue du paramètre étudié.

Rédigée par : Marina EL KAMOUH Fonction : Visa	Revue par: Catherine Labbé Fonction: Visa:	Approuvée par: Visa:
---	--	-------------------------

## B- Plusieurs sous populations

Au cours du temps, les spermatozoïdes décongelés-lavés s'abiment et se dégradent. Lors de la mesure au cytomètre à un instant donné, on retrouve plusieurs sous-populations : une population très marquée en vert (high stain), une population moins marquée en vert (medium stain) et même une 3e population encore moins marquée en vert (low stain)

Il existe un glissement des cellules dans des populations moins marquées



Rédigée par : Marina EL  
KAMOUH  
Fonction :  
Visa

Revue par: Catherine Labbé  
Fonction:  
Visa:

Approuvée par:  
Visa:

## FICHE RESUME :

### 1/ Echantillon

Sperme cryoconservé (paillettes) : 2 paillettes bleues de HD 8 (1 mâle) sont à  $3 \cdot 10^9$  spz/mL

### 2/ Décongélation et lavage du sperme

- Décongeler 2 paillettes dans un bain marie pendant 10 s à 37°C :
- Verser 800µL spz-cryop dans un falcon 50mL
- Ajouter 10mL de SFMM au falcon 50mL
- Attendre 5min
- Centrifuger pendant 10 min 200 g à 4°C
- Jeter le surnageant
- Ajouter 1.6 mL SFMM franco sur culot
- Agiter, aspirer et refouler délicatement

### 3/ Déterminer la concentration du sperme décongelé et lavé

- **Dilution 1/100** : Préparer triplicat de 10 µL spz décong lavé + 990 µL SFMM
- **Dilution 1/10** : Préparer triplicat de 100 µL spz a (spz 1/100) + 900 µL SFMM
- Mesurer la concentration au cytomètre
- Calculer la moyenne de ces 3 concentrations
- Faire le calcul de la dilution nécessaire pour être à  $1 \cdot 10^6$  spz/mL lors du marquage avec JC1 :
- **Nouvelle dilution 1/....** : ....µL spz décong lavé + ....µL SFMM
- **Dilution 1/10** : 1mL spz 1/... + 9mL SFMM

### 4/ Marquage avec JC-1 0,5µM final

- Reconstituer une solution mère de JC-1 à 200µM dans DMSO :
- Préparer une solution travail de JC-1 dans DMSO à 50 µM à partir de la solution mère
- Déposer 5 µL DMSO dans tubes « DMSO+ spz-SFMM » à mesurer
- Déposer 5 µL JC-1 100µM (solution de travail) dans chacun des tubes à mesurer **sauf celui avec du DMSO**
- Ajout de 495 µL spz 1/10 ( $1 \cdot 10^6$  spz/ml) à :  
0 min au tube qui sert à caler les fenêtres ; à 5min au tube avec DMSO  
à 6min30s au 1<sup>e</sup> tube du triplicat ; à 8min au 2<sup>e</sup> tube du triplicat ; à 9min30s au 3<sup>e</sup> tube du triplicat
- Après ajout de 495 µL spz 1/10 ( $1 \cdot 10^6$  spz/ml) au temps adéquat, **Mettre directement à incuber à 20°C pendant 15min**
- Chaque échantillon à mesurer contient :  
**5µL JC-1 50µM (solution de travail) + 495 µL spz de 1/10** (spz à  $1 \cdot 10^6$  spz/mL)

Rédigée par : Marina EL KAMOUEH Fonction : Visa	Revue par: Catherine Labbé Fonction: Visa:	Approuvée par: Visa:
--	--	-------------------------

## 5/ Mesure au cytomètre

- **Pour JC-1 0,5 $\mu$ M** : (FSC ; SSC ; B1 ; B2) (415V ;524V ;435V ;445V)
- **Pour JC-1 1 $\mu$ M** : (FSC ; SSC ; B1 ; B2) (415V ;524V ;396V ;365V)
- **Trigger pour JC-1 0,5 $\mu$ M et 1 $\mu$ M** : (FSC ; SSC) (50 ; 100)
- Mesurer les tubes à respectivement :

15 min, 20 min, 21min30s, 23min et 24min30s

Rédigée par : Marina EL KAMOUEH Fonction : Visa	Revue par: Catherine Labbé Fonction: Visa:	Approuvée par: Visa:
--	--	-------------------------





## Marina EL KAMOUH

**Docteur en Biologie cellulaire et biologie du développement**

**Eligible au statut jeune chercheur - Crédit d'Impôt Recherche**

### CONTACT

+33 07 52 92 15 68

elkamouhmarina@gmail.com

<https://www.linkedin.com/in/marina-el-kamouh-12583916b/>

### REFERENTS

**Dr. Catherine Labbé : directrice de thèse :**

catherine.labbe@inrae.fr

**Dr. Audrey Laurent : co-encadrante de thèse :**

Audrey.Laurent@inrae.fr

**Pr. Oliana Carnevali : directrice d'unité :**

o.canevalli@staff.univpm.it

### COMPETENCES

#### TECHNIQUES :

Cryoconservation, extraction d'ADN, ARN et protéines, CASA, cytométrie en flux

#### BIOINFORMATIQUE :

Langage R, Linux, Cluster

#### INFORMATIQUE :

Pack office; Fiji-ImageJ; Logiciel MACSquant; Graphpad; Inkscape

#### "SOFT SKILLS" :

Communication, résolution de problèmes, travail d'équipe, leadership, sens critique, créativité, adaptabilité, gestion du temps

### LANGUES

- **Français** : bilingue
- **Anglais** : courant
- **Arabe** : langue maternelle

### PRIX

**2e prix pour la meilleure présentation orale au congrès " 8th IWBF" ; label EIR-A**

### INTERETS

**Flute traversière; Randonnée; Lecture; Scout (2004-2015. assitante cheftaine en 2015)**

## EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

### Doctorat

**Novembre 2020 - Octobre 2023**

#### INRAE - LPGP

**Sujet:** Etude de l'épigénétique du spermatozoïde chez les poissons: risques induits par la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN

- Maîtriser des techniques liées à l'évaluation de la qualité du sperme
- Utiliser des outils et des logiciels pour des analyses bioinformatiques
- Analyser et synthétiser les données obtenues
- Encadrer des étudiants
- Participer à des conférences et journées scientifiques
- Contribuer à l'organisation de nombreuses réunions et conférences

### Stage de recherche

**Septembre 2022 - Décembre 2022**

#### UNIVPM - Laboratoire de Prof. Oliana Carnevali - Italie

**Sujet:** Etude de l'effet du glyphosate sur la reproduction de poisson zèbre adulte

- Acquérir et mettre en œuvre de nouvelles techniques scientifiques
- Présenter mon parcours et mon projet de thèse durant un séminaire

### Stage de recherche - M2

**Février 2020 - Juin 2020**

#### INSERM - Neurodiderot - Neurokines

**Sujet:** Stratégie de neuroprotection suite à une hypoxie-ischémie chez des rats juvéniles

- Réaliser des analyses d'immunohistochimie et d'immuno-fluorescence
- Rédaction d'un mémoire bibliographique incluant les résultats

### Stage de recherche - M1

**Mai 2019 - Juin 2019**

#### INSERM - Neurodiderot - Neurokines

**Sujet:** Impact de l'hyposérotoninémie maternelle sur les neurones dans une région du cerveau de la souris (noyau accumbens)

- Apprendre et réaliser de l'analyse d'images sur les dendrites des neurones
- Présenter un poster à l'oral

## FORMATIONS

### Doctorat en Biologie cellulaire, biologie du développement

**2020 - 2023**

Université de Rennes - France

*Obtenu avec " Félicitations du jury "*

### Master II : Biologie intégrative et physiologie

**2019 - 2020**

Université de Paris - Paris Diderot - France

**Spécialité :** Reproduction et développement

### Master I : Biologie intégrative et physiologie

**2018 - 2019**

Sorbonne Université - France

**Spécialité :** Neurosciences

### Licence : Sciences de la Vie et de la Terre

**2015 - 2018**

Université Libanaise - Liban

## PUBLICATIONS

**Cryopreservation effect on DNA methylation profile in rainbow trout spermatozoa : published 03 November 2023 in scientific reports :**

**doi : [10.1038/s41598-023-44803-2](https://doi.org/10.1038/s41598-023-44803-2)**

Marina El Kamouh, Aurélien Brionne, Amin Sayyari, Audrey Laurent, Catherine Labbé

**Sildenafil-Mediated Neuroprotection from Adult to Neonatal Brain Injury: Evidence, Mechanisms, and Future Translation : published 15 octobre 2021 in MDPI - cells:doi : [10.3390/cells10102766](https://doi.org/10.3390/cells10102766)**

Manuela Zinni, Julien Pansiot, Pierre-Louis Léger, Marina El Kamouh, Olivier Baud

**Titre : Étude de l'épigénétique du spermatozoïde chez les poissons :  
Risques induits par la cryoconservation du sperme sur la méthylation de l'ADN**

**Mots clés :** gamète, truite arc-en-ciel, biotechnologie

**Résumé :** Les spermatozoïdes sont les cellules les plus utilisées pour la cryoconservation des ressources génétiques en aquaculture. Il est connu que les spermatozoïdes de poissons transmettent aux embryons non seulement leur patrimoine génétique, mais aussi leur profil épigénétique notamment la méthylation de l'ADN. Ainsi, toute altération du profil de méthylation de l'ADN des spermatozoïdes induit un risque de transmission d'altérations épigénétiques à la descendance. L'objectif de cette étude est d'évaluer si la cryoconservation du sperme peut modifier le profil de méthylation de l'ADN du spermatozoïde chez la truite arc-en-ciel. Sa finalité est de connaître le risque de l'utilisation de sperme cryoconservé pour la descendance. Pour induire des réponses cellulaires variables après la cryoconservation, les spermatozoïdes ont été cryoconservés dans différents cryoprotecteurs : le diméthyl sulfoxyde, le méthanol, et le glycérol. Nous avons confirmé que chacun d'eux apportait

un niveau de protection cellulaires différent selon le critère étudié (qualité des membranes et des mitochondries, motilité, fécondance). Suite à l'analyse de la méthylation de l'ADN par RRBS, nous n'avons pas vu d'effet global de la cryoconservation. Au niveau du génome, nous avons pu identifier un faible nombre (335 à 564) de cytosines à statut différenciellement méthylé (DMCs). Peu sont communes entre les cryoprotecteurs, et aucune corrélation n'a été observée entre le nombre de DMCs et les altérations cellulaires post-cryoconservation. Nous suggérons cependant que les DMCs signent l'existence de régions potentiellement sensibles à la cryoconservation.

En conclusion, la méthylation de l'ADN des spermatozoïdes de truite arc-en-ciel ne serait que faiblement sensible à la cryoconservation. Les régions affectées nécessitent confirmation avant d'étudier l'effet sur la descendance.

**Title: Sperm epigenome in fish:**

**Exploration of the risks induced by sperm cryopreservation on DNA methylation**

**Keywords :** gametes, rainbow trout, biotechnology

**Abstract :** Spermatozoa are the cells the most commonly used for cryopreservation of valuable genetic resources in aquaculture. It is known that fish spermatozoa transmit to the embryo not only their genetic but also their epigenetic profile, particularly DNA methylation. Therefore, any alteration of the DNA methylation profile in spermatozoa induces the risk of transmitting epigenetic alterations to the offspring. The aim of this study was to assess whether sperm cryopreservation can alter DNA methylation profile in rainbow trout spermatozoa. Its purpose is to know the risk of using cryopreserved sperm for the offspring. To trigger variable cellular response after cryopreservation, spermatozoa were cryopreserved with different cryoprotectants : dimethyl sulfoxide, methanol and glycerol. We confirmed that each of them provided a different

level of cellular protection according to the cellular parameter (membrane and mitochondria quality, motility, fertilization ability). Following the analysis of DNA methylation by RRBS, we did not see an overall effect of cryopreservation. At the genome level, we were able to identify a small number (335 to 564) of differentially methylated cytosines (DMCs). Few are common between cryoprotectants, and no correlation was observed between the number of DMCs and cellular alterations after cryopreservation. We suggest that the DMCs indicate the presence of potentially sensitive regions to cryopreservation. In conclusion, sperm DNA methylation of rainbow trout would be only slightly sensitive to cryopreservation. Affected regions need to be confirmed before studying the impact on offspring.