



**HAL**  
open science

# Les nouvelles technologies de l'assistance médicale à la procréation (amp) et la qualité des gamètes et des embryons : évaluation de l'épigénome

Samira Ibala Romdhane

► **To cite this version:**

Samira Ibala Romdhane. Les nouvelles technologies de l'assistance médicale à la procréation (amp) et la qualité des gamètes et des embryons : évaluation de l'épigénome. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10143 . tel-00838798

**HAL Id: tel-00838798**

**<https://theses.hal.science/tel-00838798>**

Submitted on 26 Jun 2013

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

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

**THESE**

Présentée devant

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1**  
**Ecole Doctorale BMIC**

En vue de l'obtention du

**DIPLOME DE DOCTORAT**

(Arrêté du 7 août 2006 relatif à la formation doctorale)

**Mme IBALA-ROMDHANE Samira**

Présenté et soutenu publiquement le 29 septembre 2010

**LES NOUVELLES TECHNOLOGIES DE L'ASSISTANCE  
MEDICALE A LA PROCREATION (AMP) ET LA QUALITE  
DES GAMETES ET DES EMBRYONS:  
Évaluation de l'épigénome**

**Directeur de thèse :**

**Dr Annick LEFEVRE**

**Jury : Pr Jean-François GUERIN**

**Dr Jacqueline MANDELBAUM**

**Dr Hélène JAMMES**

**Dr Annick LEFEVRE**

**Président**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Directeur**

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

**M. le Professeur L. Collet**

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur C. Gautier

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

# Dedicace

A mon père et ma mère. Ils ont partagé mes peines et mes joies et ils ont tout fait pour mon bien. Je leur dédie ce travail en témoignage de mon profond amour et mon éternelle reconnaissance.

A mon cher mari Riad, pour toute la patience et les sacrifices qu'il a consenti pour moi, que la vie ne nous sépare jamais.

A mes enfants, Hamza, Chaima, Ahmed et Aya pour tout le bonheur qu'ils me donnent. Que dieu les garde et leurs procure santé, bonheur et longue vie.

A mon frère et ma sœur ainsi que sa famille.

A mes beaux parents, mes beaux frères et sœurs.

# Remerciements

*La présentation de ce travail est pour moi l'occasion d'exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui ont permis sa réalisation. Il a été réalisé au sein de l'unité U846 de l'INSERM « Institut Cellules Souches et Cerveau » au laboratoire de Biologie du Développement et de la Reproduction à la faculté de Médecine Grange Blanche Domaine Rockefeller en collaboration avec le laboratoire de Biologie de la Reproduction à l'hôpital Femme Mère Enfant Bron Lyon France.*

*J'adresse mes vifs remerciements à Dr Annick LEFEVRE, à l'Unité INSERM U846 d'avoir accepté de diriger ce travail. Je la remercie pour sa grande patience et les qualités humaines dont elle a fait preuve à mon égard. Elle m'a fait profiter de sa grande expérience scientifique. Je tiens à lui exprimer également ma profonde gratitude et reconnaissance pour son accueil sympathique lors de mon séjour à Lyon. Veuillez trouver, ici, l'expression de ma vive reconnaissance et mon profond respect.*

*Je remercie le Pr Ali SAAD, Pr en Histologie Embryologie et chef du laboratoire de Cytogénétique, Génétique Moléculaire et Biologie de la Reproduction Humaine CHU Farhat Hached Sousse Tunisie avec qui je travaille actuellement en tant qu'Assistante Hospitalo-Universitaire et qui m'a encouragé à accomplir ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde estime et ma haute considération.*

*Je remercie chaleureusement le Pr Jean-François GUERIN, chef du laboratoire de Biologie de la Reproduction à l'hôpital Femme-Mère-Enfant Bron-Lyon pour avoir aimablement accepté la présidence du jury. Je tiens à lui exprimer ici ma haute estime et ma grande considération.*

*Je remercie sincèrement Dr Jacqueline MANDELBAUM, Pr au service d'Histologie, Biologie de la Reproduction et Cytogénétique à l'hôpital Tenon Paris d'avoir accepté d'être le rapporteur de ma thèse et de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.*

*Je remercie chaleureusement Dr Hélène JAMMES, de l'unité UMR 1198 INRA ENVA, Biologie du Développement et de la Reproduction Domaine de Vilvert, Jouy en Josas qui a aimablement accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Veuillez trouver ici, l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.*

*Je remercie vivement Thierry BLACHERE, Rita KHOUEIRY, Nada BORGOL, Mohammed AL-KHTIB pour l'aide et les conseils qu'ils m'ont prodigués.*

*Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de Biologie de la Reproduction à l'hôpital Femme Mère Enfant Bron Lyon France.*

# TABLE DES MATIERES

<b>AVANT PROPOS.....</b>	<b>10</b>
<b>CHAPITRE I : LES TECHNIQUES D'ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION (AMP) .....</b>	<b>12</b>
A. INTRODUCTION : .....	13
B. INSEMINATION ARTIFICIELLE (IA) : .....	14
C. FECONDATION IN VITRO (FIV) : .....	16
1. <i>Stimulation ovarienne ou induction de l'ovulation:</i> .....	16
2. <i>Recueil des gamètes :</i> .....	18
3. <i>FIV proprement dite :</i> .....	18
4. <i>Transfert embryonnaire :</i> .....	18
D. INJECTION DE SPERMATOZOIDE DANS LE CYTOPLASME DE L'OVOCYTE : (ICSI).....	19
E. TECHNIQUES ASSOCIEES : .....	21
1. <i>Maturation in vitro des ovocytes : (MIV)</i> .....	22
a. Indications de la MIV : .....	22
b. Différentes étapes de la MIV : .....	23
c. Résultats de la MIV : .....	25
2. <i>Culture prolongée :</i> .....	26
a. Coculture : .....	27
b. Culture prolongée en milieux synthétiques : milieux séquentiels : .....	28
3. <i>Cryoconservation des ovocytes :</i> .....	30
a. Indications : .....	30
b. Principes de la cryoconservation : .....	30
c. Techniques de cryoconservation : .....	31
d. Effets de la cryoconservation : .....	32
e. Résultats de la cryoconservation : .....	33
<b>CHAPITRE II : GAMETOGENESE - FECONDATION DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE .....</b>	<b>34</b>
A. OVOGENESE – FOLLICULOGENESE : .....	35
1. <i>Ovogenèse :</i> .....	35

a. Pendant la vie embryonnaire et fœtale : .....	35
b. Dans l'enfance : .....	36
c. De la puberté à la ménopause : .....	37
2. <i>Folliculogenèse</i> : .....	39
a. Stades folliculaires : .....	39
b. Rupture folliculaire et l'organisation du corps jaune : .....	41
c. Chronologie de la croissance folliculaire : .....	42
3. <i>Le cycle hypothalamo- hypophyso-ovarien</i> : .....	43
<b>B. SPERMATOGENESE</b> : .....	45
1. <i>Définition</i> : .....	45
2. <i>Phase de multiplication des spermatogonies</i> : .....	45
3. <i>Phase de maturation et de réduction de la charge d'ADN</i> : .....	45
4. <i>Phase de différenciation des spermatides ou spermiogenèse</i> : .....	46
<b>C. FECONDATION ET DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE</b>	
<b>PREIMPLANTATOIRE:</b> .....	48
1. <i>Préparation des spermatozoïdes à la fécondation</i> : .....	48
2. <i>Préparation de l'ovocyte à la fécondation</i> : .....	49
3. <i>Phénomènes cytologiques de la fécondation</i> : .....	49
4. <i>Développement embryonnaire préimplantatoire</i> : .....	50
<b>CHAPITRE III : PHENOMENES EPIGENETIQUES.....</b>	<b>53</b>
A. INTRODUCTION: .....	54
B. DEFINITION DE L'EPIGENESE : .....	55
C. LES MECANISMES EPIGENETIQUES : .....	55
1. <i>La méthylation de l'ADN</i> : .....	58
2. <i>Les modifications post-traductionnelles des histones</i> : .....	58
3. <i>Micro ARNs</i> : .....	61
D. LES FONCTIONS DES MECANISMES EPIGENETIQUES : .....	62
<b>CHAPITRE IV : METHYLATION DE L'ADN .....</b>	<b>64</b>
A. INTRODUCTION ET DEFINITION: .....	65
B. LES ENZYMES INTERVENANTS DANS LA METHYLATION DE L'ADN : .....	67
1. <i>Dnmt1</i> : .....	68
2. <i>Dnmt2</i> : .....	69
3. <i>Dnmt3</i> : .....	70
C. DYNAMIQUE DE LA METHYLATION : .....	71



1. <i>Modèle de méthylation</i> :	72
2. <i>Maintenance et commutation</i> :	72
D. METHYLATION ET ETAT CHROMATINIEN :	74
E. METHYLATION ET REPROGRAMMATION EPIGENETIQUE:	76
1. <i>Au cours du développement embryonnaire préimplantatoire</i> :	76
2. <i>Dans les cellules germinales primordiales (PGC)</i> :	78
F. FONCTIONS DE LA METHYLATION DE L'ADN :	81
1. <i>Méthylation de l'ADN et régulation de l'expression des gènes</i> :	81
2. <i>Méthylation de l'ADN et l'inactivation du chromosome X</i> :	83
3. <i>Méthylation de l'ADN et différenciation cellulaire</i> :	84
4. <i>Méthylation de l'ADN et protection du génome</i> :	86
5. <i>Méthylation de l'ADN et empreinte parentale</i> :	87
a. Historique – définition :	87
b. Caractéristiques de l'empreinte :	88
c. Bases moléculaires de l'empreinte parentale :	88
d. Régulation des gènes soumis a empreinte parentale, exemple du locus 11p15.5 :	89
e. Reprogrammation de l'empreinte :	93
<b>CHAPITRE V : DEREGLATIONS EPIGENETIQUES ET AMP</b>	<b>98</b>
A. METHYLATION DE L'ADN ET PATHOLOGIES HUMAINES :	99
1. <i>Méthylation de l'ADN et Cancer</i> :	99
a. Hypométhylation globale :	99
b. Hyperméthylation et inactivation génique :	100
2. <i>La méthylation de l'ADN et les pathologies non cancéreuses</i> :	101
a. Syndrome ICF et DNMT3 :	101
b. Syndrome de Rett et MeCP2 :	102
c. Syndrome de l'X fragile et FMR1 :	102
d. La dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale : (DFSH) :	102
B. PATHOLOGIES DE L'EMPREINTE PARENTALE :	103
1. <i>Empreinte parentale et tumorigenèse</i> :	104
2. <i>Empreinte parentale et syndromes liés à la croissance fœtale</i> :	104
a. Syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW).....	104
b. Syndrome de Silver Russel (SSR).....	105
3. <i>Empreinte parentale et syndromes de déficience mentale</i> :	106
a. Syndrome d'Angelman (SA) :	106

b. Syndrome de Prader-Willi (SPW) : .....	106
c. Syndrome ostéodystrophique d'Albright (pseudo-hypo-parathyroidisme) .....	107
4. Empreinte parentale et syndrome métabolique : .....	107
a. Diabète néonatal transitoire mellitus (transient neonatal diabetes mellitus ou TNDM) : .....	107
5. Empreinte parentale et infertilité : .....	108
C. PATHOLOGIES EPIGENETIQUES LIEES A L'AMP .....	109
1. Syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW): .....	110
2. Syndrome de Silver-Russell (SSR) : .....	111
3. Syndrome de Prader-Willi (SPW): .....	112
4. Syndrome d'Angelman (SA): .....	112
5. Rétinoblastome : .....	112
6. Faible poids de naissance après AMP : .....	113
D. TECHNIQUES D'AMP ET DEREGULATIONS EPIGENETIQUES : .....	114
1. Stimulation ovarienne : .....	114
2. Maturation in vitro des ovocytes : .....	115
3. FIV et l'ICSI : .....	116
4. Culture prolongée des embryons .....	116
5. Transfert embryonnaire .....	117
<b>PREMIER ARTICLE .....</b>	<b>118</b>
<b>DEUXIÈME ARTICLE:.....</b>	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES : .....</b>	<b>142</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES : .....</b>	<b>1428</b>
<b>ANNEXES : PROTOCOLE ET REPRÉSENTATION DES RÉSULTATS .....</b>	<b>174</b>
<b>PUBLICATIONS.....</b>	<b>180</b>

# AVANT PROPOS

Une cellule transmet à sa descendance, outre la séquence de ses gènes, les niveaux d'activité de beaucoup d'entre eux. De même que la séquence peut varier par mutation, le niveau d'activité génique peut changer par « épimutation », ou modifications épigénétiques, qui sont hérissables sans altération génétique concomitante. En effet, ces épimutations vont être responsables de la divergence morphologique et fonctionnelle entre un neurone et une cellule épithéliale provenant du même œuf et contenant le même génome.

Il est ici question d'effets régulateurs qui verrouillent les cellules dans un schéma transcriptionnel stable, hérissable dans les cellules filles après division cellulaire. Les effecteurs

sont ainsi multiples et agissent en concert pour réguler l'expression des gènes au sein d'une cellule. Ils sont représentés par les facteurs de transcription au sens large ainsi que l'ensemble des modifications épigénétiques qui détermine « un code épigénétique ».

Le code épigénétique comprend plusieurs strates interconnectées et interdépendantes : le code de la méthylation de l'ADN, le code des histones (acétylation, méthylation, phosphorylation...) et celui des co-activateurs et co-répresseurs ainsi que les petits ARN régulateurs dits antisens, non codants, ou interférents qui peuvent entraîner la formation d'hétérochromatine silencieuse sur le plan transcriptionnel.

Ce code est mis en place grâce à une machinerie enzymatique complexe et des cofacteurs qui assurent un remodelage adéquat de la chromatine autour des gènes et son accessibilité aux facteurs de transcription.

Les réactions enzymatiques permettent que ces changements puissent être reproduits lors de la réplication de l'ADN et donc qu'ils soient hérissables, ou effacés, c'est-à-dire réversibles. Ces processus se mettent en place au cours de deux périodes critiques : la gamétogenèse, et le développement embryonnaire préimplantatoire et conduisent au maintien du profil d'expression des gènes tissus spécifiques. C'est le cas particulier des gènes soumis à empreinte, caractérisés par une expression monoallélique dépendante de l'origine parentale, ayant comme base moléculaire une méthylation différentielle sur les

deux allèles maternel et paternel des éléments de contrôle appelés DMR qui aura pour rôle de contrôler la transcription des gènes concernés.

Tout changement environnemental au cours des phases critiques de programmation de l'épigénome représente un risque de dérégulation de l'empreinte à l'origine de nombreuses pathologies humaines.

C'est le cas des techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) qui impliquent la manipulation *in vitro* des gamètes et des embryons préimplantatoires.

Afin d'étudier l'impact des techniques utilisées par l'AMP sur la reprogrammation de la méthylation des gènes soumis à empreinte parentale au cours de l'ovogenèse, dans le sperme et au début du développement embryonnaire, nous avons choisi d'analyser:

- 1- l'impact de la stimulation hormonale et de la maturation *in vitro* des ovocytes humains sur la mise en place et le maintien de la méthylation au niveau de la DMR du gène soumis à empreinte parentale KCNQ1OT1.
- 2- le profil de méthylation de la DMR du gène H19, soumis à empreinte parentale, dans des embryons en retard, atypiques issus d'ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection), dans des spermatozoïdes et des ovocytes.

La présentation et la discussion des résultats obtenus au cours de ce travail sont précédées d'une revue bibliographique. Celle-ci est divisée en cinq chapitres, le premier comporte une description des différentes techniques utilisées en AMP en particulier la stimulation hormonale, la maturation *in vitro* des ovocytes et la culture prolongée permettant d'obtenir des embryons *in vitro* et palliant à différentes causes d'infertilité. Le deuxième chapitre fera un rappel sur la gamétogenèse, la fécondation et le développement embryonnaire préimplantatoire *in vivo* dans les conditions physiologiques. Le troisième chapitre résumera les différents marqueurs épigénétiques ainsi que leur fonction. Le quatrième chapitre détaillera les aspects de la méthylation de l'ADN ainsi que ses différentes fonctions plus particulièrement l'empreinte parentale et ses différents aspects.

Dans le dernier chapitre, seront traitées les pathologies humaines conséquences de toute dérégulation de la méthylation de l'ADN ou de l'empreinte parentale ainsi que l'éventuel lien entre les techniques de l'AMP et ces dérégulations.

# CHAPITRE I

---

## LES TECHNIQUES D'ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION (AMP)

## A. INTRODUCTION :

Pour l'Organisation mondiale de la santé, l'infertilité est définie par l'absence de conception après au moins 12 mois de rapports sexuels non protégés (OMS), elle est à différencier de la stérilité qui désigne l'incapacité totale et définitive à concevoir, diagnostic qui ne peut être posé que devant une cause évidente et non curable d'infertilité.

Une étude récente réalisée sur 172 413 femmes venant de 25 pays, indique que la prévalence de l'infertilité est d'environ 9 %, soit un chiffre inférieur à ce qui est généralement cité dans la littérature médicale. Même sur la base de cette sous-estimation, les auteurs calculent que 70 millions de couples au moins sont concernés par cette pathologie. (Boivin J et coll. 2007)

Face aux problèmes d'infertilité, des réponses médicales ont été apportées sous forme d'interventions chirurgicales, de stimulations hormonales, d'inséminations artificielles avec les spermatozoïdes du conjoint (IAC), d'inséminations artificielles avec les spermatozoïdes d'un donneur (IAD), de fécondation *in vitro* (FIV), etc..... Parmi ces traitements et techniques, on distingue les techniques dites d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) (Breart G et coll. 1995), définies comme l'ensemble des traitements et procédures durant lesquels il y a une manipulation de l'ovocyte et du sperme ou des embryons afin de permettre le commencement d'une grossesse.

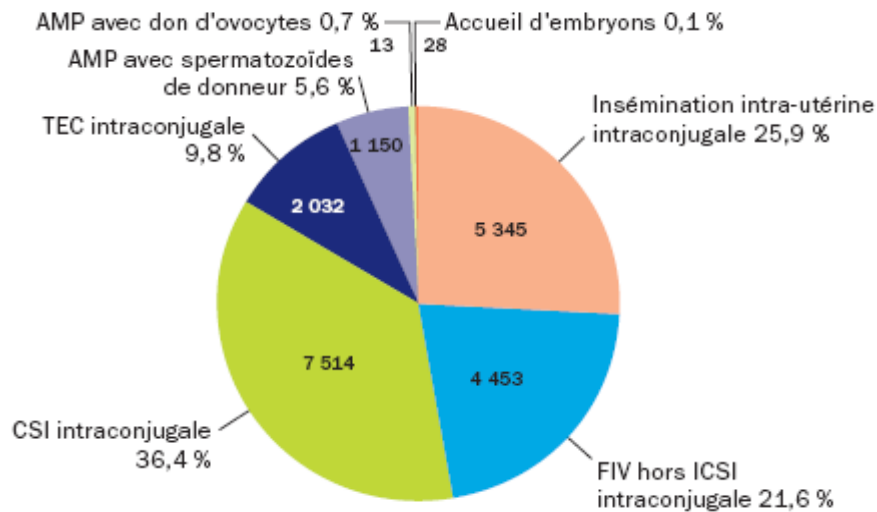
L'assistance médicale à la procréation est l'un des domaines scientifiques qui s'est particulièrement développé à la fin du XXème siècle. Cependant, l'idée même de pouvoir procréer sans avoir recours à la sexualité n'est pas nouvelle, car l'abbé Lazarro Spallanzani avait déjà tenté et réussi une insémination artificielle chez la chienne au XVIIIème. John Hunter a lui-même réalisé la première insémination artificielle chez une femme en 1791, et ce n'est qu'en 1978 à Manchester en Angleterre que les docteurs Steptoe et Edwards donnent naissance au premier « bébé éprouvette » issu de la technique de fécondation *in vitro* (Steptoe PC et coll. 1978), suivie en 1982 par la naissance d'Amandine en France. (Testart J et coll. 1982)

Enfin, en 1992, lors d'une expérimentation médicale, un spermatozoïde est accidentellement micro injecté au-delà de la membrane ovocytaire : c'est la première tentative réussie d'ICSI humaine (Intracytoplasmic Sperm Injection) (Palermo G et coll. 1992).

Durant ces deux décennies, les techniques de FIV se sont diversifiées, des GIFT (transfert de gamètes dans les trompes de Fallope), aux ZIFT (transfert de zygotes dans les trompes de Fallope), à la maturation *in vitro* des ovocytes (MIV) et récemment la transplantation de tissu ovarien cryoconservé qui a permis la naissance d'un enfant (Donnez et coll. 2004).

Selon le rapport de l'Agence de Biomédecine de 2007, 122 056 tentatives regroupant différentes techniques (inséminations, fécondations *in vitro* et transferts d'embryons congelés) et différentes origines de gamètes et d'embryons ont abouti à la naissance de 20 657 enfants, ce qui représente 2,5 % des naissances enregistrées en France ; ce taux estimé augmente légèrement année après année, reflétant une augmentation plus rapide du nombre de naissances après AMP que du nombre de naissances globales.

Dans la très grande majorité des cas (94 %), ces tentatives sont réalisées avec les gamètes des deux membres du couple. Dans 6 % des cas, elles font appel à des spermatozoïdes, des ovocytes ou des embryons issus d'un don.



**Fig 1 : La part des enfants nés après AMP en 2007 selon la technique et l'origine des gamètes (Rapport Agence de Biomédecine 2007)**

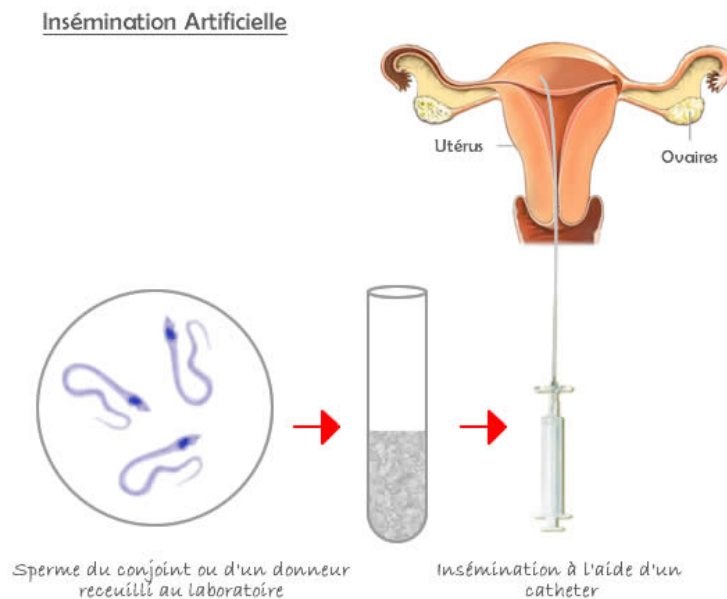
## **B. INSEMINATION ARTIFICIELLE (IA) :**

L'insémination intra-utérine est une technique proposée de première intention dans de nombreuses situations d'infertilité à trompes normales comme l'infertilité masculine, les infertilités d'origine cervicale, ou les infertilités inexplicables. Elle a pour but de favoriser *in*

*vivo*, c'est-à-dire au niveau de la trompe dans l'appareil génital féminin, la rencontre des spermatozoïdes les plus féconds sélectionnés au laboratoire, et de 2 à 3 ovocytes de la femme. Elle est très fréquemment associée à une stimulation de l'ovulation avec pour objectif une synchronisation précise de l'insémination intra-utérine et de l'ovulation, et une augmentation du recrutement folliculaire à fin d'optimiser les chances de conception.

La pratique de cette technique appartient depuis longtemps à l'arsenal des techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) mais l'évaluation de sa place parmi celles-ci demeure l'objet de controverses. Selon le rapport de l'Agence de Biomédecine de 2007 elle représente environ 44 % des tentatives d'AMP en intraconjugales (rapport Agence de Biomédecine 2007), malgré cette large place qu'elle occupe dans la prise en charge des couples inféconds, ses modalités (cycle naturel ou stimulé, stimulation pauci- ou multi-folliculaire) restent à établir y compris dans leur chronologie d'où la nécessité d'études en aveugle à grande échelle avec groupe témoin. (Royere D 2004). Ces études permettront aussi d'évaluer la vraie efficacité de la technique en terme de pourcentage d'accouchement unique au lieu du pourcentage de grossesse par cycle ou par couple qui atteint au maximum 15% par cycle.

Les couples confrontés à un échec d'insémination peuvent s'orienter vers une pratique de FIV ou d'ICSI surtout que les données du registre national (FIVNAT 2003) ne révèlent pas de différences majeures pour les patientes réalisant une FIV ou une ICSI suite à l'échec de l'insémination par rapport à celles directement orientées vers ces pratiques.



**Fig 2 : L'insémination intra-utérine (IIU)**



## C. FECONDATION IN VITRO (FIV):

Cent mille enfants sont nés par FIV en France depuis la naissance d'Amandine, premier bébé-éprouvette français (Testart J et coll. 1982). Cette technique représente 16 % des tentatives d'AMP en intraconjugales et 38.8 % des tentatives FIV/ICSI d'après le rapport de l'Agence de Biomédecine en 2007 ; elle a pour objectif de reproduire en laboratoire la fécondation et les premières étapes du développement embryonnaire.

La fécondation *in vitro* a été proposée comme moyen efficace pour traiter des stérilités humaines résultant d'une obstruction définitive des trompes de Fallope. Frydman et coll 1997, découpent schématiquement le processus de FIV en quatre étapes successives : la stimulation ovarienne, le recueil des gamètes, la FIV à proprement parler et le transfert embryonnaire dans l'utérus.

### 1. Stimulation ovarienne ou induction de l'ovulation:

La très grande majorité des cycles de fécondation *in vitro* est associée à une stimulation de l'ovulation dont l'objectif est d'obtenir un nombre élevé d'ovocytes, donc d'embryons, et, ainsi, d'augmenter les chances de grossesse par rapport à un cycle spontané. Dans ce processus, on utilise des hormones appelées inducteurs de l'ovulation.

Les inducteurs utilisés ont beaucoup évolué, passant du citrate de clomifène aux gonadotrophines, d'abord associées à celui-ci, puis utilisées seules. Ces dernières ont également subi des évolutions importantes. Ainsi, alors que l'HMG (*Human Menopausal Gonadotropin*) représentait 90 % des cycles en 1987 (FIVNAT 1996), les cycles, dans leur majorité (69 %), étaient stimulés avec la follicle stimulating hormone (FSH) urinaire en 1996 (FIVNAT 1999). Enfin sont apparues les FSH recombinantes, utilisées dans près de 90 % des cas depuis 1999 (FIVNAT 2002).

Aux gonadotrophines s'associent des agonistes de la GnRH recommandée dans la prévention de l'ovulation prématurée au cours de la stimulation de l'ovulation selon deux protocoles :

- **Protocole long** : Le premier décrit et reste le plus utilisé en France. Ce protocole induit une désensibilisation hypophysaire pour obtenir une quiescence ovarienne avant la stimulation par gonadotrophines. L'agoniste de la GnRH peut être commencé en phase lutéale du cycle précédent (J21, J22 ou J 23). En général, il est poursuivi en association avec les gonadotrophines jusqu'à l'administration d'hCG (*human Chorionic Gonadotropin*) qui a pour rôle de déclencher l'ovulation, la maturation folliculaire finale et la lutéinisation après stimulation de la croissance folliculaire.

- **Protocole court :** Ce protocole induit une libération initiale des hormones gonadotropes endogènes qui permet, en association avec les gonadotrophines exogènes un recrutement folliculaire, ensuite il induit une désensibilisation hypophysaire.

L'agoniste est commencé en phase folliculaire précoce entre le premier et le troisième jour du cycle. Il est poursuivi jusqu'à l'administration d'hCG.

Ces dernières années, sont apparus les antagonistes de la GnRH qui contrairement aux agonistes n'entraîne pas une désensibilisation de l'hypophyse mais un blocage immédiat des récepteurs du GnRH. L'utilisation des antagonistes de la GnRH est recommandée dans la prévention de l'ovulation prématurée au cours d'une stimulation de l'ovulation par les gonadotrophines selon deux protocoles.

- **Protocole monodose :** Il consiste en l'administration d'une injection de 3 mg, dont l'efficacité est d'environ 96 heures.

- **Protocole multidose :** Il consiste en l'administration d'une injection quotidienne de 0,25 mg jusqu'au jour du déclenchement par hCG inclus. (Recommandation Afssaps 2004)

Le schéma thérapeutique doit être adapté à chaque patiente, en fonction de l'indication, de son âge, de sa réponse ovarienne, du rang de la tentative et des effets indésirables potentiels.

Une étude récente de Rossin B et coll 2009 (groupe FIVNAT) réalisée à partir des données FIVNAT 2005, montre pour la pratique de la stimulation de l'ovulation en France, une préférence pour les protocoles agonistes longs surtout en première intention, mais la prescription des antagonistes progresse avec des résultats moindres en taux d'accouchement par ponction (différence faible mais significative). Les protocoles courts restent utilisés avec des résultats décevants. La FSH-rec est préférée mais les HMG et la FSH-ur montre une progression de prescription depuis 2002. La tendance est de commencer par les protocoles longs FSH-rec puis en cas d'échecs à opter progressivement pour l'utilisation des antagonistes, d'une part, et les HMG, d'autre part, et ce d'autant plus que les femmes sont âgées et mauvaises répondeuses. Les taux de succès sont très proches, quel que soit le type de gonadotrophines utilisées, et les caractéristiques de la femme (âge, rang de tentative..) restent les facteurs pronostiques les plus importants.

- **Le monitoring de la stimulation** ovarienne permet de surveiller le bon déroulement de la croissance des follicules ovariens sous l'effet des inducteurs de l'ovulation. Ce monitoring est basé sur les contrôles échographiques des ovaires qui permettent de préciser le nombre de follicules en développement, la taille de ces follicules et leurs localisation à

l'ovaire droit et gauche ainsi que les dosages répétitifs de l'hormone de l'oestradiol dans le sang. En couplant les dosages hormonaux de l'oestradiol au nombre et à la taille des follicules observés à l'échographie le médecin peut évaluer le degré de maturation de ces follicules et donc déterminer le moment optimal pour l'administration des HCG (ou les gonadotrophines chorioniques) qui permettent de déclencher l'ovulation et d'achever la maturation des follicules ovariens en développement jusqu'à une taille d'environ 17-18 mm avec environ 250 pg/ml d'oestradiol par follicule mature.

## **2. Recueil des gamètes :**

La ponction des ovocytes s'effectue généralement sous anesthésie générale légère ou locale 34 à 36 heures après l'injection des déclencheurs de l'ovulation par voie vaginale sous contrôle échographique endovaginal. Le sperme est recueilli par masturbation au laboratoire, le jour de la ponction des follicules, il est ensuite préparé techniquement afin de sélectionner les spermatozoïdes les plus mobiles et ayant la meilleure morphologie.

## **3. FIV proprement dite :**

Consiste à la mise en culture des spermatozoïdes sélectionnés avec les ovocytes recueillis, dans des boîtes stériles contenant des puits avec un milieu de culture approprié. La fécondation survient entre 16 et 20h après l'insémination, caractérisée par l'apparition de 2 deux pronucléi (PN), masculin et féminin, suivie par la segmentation ou clivage qui correspond à la division cellulaire de l'ovocyte fécondé (zygote) aboutissant à la formation de l'embryon.

## **4. Transfert embryonnaire :**

Les embryons sont cultivés *in vitro* pendant 48 à 72h et transférés au stade de 4 à 8 cellules. Ils sont classés en fonction de leur qualité cellulaire, à savoir: le nombre de cellules, leur régularité (tailles de cellules différentes ou non), et leur fragmentation. Les embryons utilisés en priorité sont ceux chez qui la chronologie de la division cellulaire est respectée, avec des cellules bien régulières et sans fragmentation, car ils donnent les meilleures chances de grossesse. Le transfert consiste à introduire les embryons obtenus à l'intérieur de la cavité utérine en passant à travers le col utérin, il se fait sans anesthésie sous contrôle échographique vers 48 ou 72h après insémination. Le nombre d'embryon transféré est de l'ordre de 2 à 3 embryons, un nombre plus important augmente la chance d'obtenir une grossesse mais il augmente le risque de grossesse multiple.

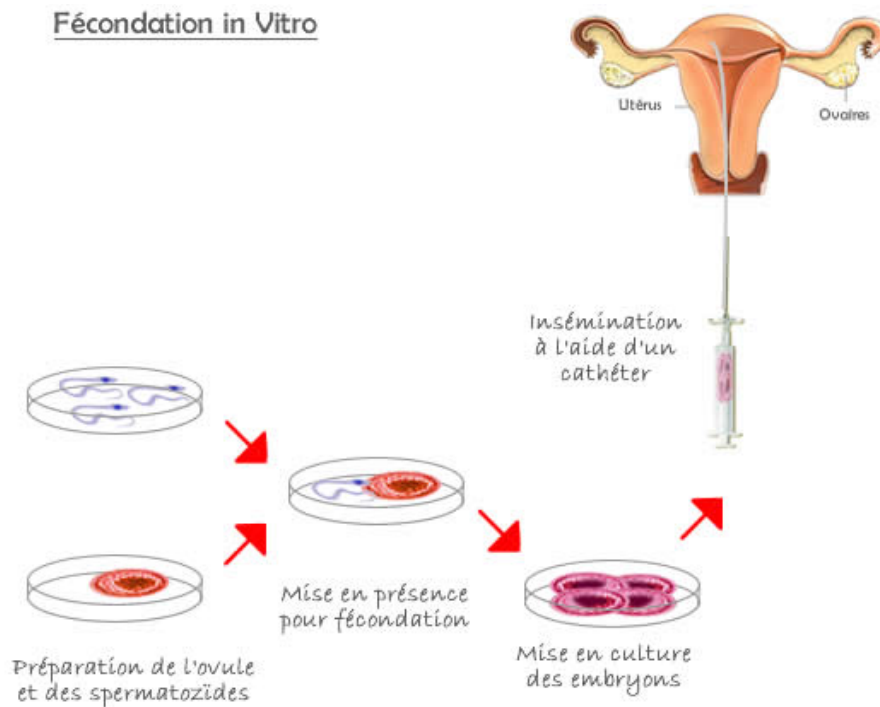


Fig 3 : La fécondation in vitro.

#### D. INJECTION DE SPERMATOZOÏDE DANS LE CYTOPLASME DE L'OVOCYTE : (ICSI)

Le traitement de l'infertilité masculine a connu un réel essor avec le développement de l'injection intracytoplasmique des spermatozoïdes ou ICSI qui a indéniablement constitué l'événement marquant de l'année 1992 quand Palermo et coll rapportent la première grossesse obtenue par l'injection d'un seul spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovocyte (Palermo et coll 1992).

Cette technique est en fait une fécondation *in vitro* assistée proposée en cas d'infertilités masculines sévères portant sur l'un des paramètres du sperme (nombre de spermatozoïdes abaissé, mobilité altérée ou pourcentage de formes atypiques élevé) ou sur les trois paramètres (oligo-asthéo-tératozoospermie : OAT) ; elle est proposée d'emblée pour moins de 0.5 million de spermatozoïdes progressifs au total après préparation ou bien pour plus de 0.5 million de spermatozoïdes progressifs avec morphologie altérée ou une survie anormale après préparation du sperme, selon un consensus publié sous l'égide de la Haute Autorité de Santé HAS en 2007 (HAS 2007).

Elle peut être réalisée avec sperme testiculaire, TESA (Testicular Sperm Aspiration), chez les hommes ayant une azoospermie non obstructive (ANO) ou avec sperme épидidymaire, MESA

(Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration), en cas d'azoospermie obstructive (AO) congénitale ou acquise.

Elle est aussi proposée en cas d'infertilité inexplicée, d'échecs de FIV répétés ou devant un âge maternel avancé (Van Steirteghem et coll 1993, Palermo et coll 2000, Van der Westerlaken et coll 2005).

Le rapport de l'HAS met en évidence un recours de plus en plus important à cette technique puisqu'elle représente 22,3 % du total des FIV en 1995, 48,5 % en 2000, 53% en 2002 et 57 % en 2004.

Cette technique représente environ 25 % des tentatives d'AMP en intraconjugales et 61 % des tentatives FIV/ICSI d'après le rapport de l'Agence de Biomédecine de 2007.

Les étapes d'induction de l'ovulation et le recueil des gamètes sont identiques à celles décrites lors de la FIV classique. Les ovocytes recueillis subissent deux étapes de décoronisation afin de dissocier les cellules du cumulus : la première chimique à l'aide de la Hyaluronidase, la seconde mécanique par aspiration refoulement dans une pipette en verre. Ensuite l'observation au microscope permet de noter le stade de maturité ovocytaire. Seuls les ovocytes matures ayant émis le 1<sup>er</sup> globule polaire seront micro injectés, chacun par un seul spermatozoïde sélectionné à l'aide d'une pipette d'injection, l'ovocyte lui est maintenu par une pipette de contention (Hamamah S et coll 2004).

La fécondation est observée 16 à 20 h après par l'apparition des 2 PN ; 48 ou 72 h après la micro-injection 2 ou 3 embryons en moyenne seront transférés dans la cavité utérine.

Tout comme pour les enfants conçus naturellement, le risque principal des enfants conçus par FIV ou ICSI reste la mortalité et surtout la morbidité associée aux grossesses multiples. En plus, ces enfants ont un risque élevé de prématurité (estimé en moyenne à 9,3 % versus 6,4 %) et d'hypotrophie (estimé en moyenne à 9 % versus 4,7 %) (Basatemur et coll 2008, Steel et coll 2009)

Comparé aux enfants conçus naturellement, le taux de malformations congénitales majeures était supérieur chez les enfants issus de FIV et d'ICSI (estimé respectivement en moyenne à 5,9 et 3,6 %). Les études de grande cohorte avec un long suivi à cinq ans n'ont pas rapporté de différences majeures entre les enfants conçus naturellement ou après ICSI quant au développement physique, cognitif et psychologique (Bonduelle et coll 2005).

L'ICSI permet à des patients infertiles ayant une fréquence accrue d'anomalies chromosomiques de procréer. Ceci peut expliquer la fréquence accrue d'anomalies chromosomiques transmises, observée chez les enfants issus d'ICSI (en moyenne 3 % versus 0,37 % dans la population générale), le risque épi génétique reste un problème sérieux en

cours d'évaluation (Van Steirteghem et coll 2002, Georgiou et coll 2006, Manipalviratn et coll 2009).

Diverses études suggèrent un lien entre le recours à l'AMP et une fréquence accrue d'erreurs épigénétiques: augmentation de la fréquence du syndrome de Beckwith-Wiedmann (BWS) chez les enfants nés par FIV ou ICSI, en liaison avec une anomalie de l'empreinte des gènes KCNQ1OT1 et H19 (Maher et col. 2003 ; Debaun et col 2003 ; Gicquel et col. 2003), du syndrome d'Angelman après ICSI. (Cox et col. 2002 ; Ostarvik et col. 2003).

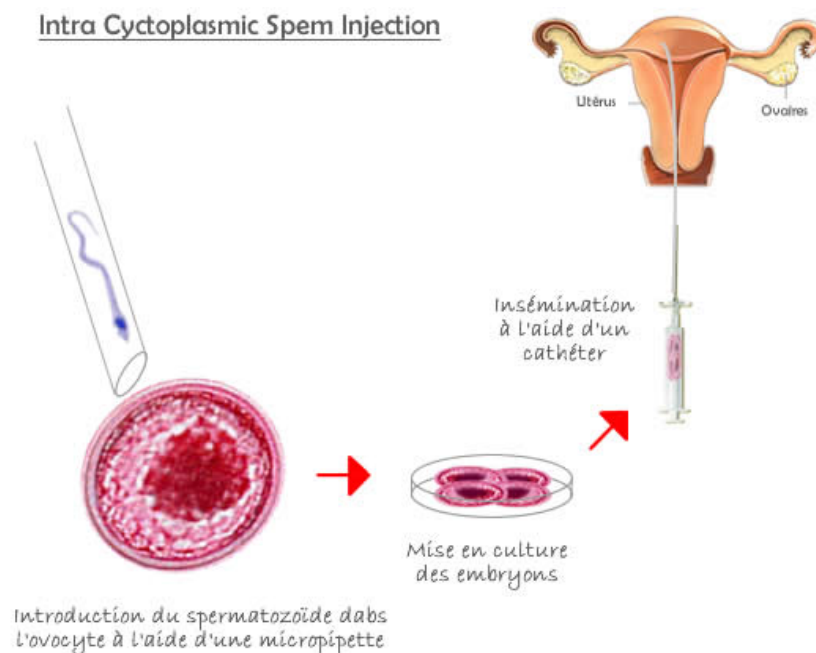


Fig 4 : L'ICSI.

## E. TECHNIQUES ASSOCIEES :

En AMP, l'objectif à atteindre est de permettre à des couples infertiles d'avoir un enfant en bonne santé, en essayant de limiter le nombre des tentatives donc en optimisant chacune d'entre elles. Les laboratoires de fécondation *in vitro*, ont été amenés, progressivement, à développer différentes techniques pour tenter de répondre aux problèmes posés par des situations difficiles telles que des situations d'échecs de maturation ovocytaire *in vivo* ou d'implantation. Pour les échecs de maturation ovocytaire *in vivo*, ils ont développé la

maturation *in vitro* (MIV) et pour les échecs d'implantation, ils ont opté pour la culture prolongée des embryons jusqu'au stade blastocyste.

## 1. Maturation *in vitro* des ovocytes : (MIV)

La maturation *in vitro* consiste à prélever des ovocytes immatures et à les faire mûrir en culture, en laboratoire. Décrite pour la première fois en 1935 par Pincus et Enzmann avec des ovocytes de lapine ce n'est qu'en 1965 qu'Edwards obtient la première MIV chez l'humain et conclut au fait que ces ovocytes pourront être fécondés *in vitro* (Edwards 1965). La première grossesse et naissance après MIV a été décrite en 1983 (Weeck et coll 1983)

### *a. Indications de la MIV :*

La maturation *in vitro* constitue une alternative intéressante pour les patientes présentant un syndrome des ovaires poly kystiques et une hypersensibilité aux gonadotrophines puisqu'elle permet de leur éviter le risque d'hyperstimulation grave lors des protocoles classiques de stimulation ovarienne et de réduire aussi de façon considérable le coût des traitements (Trounson et coll 1994, Poirot et coll 2003, Holzer et coll 2007, Zhao et coll 2009).

Elle pourrait être proposée aux mauvaises répondeuses avec un taux de recueil ovocytaire similaire à celui des normo répondeuses, quand la ponction se fait avant la présence d'un follicule de plus de 10 mm de diamètre (Requena et coll 2000).

Elle permet aussi de récupérer les ovocytes immatures récoltés lors des ponctions de FIV classiques au lieu de les jeter. Ces derniers résultent d'un asynchronisme de développement folliculaire au cours des stimulations ovariennes.

Elle pourrait ouvrir la voie à la congélation des ovocytes immatures et de ce fait éviter le problème du dommage du fuseau méiotique lors de la congélation des ovocytes matures bloqués en MII (Coticchio et coll 2009). L'étude de Cao suggère plutôt de congeler les ovocytes à un stade mature puisque d'après cette équipe, la vitrification des ovocytes immatures (VG) s'accompagne d'un taux faible de maturation en MIV (Cao et coll 2009). Dans notre équipe nous avons par contre obtenu un taux de MIV élevé lorsque les ovocytes étaient vitrifiés au stade VG (Al-Khtib 2010 : article soumis).

Elle rendra plus facile l'obtention d'ovocytes par les donneuses en leur évitant les traitements lourds de la stimulation ovarienne et permettrait d'achever la croissance d'ovocytes

immatures prélevés sur du cortex ovarien congelé des patientes ayant subi un traitement stérilisant (Poirot et coll 2002, Rao et coll 2005).

***b. Différentes étapes de la MIV :***

- Un prétraitement peut être administré à base de FSH (amorçage *par FSH*) ou de HCG (amorçage *par HCG*), bien que les dernières études cliniques n'aient pas montré d'intérêt majeur (Lin et coll 2003).

Mikkelsen a montré, dans une étude en aveugle, que l'amorçage par FSH n'améliorait pas le taux de récupération des ovocytes, ni les taux de maturation, de clivage et de grossesse (Mikkelsen et coll 1999). Pour l'amorçage par *HCG*, l'équipe de Chian montre des taux équivalents de recueil ovocytaire, de maturation ou de fécondation suite à l'injection de HCG 36h avant la ponction, chez des patientes présentant des ovaires polykystiques (PCO) ou un syndrome des ovaires polykystiques (PCOS) ou des patientes normo-ovulantes ; en ce qui concerne les taux de grossesses, ils sont plus importants pour les patientes PCO et PCOS (Chian et coll 2000, Child et coll 2001).

L'étude prospective en aveugle de Fadini a montré un effet bénéfique en cycle de MIV chez des patientes à ovaire normaux, de l'association amorçage FSH et amorçage HCG par rapport à l'amorçage FSH seul ou HCG seul (Fadini et coll 2009).

Les ovocytes utilisés en MIV sont donc de trois types, soit des ovocytes provenant d'ovaires stimulés et exposés ou non à l'HCG, soit d'ovaires non stimulés, soit enfin d'ovaires de patientes présentant un syndrome des ovaires polykystiques (PCOS).

- Les ovocytes immatures sont recueillis vers J8-J11 du cycle après un contrôle échographique et hormonal, par ponction transvaginale échoguidée de follicules antraux de quelques millimètres avec des aiguilles de 17 à 19 gauge (1.15-1.02mm de diamètre), double lumière, branchées sur une pompe d'aspiration et fabriquées spécialement pour la ponction de petits follicules.

La pression d'aspiration utilisée est de 7,5 kPa, pression qui est la moitié de celle utilisée dans les cycles stimulés (Trounson et coll 1994). En raison du caractère sanglant des liquides folliculaires, une solution de rinçage folliculaire héparinée est utilisée de façon systématique.

Les travaux de Wynn montrent que le diamètre idéal des follicules doit être compris entre 5 et 10 mm et Cobo a montré dans ce cas un meilleur taux de développement avec un taux d'obtention de blastocystes plus élevé (Wynn et coll 1998, Cobo et coll 1999). Par ailleurs, la présence au sein de l'ovaire d'un follicule de plus de 10 mm de diamètre diminue le taux de



maturation des ovocytes recueillis dans les autres follicules (Requena et coll 2000, Suikkari et coll 2000).

- Les complexes cumulo-ovocytaires seront repérés dans le liquide folliculaire avec la loupe binoculaire par la suite lavés avant d'être mis dans un milieu de culture à base de TC 199 supplémenté en FSH, en HCG et en sérum de la patiente (20%) comme source de protéines.

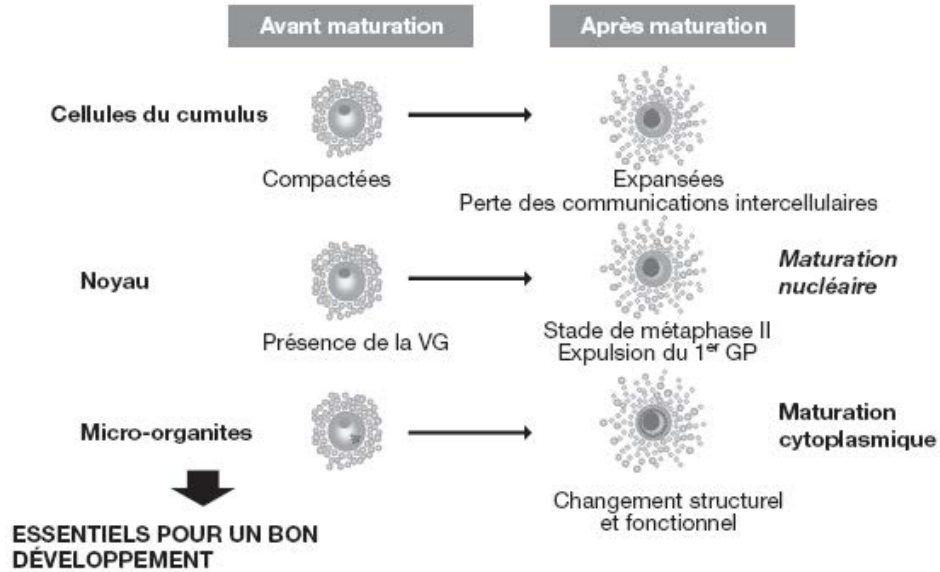
La présence des cellules de la granulosa autour de l'ovocyte est très importante dans le processus de maturation ovocytaire, et augmente aussi le taux de clivage (Gosden et coll 1997, Jonhson et coll 2008).

Selon Zhang l'ajout de FSH ou d'HMG augmente les taux de maturation des ovocytes (Zhang et coll 1993). En revanche l'étude prospective en aveugle de Ge ne trouve pas un effet bénéfique à l'addition de HCG dans différents milieux de culture (Ge et coll 2008). Celle de Filali comparant deux milieux de culture (TC 199 et IVM medium de Medicult) trouve des taux similaires de maturation, de fécondation, de développement embryonnaire et de grossesse (Filali et coll 2008). Une étude récente a montré l'effet bénéfique du milieu TC 199 par rapport au fluide tubaire sur les taux de maturation et de fécondation ainsi que sur le développement embryonnaire chez les patientes atteintes de PCOS (De Araujo et coll 2009).

- La durée de la maturation est en général comprise entre 24 et 48 heures. Smith compare 28 et 36 heures de maturation sans trouver de différence sur les taux de grossesse (Smith et coll 2000). En revanche Mikkelsen montre l'effet bénéfique d'une durée de maturation de 36 heures sur les taux d'implantation (Mikkelsen et coll 1999).

- La fécondation est en général assistée (ICSI) mais une FIV classique peut être réalisée. Nagy en 1996, rapporte que l'ICSI est la meilleure option car la baisse des taux de fécondation observée après FIV sans micromanipulation pourrait être due à un durcissement de la zone pellucide lors de la MIV (Nagy et coll 1996)

Le transfert aura lieu vers J2 ou J3 selon les équipes après préparation de l'endomètre afin de le rendre adéquat à la nidation par l'association d'un traitement oestroprogestatif séquentiel (Requena et coll 2001).



Tiré de Cha, 2004

**Fig 5 : Les différentes étapes de la maturation ovocytaire *in vitro*.**

**c. Résultats de la MIV :**

- Le taux de recueil ovocytaire peut être prévu par l'examen échographique, il est variable selon les études et compris entre 8 et 10 ovocytes en moyenne (Tan et coll 2002). Il est plus élevé, en moyenne 13 ovocytes, pour les patientes avec PCOS (Trounson et coll 1994, Child et coll 2001).
- Le taux de maturation nucléaire est en moyenne de 70% avec un intervalle allant de 49% (Cha et coll 1991) à 84% (Chian et coll 1999).
- Le taux de fécondation varie selon que les ovocytes ont été fécondés en FIV classique ou en ICSI et varie aussi selon les études. Les premiers résultats après FIV vont de 41% (Trounson et coll 1994) à 82.2% (Veeck et coll 1983). Par la suite des études rapportent des taux de fécondation meilleurs en ICSI (Nagy et coll 1996 et Hwang et coll 2000). Actuellement ce taux est en moyenne de 47,5% après FIV et de 76,5% après ICSI. En pratique, dans toutes les études récentes, l'ICSI est utilisée pour féconder les ovocytes mûris *in vitro*.
- Les taux moyens de clivage et de transfert sont respectivement de 80 % et 86 % avec un nombre moyen d'embryon transférés de 3,18 % et un taux d'implantation de 9 %, ce qui est plus bas qu'en FIV classique (Poirot et coll 2003).

Les résultats cliniques se sont sensiblement améliorés ces dernières années avec des taux de grossesse entre 20 et 54%. La naissance d'approximativement 400 enfants a été rapportée dans

la littérature et le suivi organisé par certaines équipes conclut au bon développement à la fois physique et psychique des enfants issus de la MIV.

Bien que de bons résultats aient été obtenus ces dernières années, surtout pour les patientes atteintes d'ovaires poly kystiques ou du syndrome des ovaires poly kystiques (Chian et coll 2004), la maturation *in vitro* n'est pas encore devenue un traitement de fertilité classique du fait du faible nombre de naissance vivante par rapport à la FIV classique (Suikkari et coll 2008). Selon Li et coll, la MIV peut désorganiser le fuseau de division méiotique et perturber ainsi la ségrégation chromosomique qui pourrait être à l'origine de défaut de développement embryonnaire précoce (Li et coll 2006). Une étude récente de Benkhalifa et coll 2009, trouve un taux élevé de fausses couches de 28 % supérieur à celui rapporté en FIV classique (8 %) avec une analyse cytogénétique et de la fragmentation de l'ADN des embryons ne révélant pas de différence par rapport à ce qui a été décrit en FIV. Ceci suggère que ces résultats ne sont pas nécessairement dus à une mauvaise qualité des ovocytes mûris *in vitro* mais plutôt à une mauvaise réceptivité endométriale en rapport avec une phase folliculaire écourtée lors de ces cycles de MIV qu'il faudrait prendre en considération.

## 2. Culture prolongée :

Les embryons humains préimplantatoires produits par fécondation *in vitro* sont transférés dans l'utérus 2 à 3 jours après la ponction ovocytaire, c'est à dire aux stades 4 ou 8 cellules après culture. Le taux d'implantation des embryons âgés de 2 ou 3 jours est faible puisqu'il n'est que de 10 % à 12 % par embryon. Ce faible taux d'implantation peut s'expliquer en partie par l'hypermotricité utérine et la période inappropriée du transfert puisque *in vivo*, les embryons à ce stade de développement sont encore dans les trompes et que l'embryon n'atteint l'utérus qu'au stade de blastocyste, c'est à dire, 5 à 6 jours après la fécondation.

C'est pour cette raison que les biologistes ont développé la culture prolongée des embryons jusqu'au stade blastocyste depuis 1990, dans le but de sélectionner les embryons à potentiel de développement et d'implantation important et d'assurer une synchronisation optimale entre l'endomètre et l'embryon permettant ainsi de pallier aux échecs répétés d'implantation en FIV et d'éviter le risque de grossesses multiples par transfert de plusieurs embryons lors de la même tentative. La plupart des études concernant l'évolutivité des embryons cultivés *in vitro* s'accordent sur le fait qu'environ 40 à 50 % atteignent le stade blastocyste, donc cette technique va permettre aussi d'éliminer les embryons bloqués dans la période correspondant à

l'activation génomique (stade 8 cellules vers J3-J4 post-insémination) du fait de problèmes maternels (transcrits maternels déficients) ou paternels. Elle permet aussi une sélection cytogénétique des embryons puisque la moitié des embryons bloqués en culture prolongée sont porteurs d'anomalies cytogénétiques (Benkhalifa et coll, 1996 ; Menezo et coll, 1997).

Plusieurs études ont comparé les résultats obtenus avec transfert précoce d'embryons ou bien culture prolongée et trouvent une différence significative concernant les taux de grossesse, d'implantation et de naissance vivante qui sont meilleurs en cas de transfert de blastocystes (Gardner et coll 2002, Blake et coll 2007, Mangalraj et coll 2009). Dans certaines situations l'obtention d'une grossesse unique est indispensable en cas d'utérus cicatriciel, malformé ou en cas de risques connus d'anomalies chromosomiques. Dans toutes ces situations, le taux d'implantation plus élevé des blastocystes (21% par blastocyste transféré) autorise un transfert numériquement plus faible sans altération des résultats. (36,4 % grossesse/ transfert).

C'est une technique qui occupe de nos jours la place la plus importante au sein des techniques particulières. La proportion de fécondations *in vitro* avec culture prolongée semble avoir augmenté en 2007 par rapport aux années précédentes. Selon le rapport de l'Agence de Biomédecine de 2007, les taux de grossesse échographique par ponction sont respectivement de 31 % et 28,3 % en FIV et ICSI. La culture prolongée consiste à prolonger de 3 jours en moyenne la culture embryonnaire soit en coculture soit à en utilisant des milieux séquentiels :

***a. Coculture :***

La coculture consiste à cultiver les embryons jusqu'au stade blastocyste sur une couche cellulaire d'origine somatique. Différents supports cellulaires ont été utilisés en embryologie humaine : des tapis cellulaires d'origine génitale (cellules du cumulus, de la granulosa, de l'oviducte, de l'utérus). Ces cellules ont été choisies afin de reproduire l'environnement naturel de l'embryon et favoriser l'échange des facteurs produits par les cellules avec lesquelles il se trouve en contact. Une méta analyse de Kattal en 2008 met en évidence l'effet bénéfique de la coculture puisqu'elle améliore de façon significative le taux de grossesse et d'implantation des embryons (Kattal et coll 2008). D'autres études ont mis en évidence l'amélioration des taux d'implantation et de grossesse lors de la coculture avec les cellules épithéliales de l'endomètre (Rubio et coll 2000, Mercader et coll 2003) et Dominguez trouve une supériorité significative de cette technique de coculture par rapport à la culture en milieu séquentiel en ce qui concerne les taux de blastocyste obtenus, de grossesse et d'implantation (Dominguez et coll 2010).

Menezo et coll en 1992 ont montré qu'il est possible d'utiliser des cellules immortalisées d'origine extra génitale : les cellules Véro provenant d'épithélium de rein de singe (Menezo et coll 1992). La plupart des auteurs rapportent des résultats satisfaisants en terme de grossesse et d'implantation, résultats qui sont doublés par rapport aux résultats des transferts précoces J2-J3. Actuellement, cette technique est déconseillée car les cellules Véro n'ont fait l'objet d'aucune procédure de validation au regard de la sécurité sanitaire. En général, les résultats de ces techniques de coculture dépendent fortement de la qualité de la culture, ce sont des techniques lourdes qui ne donnent pas toujours des résultats constants et reproductibles.

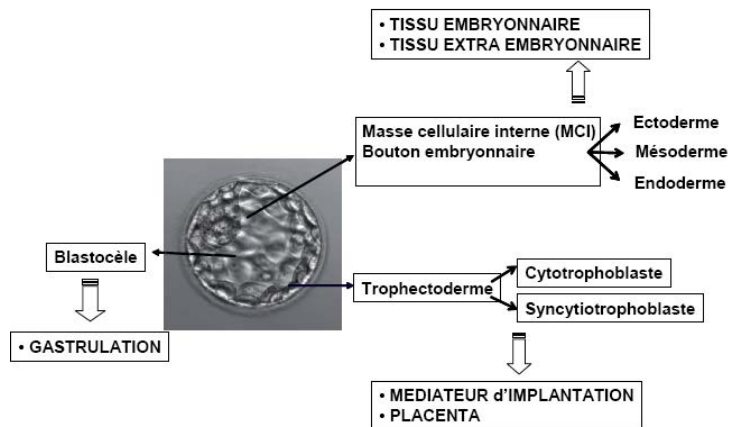
La pratique de la coculture a permis une meilleure connaissance de la biochimie de l'embryon et la fabrication des milieux de culture capables de maintenir le développement jusqu'au stade blastocyste sans coculture.

***b. Culture prolongée en milieux synthétiques : milieux séquentiels :***

Grâce à la coculture, les connaissances sur les besoins métaboliques des embryons se sont améliorées et en 1998, Gardner et coll ont proposé la culture prolongée en milieux séquentiels, technique plus simple, plus fiable et mieux définie, entraînant de ce fait l'abandon progressif des cocultures (Gardner et coll 1998). Les milieux de culture utilisés pour l'insémination et le développement précoce de l'embryon humain sont inadaptés pour la culture prolongée jusqu'au stade blastocyste. En effet, si avant l'activation génomique un simple milieu suffit puisque l'embryon se développe à partir de ses réserves propres avec une activité transcriptionnelle très faible ; en revanche, après l'activation génomique, l'embryon démarre son activité transcriptionnelle et a besoin de milieux riches, notamment avec des facteurs de croissance. C'est pourquoi on utilise 2 ou 3 milieux successifs au cours de la culture. La mise au point par différentes sociétés internationales, de milieux séquentiels faciles à utiliser a permis aux biologistes de FIV d'envisager le transfert de blastocyste non seulement pour essayer de résoudre certains échecs d'implantation mais aussi comme technique de routine en FIV. Depuis l'an 2000, la plupart des équipes réalisant des transferts de blastocystes utilisant les différents milieux séquentiels commercialisés rapportent des taux de grossesses cliniques par transfert et d'implantation par blastocyste transféré plus élevés qu'avec des transferts réalisés avec des embryons précoces (Gardner et coll 2002, Blake et coll 2007). Le risque qui existe est de ne pas pouvoir bénéficier d'un transfert, faute d'obtention de blastocystes mais il est faible. La plupart des études rapportent des absences totales d'évolution en blastocyste dans moins de 10 % (Gardner et coll 1998), ce qui est un

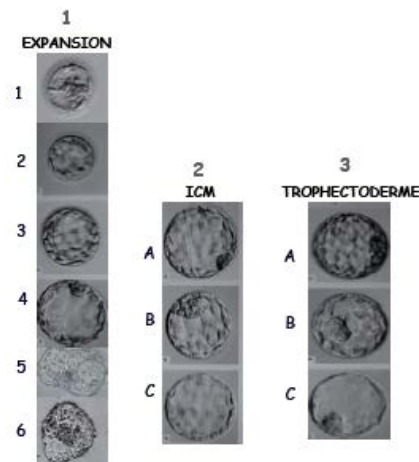
risque faible et acceptable surtout quand le choix de prolonger la culture n'est adopté que si à J3 on dispose d'au moins de 3 embryons à 8 cellules (Guerin JF 2002).

Le contrôle de l'évolution de l'embryon jusqu'au stade du blastocyste doit prendre en compte à J1, ses caractéristiques au stade zygote (score et position des PN) à J2-J3 son stade de clivage avec le nombre de blastomères et leur symétrie ainsi que le taux de fragmentation et la constitution nucléaire (mono ou multinucléation des blastomères), à J4, l'état embryonnaire au stade morula (compaction complète et début de blastulation), à J5, l'état d'expansion du blastocyste et à J6 son degré d'éclosion (Nogueira D 2008).



**Fig 6 : Blastocyste.**

La morphologie des blastocystes le jour du transfert est évaluée selon les critères de classification établis par Gardner en 1998 qui tiennent compte de l'état d'expansion de J1 à J6, du début de la formation des blastocèles jusqu'à éclosion du blastocyste ; de l'état de compaction des cellules du bouton embryonnaire selon 3 stades dégressifs du nombre de cellules compactées (A, B, C) et de l'état du trophectoderme évalué en 3 stades dégressifs, en fonction de la quantité de ces cellules (A, B, C).



**Fig 7 : Critères de classification (Gardner 1998-1999)**

### 3. Cryoconservation des ovocytes :

#### *a. Indications :*

La cryoconservation des ovocytes humains répond à des besoins cliniques indiscutables mais pose encore des problèmes d'efficacité et d'innocuité. Elle est la technique de choix pour préserver la fertilité féminine avant un traitement stérilisant anticancéreux telle que les chimiothérapies par les alkylants ou les radiothérapies à fortes doses. Elle peut être une alternative à la congélation des embryons surnuméraires conséquence de l'hyperstimulation ovarienne, qui pose de nombreux problèmes légaux, moraux et religieux pour les praticiens, les législateurs et les patients. Elle permet aussi le sauvetage de certains cycles de fécondation *in vitro* avec échec de recueil de spermatozoïdes et pourrait permettre une gestion plus facile du don d'ovocytes par constitution de banques d'ovocytes, l'équivalent de banques de sperme. Elle serait aussi la solution aux problèmes d'altération de la réserve ovarienne et aux ménopauses précoces.

#### *b. Principes de la cryoconservation :*

La cryoconservation repose sur le principe de suspendre toute activité biologique à des basses températures d'où la possibilité d'un stockage prolongé, et un retour à la viabilité des cellules après réchauffement. La température généralement utilisée pour la cryoconservation des gamètes et des embryons est celle de l'azote liquide, -196 °C.

Les phases critiques de la cryoconservation sont le refroidissement de 37 à -196 °C et le réchauffement. Lors du refroidissement, la formation de cristaux de glace peut causer des dégâts intracellulaires d'origine mécanique. De plus, lors de la cristallisation, les électrolytes en solution dans l'eau sont exclus du cristal et se retrouvent à l'interface glace eau, à des concentrations toxiques pour les protéines. Lors du réchauffement, la glace fond et libère de l'eau, ce qui diminue l'osmolarité du milieu extracellulaire. Si ces phénomènes sont rapides, des mouvements d'eau vers la cellule peuvent la faire gonfler et la lyser par choc osmotique (Desolle et coll 2009). Les objectifs de la cryoconservation sont donc de limiter la formation de cristaux de glace, les phénomènes de concentration–dilution des électrolytes et le risque de choc osmotique au réchauffement. Pour cela, des cryoprotecteurs diffusibles (éthylène glycol EG, propylène glycol PROH, Glycérol et DMSO) et non diffusibles (les sucres) sont utilisés permettant la déshydratation des cellules et l'abaissement du point de congélation en contrôlant la condensation des germes cristallins des molécules d'eau du milieu

extracellulaire (Camus et coll 2006). De plus, il faut contrôler la vitesse de congélation et le volume congelé.

***c. Techniques de cryoconservation :***

**La congélation lente :** décrite depuis les années 80 par Trounson et coll, Lasalle et coll basée sur le principe d'une descente programmée de la température dans des automates. Au début, Les ovocytes sont incubés pendant 15 mn en présence de faibles concentrations de cryoprotecteurs (PROH à 1.5mol/l) ensuite pendant 10mn avec l'association PROH à 1,5 mol/l et sucrose 0.2 mol/l et enfin ils sont aspirés avec un volume de 50µl dans une paillette en résine qui sera soudée. Le refroidissement se fait à une vitesse d'environ 2°C/mn de 37 à -7°C ; à cette température, une cristallisation est induite manuellement à distance (*seeding*), avec stabilisation pendant 10mn, ensuite la descente de la température est poursuivie à la vitesse de 0,3°C/mn jusqu'à -35°C. Pendant ce temps les cryoprotecteurs pénètrent en intracellulaire et le sucrose induit une déshydratation de l'ovocyte permettant d'accroître leur concentration. Entre -35°C et -150°C le refroidissement est poursuivi à une vitesse de 33,3°C/mn. A la fin les paillettes sont conservées dans l'azote liquide. Le réchauffement doit être rapide, pour éviter les phénomènes de recristallisation, par incubation successive de l'ovocyte dans plusieurs bains avec de fortes concentrations de sucrose (0,3 mol/l) dans le milieu extracellulaire pour prévenir le choc osmotique en raison des concentrations intracellulaires de PROH. Enfin, l'ovocyte est lavé et placé à l'étuve dans un milieu de culture standard.

**La vitrification :** Décrite dès 1937 par Luyet, c'est une technique de refroidissement très rapide permettant la cryoconservation sans formation de cristaux de glace par transformation des liquides en un état vitreux ou amorphe. Cette technique est difficile à réaliser car l'état amorphe n'est obtenu qu'en refroidissant le liquide suffisamment vite pour le solidifier sans lui laisser le temps d'ordonner ces molécules en cristal (Luyet 1937).

C'est une technique en plein essor en biologie de la reproduction pour la cryoconservation des embryons et des ovocytes (Kuwayama 2007, Loutardi et coll 2008, Cobo et coll 2008).

Sa réalisation nécessite une forte concentration de cryoprotecteurs permettant d'augmenter la viscosité des milieux intra- et extracellulaire, évitant le rassemblement des molécules d'eau par leur liaison hydrogène. Plusieurs sont utilisés en association, ce qui permet de réduire la concentration de chacun d'entre eux et de réduire ainsi leur effet toxique (Camus et coll 2006, Yavin et coll 2007). Aussi, la durée d'exposition aux cryoprotecteurs doit être réduite afin de limiter leur toxicité. Une très grande vitesse de descente en température est requise, donc la



vitrification nécessite de faire un compromis entre une vitesse de refroidissement et une concentration minimale en cryoprotecteurs (Fahy et coll 2004).

L'étape de réchauffement est très délicate par ce qu'il existe un risque de formation de cristaux de glace, paradoxalement plus important que le risque rencontré durant le refroidissement. Le réchauffement doit être très rapide pour éviter une dévitrification extensive dans l'état liquide surfondu. (Baudot et coll 1998)

***d. Effets de la cryoconservation :***

La cryoconservation peut provoquer des altérations de la zone pellucide et de l'oolemme démontré en microscopie électronique et par l'analyse biochimique des composants intra et extracellulaire (Gook et coll 2007). Selon Gardner l'exposition des ovocytes aux cryoprotecteurs provoque une augmentation du calcium intracellulaire et pourrait induire un durcissement de la zone pellucide par libération prématurée des granules corticaux. Il a aussi démontré grâce aux dosages des substrats énergétiques (Pyruvate, lactate) dans les milieux de culture que la cryoconservation altère le métabolisme énergétique de l'ovocyte (Gardner et coll 2007).

La cryoconservation affecte aussi le fuseau de division méiotique. C'est une structure temporaire, dynamique et polarisée, qui assure la ségrégation chromosomique, donc essentielle à l'achèvement de la méiose et à l'euploïdie. Il est formé par un système de microtubules sensibles au froid et à l'exposition aux cryoprotecteurs. Selon Mandelbum les variations de la température pourraient provoquer des anomalies de distribution des chromosomes sur la plaque équatoriale, conduisant ainsi à des aneuploïdies (Mandelbum et coll 2004). Dans une étude en aveugle, Cao trouve beaucoup plus d'anomalies ovocytaires touchant le fuseau et l'organisation des chromosomes après congélation lente par rapport à la vitrification (Cao et coll 2009). Molinari met en évidence une désorganisation du fuseau et de la zone pellucide après décongélation lente indépendante de l'âge des patientes ou de leur indice de masse corporelle (Molinari et coll 2010).

Devant ces risques, la congélation de l'ovocyte en fin de prophase I, au stade de vésicule germinative (VG) au moment où le fuseau n'est pas encore formé peut-être une alternative intéressante (Bianchi et coll en 2007). Après décongélation, les ovocytes devront subir une MIV en vue d'une fécondation par ICSI, mais plusieurs études ont montré que les ovocytes congelés au stade immature présentaient des taux de survie, de fécondabilité et de développement embryonnaire inférieurs par rapport aux ovocytes congelés au stade de MII (Toth et coll 1994, Cao et coll 2009). Le développement de nouvelles techniques de biologie

moléculaire permettant d'établir des profils génomique et protéomique normaux dans les gamètes apporteront des renseignements indispensables pour améliorer les procédures de cryoconservation.

*e. Résultats de la cryoconservation :*

Les critères d'évaluation possibles sont la survie à la cryoconservation, les taux de fécondation et le développement embryonnaire précoce.

Le taux de survie à la congélation lente des ovocytes mûrs avec les protocoles actuels est de l'ordre de 70 % ; après vitrification ce taux publié récemment est de l'ordre de 90 % (Okaty et coll 2006, Gook et coll 2007, Cobo et coll 2008).

Des taux de fécondations en ICSI reproductibles de l'ordre de 70 à 80 % sont rapportés, équivalents à ceux obtenus avec des ovocytes frais (Borini et coll 2008). Après vitrification, les taux de fécondation publiés sont de l'ordre de 90 % (Okaty et coll 2006, Gook et coll 2007). Le taux de clivage est presque équivalent après congélation lente ou vitrification en moyenne de l'ordre de 90 % (Gook et coll 2007, Borini et coll 2008).

Après congélation lente, plus de cinq implantations pour 100 ovocytes utilisés ont été obtenues par Bianchi et coll en 2007, alors qu'après vitrification 11 implantations pour 100 ovocytes décongelés ont été rapportées (Gook et coll 2007).

Une étude prospective en aveugle de Smith et coll a trouvé des taux de survie ovocytaire, de fécondation, de segmentation et de grossesse significativement plus élevés après vitrification, qu'après congélation lente (Smith et coll 2010), c'est ce qui a été démontré par Cao et coll en 2009.

Il n'a pas été observé d'augmentation du risque d'anomalies congénitales chez les quelques centaines d'enfants nés dans le monde après cryoconservation ovocytaire, mais une revue de la littérature concernant les enfants nés après cryoconservation d'embryon ou d'ovocyte conclut à la nécessité d'autres études de suivie à long terme de ces enfants (Wennerholm et coll 2009, Noyes et coll 2009)

De nos jours, malgré les progrès incontestables réalisés dans la technique de congélation des ovocytes, seulement 1% des ovocytes décongelés conduisent à la naissance d'un enfant (Okaty et coll 2006, Gook et coll 2007). Il convient donc de poursuivre l'évaluation de ces techniques dans le cadre de protocoles de recherche par l'étude du profil génomique, épigénomique, transcriptomique ou protéomique pour pouvoir conclure à leur réelle efficacité et à leur innocuité.

# CHAPITRE II

---

## GAMETOGENESE - FECONDATION DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

La reproduction définit l'ensemble des processus par lesquels une espèce se perpétue, en suscitant de nouveaux individus. Dans l'espèce humaine et la majorité des espèces eucaryotes la reproduction est sexuée. Elle est caractérisée par la rencontre et la fusion des gamètes mâle et femelle donnant naissance à un œuf (ou zygote). Selon ce mode de reproduction, les individus sont tous génétiquement uniques, mais différents entre eux et différents de leurs parents. Cette variabilité intraspécifique est le résultat du brassage de gènes qui se fait au cours de deux étapes clés de la reproduction sexuée : la gamétogenèse et la fécondation.

La gamétogenèse est un processus de maturation des cellules germinales ou gonocytes diploïdes en cellules mûres haploïdes. Elle est différente selon le sexe, chez l'homme c'est la spermatogenèse, chez la femme c'est l'ovogenèse.

Ce 1<sup>er</sup> chapitre fera un rappel des notions de base de la biologie de la reproduction sexuée, en particulier le processus de la gamétogenèse et la fusion des deux gamètes mâle et femelle (fécondation) ainsi que le développement embryonnaire préimplantatoire.

## **A. OVOGENESE – FOLLICULOGENESE :**

### **1. Ovogenèse :**

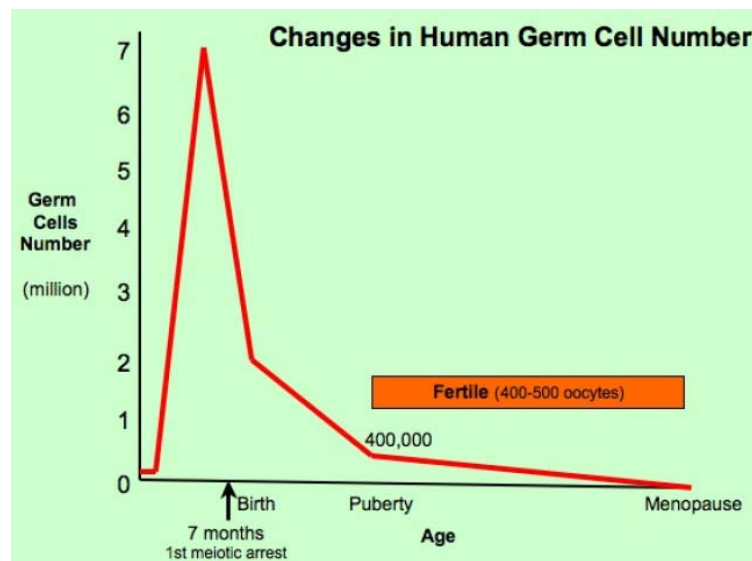
L'ovogenèse est le processus de transformation des cellules souches appelées ovogonies en gamètes femelles ou ovocytes qui, à l'issue d'une série de changements tant cytologiques que moléculaires vont acquérir la capacité à être fécondé et à supporter l'embryogenèse. Pour cela l'ovocyte est dépendant des cellules qui l'entourent avec lesquels il forme une unité morphologique, fonctionnelle évolutive appelé follicule ovarien. La chronologie de ces transformations s'étale sur des années elle débute au cours de la vie embryonnaire mais n'aboutit à la formation de gamète femelle qu'à partir de la puberté et se déroule de façon cyclique entre la puberté et la ménopause (Czyba et Montella 1993).

#### ***a. Pendant la vie embryonnaire et fœtale :***

A la fin du 1<sup>er</sup> mois de développement, les cellules germinales primordiales migrent vers les crêtes génitales et s'organisent en cordon de Valentin Pfluger dans la gonade en formation. Elles se différencient en ovogonies qui se multiplient par des mitoses de type somatique et de façon synchrone grâce à des ponts cytoplasmiques, c'est la phase active de prolifération (Czyba et coll 1971).

Du 5<sup>ème</sup> au 7<sup>ème</sup> mois de développement, une partie des ovogonies se différencie en ovocytes de 1<sup>er</sup> ordre ou ovocytes primaires entourés chacun d'une couche de cellules folliculaires formant ainsi des follicules primordiaux. Lors de cette différenciation, des changements nucléaires auront lieu essentiellement l'entrée en méiose, type particulier de division cellulaire destinée à produire des cellules germinales haploïdes. La méiose est initiée par une duplication de l'ADN et des centrosomes suivie de l'entrée de la cellule en prophase I. Elle va accomplir le stade leptotène, zygotène, pachytène et se bloque au stade diplotène ou dictyé caractérisé par des chromosomes très diffus entourés par une membrane nucléaire c'est la vésicule germinative (VG) (Figure 2). Ce blocage de la méiose va durer jusqu'à la puberté. Il est attribué à des substances appelées OMI (Oocyte Maturation Inhibitors) transmises à travers les cellules folliculaires par des jonctions perméables (Tsafirri et coll 1976) et surtout à l'AMPc qui active des protéines cellulaires inhibant la méiose (Lefevre B 2004).

Dès la vie fœtale, il existe une dégénérescence de la réserve d'ovocytes (Figure 1). Ce stock représente environ 7 millions à 7 mois, 1 à 2 millions à la naissance, 400 000 à la puberté dont 400 uniquement seront potentiellement émis de façon cyclique de la puberté à la ménopause (Thibault et Levasseur 2001).



**Fig 8: Variation du nombre des cellules germinales durant la vie de la femme.**

***b. Dans l'enfance :***

A la naissance les ovocytes ont un diamètre de 50 à 70  $\mu\text{m}$ , leurs chromosomes sont sous forme de bivalent, le cytoplasme contient les organites habituels, la membrane cytoplasmique présente des zones de jonction avec les cellules folliculaires aplaties qui l'entourent formant

les follicules primordiaux. La majorité régresse en grand nombre ainsi que les ovocytes qu'ils contiennent de sorte qu'il n'en restera que 400 000 à la puberté (Czyba et coll 1971).

Pour certains débute la longue phase de croissance ovocytaire sous l'effet de substances transmises par les cellules folliculaires à travers les jonctions perméables. Elle ne s'achève qu'au moment de la maturation du follicule durant la folliculogénèse. Le volume de l'ovocyte augmente de 40µm à 120µm, le noyau produit de grandes quantités d'ARN, le cytoplasme est le siège de nombreuses synthèses protéiques et s'enrichit progressivement en organites divers. L'ovocyte excrète des glycoprotéines qui forment la zone pellucide (Czyba et Montella 1993).

***c. De la puberté à la ménopause :***

La maturation de l'ovocyte est synchrone de la maturation folliculaire. Ce phénomène ne va concerner qu'un petit nombre de follicule environ 400 à 500 durant la période d'activité génitale ovarienne chez la femme. Il correspond à l'ensemble des changements cytoplasmiques et nucléaires que subit l'ovocyte primaire à l'intérieur du follicule mûr suite à la décharge gonadotrope ovulante de LH (Luteinizing hormon).

- **La maturation nucléaire** : Caractérisée par plusieurs aspects cytologiques, le plus important étant la rupture de la vésicule germinale : c'est le premier signe de la reprise du processus méiotique représenté par un plissement puis une fragmentation et la disparition de l'enveloppe nucléaire, qualifiée de *Germinal Vesicle Break Down* ou GVBD. Au même moment les chromosomes se condensent et l'activité transcriptionnelle diminue puis s'arrête complètement. Cette reprise de la méiose repose en partie sur l'activation du MPF (Maturation Promoting Factor) et ne peut se réaliser que lorsque l'ovocyte a synthétisé et emmagasiné assez d'ARNs et de protéines pendant sa croissance au stade VG (vésicule germinative).

Le fuseau de division méiotique se met en place et les chromosomes s'organisent sur la plaque équatoriale métaphasique. L'ovocyte accomplira la première division méiotique et entamera sans réplication la deuxième division pour se bloquer en métaphase II (MII). Un lot de chromosomes sera retenu dans l'ovocyte qui conservera tout le cytoplasme de la cellule mère, tandis que l'autre est expulsé dans le premier globule polaire (Czyba et Montella 1993, Lefevre B 2004). Ce blocage en MII est dû à un facteur cytotatique, CSF (Cytostatic Factor), qui maintiendrait l'activité du MPF (Masui Y 1991, Kubiak et coll 1993).

En absence de fécondation l'ovocyte reste bloqué à ce stade de la méiose II au cours de sa migration tubaire et dégénère ensuite. S'il y a fécondation l'ovocyte II achève sa maturation et se transforme en ovocyte mûr avec émission du 2<sup>ème</sup> GP. (Figure 2)

- **La maturation cytoplasmique** : elle serait aussi déclenchée par le facteur MPF. Elle est caractérisée par un remaniement de la membrane cytoplasmique qui se hérissé de microvillosités engrenées avec des prolongements des cellules folliculaires. Les mitochondries se multiplient et l'appareil de golgi s'étend largement. Au centre des formations vésiculaires et vacuolaires apparaissent. Un remaniement du cytosquelette entraînera la migration des granules corticaux vers la périphérie et leur fixation sur la membrane plasmique en préparation à la réaction corticale au moment de la fécondation. (Czyba et coll 1971).

La régulation du développement des ovocytes ainsi que le processus de maturation ne sont pas encore totalement compris. Les interactions entre les hormones et les facteurs de croissance qui contrôlent ces processus sont très complexes (Gougeon et coll 1997). La croissance de l'ovocyte est intimement liée à celle du follicule engagé dans les différentes étapes de la folliculogénèse qui se produit alors qu'il est bloqué en fin de prophase méiotique.

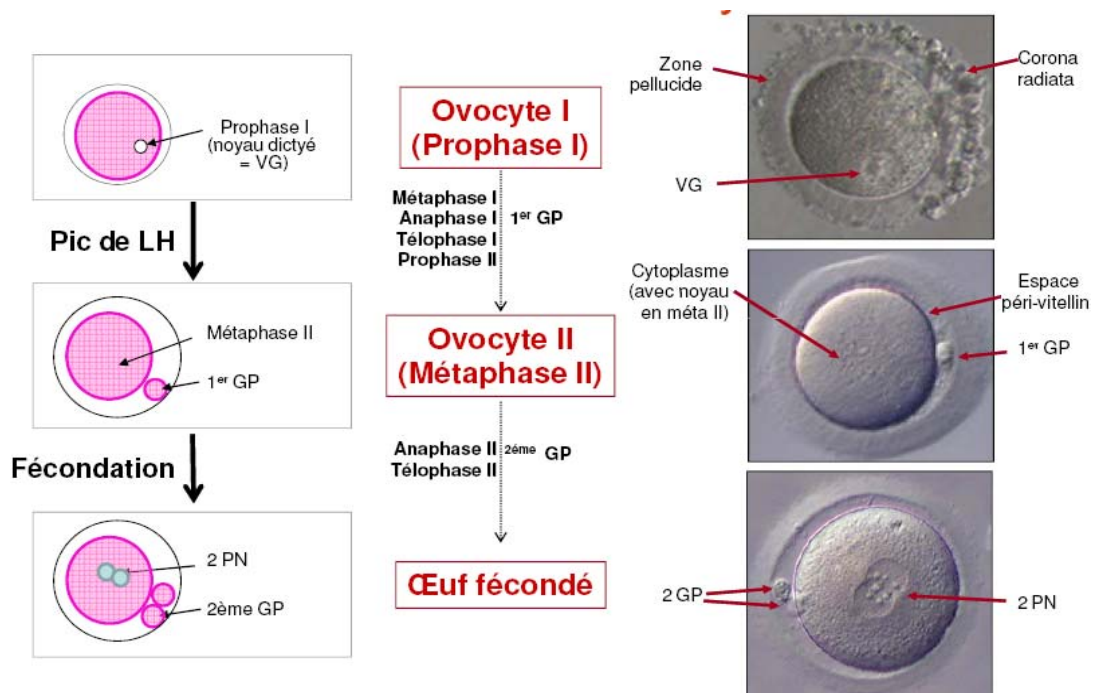


Fig 9 : La méiose ovocytaire et l'aspect de l'ovocyte fécondé.

## 2. Folliculogenèse :

C'est l'ensemble des transformations que subit le follicule primordial pour devenir un follicule mûr. Elle se déroule dans le cortex ovarien et elle n'est complète qu'à la puberté. Elle dure plus de 3 mois chez la femme.

### *a. Stades folliculaires :*

**Les follicules primordiaux :** représentent la réserve à partir de laquelle s'effectuera la folliculogenèse. Ils ont un diamètre qui varie entre 40 et 50  $\mu\text{m}$  et contiennent un ovocyte d'environ 40  $\mu\text{m}$  de diamètre, bloqué au stade diplotène de sa première division méiotique et entouré de cellules folliculeuses aplaties qui varient entre 7 et 50 cellules nécessaires pour que l'ovocyte puisse survivre et croître (Czyba 1993, Picton 2001).

**Les follicules primaires :** commencent à se mettre en place avant la naissance. Ils augmentent de taille pour atteindre environ 100  $\mu\text{m}$ , mais il n'y a pas de différence significative au niveau du diamètre de l'ovocyte. Les cellules folliculeuses deviennent cubiques et s'entourent d'une membrane basale les séparant du stroma ovarien. Elles acquièrent des sites de liaison pour la FSH (Follicle Stimulating Hormone) (Morbeck et coll 1993). C'est dans le follicule primaire que l'ovocyte I débute sa croissance et il ne l'achève que dans le follicule mûr. A ce stade, il synthétise de l'ARN et des protéines dont certaines vont servir à la formation de la zone pellucide qui se met en place définitivement dans les follicules secondaires. Une étude récente a mis en évidence l'existence des protéines qui formeront la ZP (ZP1, ZP2 et ZP3) dans le cytoplasme de l'ovocyte mais aussi celui des cellules de la granulosa depuis le stade de follicule primordial (Gook et coll 2008)

**Les follicules secondaires :** les cellules folliculeuses se multiplient intensément par division mitotique formant plusieurs couches appelées la granulosa et permettant ainsi l'augmentation de la taille des follicules qui feront entre 120 et 200  $\mu\text{m}$ . En périphérie, une couche de cellules richement vascularisées apparaît issues du stroma ovarien, c'est la thèque interne. Une étude récente montre un effet positif des cellules thécales sur l'initiation et la croissance des follicules par l'intermédiaire de l'induction des récepteurs à la FSH et l'induction des divisions mitotiques des cellules de la granulosa (Tajimaka et coll 2007).

Bien que ces cellules acquièrent des sites de liaison pour la LH, les premiers stades de croissance folliculaire sont indépendants des hormones gonadotropes (Monniaux et coll



1997). L'ovocyte qui atteint 90µm de diamètre s'entoure de la zone pellucide, de nature glycoprotéique.

Les follicules primordiaux, primaires et secondaires forment la catégorie de follicules préantraux et constituent ensemble 95 % de la population folliculaire.

**Les follicules antraux, cavitaires ou tertiaires :** caractérisés par l'apparition entre les cellules de la granulosa de petites cavités qui confluent pour créer une cavité unique appelée antrum, remplie de liquide folliculaire riche en oestrogène.

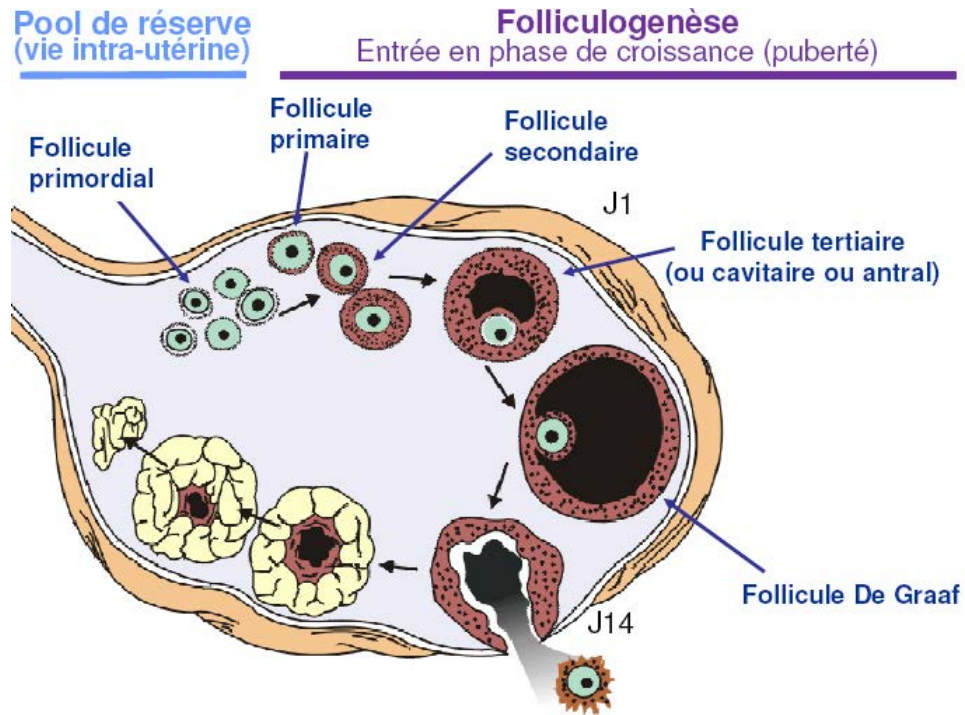
L'ovocyte I entouré de la zone pellucide et d'un petit massif de cellules folliculeuses est progressivement déplacé vers la périphérie du follicule. La masse cellulaire déplacée en même temps que l'ovocyte est appelée cumulus oophorus. A l'extérieur du follicule, en dehors de la thèque interne, apparaît une nouvelle couche de cellule constituée par des myo-fibroblastes, c'est la thèque externe.

A ce stade débute la phase de recrutement folliculaire et les follicules deviennent dépendants des gonadotrophines (Spicer et coll 1993).

**Le follicule ovulatoire, mûr ou de Dee Graaf :** habituellement il y en a un seul pour les deux ovaires, dans lequel l'antrum augmente très rapidement de volume. Le follicule atteint 2 cm de diamètre et fait saillie à la surface de l'ovaire. Au tour de l'ovocyte qui atteint 120 µm de diamètre, des cellules de la granulosa en contact direct avec la zone pellucide vont former la corona radiata.

Les capillaires de la thèque interne traversent la membrane basale et pénètrent dans la granulosa. A leur contact les cellules de la granulosa se transforment en cellules lutéales. Les cellules du cumulus oophorus synthétisent de l'acide hyaluronique qui permet la dissociation du pied du cumulus et la libération de l'ovocyte dans la cavité antrale (Czyba et Montella 1993).

Au fur et à mesure de la croissance folliculaire, les jonctions communicantes entre l'ovocyte et les cellules folliculaires augmentent en nombre et en dimension (Larsen et coll 1988). Cette association permet l'échange de facteurs régulateurs de la maturation ovocytaire. Juste avant l'ovulation un espace périvitellin se forme entre l'ovocyte et la zone pellucide. L'ovocyte reprend ainsi sa méiose qui était bloquée depuis la période foetale et se divise en 2 cellules haploïdes de tailles inégales, l'ovocyte II et le 1er globule polaire. Il entame par la suite la seconde division méiotique et se bloque en métaphase II (de la méiose).



**Fig 10: Evolution des follicules gamétogénès.**

***b. Rupture folliculaire et l'organisation du corps jaune :***

Suite au pic de LH relâchée par l'adénohypophyse, la partie saillante du follicule sera nécrosée par ischémie, les cellules myoépithéliales de la thèque externe se contractent provoquant l'expulsion de l'ovocyte entouré des cellules du cumulus. Il sera capté par les franges tubaires.

Les cellules de la granulosa restantes seront envahies par les capillaires de la thèque interne et vont se transformer en cellules lutéales ou cellules du corps jaune. Ce dernier sera centré par une cavité remplie par des dépôts de fibrine. En périphérie se trouve un tissu fibreux orienté ressemblant à la thèque externe du follicule antral. En l'absence de fécondation, ce corps jaune va régresser au cours de la phase lutéale et se transformer en une cicatrice fibreuse appelée corpus albicans (Czyba et Montella 1993).

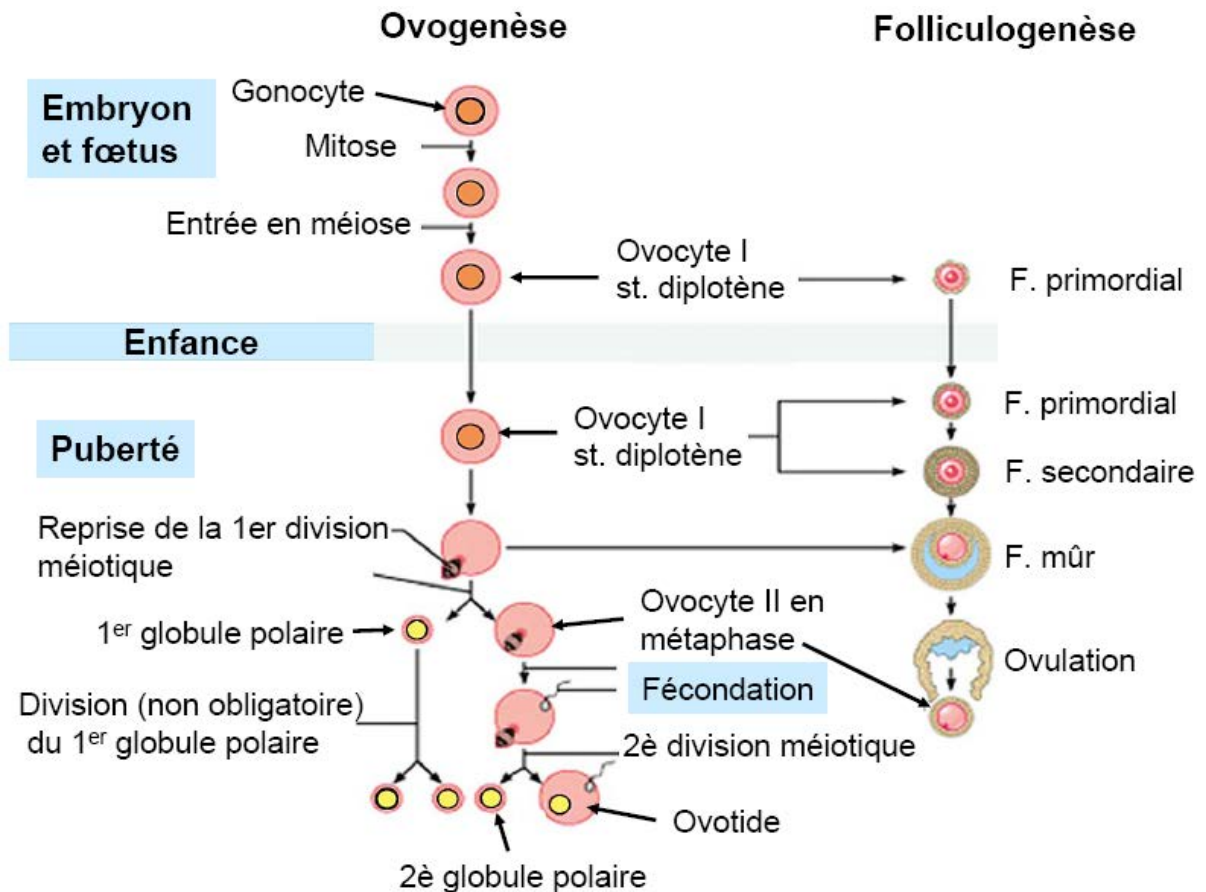


Fig 11: Chronologie de l'ovogenèse et la folliculogénèse.

*c. Chronologie de la croissance folliculaire :*

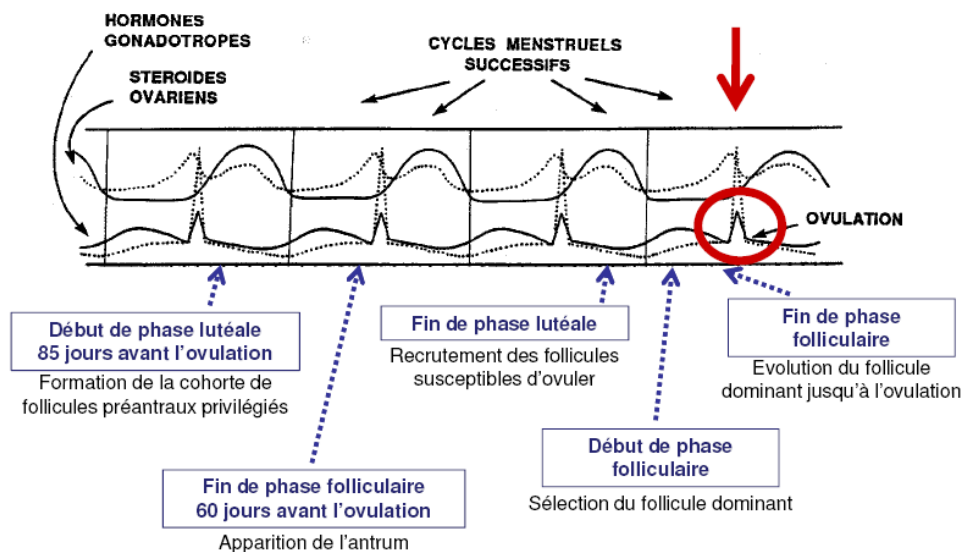
La maturation des follicules ovariens dure 3 mois et se déroule en 3 étapes :

- **la croissance des follicules ovariens jusqu'au stade pré-antral:** elle débute environ 3 mois avant l'ovulation et permet la transformation d'environ 500 follicules primordiaux quiescents en follicules préantraux. Cette phase est essentiellement contrôlée par des facteurs intra ovariens et indépendante des hormones gonadotropes (FSH et LH).

- **le recrutement d'une cohorte de follicules préantraux:** grâce à leur sensibilité à la FSH, environ 5 follicules au niveau de l'un des deux ovaires vont poursuivre leur croissance en formant un antrum. Ils ont une taille de 3 à 5 mm et vont se développer plus rapidement que les autres follicules préantraux qui dégénèrent par phénomène d'atrésie folliculaire à la fin du cycle précédent. (Czyba et Montella 1993, Thibault et Levasseur 2001).

- **la dominance et la maturation du follicule ovulatoire** : Au début de la phase folliculaire entre J1 et J6 du cycle ovarien, un des follicules se développe plus rapidement que les autres c'est la sélection du follicule dominant. Celui-ci poursuivra une croissance fortement accélérée jusqu'au stade pré ovulatoire (2cm de diamètre) grâce à sa sensibilité plus importante vis-à-vis de la FSH dont la sécrétion augmente régulièrement durant la phase folliculaire du cycle. L'antrum augmente de volume et la vascularisation se développe ce qui est indispensable pour l'apport des hormones circulantes et la sécrétion dans la circulation périphérique de l'œstradiol et de la progestérone. Les cellules de thèque interne et les cellules de granulosa acquièrent des récepteurs à LH qui stimule la stéroïdogénèse thécale favorisant la synthèse des androgènes qui seront ensuite aromatisés par les cellules de granulosa afin de sécréter de l'oestradiol. Au delà d'un certain seuil dans la circulation, les concentrations d'oestradiol déclenchent la décharge ovulante de LH et de FSH. 35 à 36 heures après survient l'ovulation (Czyba et Montella 1993).

Par la sécrétion de facteurs paracrines (inhibine et FPR), le follicule dominant induit l'involution ou l'atrésie des autres follicules à antrum de la cohorte.



**Fig 12 : Dynamique de la folliculogénèse par rapport aux cycles menstruels d'après Gougeon A**

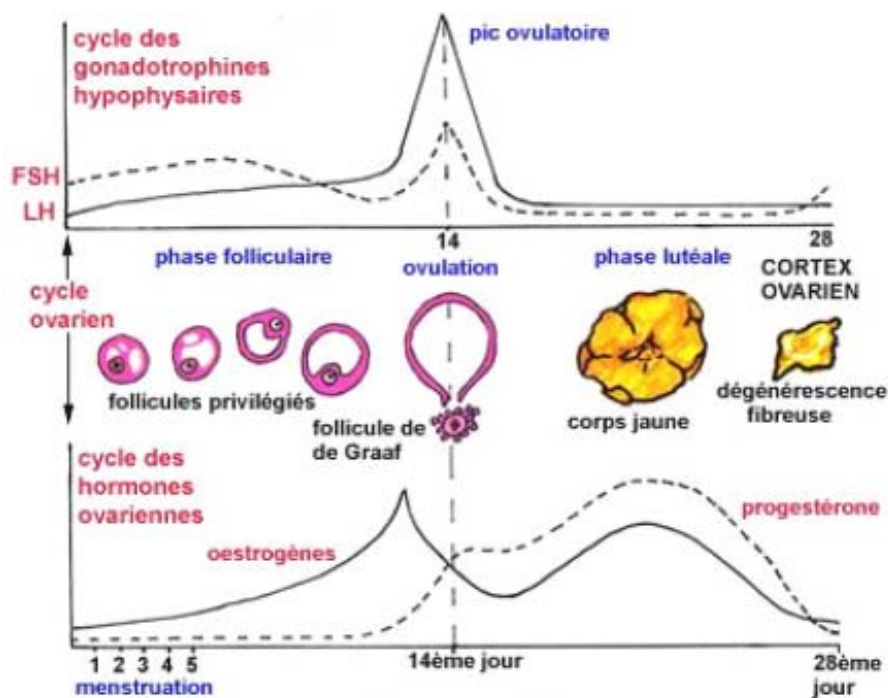
### 3. Le cycle hypothalamo-hypophyso-ovarien :

Le cycle ovarien dure en moyenne 28 jours comptés du premier jour d'une menstruation au premier jour de la suivante. Il comporte une phase folliculaire qui fait suite directement aux

règles et correspond à la croissance d'une cohorte de follicules à antrum suivie de la sélection d'un seul follicule dominant qui sera destiné à l'ovulation vers J14 du cycle. Au cours de la phase lutéale, les cellules de la granulosa du follicule qui a subi l'ovulation se différencient en cellule lutéale formant le corps jaune qui se maintient jusqu'à J25 du cycle puis dégénère par lutéolyse ce qui déclenche les règles suivantes.

Le cycle ovarien est contrôlé par l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'hypothalamus assure une sécrétion pulsatile de GnRH indispensable au fonctionnement des cellules gonadotropes hypophysaires qui excrètent de façon pulsatile la LH et la FSH.

La FSH stimule la prolifération des cellules de la granulosa dans les follicules antraux, et la sécrétion d'aromatase qui stimule la sécrétion d'oestradiol (et de l'inhibine). L'effet de la LH varie en fonction de la phase du cycle ovarien. Durant la phase folliculaire, elle stimule la production d'androstènediol par les cellules de la thèque interne, juste avant l'ovulation, le pic de LH produit une augmentation très rapide du volume de l'antrum et induit ainsi l'ovulation. Au cours de la phase lutéale, elle stimule la sécrétion de progestérone par les cellules du corps jaune.



**Fig 13: Cycles des gonadotrophines hypophysaires- cycle des hormones ovariennes.**

## **B. SPERMATOGENESE :**

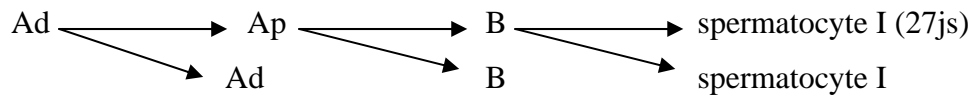
### **1. Définition :**

La spermatogenèse est le processus de transformation des cellules souches diploïdes appelées spermatogonies en gamètes mâles haploïdes ou spermatozoïdes dans la paroi des tubes séminifères du testicule (Czyba et Montella 1993). Les cellules concernées par ce processus constituent la lignée germinale ou épithélium séminifère qui forme avec les cellules de Sertoli la paroi des tubes séminifères. Elle débute à la puberté, se déroule de façon continue et se poursuit chez le vieillard. Elle se déroule selon un cycle spermatogénique qui dure environ 74 jours et comprend trois phases, une phase de multiplication des spermatogonies, une phase de maturation et de réduction de la charge d'ADN et une phase de différenciation des spermatides appelée spermiogenèse (Czyba et coll 1971).

### **2. Phase de multiplication des spermatogonies :**

Les spermatogonies sont les cellules souches diploïdes, toujours disposées à la périphérie de la paroi du tube séminifère au contact de la membrane basale doublée par la membrane propre (enveloppe fibreuse constituée de fibres de collagènes et de fibroblastes). Elles sont de 3 types, les spermatogonies Ad (dark), à chromatine finement granuleuse dense à aspect sombre. Les spermatogonies Ap (pale) à chromatine poussiéreuse claire et les spermatogonies B à chromatine en forme de gros grains irréguliers (crouilleuses).

Les spermatogonies se divisent par mitoses somatiques normales d'une part pour renouveler le stock de spermatogonies et d'autre part pour donner des spermatocytes I.



### **3. Phase de maturation et de réduction de la charge d'ADN :**

Les spermatocytes I d'abord peu différents des spermatogonies B vont subir une phase de croissance cytoplasmique pour devenir de grandes cellules à 46 chromosomes, de forme ovale à noyau arrondi nucléolé et chromatine en mottes appelés auxocytes (Czyba 1971).

Ils subissent une division réductionnelle, qui correspond à la 1<sup>ère</sup> mitose de la méiose qui aboutit à la formation de spermatocytes II possédant chacun la moitié du stock chromosomique du spermatocyte I (23 chromosomes : 22 autosomes + X ou 22 autosomes + Y). Ils sont généralement groupés par paires et au bout de 24 h forment des spermatides à la suite d'une division équationnelle appelée aussi méiose II.

La 1<sup>ère</sup> mitose de la méiose comporte 4 stades (Prophase, Métaphase, Anaphase et Télaphase) et a pour conséquence la réduction de moitié de la charge chromosomique avec conservation de la charge d'ADN (la cellule va comporter 23 chromosomes avec 2 chromatides chacun donc 46 molécules d'ADN), la disjonction des chromosomes sexuels X et Y, un échange de segments entre chromatides sœurs au cours de la prophase I (1<sup>er</sup> brassage génétique) puis une répartition aléatoire des chromosomes maternels et paternels au cours de l'anaphase (2<sup>ème</sup> brassage génétique) (Courot et coll 1970).

La transformation des spermatocytes I en auxocytes puis spermatocytes II dure environ 23 jours. Les spermatocytes II sont de petites cellules groupées par paires, peu nombreuses car en 24 h elles forment chacune 2 spermatides à la suite d'une division équationnelle = méiose II caractérisée par l'entrée en prophase II des chromosomes sans phase de réplication d'ADN suivie d'un dédoublement du centromère au cours de la métaphase II et séparation à l'anaphase II des chromatides de chaque chromosome.

Les spermatides contiennent le même nombre de chromosome haploïde que les spermatocytes II mais une charge d'ADN divisée par 2, ils sont réellement haploïdes : 23 chromosomes constitués de 23 molécules d'ADN (Czyba et Montella 1993, Benahmed et coll 2004).

#### **4. Phase de différenciation des spermatides ou spermiogenèse :**

La spermiogenèse est un processus complexe qui dure 23 jours, par lequel les spermatides se transforment en spermatozoïdes capables de bouger et de féconder. Ce processus implique des changements :

- Les remaniements nucléaires : le noyau se condense, s'allonge et s'aplatit avec des remaniements dans la composition biochimique des protéines basiques, les histones qui seront remplacées par les protéines de transition puis par les protamines.
- La formation de l'acrosome à partir de l'appareil de golgi par la confluence des lysosomes ou vacuoles acrosomiques formant un capuchon acrosomique ou acrosome qui s'étale progressivement sur environ le 1/3 de la surface du noyau. Il contient des enzymes protéolytiques nécessaires aux spermatozoïdes lors de l'interaction avec l'ovocyte

- Le développement flagellaire à partir du centriole distal qui se transforme et donne naissance aux microtubules du complexe axonémal du flagelle indispensable à la mobilité des spermatozoïdes.
- La réorganisation du cytoplasme : les mitochondries se disposent en spirale autour de la première partie de l'axonème. Le cytoplasme s'écoule en arrière du noyau et sera éliminé sous forme de corps résiduel phagocytés par les cellules de sertoli. Finalement les spermatozoïdes seront libérés dans la lumière du tube séminifère c'est la spermiation.

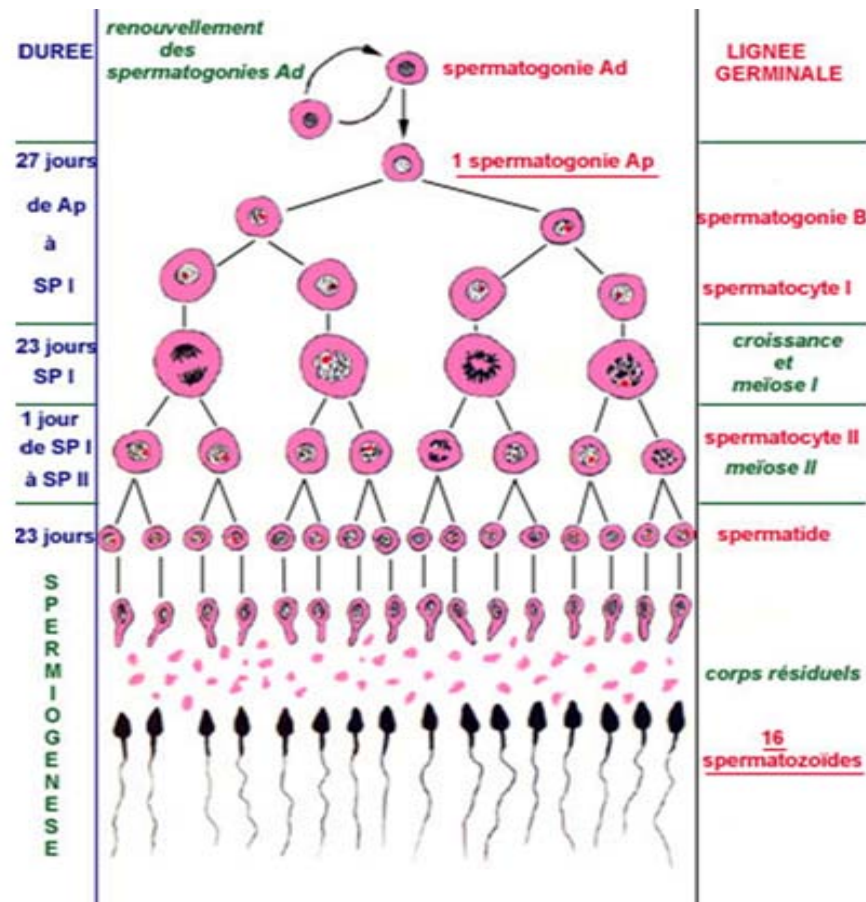


Fig 14: Les étapes de la spermatogenèse.

La spermatogenèse subit un double contrôle neuroendocrinien et local. Le contrôle neuroendocrinien est assuré par l'axe hypothalamo-hypophysaire grâce aux gonadotrophines la FSH et la LH.

La LH stimule les cellules de Leydig dans le tissu interstitiel testiculaire qui synthétisent la testostérone indispensable au déroulement normal de la spermatogenèse.

La FSH agit sur la cellule de sertoli qui joue un rôle crucial dans le développement des cellules germinales et dans la régulation de la spermatogenèse. En effet, ce sont les cellules de



Sertoli qui reçoivent les messages hormonaux (testostérone, FSH) et un grand nombre de signaux locaux (facteurs de croissance). Les cellules de Sertoli vont alors sécréter d'autres facteurs qui moduleront les fonctions des cellules de Sertoli elles-mêmes, et des cellules voisines, les cellules de Leydig et surtout les cellules germinales.

Pour le contrôle local, les cellules germinales pourraient être sous le contrôle direct de certains facteurs de croissance et cytokines produits par les cellules de Sertoli.

## **C. FECONDATION ET DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PREIMPLANTATOIRE:**

La fécondation est la rencontre et la fusion en une cellule unique, œuf fécondé ou zygote, du gamète féminin (ovocyte de 2<sup>ème</sup> ordre) et du gamète masculin (spermatozoïde) (Czyba 1971). Cette rencontre est précédée de transformations cellulaires des cellules de la lignée germinale lors de la gamétogenèse et du cheminement des gamètes dans les voies génitales (Czyba et Montella 1993, Hammamah 2004). Elle a lieu normalement dans le segment élargi des trompes de Fallope appelée ampoule, quelques heures après l'ovulation.

### **1. Préparation des spermatozoïdes à la fécondation :**

Les spermatozoïdes émis dans le tractus génital féminin vont entamer immédiatement la traversée du col et grâce à la glaire cervicale qui leur offre des conditions de pH favorables, et leur fournit du glucose comme élément énergétique. Elle peut aussi constituer une réserve de spermatozoïdes qui seront relâchés par ondes successives et assure surtout le rôle de barrière pour le liquide spermatique, les spermatozoïdes à morphologie anormale, peu ou pas mobile (Czyba et Montella 1993, Feki et coll 2004)).

Les voies génitales féminines sont aussi capables grâce aux sécrétions utérines et tubaires, de contrôler de façon active, coordonnée et progressive des modifications fonctionnelles des spermatozoïdes leurs permettant d'acquérir un pouvoir fécondant, c'est la capacitation. Elle est caractérisée par une déstabilisation membranaire avec élimination de certaines protéines fixées par des liaisons non covalentes, survient aussi une modification de la structure ou de la topographie des protéines intégrées et une diminution du rapport cholestérol/phospholipides.

Il en résulte une augmentation de la perméabilité aux ions Ca<sup>++</sup>, activant ainsi une cascade de phosphorylation de diverses protéines spermatiques et une modification du mouvement spermatique qui devient hyperactivé, avec des battements flagellaires rapides et amples lui permettant de progresser vers le site de fécondation (Parat et coll 2009). En effet, la

constitution de zones dépourvues de protéines favorisera la fusion de la membrane plasmique avec la membrane externe de l'acrosome lors de la réaction acrosomique.

Seuls les spermatozoïdes capotés sont capables de traverser les cellules folliculaires qui entourent l'ovocyte et d'entreprendre la réaction acrosomique qui leur permettra de perforer la zone pellucide. Ils conserveraient leur pouvoir fécondant pendant environ 3 jours après l'insémination.

## **2. Préparation de l'ovocyte à la fécondation :**

36 h avant l'ovulation l'ovogenèse s'achève par la phase de maturation nucléaire et cytoplasmique déjà décrite, ce qui rend l'ovocyte apte à être fécondé.

Au moment de l'ovulation, l'ovocyte de 2<sup>ème</sup> ordre bloqué en métaphase de 2<sup>ème</sup> mitose de méiose entouré de la ZP, de la corona radiata et des cellules du cumulus oophorus est émis par l'ovaire. Il est capté par les franges du pavillon de la trompe et va atteindre l'ampoule tubaire (site de la fécondation) grâce aux mouvements des cils de l'épithélium tubaire et aux mouvements péristaltiques de la musculature tubaire. Il reste fécondable pendant environ 24h.

## **3. Phénomènes cytologiques de la fécondation :**

Les spermatozoïdes activés entrent en contact avec les cellules du cumulus qui baignent dans une matrice riche en acide hyaluronique. Il semble que l'acrosome libère une certaine quantité de hyaluronidase capable de liquéfier la matrice intercellulaire permettant la traversée du cumulus. Arrivé à la zone pellucide, la liaison s'établit entre des enzymes de la membrane spermatique et des glycoprotéines de la ZP (ZP2, ZP3) (Czyba et Montella 1993, Hammamah 2004).

Cet attachement déclenche la réaction acrosomique, caractérisée par un afflux brutal de Ca<sup>++</sup> dans le spermatozoïde, ce qui provoque la fusion de la membrane externe de l'acrosome à la membrane plasmique du spermatozoïde. Il en résulte une libération des enzymes acrosomiques qui hydrolysent la ZP1 libérant ainsi ZP2 et ZP3, diminuant par conséquent la résistance de la zone pellucide permettant ainsi la pénétration du spermatozoïde poussée par les battements flagellaires (Hammamah 2004).

Après franchissement de la zone pellucide, le spermatozoïde se retrouve dans l'espace péri-vitellin et fusionne avec l'ovocyte. La fusion se produit entre la membrane ovocytaire et la membrane plasmique de la cape post acrosomique du spermatozoïde et provoque une décharge de Ca<sup>++</sup> qui déclenchera la réaction corticale caractérisée par la libération des enzymes hydrolytiques des granules corticaux dans l'espace péri-vitellin. Il en résulte des

modifications physiques et chimiques de la ZP la rendent imperméable à d'autres spermatozoïdes (Czyba et Montella 1993, Hammamah 2004).

Cette activation cytoplasmique déclenche la reprise de la méiose avec achèvement de la 2<sup>ème</sup> division et expulsion du 2<sup>ème</sup> GP ainsi que la formation d'un pronucléus ou pronoyau femelle haploïde, à chromatine condensée. Le noyau spermatique se décondense par rupture des ponts disulfures des protamines sous l'action de facteurs ovocytaires, se réhydrate et sa membrane nucléaire se fragmente. Par la suite une nouvelle enveloppe nucléaire est mise en place délimitant un pronucléus ou un pronoyau mâle à chromatine moins dense que celle du pronoyau femelle (Adenot et coll 1991, Jeanblanc et coll 2008).

Les deux pronoyaux sont formés dans la région corticale de l'œuf fécondé et migrent vers le centre de l'œuf sous contrôle du cytosquelette et se place l'un au contact de l'autre, c'est la caryogamie ou amphimixie qui marque la fin de la fécondation et détermine un zygote. La synthèse d'ADN commence simultanément dans chaque pronucléus, environ 12 h après la fusion. Les enveloppes des pronoyaux sont détruites et les chromosomes s'individualisent et viennent se placer autour de la plaque équatoriale métaphasique sur le fuseau de division. Ce qui correspond à la métaphase de la première division ou segmentation de l'œuf fécondé. Les chromosomes gagnent par la suite l'un des pôles du fuseau où se reconstitue une cellule, il en résulte la formation d'un embryon à deux cellules ou deux blastomères de tailles équivalentes contenant chacun un génome paternel et un maternel (Jeanblanc et coll 2008).

#### **4. Développement embryonnaire préimplantatoire :**

La 1<sup>ère</sup> semaine du développement correspond à la phase préimplantatoire. C'est aussi la phase de migration de l'embryon dans la trompe puis dans la cavité utérine avant la nidation. L'embryon est libre, il se divise activement par mitoses successives entraînant de ce fait une diminution de la taille des blastomères. C'est la segmentation qui aboutit au 4<sup>ème</sup> jour à un massif cellulaire sphérique d'environ une trentaine de cellules appelé morula.

A ce stade, le développement dépend strictement de l'héritage maternel en ARN et en protéines présents dans le cytoplasme de l'ovocyte et accumulés au cours de l'ovogenèse. La durée de vie de ces transcrits maternels est très variable d'une molécule à l'autre et dépend de leur remplacement par la mise en activité du génome embryonnaire. Ce remplacement, qui constitue le passage d'un contrôle maternel à un contrôle zygotique du développement, est initié à un moment de la période préimplantatoire variable selon les espèces et appelé mise en route du génome embryonnaire (Czyba et Montella 1993, Jeanblanc et coll 2008). Entre le

4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour survient la compaction, les blastomères s'aplatissent, augmentent leur surface de contact avec les cellules voisines, réduisent la taille de l'espace intercellulaire. Il en résulte la formation de 2 types cellulaires distincts au sein de l'embryon : les cellules externes polarisées, jointes par des jonctions serrées qui vont former le trophoctoderme et les cellules internes qui formeront le reste des tissus.

Entre 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> jour, une infiltration de liquide provoque la formation d'une cavité appelée blastocèle. Les blastomères périphériques s'organisent en trophoctoderme. Les blastomères internes constituent le bouton embryonnaire ou masse cellulaire interne. L'embryon prend le nom de blastocyste ou blastula.

La formation du blastocèle s'accompagne d'une croissance du diamètre de l'embryon. Cette croissance associée à la perforation de la zone pellucide par digestion enzymatique entraîne une sortie de l'embryon de la zone pellucide permettant les interactions de l'embryon et de la muqueuse utérine qui seront primordiales pour la nidation.

Une complémentarité entre les génomes maternel et paternel est indispensable au bon développement embryonnaire. Ceci a été démontré depuis 1984 par Davos Solter grâce à la parthénogenèse artificielle. Il a mis au point une technique de transfert nucléaire permettant d'échanger, dans des œufs de souris fécondés, les noyaux issus du spermatozoïde et ceux issus de l'ovocyte. Des gynogénotes (deux noyaux femelles) et des androgénotes (deux noyaux males) ont ainsi été produits, mais ces embryons ne se développaient jamais, malgré la composition diploïde (McGrath et Solter 1984).

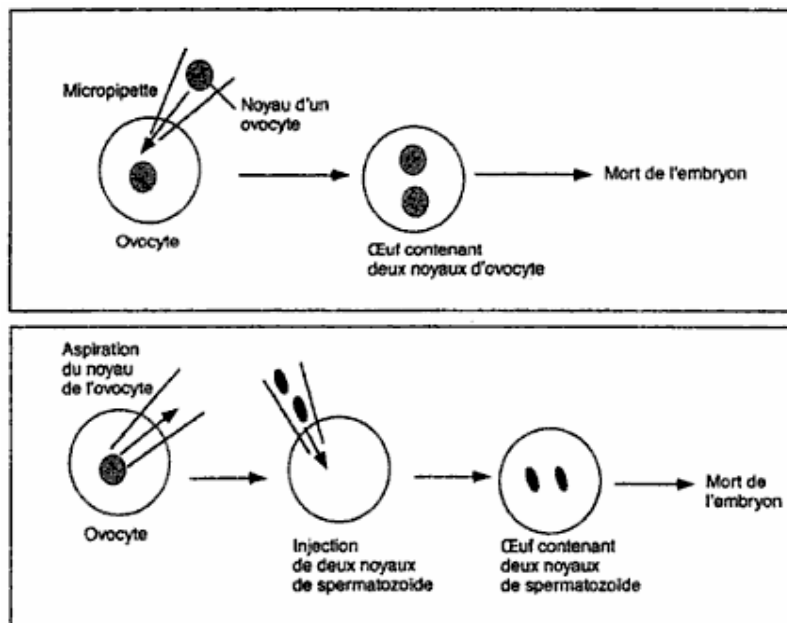


Fig 15: Démonstration de la complémentarité entre génome maternel et paternel.

Dans le cas des gynogénètes, le développement de l'embryon était à peu près normal alors que les annexes embryonnaires étaient anormales, la situation inverse était observée pour les androgénètes. Ces observations suggèrent que le développement embryonnaire requiert la présence des deux génomes maternel et paternel et que malgré leur constitution génique identique, ils ne fonctionnent pas de façon équivalente car ils sont marqués par un sceau différent nommé empreinte. D'où la découverte au début des années 1980 d'un phénomène appelé « empreinte génomique parentale » (Gabory et coll 2005). Il en résulte une différence fonctionnelle des deux génomes parentaux, qui rend la présence de chacun d'entre eux indispensable au développement à terme de l'embryon.

Par la suite, l'identification de gènes spécifiques soumis à empreinte parentale a permis de montrer que cette empreinte conduit à une expression monoallélique, dépendante de l'origine parentale. Les caractéristiques moléculaires de ce phénomène de marquage épigénétique qui permettent d'expliquer certaines maladies humaines liées à des gènes soumis à empreinte seront détaillées dans les chapitres suivants.

# **CHAPITRE III :**

---

## **PHENOMENES EPIGENETIQUES**

## A. INTRODUCTION:

C'est en 1942 que le généticien anglais Conrad Waddington propose le terme épigénétique pour désigner une nouvelle science visant à étudier les mécanismes par lesquels le génotype engendre le phénotype (Waddington C 1942). Il a voulu expliquer le fait qu'une cellule (œuf fécondé) donne naissance à un organisme complexe formé de différents tissus. Il souligne ainsi l'incapacité de la génétique à expliquer le développement embryonnaire et veut montrer comment un gène interagit avec son entourage pour produire un phénotype (Morange M 2005, Grandjean V 2009).

Au début des années 1960, François Jacob et Jaques Monod proposent le modèle de l'opéron, premier modèle moléculaire de régulation de l'activité des gènes et formulent l'hypothèse selon laquelle des mécanismes expliquent les variations d'activité génique qui se produisent au cours de la différenciation cellulaire et le développement embryonnaire. D'autres travaux révélant l'activité différentielle des gènes selon l'état de la chromatine se sont multipliés et ont conduit à la mise en évidence des premières réactions de modification des histones. En 1975, Arthur Riggs et Robin Holliday proposent l'hypothèse selon laquelle la méthylation de l'ADN pourrait participer au contrôle de l'expression des gènes à partir d'observations réalisées chez les bactéries (Riggs AD 1975, Holliday et coll 1975).

Les mécanismes épigénétiques ainsi conçus concernent la différenciation cellulaire et le développement embryonnaire et sont conservés lors de la division cellulaire mitotique. Ce n'est que bien plus tard et grâce aux études sur les plantes, qu'il a été démontré que la régulation épigénétique peut intéresser aussi la méiose et être à l'origine de variations héréditaires (Morange M 2005).

Au cours du développement, vient ainsi s'ajouter à l'héritage génétique, une programmation par des processus épigénétiques, elle-même sous l'influence d'une multitude de facteurs environnementaux.

Donc l'épigénèse est étroitement associée à la régulation de l'expression des gènes. Elle contribue à leur expression différentielle à la fois dans le temps et dans l'espace, et participe ainsi au contrôle de leur état actif ou réprimé (Beaujean et coll 2005).

## **B. DEFINITION DE L'ÉPIGENESE :**

Le préfixe "épi" signifie "au-dessus de" ou "en addition de". Le terme épigénétique se réfère donc à un changement héréditaire dans l'expression d'un gène dû non pas à un changement de la séquence en elle-même, mais à un événement qui est "en addition" à la séquence d'ADN.

En 1975, Robin Holliday définit l'épigénétique comme « l'étude des mécanismes de contrôles spatio-temporels de l'activité d'un gène pendant le développement d'un organisme complexe » et depuis cette définition n'arrête pas d'évoluer pour être de plus en plus précise.

Actuellement, l'épigénétique se définit comme tout événement qui remplit les trois caractéristiques suivantes. Premièrement, une modification épigénétique n'implique pas de changement sur la molécule d'ADN. Deuxièmement, et par opposition à la génétique, une modification épigénétique bien que stable se doit d'être réversible. Finalement, et c'est probablement le plus important, toute modification épigénétique est transmissible (Wu et coll 2001, Grandjean V 2009). C'est donc l'ensemble des modifications transmissibles d'une génération à l'autre et réversibles de l'expression des gènes sans altération des séquences nucléotidiques (Reik et coll 2001).

Ainsi, chacun hérite une information génétique portée par l'ADN transmis selon les lois de Mendel et une information épigénétique non portée par l'ADN qui ne suit pas les lois de Mendel et dont les bases moléculaires ne sont que partiellement comprises. Mais la recherche dans ce domaine montre que ces informations épigénétiques longtemps négligées sont primordiales, au même titre que les informations génétiques, à la survie de l'espèce.

## **C. LES MECANISMES EPIGENETIQUES :**

L'épigénétique est une science en plein essor. Elle explore tous les mécanismes impliqués dans la différenciation cellulaire et le développement embryonnaire, mécanismes que la génétique à elle seule n'a pas pu expliquer. A la base, il y a des mécanismes qu'on appelle épigénétiques, liés à la chromatine et qui assurent en quelque sorte la transmission de l'état d'activité d'un gène au cours de divisions cellulaires. Les cellules d'un organisme possèdent le même génome, avec les mêmes séquences d'ADN, et malgré tout elles sont phénotypiquement très différentes et forment des structures très différentes (Li et coll 2002, Reik et coll 2001, Reik et Dean 2001). Cela est possible grâce à une régulation différentielle de l'expression de leurs gènes. En même temps cet état différencié est stable, c'est à dire



que quand une cellule se divise, les cellules qui en résultent vont conserver les caractéristiques de la cellule mère. En plus, ces mécanismes peuvent agir à travers les générations, donc d'une façon ou d'une autre ils peuvent être transmis par les gamètes dans la génération suivante (Kelly et coll 2004, L.Hartel et coll 2003).

Les changements peuvent se produire spontanément, en réponse à l'environnement, à la présence d'un allèle particulier, même si celui-ci n'est plus présent dans les descendants. L'environnement influence ces signaux épigénétiques qui peuvent ainsi subir de petits changements appelés épimutations qui sont plus fréquents que les mutations classiques de l'ADN.

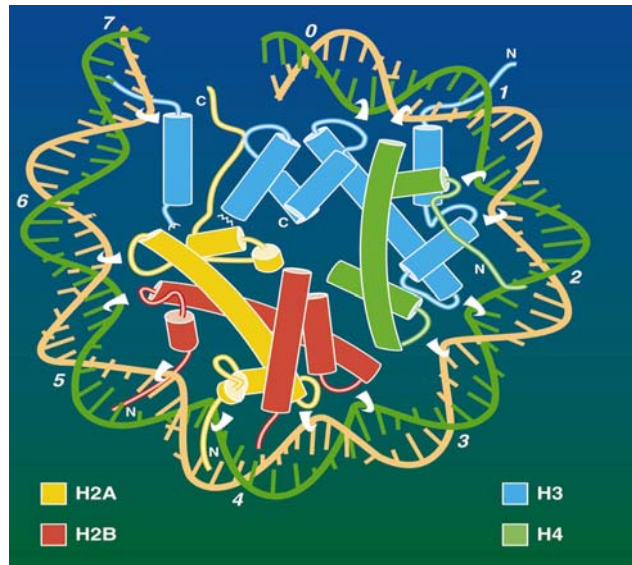
C'est le cas par exemple des gènes qui sont soumis à empreinte parentale, l'origine parentale va décider si le gène en question sera exprimé ou non, et pourtant la séquence d'ADN reste la même, l'origine parentale n'est pas inscrite dans la séquence d'ADN, elle est inscrite dans les mécanismes épigénétiques qui entourent cette séquence (Reik et coll 2001).

En réalité, les modifications épigénétiques englobent une grande variété de mécanismes qui peuvent cibler l'ADN (méthylation de la cytosine des dinucléotides CpG), l'ARN ou les protéines histones au niveau de la chromatine (méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitination) et agir au niveau du noyau ou du cytoplasme. Ils agissent non seulement au moment de la transcription, mais également après la transcription et la traduction des messages génétiques (Bird et coll 2001, Bird et coll 2002).

Ces changements chimiques sont catalysés par des enzymes et peuvent faire appel à d'autres protéines comme des facteurs de transcription et des répresseurs, ils vont déterminer l'état d'activité des gènes de manière transmissible au cours des divisions cellulaires sans impliquer de modifications des séquences nucléotidiques concernées et être l'un des fondements de la diversité biologique (Holliday R 1994, Beaujean et coll 2005).

Toutes ces modifications agissent sur la conformation, les forces d'interaction ou bien les charges électriques de la chromatine. Il en résulte un changement dans sa structure qui est aussi un mode de contrôle de l'expression des gènes (Jenuwein et coll. 2001, Narlikar et coll 2002, Kelly et coll. 2004).

Normalement dans une cellule somatique, la chromatine est organisée en une structure dite nucléosomale ayant comme unité de base le nucléosome. Celui-ci est un octamère formé de deux de chacune des histones cœurs, H2A, H2B, H3 et H4, autour duquel est enroulé la molécule d'ADN sur 146 pb en 1,75 tours. La portion centrale est occupée par l'histone de liaison H1 (Li 2002).



**Fig 16: Structure du nucléosome.**

Selon le degré de condensation de l'ADN, il existe deux types de chromatines. L'euchromatine, qui consiste en ADN actif, de structure globalement décondensée permettant l'expression génique et l'hétérochromatine caractérisée par de l'ADN condensé principalement inactif. Il semble servir à des fins structurales durant les phases chromosomiques.

L'hétérochromatine peut à son tour se subdiviser en deux types. Une hétérochromatine constitutive globalement non exprimée, formée par des séquences répétées situées autour du centromère et du télomère et l'hétérochromatine facultative, qui contient généralement des gènes éteints. Les cellules en stade final de différenciation (qui doivent donc exprimer un nombre de gènes restreint, assurant juste leur métabolisme et leur fonction) présentent de nombreuses régions de cette hétérochromatine facultative. L'exemple le plus fréquemment donné est l'inactivation d'un des deux chromosomes X chez les mammifères.

Dans de nombreux processus nécessitant un accès à l'ADN, tels que la réplication ou la transcription, la chromatine doit subir un remodelage complexe et finement régulé de sa structure grâce à des enzymes présents dans le noyau. Les réactions qu'ils catalysent, par exemple l'acétylation par les acétyltransférases, sont réversibles.

L'état épigénétique à un moment donné d'une séquence ou d'un gène donné dans le génome sera déterminé par l'équilibre de ces deux réactions, par exemple, acétylation ou déacétylation, et donc cet équilibre sera modifié quand la chromatine changera d'état.

## **1. La méthylation de l'ADN :**

L'une des modifications biochimiques la mieux connue est la méthylation de l'ADN au niveau des cytosines. Elle s'est révélée être un mécanisme physiologique majeur, intervenant entre autre dans l'organisation structurale de la molécule d'ADN au sein des chromosomes, dans la protection du génome contre les mutations et l'insertion de matériel génétique exogène et dans la régulation de l'expression des gènes (Bestor et coll 1996, Karp 2004, Jenuwein et coll 2001, Jones et coll 2001). Elle sera détaillée ultérieurement dans le chapitre IV.

## **2. Les modifications post-traductionnelles des histones :**

Les histones ainsi que les modifications post-traductionnelles de leurs structures sont largement impliquées dans l'organisation de la structure chromatinienne ainsi que la régulation de l'expression des gènes (Dupont et coll 2009). Les extrémités amino-terminales sont la cible de ces modifications, comme la méthylation des lysines et arginines, l'acétylation de la lysine, la phosphorylation des sérines et thréonines, et l'ubiquitination de la lysine (Kouzarides 2007, Marmorstein et coll 2009). D'autres modifications peuvent intervenir comme la sumoylation, l'ADN-ribosylation, la glycosylation et la biotinylation (Dupont et coll 2009).

Ces modifications des histones peuvent interférer les unes avec les autres et chaque combinaison peut conduire à une réponse biologique différente et induit une structure et une activité chromatinienne bien particulière. En 2000, Allis propose la présence d'un « langage » chromatinien qui regroupe toutes ses combinaisons, ce langage est baptisé « **code histone** » (Jenuwein et Allis 2001)

### **La méthylation des histones :**

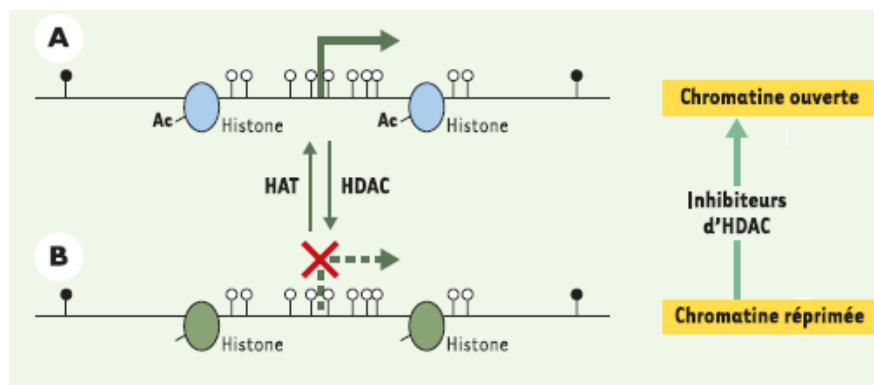
La méthylation a lieu au niveau d'un atome d'azote des résidus lysines (lys, K) ou arginines (Arg, R) des histones, grâce aux histones méthyl-transférases (HMT) qui catalysent le transfert des groupements méthylés. L'histone la plus méthylée est H3 suivit de H4. La méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 (H3-K9) est une modification épigénétique, démontrée comme étant impliquée dans les processus de l'hétérochromatinisation, aussi bien dans l'hétérochromatine constitutive que sur l'X inactif (Bannister et coll 2001, Bird A 2001, Reik 2001, Li E 2002). L'enzyme responsable de la méthylation est l'histone méthyltransférase SUV 39H1. La méthylation de H3-K9 crée en outre un site de haute affinité pour la protéine de l'hétérochromatine HP1, qui recrute une DNA méthyltransférase DNMT capable de méthyler le CpG de l'ADN (Li E 2002, Theresa et coll 2002).

Les protéines HP1 semblent constituer le maillon indispensable à la formation d'hétérochromatine et pourraient jouer un rôle d'organisateur de domaine chromatinien (Lachner et coll 2001, Nakayama et coll 2001).

La méthylation des histones peut être à la fois associée à l'activation et à la répression de la transcription selon les facteurs protéiques recrutés (Kubicek et coll 2004, Gelato et coll 2008) Cette modification, bien que réversible par le biais des histones déméthylases, est néanmoins très stable, ce qui en fait une modification de choix pour le maintien d'état chromatinien stable à travers les divisions cellulaires, et par conséquent pour l'hérédité épigénétique (Agger et coll 2008).

### L'acétylation des histones :

L'acétylation/déacétylation des histones est un mécanisme tout à fait essentiel de la régulation de l'expression des gènes. Le niveau d'acétylation est la résultante de l'activité de deux familles d'enzymes antagonistes: les histone-acétyltransférases (HAT) et les histone-désacétylases (HDAC). En désacétylant les résidus lysine, les HDAC permettent de passer d'une chromatine «permissive» pour la transcription à une chromatine «réprimée» grâce à la libération des charges positives ce qui favorise une attraction étroite avec l'ADN, conduisant ainsi à la formation d'une chromatine condensée donc inactive, cet effet pouvant être renforcé par l'intervention ultérieure d'histone-méthyltransférases (HMT) ciblant les mêmes résidus (Deltour et coll 2005). L'hyperacétylation annule la charge positive des histones, diminuant ainsi les forces d'attraction avec la charge négative du phosphate de l'ADN conduisant à une ouverture plus large de la chromatine qui devient ainsi active (Zhang et coll 2001, Li E 2002, Grandjean 2009)



**Fig 17: La déacétylation des résidus lysines des histones par HDAC permet de passer d'une chromatine « ouverte » (A), accessible pour la transcription, à une chromatine « réprimée » (B), dans laquelle la transcription est inhibée.**

### **La phosphorylation des histones**

Elle touche surtout les résidus sérines de l'histone H3, mais d'autres sites de phosphorylation (sérine ou thréonine) ont été identifiés au niveau des histones H4, H2A, H1 et H2B. Cette modification des histones est liée à plusieurs mécanismes cellulaires comme la condensation et la ségrégation des chromosomes, l'activation de la transcription, la répression des gènes, l'apoptose et la réparation de l'ADN (Houben et coll 2007, Kouzarides et coll 2007).

Elle joue en particulier un rôle dans la mitose, la progression du cycle cellulaire et la régulation de l'expression des gènes (Strahl et Allis 2000; Garcia et coll. 2005).

### **L'ubiquitination des histones**

L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés, ubiquitaire et hautement conservée, qui peut être liée de manière covalente à des protéines cellulaires par un processus multienzymatique. La mono- ou poly-ubiquitination représente un signal induisant des modifications fonctionnelles des protéines ou leur dégradation. Des composants du système ubiquitine apparaissent impliqués dans différentes étapes de la gamétogenèse dont le contrôle de la méiose et la réorganisation de la structure de la chromatine (Gootegoed et coll 2000, Zhang 2003)

L'ubiquitine ne sert pas uniquement au marquage des protéines pour leur dégradation, mais de courtes chaînes d'ubiquitine jouent probablement un rôle différent. Ils ubiquitinent les histones H2A, H2B et H1 dans leur partie C-terminale sans que ces dernières ne soit condamnées à être dégradées mais elles vont interagir avec la méthylation des résidus lysines et contrôler ainsi la régulation transcriptionnelle (Zhang 2003).

Il existe des protéines apparentées à l'ubiquitine, soit par leur séquence, soit par leur capacité d'être greffée à des protéines déjà existantes. C'est le cas des protéines SUMO (small ubiquitin-like modifier). La sumoylation est une variante de l'ubiquitination. Elle implique une liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO sur une lysine acceptrice d'une protéine cible (Nathan et coll 2003, Friedlander et coll 2007).

### **La poly-ADP-ribosylation :**

C'est une modification épigénétique de la chromatine, qui utilise la molécule de NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) comme substrat et sous l'action d'une poly-ADP-ribosylase, la partie ADP-ribosyl est attachée à la surface des protéines, il y a des chaînes longues jusqu'à plusieurs dizaines d'ADP-riboses qui sont synthétisés à la surface des protéines. Une autre enzyme va dégrader ces chaînes, donc la longueur va dépendre de

l'équilibre de l'activité enzymatique des deux réactions qui est déterminé majoritairement par la concentration du NAD dans la cellule (D'Amours et coll 1999, Zardo et coll 2003).

C'est une réaction de stress connue, c'est à dire que lorsque les cellules subissent un stress, il y a des réactions de poly-ADP-ribosylation qui augmentent dans la plus part des cas.

### **3. Micro ARNs :**

Les micro ARN (*miRNA* ou *mi RNA*) sont des ARN simple-brin longs d'environ 21 à 24 nucléotides. Les miRNA contrôlent l'expression des gènes ; ce sont des répresseurs post-transcriptionnels. Ils s'apparient aux ARN messagers qu'ils dégradent, ou répriment leur traduction en protéine (Royo et coll 2008). Deux à 3 % des gènes humains codent pour des miRNAs, tandis que 20 à 30% des gènes seraient régulés par des miRNAs (Sontheimer et coll 2005).

Les gènes de miRNA sont transcrits sous la forme de longs précurseurs appelés « *pri-miRNA* ». Plusieurs enzymes sont impliqués dans la maturation des petits ARN. Les enzymes Drosha au sein d'un complexe microprocesseur vont cliver le précurseur en un produit intermédiaire appelé « *pre-miRNA* » (He et coll 2004, Denli et coll 2004). Récemment des mécanismes de formation de pre-miARNs indépendants du complexe formé par la protéine Drosha sont décrits, il s'agit du mécanisme de « *splicing* » (épissage) des pri-miARNs (Ruby et coll 2007).

Le pre-miRNA long d'environ 70 nucléotides, replié en tige-boucle imparfaite est ensuite clivé par une enzyme de la famille Dicer qui permet l'hydrolyse de la structure boucle, pour libérer un petit ARN double-brin appelé « *miRNA* ». Ce miRNA mature interagit alors avec une protéine de la famille Argonaute (Ago1 ou Ago2) pour former le complexe RISC (RNA-induced Silencing Complex) qui a été décrit comme étant responsable de la répression de plusieurs gènes (Vastenhouw et coll 2006, Carthew et coll 2009).

Ces ARNs non codants jouent un rôle dans la mise en place et /ou le maintien de marques épigénétiques puisque différentes analyses montrent qu'ils ont des effets directs, en servant de guides à des molécules impliquées dans la structure de la chromatine, ou indirects, en affectant l'expression des protéines régulatrices de la chromatine ainsi que de sa structure et par conséquent l'expression héréditaire des gènes (Vastenhouw et coll 2006, Armal et coll 2008, Grandjean 2009).

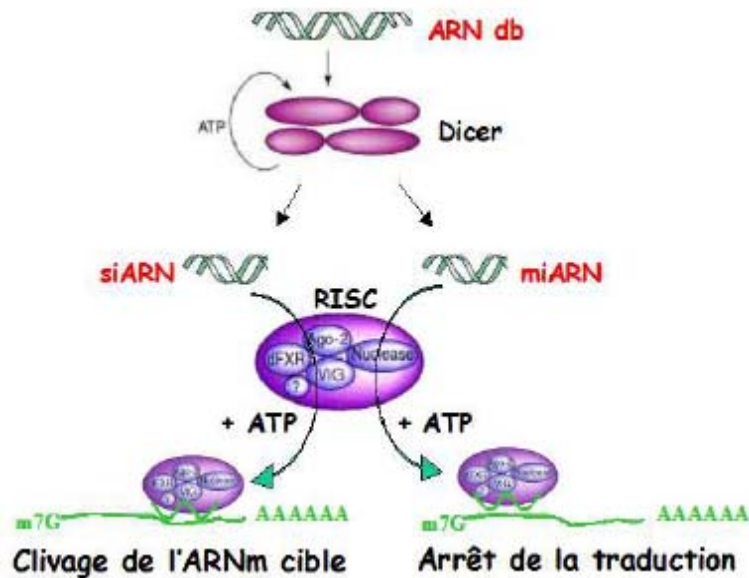


Fig 18: Fonctionnement classique de la machinerie de l'ARN interférence.

#### D. LES FONCTIONS DES MECANISMES EPIGENETIQUES :

Les mécanismes épigénétiques assurent la régulation de l'expression des gènes (Bird A 2002). On peut parler de deux fonctions des mécanismes épigénétiques, d'une part ils ont une fonction mémoire, c'est à dire garder en mémoire à long terme, et une fonction régulation qui est une fonction locale à un moment donné dans une cellule donnée. Par exemple si une cellule n'exprime pas un gène donné, elle va former une chromatine plus compactée qui empêchera la transcription de ce gène et cette chromatine sera caractérisée par un nombre de modifications épigénétiques qui sont caractéristiques d'une chromatine inactive (Jenuwein et coll 2001, Bird A 2002)

Au contraire le même gène dans un autre type cellulaire va être exprimé parce que la chromatine permet la transcription de l'ADN. La structure de la chromatine est déterminée par un ensemble de modifications épigénétiques. Par conséquent, on parle souvent d'euchromatine et d'hétérochromatine, le premier terme désignant la chromatine potentiellement active, et le deuxième la chromatine potentiellement inactive (Narlikar et coll 2002, Li E 2003)

Etant donné qu'il y a une grande variété de mécanismes épigénétiques qui agissent tous ensemble en concert, on peut parler d'une façon un peu simplifiée d'une signature épigénétique caractéristique pour la chromatine active, et d'une signature épigénétique typique pour une chromatine inactive.

Cet état épigénétique est stable parce qu'un gène garde son état épigénétique même après la division cellulaire (fonction mémoire), il est en même temps instable parce qu'il est capable de changer étant donné qu'il s'agit d'une régulation, et quand on dit régulation, on dit quelque chose qui est capable de s'adapter rapidement, changer rapidement d'état ; il y a donc une sorte de contradiction dans les mécanismes épigénétiques.

En effet, il existe un équilibre entre ces deux états (stable/instable) et il y a des étapes intermédiaires qui sont plus ou moins stables quand la chromatine change d'état (Bird A 2002, Kelly et coll 2004)

L'épigénétique est donc un système régulateur fondamental au-delà de l'information contenue dans la séquence d'ADN. Le gène défini par Mendel doit maintenant être considéré avec la chromatine qui l'entoure puisqu'elle joue un rôle primordial dans la régulation transcriptionnelle et que, de plus, elle est héréditaire tout comme les gènes Mendéliens.



# CHAPITRE IV

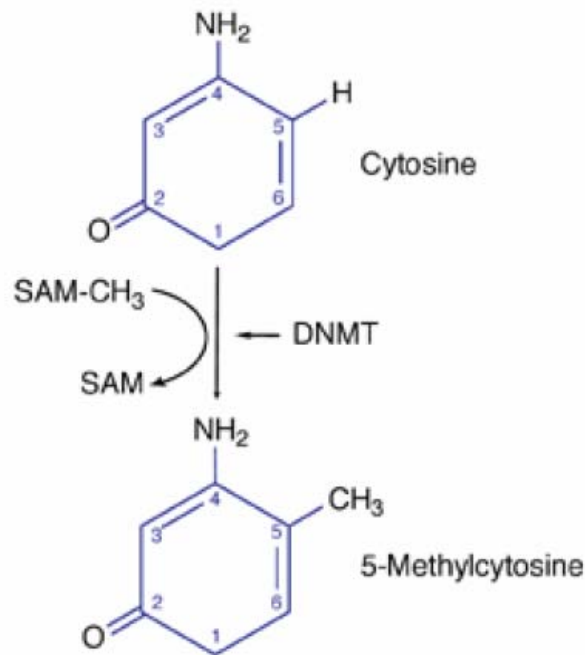
---

## METHYLATION DE L'ADN

## A. INTRODUCTION ET DEFINITION:

Parmi les marques épigénétiques, la méthylation de l'ADN est la seule qui affecte directement la molécule d'ADN. C'est une modification chimique covalente qui consiste en l'ajout d'un groupement méthyle (CH<sub>3</sub>) provenant du donneur universel de méthyle (S-adénosine-L-méthionine : SAM) sur le carbone 5 de la cytosine (Robertson 2002). D'autres bases méthylées comme la N6-méthyladénine, et la N4-méthylcytosine ont été décrites chez *E. coli* et sont considérées comme des constituants normaux de l'ADN, mais la 5-méthylcytosine est la seule base modifiée dans les espèces les plus évoluées (Adams 1990, Clark et coll 1995, Ramsahoye et coll 2000, Ratel et coll 2006)

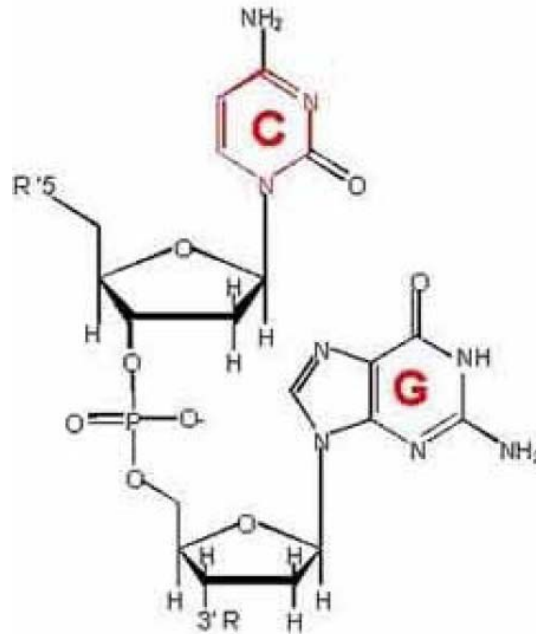
Cette réaction est catalysée par l'intermédiaire d'une enzyme appelée ADN méthylase ou ADN méthyltransférase (DNMT) (Jeltsch A 2002, Kelly et coll 2004).



**Fig 19: Réaction de méthylation par la DNMT.**

Chez les mammifères, cette modification se produit essentiellement sur les cytosines au sein des dinucléotides CpG. Dans le génome des mammifères, environ 80% des cytosines associées aux dinucléotides CpG sont méthylées. Cette méthylation est principalement localisée au niveau des régions génomiques répétées comme l'ADN satellite et les éléments parasites comme les séquences LINES (long interspersed transposable elements) ou encore les séquences virales et rétrovirales (Yoder et coll 1997, Grandjean V et coll 2006).

Chez l'homme, la plupart des régions de l'ADN génomique sont méthylables, essentiellement, sinon exclusivement, sur la cytosine du doublet 5'CpG3'.



**Fig 20: Dinucléotide CpG.**

En effet, il existe ce que l'on appelle des îlots de CpG, portions du génome à forte concentration en dinucléotides CpG (rapport de dinucléotides CpG observé/attendu égale ~ à 0,65) et d'une longueur de 0,5 à 5 kb (Bird 2002). L'analyse du génome humain a mis en évidence plus de 29000 îlots CpG. Ces îlots se trouvent généralement en 5' d'environ 90% des gènes qualifiés de gènes de ménage (house keeping) et leur état de non méthylation est la marque de leur expression dans tous les tissus (Ponger et coll 2001). En revanche les gènes d'expression tissu spécifique sont méthylés ou non méthylés selon qu'ils sont ou non exprimables dans un tissu donné (Lander et coll 2001)

La distinction entre ces deux catégories n'est probablement pas aussi nette, car chez l'homme, environ 60% de gènes sont associés à des îlots CpG, parmi lesquels l'ensemble des gènes dits de ménage, mais aussi environ 40% de gène à expression spécifique (Bird A 2002, Weber M 2008). La méthylation affecte également les parties non codantes du génome humain. C'est le cas en particulier des séquences Alu particulièrement riches en doublets CpG. La méthylation varie selon les tissus, tandis que ces séquences sont presque totalement méthylées dans les tissus somatiques comme la rate, elles sont hypométhylées

dans la lignée germinale mâle et dans les tissus qui dépendent d'une expression différentielle du génome au cours du développement (Paulson et coll 2001, Karp G 2004)

Le dinucléotide CpG est un véritable point chaud de mutation. Il est la cible fréquente de la modification enzymatique physiologique de l'ADN, la méthylation. Par ailleurs, au sein de l'ADN, la cytosine est susceptible d'être désaminée en uracile par une désaminase. La présence de l'uracile, un constituant anormal de l'ADN est détecté efficacement par un mécanisme d'excision par l'uracile DNA glycosylase. Si la désamination concerne une cytosine méthylée, cette dernière est transformée en T, erreur qui sera moins efficacement corrigée en raison du caractère palindromique du dinucléotide CpG et de sa méthylation ; il résultera une mutation vers TpG ou CpA. De ce fait les CpG des mammifères sont très instables et sont peu abondants (Larsen 1992, Karp G 2004).

L'une des caractéristiques importantes de la méthylation de l'ADN est le fait que le groupement méthyl se loge dans le grand sillon de l'ADN sous forme B. l'ADN de forme B dont la conformation en double hélice tourne vers la droite, est l'agencement naturel de l'ADN quand l'humidité est élevée et la salinité basse. C'est la forme d'ADN la plus commune dans l'organisme. Ce changement a non seulement d'importantes répercussions sur le génome, puisque c'est la structure même de l'ADN qui est modifiée, mais il modifie radicalement les interactions des protéines avec l'ADN. (Hartel et coll 2003, Kelly et coll 2004)

La méthylation de l'ADN est considérée comme une marque répressive, c'est à- dire que la méthylation d'un îlot CpG est généralement incompatible avec l'activité transcriptionnelle. Elle a été impliquée dans des phénomènes tels que l'empreinte génomique parentale (Henckel et coll 2008) l'inactivation du chromosome X et la répression des éléments répétés du génome (Gabory et coll 2005)

## **B. LES ENZYMES INTERVENANTS DANS LA METHYLATION DE L'ADN :**

Il existe un système enzymatique de méthylation/déméthylation dont les différents éléments sont encore mal connus. Cependant, l'existence de profils de méthylation tissus spécifiques prouve clairement qu'une fois établis ces profils sont propagés fidèlement dans les tissus somatiques et à travers les générations (Reik et coll 2002)

Les cycles de méthylation/déméthylation passent donc par deux types de méthylase, l'une assurant une méthylation *de novo* appelé méthylase ou DNA méthyl transférase (Dnmt) d'initiation qui agit sur l'ADN non méthylé, l'autre dite de maintenance ou d'entretien qui n'agit que sur les séquences CG qui sont appariées à une séquence CG déjà méthylée ce qui permet la transmission héréditaire directe d'un profil de méthylation préexistant par un processus matriciel (Bestor et coll 1996, Karp G 2004).

Il existe également deux modèles de déméthylation, l'un passif si la méthylase de maintenance n'agit pas après la réplication (5 cycles de réplication permettent une déméthylation > 95%), l'autre actif par l'intermédiaire d'une enzyme la 5mC glycosylase (Zhu et coll 2001, Liang et coll 2002, Kelly et coll 2004).

Plusieurs formes de Dnmt existent (Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3..), toutes possèdent un domaine conservé C-terminal qui correspond au domaine catalytique et un domaine très variable situé en N-terminal spécifique à chacune de ces enzymes. Elles possèdent aussi un domaine régulateur comportant une séquence NLS (Nuclear Localisation Sequence) mais également une séquence de rétention cytoplasmique. En effet, les DnmTs sont retenues dans le cytoplasme durant les stades précoces de l'embryogenèse (Cilio et coll 2008). Un stock maternel de Dnmt (Dnmt1o) accumulé dans l'ovocyte est observé et pourrait avoir un rôle de protection sur le développement de l'embryon et sur la lignée germinale en méthylant systématiquement les ADN intrus empêchant leur transcription.

### **1. Dnmt1 :**

Protéine de 1620 acides aminés codée par un gène localisé sur le chromosome 19 p13.2 chez l'homme et la plus abondante dans les cellules somatiques. Plusieurs isoformes ont été décrites telle que : Dnmt1s qui est la forme somatique s'exprime rapidement après l'implantation embryonnaire, dès le stade 2 cellules au niveau nucléaire et cytoplasmique chez la souris et joue un rôle primordial dans le maintien de l'empreinte parentale et le développement (Cilio et coll 2008).

Dnmt1b caractérisé par 88 aa supplémentaires au niveau N terminale et une activité de méthylation similaire à celle de Dnmt1 décrite *in vitro* (Robertson 2002).

Dnmt1o, isoforme spécifique de l'ovocyte présentant un déficit de 150 aa au niveau N terminal par rapport à Dnmt1, est aussi active *in vitro* et *in vivo*. C'est une forme impliquée dans le maintien de l'empreinte parentale durant les divisions cellulaires au cours de l'embryogenèse (Li E 1992, Jeltsh A 2002, Cirio et coll 2008). Dans les ovocytes de souris, la Dnmt1o est exprimée au niveau cytoplasmique jusqu'au stade 8 cellules puis devient

nucléaire et joue un rôle important dans le développement embryonnaire en collaboration avec Dnmt1s (Ratnam et coll 2002, Cilio et coll 2008)

Il a été démontré que par sa partie N terminale, Dnmt1 interagit avec d'autres protéines telles que DMAP1 un co-répresseur transcriptionnel, HDAC1 et HDAC2 deux histones déacetylases, E2F1 un facteur transcriptionnel et Rb une protéine suppresseur de tumeur (Robertson 2002).

On peut déduire que la partie N terminale joue le rôle d'une plate-forme sur lequel se réunissent plusieurs protéines qui interviennent dans la configuration de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes (Fuck et coll 2000, Fuck et coll 2003).

Dnmt1 agit préférentiellement au niveau de l'ADN hémiméthylé d'où son rôle dans le maintien de la méthylation *in vivo*, sa localisation au niveau des foyers de réplication a été rapportée, mais l'interaction de la Dnmt1 avec la machinerie de réplication ne semble pas strictement associée au maintien de la méthylation (Schermelleh et coll 2007). Elle agit aussi sur l'ADN non méthylé ce qui explique son rôle au niveau de la méthylation de novo (Bestor 1992, Pradhan et coll 1997, Yoder et coll 1997).

Hirasawa et coll ont démontré dans des modèles de souris invalidées que les Dnmt1 maternelle et zygotique ainsi que ses isomères sont nécessaires et suffisantes pour maintenir les profils de méthylation des gènes soumis à empreinte au cours des différents stades du développement préimplantatoire (Hirasawa et coll 2008)

Dnmt1 est essentielle pour le bon développement embryonnaire. En effet, l'inactivation de Dnmt1 chez la souris se manifeste par une létalité embryonnaire précoce peu après l'implantation avec une hypométhylation globale du génome, une inactivation ectopique du chromosome X, et une perte de l'expression de certains gènes soumis à empreinte (Li et coll 1992, Lei et coll 1996, Howell et coll 2001)

Des études récentes montrent un lien entre Dnmt1 et la lysine déméthylase LSD1 au cours de l'embryogenèse, cette interaction a pour rôle le maintien de la méthylation de l'ADN (Wang et coll 2009).

## **2. Dnmt2 :**

Initialement décrite comme membre de la famille des ADN méthyltransférases en se basant sur l'analogie structurale avec les Dnmt des eucaryotes et des procaryotes. Mais aucune activité catalytique n'a été démontrée ; de plus, les souris invalidées pour l'enzyme Dnmt2 -/- ne présentent pas de phénotype particulier. Par conséquent, ses fonctions biologiques

restent largement méconnues bien qu'elle soit hautement conservée dans les différentes espèces (Dong et coll 2001, Jeltsh et coll 2002, Tomasz et coll 2008). Certaines études ont montré que Dnmt2 est capable, avec une faible efficacité par rapport aux Dnmt1, de méthyler l'ADN *in vitro* (Hermann et coll 2003, Goll et coll 2005). Récemment elle a été décrite comme la première enzyme capable de méthyler l'ARN (Goll et coll 2006, Tomasz et coll 2008).

### **3. Dnmt3:**

La Dnmt3 méthyltransférase a été découverte en 1998 (Okano et coll 1998). Trois isoformes sont décrits : Dnmt3a, Dnmt3b et Dnmt3L. Les deux premières sont hautement représentées au niveau des cellules embryonnaires et faiblement au niveau des cellules différenciées (Pradhan et coll 2003)

Ces méthyltransférases sont responsables de la vague de méthylation *de novo* au cours de la gamétogenèse et au début du développement. Elles sont capables de méthyler des séquences parasites nouvellement intégrées (Okano et coll 1999, Hsieh et coll 1999).

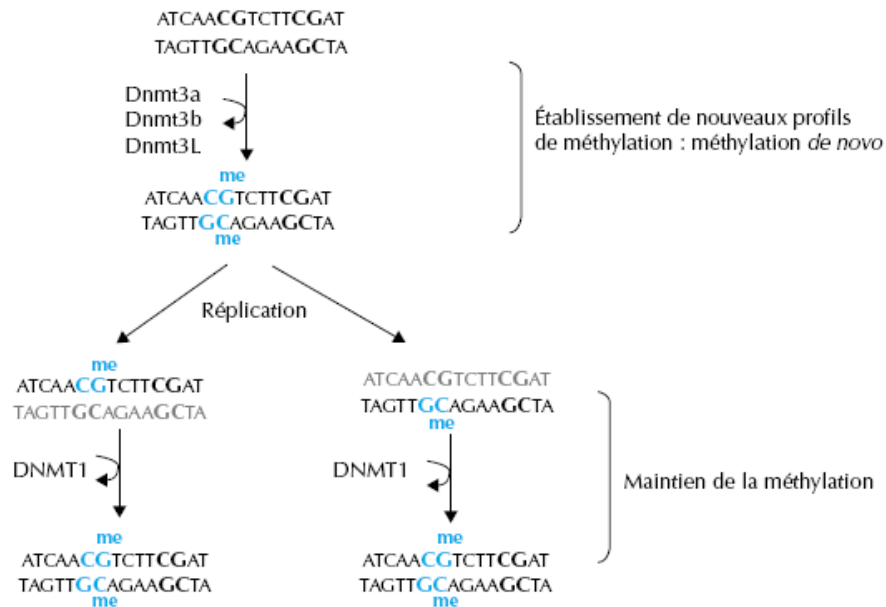
Les souris invalidées Dnmt3a *-/-* et Dnmt3b *-/-* ou uniquement Dnmt3b *-/-* décèdent à différents stades du développement embryonnaire, Dnmt3a *-/-* décède rapidement après la naissance, ce qui témoigne de l'important rôle que jouent ces enzymes au cours du développement précoce (Okano et coll 1999).

Dnmt3a interagit avec HDAC1 une histone déacetylase et RP58 un répresseur transcriptionnel (Jeltsh et coll 2002). Elle agit préférentiellement sur des sites CpG différents de ceux méthylés par Dnmt3b permettant l'orchestration de l'expression génique au cours du développement embryonnaire (Oka et coll 2006). Elle agit aussi de façon spécifique au niveau des régions différentiellement méthylées (DMR) du gène H19 et Dlk1/Gtl2 ainsi qu'au niveau des courtes séquences répétées SineB1 alors que Dnmt3b assure à elle seule la méthylation des séquences satellites au cours de la spermatogenèse chez la souris (Kato et coll 2007). Des mutations du gène de Dnmt3 affectant le domaine catalytique de l'enzyme ont été caractérisées par Hansen et coll en 1999 et sont responsable du syndrome ICF (Immunodeficiency centromeric region instability and facial anomalies).

Dnmt 3a, Dnmt3b et Dnmt3L sont régulées de façon coordonnée au cours de l'ovogenèse et leur expression est maximale au moment de la mise en place de l'empreinte maternelle (Lucifero et coll 2007)

Suite à une large délétion au niveau de son domaine catalytique, Dnmt3L est incapable de méthyler l'ADN (Aapola et coll 2000). Des études de plus en plus récentes, montre qu'elle joue un rôle dans l'établissement de l'empreinte parentale en interaction avec Dnmt3a et Dnmt3b. Elle assure également la méthylation des rétro transposons dans la lignée germinale male et non femelle ce qui suggère l'intervention d'autres facteurs dans la lignée germinale femelle (Hata et coll 2002, Yokomine et coll 2006, Lucifero et coll 2007).

L'action de ces méthyltransférases *de novo* au niveau de leur sites spécifiques nécessite l'interaction avec des protéines qui se lie à l'ADN (Protein binding DNA) ou des molécules d'ARN appelé RNAi pour RNA interférence selon le processus de méthylation d'ADN dirigé par des ARNs (RdDM : RNA directed DNA méthylation) (Klose et coll 2006)



**Fig 21: Etablissement et maintien de la méthylation de l'ADN et les enzymes impliqués.**

Il faut noter qu'une méthylation *de novo* aberrante c'est-à-dire se faisant soit sur un mauvais site, soit à un mauvais moment du stade de développement, peut être associée à des transformations cellulaires et à une perte de compétence développementale. Une régulation minutieuse de ces enzymes est donc nécessaire.

### C. DYNAMIQUE DE LA METHYLATION :

Longtemps considérée comme une modification stable, il a été démontré récemment dans l'une des plantes modèle en sciences végétales *Arabidopsis Thaliana*, que la méthylation de



l'ADN est un processus dynamique. Elle peut être perdue au profil des générations par une imperfection au sein du système de méthylation et remis en place grâce à des si RNAs (Teixeira et coll 2009, Law et coll 2009)

### **1. Modèle de méthylation :**

Le modèle de méthylation, qui a été élaboré par Riggs et Razin, est une théorie expliquant le rôle que pourrait avoir la méthylation dans la détermination du type cellulaire. Alors que chaque cellule humaine contient 100 000 gènes, seulement un petit nombre d'entre eux est activé dans une cellule, indépendamment du stade du développement de l'organisme, du type cellulaire, de signaux extérieurs à l'organisme (Razin et coll 1999)

Ainsi, selon ce modèle, la méthylation serait en partie responsable de l'inactivation des gènes. En effet, puisque seulement une fraction des gènes d'une cellule s'exprime, le reste des gènes doit être inactivé. Chaque type de cellule aurait donc un patron de méthylation qui déterminerait quels gènes sont activés (Jones et coll 1998, Jones et coll 2001)

Ce patron serait transmis aux cellules filles après une division cellulaire, c'est pourquoi le type cellulaire reste généralement le même dans une même lignée de cellule. Il a été aussi décrit que les patrons de méthylation sont spécifiques des tissus (Nan et coll 1998, Jones et coll 2001)

Le modèle de méthylation donne également une explication concernant les différenciations qui se produisent lors du développement. Selon Riggs, une méthylation large, *de novo*, se produirait en rendant l'ADN de l'embryon assez uniforme. Au fur et à mesure que les cellules se différencieraient, une déméthylation spécifique aurait lieu suivant les types cellulaires (Paulson et coll 2001)

### **2. Maintenance et commutation :**

Deux phénomènes importants liés à ce modèle sont la maintenance et la commutation des groupes méthyles. En effet, lors de la réplication de l'ADN, qui se produit à chaque division cellulaire, deux nouveaux brins d'ADN sont formés. Or, aucun groupement méthyle n'est présent sur ces brins nouvellement formés.

Donc, lorsque l'ADN totalement méthylé est répliqué, deux molécules hémiméthylées sont créées. Des groupements méthyles sont ensuite ajoutés sur tous ces sites hémiméthylés par les méthyltransférases de maintenance ou d'entretien (Betsor 1992, Jeltsch 2002)

La commutation, signifie enlever un groupement méthyle existant ou en ajouter un nouveau. La commutation peut se faire en trois occasions : lors d'une différenciation, quand une

cellule se divise en deux cellules filles différentes de la cellule mère ; lors d'une ségrégation, quand une cellule se divise en une cellule identique et une cellule différenciée autrement ou dans le cas d'une modification accidentelle d'un groupe méthyle (Jeltsch 2002, Reik and Dean 2001)

Diverses études ont décrit les mécanismes de transfert du groupement méthyle au niveau des résidus cytosines ainsi que le maintien de cette méthylation au cours des processus cellulaires chez les plantes et les mammifères (Chan et coll 2005, Goll et Bestor 2005). Ainsi, le patron de méthylation d'une cellule se transmet de la cellule mère aux cellules filles lors d'une division cellulaire (Hsieh 1999, Jones 2001).

Cependant, les mécanismes qui contrôlent la déméthylation de l'ADN restent relativement mystérieux et controversés. L'effacement de la méthylation se fait suite à deux mécanismes. Le premier est passif avec la perte du maintien de la méthylation au cours de la réplication, le deuxième est actif avec l'élimination du groupement méthyle suite à une réaction enzymatique.

**Déméthylation passive :**

Elle survient au moment des divisions cellulaires quand la cellule procède à une réplication de son ADN : les brins d'ADN nouvellement formés sont hémiméthylés sans pouvoir être méthylés à cause de la mise hors jeu du système de maintenance par la Dnmt1.

L'inhibition, l'épuisement ou l'exclusion nucléaire de Dnmt1 entraîne une déméthylation passive au cours de la prolifération cellulaire. Cette déméthylation est due à la perte des <sup>m</sup>CpG à chaque réplication. Ce processus est lent et aboutit à chaque réplication à une déméthylation maximale de 50% des <sup>m</sup>CpG (Kress et coll 2001)

**Déméthylation active :**

Les études sur la déméthylation active restent jusqu'à présent confuses et controversées. Trois mécanismes de déméthylation active sont proposés :

Bhattacharya et coll propose en 1999 le mécanisme de substitution directe du groupement méthyle de la 5<sup>m</sup>CpG grâce à la protéine MBD2 (methyl-binding protein 2) qui est capable, en utilisant l'H<sub>2</sub>O, de directement oxyder le groupement méthyle en méthanol (Bhattacharya et coll 1999).

Des études génétiques et biochimiques sur *Arabidopsis* ont mis en évidence un second mécanisme de déméthylation active avec le rôle des ADN glycosylases telle que ROS1 (REPRESSOR SILENCING 1) et DEMETER (DME) qui reconnaissent et éliminent la base

cytosine méthylée ; c'est le mécanisme de réparation par excision d'une base BER (*Base excision repair*) (Agius et coll 2006, Gehring et coll 2006)

Chez les mammifères y compris l'Homme, ce mécanisme a été mis en évidence et des études ont pu démontrer l'existence de deux protéines à activité glycosylase : la TDG ou Thymine DNA Glycosylase (Bennett et coll 2006) et la MBD4 qui possède une extrémité N-terminale à activité ADN glycosylase (Zhu et coll 2000). Aucune étude ne montre une implication directe de ces deux glycosylases dans l'élimination de la cytosine méthylée.

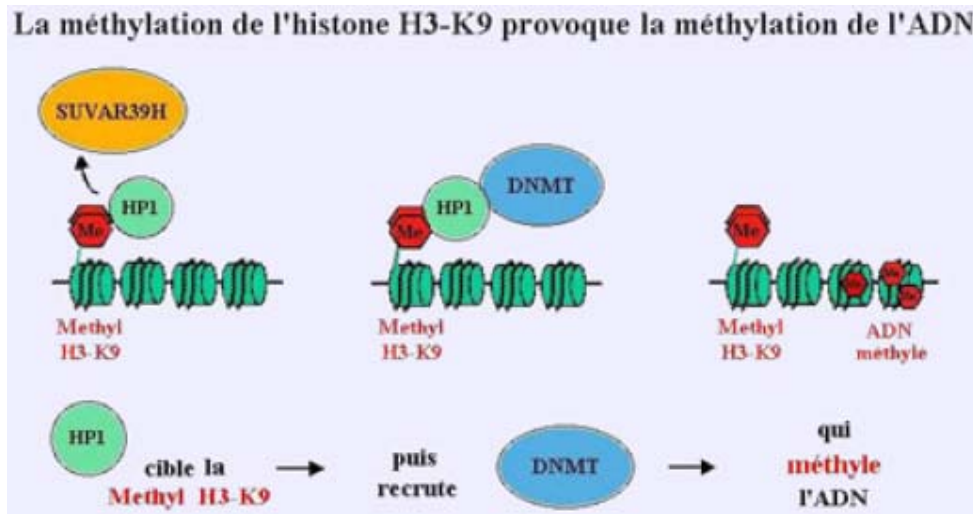
Par contre, il a été démontré que ces protéines sont capables de reconnaître et d'exciser une 5 méthyl-cytosine qui a subi une désamination par les protéines de la famille AID/Apobec (activation-induced deaminase/ Apolipoprotein B mRNA enzyme catalytic) désaminases permettant sa transformation en thymidine (Morgan et coll 2004, Zhu K 2009).

Un troisième mécanisme de déméthylation correspond au clivage d'une séquence nucléotidique de 25 à 30 nucléotides par des nucléases suivie d'une réparation par l'ADN ligase et polymérase qui remplace les nucléotides manquants, y compris les cytosines méthylées par des cytosines non méthylées. C'est la réparation par excision de nucléotide (nucleotide excision repair NER). Il a été démontré que la protéine clé dans la réponse au stress cellulaire, Gadd45a (growth arrest and DNA-damage-inducible alpha) joue un rôle dans les mécanismes de réparation de l'ADN par excision des nucléotides (Kearsey et coll 1995), ce qui laisse supposer qu'un déficit en cette protéine s'accompagnera d'une hyperméthylation mais l'étude récente d'Engel et coll montre que les souris Gadd45a *-/-* ne confirme pas cette hypothèse (Engel et coll 2009)

#### **D. METHYLATION ET ETAT CHROMATINIEN :**

Le degré de méthylation et d'acétylation des histones ainsi que l'état de méthylation de l'ADN génèrent plusieurs états de la chromatine. L'histone H3 peut être méthylée par des histones méthyl-transférases (HMTases) sur plusieurs lysines (4, 9, 27, 36). Selon la position de la méthylation, il peut y avoir soit recrutement du facteur répressif HP1 (Heterochromatin protein 1) conduisant à un état condensé et transcriptionnellement inactif de la chromatine (H3-mK9), soit inhibition de la fixation d'un complexe protéique contenant une histone désacétylase (HDAC) et conduisant à un état décondensé transcriptionnellement actif. Ces deux états chromatiniens sont donc parfaitement réversibles (Razin et coll 1999, Li E 2002).

Cependant l'état chromatinien condensé obtenu après méthylation de K9 peut être stabilisé par la méthylation de l'ADN par des DNA méthyl transférase (Dnmt) au niveau des îlots CpG des promoteurs.



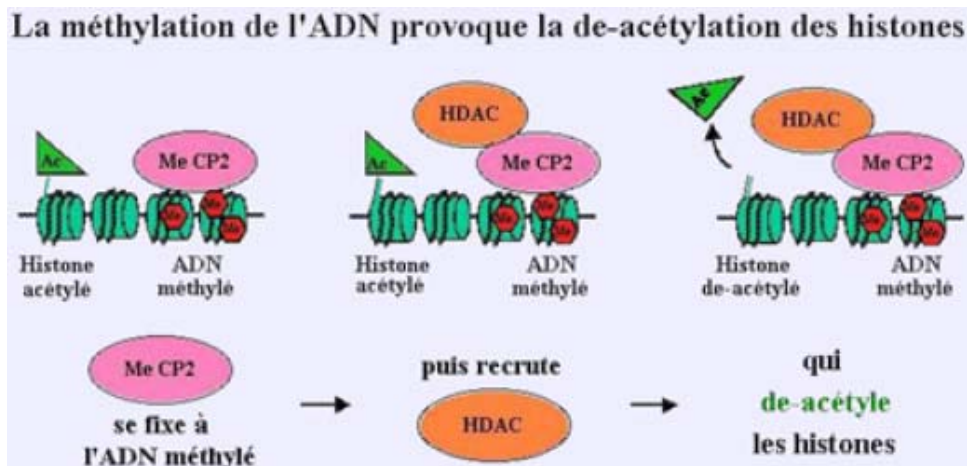
**Fig 22: La méthylation de l'histone H3-K9 provoque la méthylation de l'ADN.**

SUVAR39H : méthyltransférase qui méthyle spécifiquement la lysine 9 de l'histone H3.

Me : méthyl ; Methyl H3-K9 : Methyl sur lysine 9 de l'histone H3.

HP1 : Heterochromatin protein

La méthylation du promoteur par ces enzymes, va permettre de recruter *via* des protéines se liant à l'ADN telles Mecp2 (*methylated DNA binding protein*), l'histone désacétylase ayant pour effet un renforcement de la méthylation, une augmentation de condensation de la chromatine et une répression transcriptionnelle accrue. Cet état chromatinien particulier est transmissible. Il existe donc un équilibre dynamique entre la structure de la chromatine et la méthylation de l'ADN (Geiman et coll 2002).



**Fig 23: La méthylation de l'ADN provoque la dé-acétylation des histones. Ac: Acetyl ;**

Me: Methyl ; HDAC : histone déacetylase ; MeCP2 : Methyl CpG binding Protein2

## **E. METHYLATION ET REPROGRAMMATION EPIGENETIQUE:**

Si l'on considère l'ensemble du génome, les profils de méthylation de l'ADN sont en majorité stables au cours du développement comme dans les tissus somatiques de l'adulte (Howlett et coll 1991). Ceci est lié à la symétrie des sites CpG qui fournissent une base moléculaire pour la transmission semi conservative de la méthylation de l'ADN après réplication. Cependant, deux phases sont caractérisées par un important remaniement de ces structures donc par une reprogrammation épigénétique qui constitue une étape cruciale pour le développement normal de l'embryon : une première au cours du développement préimplantatoire de l'embryon et une seconde durant la phase de développement de la lignée germinale ou une perte de la méthylation est associée à l'effacement des empreintes disposées lors du développement des gamètes, suivie d'une reprogrammation lors de la gaméto-genèse selon le sexe du nouvel embryon (Reik et coll 2007).

### **1. Au cours du développement embryonnaire préimplantatoire :**

Avant la fécondation, l'ADN des deux gamètes, en particulier du spermatozoïde, présente un niveau élevé de méthylation (Howlett et coll 1991). Après la fécondation, le génome femelle, bloqué en métaphase de la seconde méiose, termine sa méiose devenant ainsi haploïde, expulse le second globule polaire et forme le pronucléus femelle. Le génome mâle, déjà haploïde et complexé à des nucléoprotamines, subit un échange de ces dernières par des histones cytoplasmiques de l'ovocyte. Une décondensation chromatinienne accompagne la formation du pronucléus mâle. Ce remodelage chromatinien permet l'accès au génome paternel des facteurs cytosoliques de reprogrammation (Santos et coll 2005).

Avant la première division cellulaire, le génome paternel subit une déméthylation presque totale. Cette déméthylation s'opérant en absence de toute réplication de l'ADN est appelée « déméthylation active » (Mayer et coll 2000, Oswald et coll 2000, Li E 2002, Kelly et coll 2004, Sanz et coll 2010). Deux études récentes montrent que la protéine AID (activation induced desaminase) intervient au cours de cette phase de déméthylation active chez les mammifères (Popp et coll 2010, Bhutani et coll 2010)

Cette déméthylation du pronoyau male est à mettre en relation avec l'activation mineure du génome EGA (Embryonic genome activation) qui ne nécessite pas la présence de facteurs de transcription spécifiques et qui sera suivie par une phase d'activation dite majeure ou la synthèse des transcrits augmente de manière rapide et dépend de la présence de facteurs

activateurs spécifiques (Nothias et coll 1995). Il est important de noter que la compétence transcriptionnelle est acquise à ce stade plus précocement dans le pronoyau mâle (Jeanblanc et coll 2008).

L'équipe de Yamazaki a étudié l'évolution de la localisation de l'ADN méthylé *in vivo* depuis la fécondation et jusqu'au stade morula et a ainsi pu montrer que la modification de la localisation de l'ADN méthylé est bien corrélée avec la phase d'activation majeure qui survient au cours du stade 2 cellules (Ymazaki et coll 2007). Il apparaît donc que les principales variations dans la méthylation de l'ADN aussi bien le niveau de méthylation et la localisation de l'ADN méthylé précèdent les phases d'activation mineure et majeure de l'activation du génome embryonnaire (EGA). Ces remaniements jouent donc un rôle essentiel pour l'expression correcte des gènes de l'embryon.

Le génome maternel, quant à lui, ne subit pas cette déméthylation active. Le pronucléus femelle contient de fortes concentrations en H3-mK9. Par contre, après fécondation (échange protamine / histone) le pronucléus mâle ne présente que peu de H3-mK9. Le facteur répressif HP1 ne serait recruté que par la chromatine maternelle, préservant ainsi le génome maternel de la déméthylation active (Li E 2002, Santos et coll 2005). L'incorporation de variants d'histones tels que H3.3 pourrait aussi jouer un rôle important pour différencier les deux génomes (Van der Heijden et coll 2005). Ce qui suggère que les modifications post-traductionnelles des histones interviennent aussi dans ces phénomènes de déméthylation lors de la reprogrammation du génome (Morgan et coll 2005, Sanz et coll 2010).

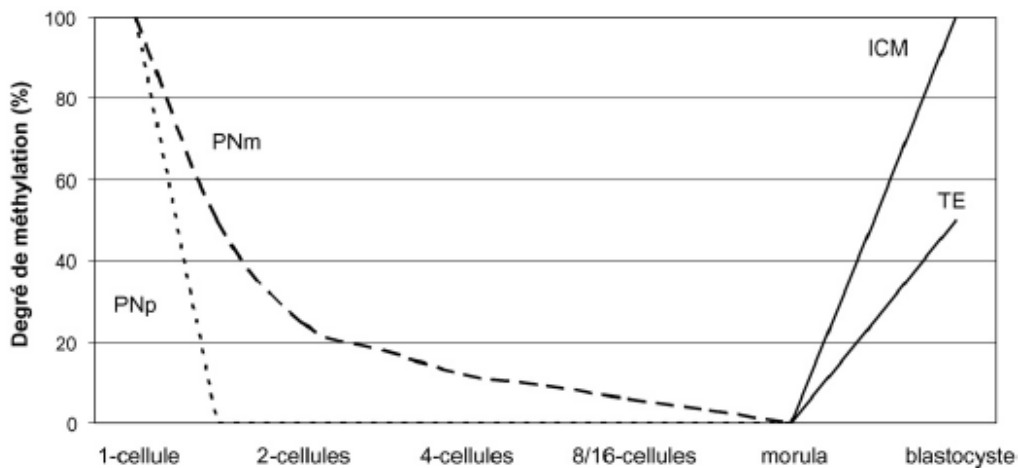
D'autres protéines produites au cours de l'ovogenèse pourraient aussi être impliquées dans la protection du génome maternel. Actuellement, une protéine a été identifiée : Stella aussi appelée PGC7 et localisée dans le pronucléus femelle et qui semble protéger le génome maternel de la déméthylation et pourrait notamment prévenir la déméthylation de certains ICR, mais le mécanisme précis reste à élucider (Nakamura et coll 2007)

À partir du stade zygote et jusqu'au stade morula, le génome maternel subit également une déméthylation. Cette déméthylation est liée à la réplication de l'ADN « déméthylation passive ». La méthyltransférase Dnmt 1, d'origine maternelle, reste exclue du noyau durant la majorité de la phase préimplantatoire, jusqu'au stade huit cellules (Ratnam 2002). Cette exclusion combinée au caractère semi-conservatif de la réplication (le brin d'ADN fils n'est pas méthylé) conduit à un état d'hypométhylation. Il faut noter que cette déméthylation épargne les gènes soumis à empreinte parentale et certaines séquences répétées comme les séquences satellites et certains rétrotransposons (Morgan et coll 2005, Sanz et coll 2010).

Cette déméthylation massive touchant les deux génomes, aurait pour rôle d'effacer toute régulation provenant des cellules germinales parentales pour permettre un nouveau profil d'expression génique caractéristique du zygote.

Une phase de réméthylation *de novo* due à l'expression des Dnmt 3a et b n'intervient qu'au stade blastocyste (Watanabe et coll 2002), qui est le premier stade de différenciation, entre les cellules de la masse cellulaire interne (ICM) qui donneront l'embryon et les cellules du trophoctoderme qui donneront les annexes extraembryonnaires. Alors que les cellules du trophoctoderme restent pour la plupart déméthylées, les cellules de l'ICM présentent une importante réméthylation de leur ADN (Santos et coll 2002, Popp et coll 2010). Chez l'humain, au stade blastocyste les cellules du trophoctoderme présentent un taux de méthylation *de novo* plus élevé que les cellules de l'ICM (Fulka et coll 2004).

Il est donc probable que la méthylation de l'ADN joue un rôle dans cette première étape de différenciation, en participant à la régulation différentielle des gènes exprimés dans l'un ou l'autre des compartiments (Jeanblanc et coll 2008).



**Fig 24: Profil de méthylation de l'ADN dans les embryons de souris au cours du développement préimplantatoire.**

PNp: pronoyau paternel, PNm: pronoyau maternel

ICM : Inner cell mass, TE : trophoctoderme

## 2. Dans les cellules germinales primordiales (PGC):

Au cours du développement embryonnaire, les cellules de l'épiblaste peuvent conduire à deux lignées distinctes: les cellules somatiques et les cellules primordiales de la lignée germinale (PGC). Ces dernières subiront une reprogrammation épigénétique distincte de celle des cellules somatiques.

Après leur détermination et leur différenciation, les PGC migrent à la base de l'allantoïde. Elles sont retrouvées ensuite au niveau de l'endoderme intestinal. Elles quittent ensuite l'intestin, traversent le mésentère dorsal pour rejoindre les ébauches gonadiques. Au cours de leur migration les PGC prolifèrent sous le contrôle de SCF (*stem cell factor*), du récepteur ckit, du ligand de c-kit. La différenciation des PCG en gonocytes mâles ou femelles est sous l'influence de facteurs protéiques tels Gas6, Gata-4, SF-1, Wt-1, Zfx (femelle), Zfy (mâle) exprimés selon la nature XX ou XY de l'embryon mais également sous l'influence du gène *sry* uniquement exprimé chez le mâle (Bessodes et coll 2005).

Au niveau des crêtes génitales, le gonocyte mâle arrête sa mitose et le gonocyte femelle entre en prophase de la première méiose. Dès leur arrivée au niveau des crêtes génitales et avant l'arrêt mitose/méiose, les PGC subissent un remaniement épigénétique très important. Il y a tout d'abord une déméthylation active d'un grand nombre de séquences ADN : gènes simple copie, gènes soumis à empreinte parentale, séquences répétées (Li E 2002, Kelly et coll 2004). Popp et coll ont montré une hyperméthylation au sein des PGC des embryons *Aid*<sup>-/-</sup> suggérant que la protéine AID contribue à cette déméthylation du génome dans les PCG (Popp et coll 2010).

Par contre, cette même équipe n'observe pas de défaut de développement dans la descendance des souris *Aid*<sup>-/-</sup> ce qui suggère que d'autres facteurs interviennent dans ce phénomène de déméthylation. C'est ce qui a été démontré par l'équipe d'Okada qui a découvert un complexe protéique d'élongation (Elongator protein: ELP3, ELP4, ELP1) qui intervient dans cette vague de déméthylation sans que le mécanisme exacte ne soit étayé (Okada et coll 2010)

Ce processus de déméthylation est essentiel pour plusieurs raisons (Sanz et coll 2010): il permettra la génération de nouvelles cellules qui seront totipotentes dans la phase préimplantatoire de l'embryogenèse, l'équivalence de l'état épigénétique des cellules des deux sexes avant leur différenciation et la réacquisition des empreintes parentales, enfin l'élimination d'éventuelles épimutations acquises au cours du temps dans les gamètes parentaux.

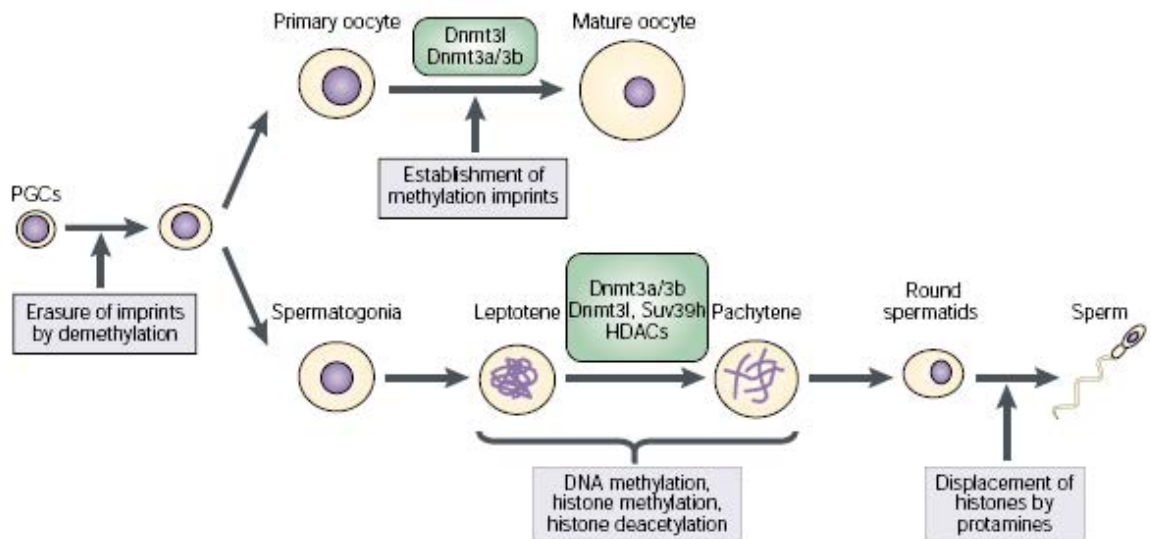
La reprogrammation épigénétique dans les PGC est aussi caractérisée par une méthylation *de novo* des gènes soumis à l'empreinte parentale qui sera détaillée dans le chapitre suivant. Elle varie selon que les gonocytes sont mâles ou femelles. Bien que les protéines responsables soient les mêmes (*Dnmt3a* et *Dnmt3l*) chez les embryons mâles et femelles, elles ne ciblent pas les mêmes séquences. Dans la lignée germinale mâle, la méthylation



concerne certains ICR (imprinting control region) et des rétroéléments (Kato et coll 2007), tandis que dans la lignée germinale femelle elle est acquise seulement au niveau d'autres ICR.

Elle est initiée dans la lignée germinale mâle en période prénatale, dans les gonocytes quiescents, puis poursuivie après la naissance pour être complète au stade pachytène des spermatogonies (Allegrucci et coll 2005). Dans la lignée germinale femelle, la méthylation *de novo* à lieu après la naissance, dans les ovocytes primaires en croissance (Sasaki et coll 2008). Ceci est nécessaire au rétablissement dans les cellules germinales des empreintes génomiques caractéristiques des deux types de gamètes et indispensable au développement ultérieur de l'embryon (Reik et coll 2001, Lucifero et coll 2004). Les gamètes mûrs présentent alors une dissymétrie de méthylation : l'ADN du gamète mâle est hyperméthylé par rapport à l'ADN de l'ovocyte. Cependant, globalement, l'ADN des gamètes est hypométhylé par rapport à celui des cellules somatiques.

Ainsi, tout au long de la gamétogenèse, les futurs génomes parentaux vont suivre deux chemins très différents, qui vont avoir des conséquences fonctionnelles au moment de la fécondation et durant le développement de l'embryon.



**Fig 25: Reprogrammation épigénétique au cours de la gamétogenèse.**

## **F. FONCTIONS DE LA METHYLATION DE L'ADN :**

Toutes les fonctions de la méthylation sont encore loin d'avoir été totalement élucidées, mais elle apparaît déjà comme essentielle au cours du développement précoce. Elle est certainement impliquée dans des processus de régulation de l'expression d'un grand nombre de gènes, mais elle peut également intervenir pour distinguer l'origine paternelle ou maternelle de certains allèles et jouer ainsi un rôle dans le phénomène d'empreinte parentale, d'inactivation de l'X ou encore dans l'oncogenèse et même dans certaines maladies héréditaires (Jeltsch 2002)

### **1. Méthylation de l'ADN et régulation de l'expression des gènes :**

L'expression des gènes est régulée par des facteurs de transcription qui se lient à l'ADN en fonction des besoins cellulaires. En 1969 Griffith et Mahler suggèrent pour la première fois que les mécanismes épigénétiques, qui incluent principalement des modifications de la méthylation de l'ADN et des modifications post-traductionnelles des histones peuvent moduler l'expression des gènes (Griffith et coll 1969). Ces deux mécanismes peuvent agir de façon indépendante ou concertée pour modifier la compaction de la chromatine, et en conséquence l'expression des gènes concernés.

En effet, la méthylation intéresse les dinucléotides CpG au sein des îlots CpG situés particulièrement dans les régions promotrices ou le premier exon de 60% des gènes humains (Bird A 2002). Il a été démontré que les promoteurs des gènes réprimés sont significativement plus méthylés que ceux des gènes qui s'expriment (Naveth et coll 1981, Antaquera et coll 1993).

D'autres études ont pu démontrer qu'une déméthylation peut induire une activation génique, en ajoutant la 5-azacytidine (5-azac) qui est un analogue de la cytosine pendant un temps bref à des cellules en culture. Ils ont démontré qu'il s'incorpore à l'ADN et agit comme un inhibiteur de la méthylase d'entretien, réduisant de ce fait le taux global de méthylation de l'ADN. Dans ces cellules traitées, des gènes particuliers qui étaient auparavant inactifs, deviennent actifs et acquièrent en même temps des cytosines non méthylées. Une fois activés, ces gènes conservent leur état actif au cours de nombreuses générations cellulaires en absence de 5-azac, impliquant que la méthylation initiale des gènes aide à maintenir leur inactivité (Nan et coll 1998, Karp G 2004)

De même dans le cas de bon nombre de gènes clonés qui ont été réintroduits dans des cellules de mammifères, la forme non méthylée se révèle plus active que le gène

délibérément méthylé (Waechter et coll 1982). En plus, le modèle du chromosome X inactivé suggère que cette méthylation est la base d'une inactivation (Holliday 2006).

Par conséquent, la méthylation de l'ADN réprime la transcription en inhibant directement la liaison de certains facteurs transcriptionnels (Watt et coll 1988) ou indirectement via le recrutement des protéines qui se lient aux dinucléotides CpG méthylés comme la MBD (Methyl Binding protein) et les histones déacétylases qui favorisent la compaction de la chromatine des gènes hyperméthylés, réprimant ainsi leur transcription (Boyes et coll 1991, Bird AP et coll 1999, Bird A 2002).

Pour le mécanisme de répression direct, le groupe 5-méthyl de la cytosine pourrait augmenter ou diminuer l'interaction entre l'ADN et des protéines comme les répresseurs et les activateurs. Il forme une protubérance dans le grand sillon de la double hélice, où a souvent lieu la reconnaissance spécifique entre protéine et ADN (Li E 2002). On peut citer comme exemple la protéine CTCF qui possède des sites de liaison au niveau du centre d'empreinte du locus *Igf2/H19* (Bird 2002). La méthylation de ces sites sur l'allèle paternel empêche CTCF de se lier et en conséquence inhibe l'expression du gène *H19* (Bell et coll 2000). Malgré l'importance de ce mécanisme, relativement peu de facteurs dont la liaison est affectée par la méthylation ont été identifiés, parmi eux : AP-2, AMPc, CREB, E2F et NF- $\kappa$ B (Singal et coll 1999, Miranda et coll 2007)

Des mécanismes de répression indirecte sont décrits dans différentes études. Les résidus CpG méthylés sont spécifiquement reconnus par des protéines qui recrutent des complexes de remodelage chromatinien. Ces complexes entraînent des modifications des histones au niveau des régions promotrices des gènes et par suite des changements de la structure de la chromatine (Miranda et coll 2007)

Trois types de domaines et de familles de MBP ont été identifiés à présent : la famille des protéines MBD, Kaiso et UHRF (Rottach et coll 2009).

Le mécanisme par lequel ces protéines inhibent l'expression des gènes n'est encore pas complètement connu, mais des études montrent que ces protéines induisent la répression soit en étant elles mêmes les répresseurs de la transcription, c'est parfois le cas de MeCP2 (Singal et coll 1999), soit en liant des facteurs de répression ou des histones déacétylases et des méthyltransférases, concourant à former une structure chromatinienne inactive et inaccessible à la machinerie transcriptionnelle (Nan et coll 1998, Sarraf et coll 2004, Harikrishnan et coll 2005).

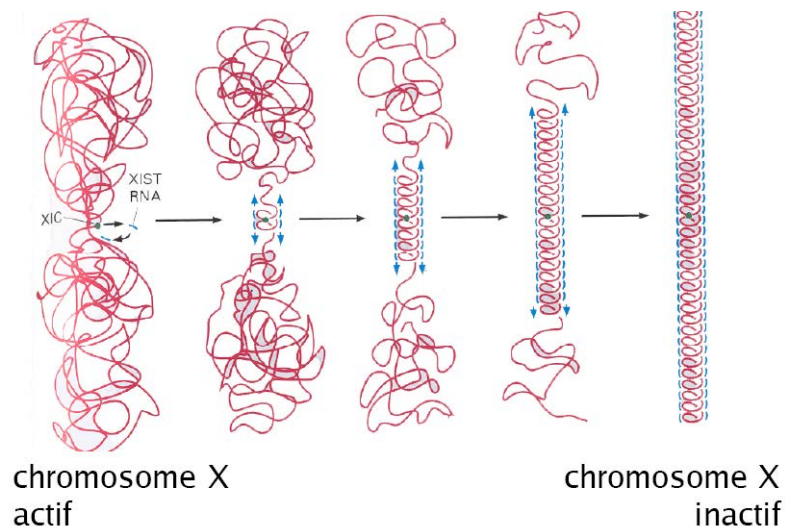
## 2. Méthylation de l'ADN et l'inactivation du chromosome X :

Le système génétique de la détermination du sexe chez les organismes possédant un sexe hétérogamétique XY implique la mise en place d'un mécanisme de compensation permettant de réguler l'expression des gènes codés par le chromosome X dans les cellules femelles XX, qui en possèdent deux copies alors que les cellules mâles XY n'en possèdent qu'une.

L'inactivation du chromosome X est la forme de compensation de dosage utilisée chez les mammifères. Ce processus aboutit dans la cellule femelle XX à l'extinction transcriptionnelle de la quasi-totalité des gènes d'un seul de ses deux chromosomes X (Bayer et coll 2008).

La régulation de ce phénomène se fait par l'intermédiaire du centre XIC (X inactivation center) qui contient le gène *Xist* fournissant un ARN *Xist* non codant. Cet ARN *Xist* possède deux fonctions distinctes : la reconnaissance du chromosome à inactiver et l'inactivation de ce chromosome. En effet, l'ARN *Xist* possède deux types de séquences : des séquences répétées en 5' et des séquences redondantes, dispersées, se complétant à différentes régions fonctionnelles de gènes du chromosome X à inactiver réalisant ainsi un balisage identifiant ce chromosome (Plath et coll 2002).

L'X inactivé (Xi) adopte les caractéristiques de l'hétérochromatine conditionnelle et se réplique plus tardivement que son homologue X actif (Xa) au cours de la phase S du cycle cellulaire.



**Fig 26: Inactivation du chromosome X.**

Après interaction avec l'ARN *Xist*, l'histone H3 est méthylée sur les lysines 9 et 27. Cependant la lysine 4 reste hypométhylée. Il semble que la présence de l'ARN *Xist*

permette de recruter un complexe protéique PRC (*polycomb repressive complex*) et une HMTase spécifique de XIC. La méthylation de la lysine 9 de H3 intervient dans l'initiation et le maintien de l'état réprimé. L'inactivation du chromosome X comprend donc deux phases principales : une phase réversible dirigée par l'ARN Xist et la méthylation de H3 et une phase irréversible caractérisée par la modification des histones (méthylation et désacétylation) et un maintien de l'ADN sous forme inactive grâce à la méthylation de l'ADN (Okamoto et coll 2004). Les îlots CpG sont hyperméthylés sur le chromosome X inactif avec la totalité des 28 îlots méthylés chez l'homme (Norris et coll 1991) Par contre sur l'allèle actif ces îlots sont hypométhylés. La méthylation de l'ADN est donc la phase définitive correspondant au maintien de l'état inactif au cours de la vie de l'individu (Sado et coll 2000, Wang et coll 2001). Sur l'allèle actif, le promoteur de Xist est méthylé et par suite Xist n'est pas exprimé (Csankovzki et coll 2001).

La première inactivation concerne le chromosome X d'origine paternelle du stade quatre cellules jusqu'au stade blastocyste. Á ce stade, les cellules du trophoctoderme, futur tissu extra embryonnaire, conservent l'inactivation de l'X paternel. Par contre, les cellules de la masse interne du blastocyste (ICM) (futur embryon) subissent la réactivation de l'X paternel avec perte de l'enrobage par l'ARN Xist, ainsi que la perte des modifications chromatiniennes (Heard 2004, Huynh et coll 2005). Par la suite, le choix du chromosome à inactiver, soit maternel soit paternel, se fait alors de façon aléatoire au moment de l'implantation du blastocyste dans l'utérus. Cette inactivation persiste pendant toute la vie de l'individu transmis de façon stable et irréversible au cours des divisions cellulaires et conduit à un mosaïcisme de clones cellulaires (Lyon FM 1961).

### **3. Méthylation de l'ADN et différenciation cellulaire :**

Si toutes les cellules somatiques diploïdes possèdent les mêmes 46 chromosomes et la même information génétique, une énorme différenciation cellulaire est cependant caractéristique de chaque organe. Cette différenciation cellulaire corrélée à une spécialisation tissulaire implique une régulation importante et complexe de l'expression des gènes. En effet, elle permet à partir de l'union de deux cellules hautement différenciées (l'ovocyte et le spermatozoïde) de donner un zygote, cellule unique qui peut potentiellement former un organisme entier. L'évolution du zygote de l'état de totipotence, vers la pluripotence et finalement le stade différencié s'accompagne d'une restriction du potentiel cellulaire et une acquisition d'un profil d'expression de gènes bien précis. De nombreuses

études montrent la participation de la méthylation de l'ADN au contrôle de l'expression des gènes des différents tissus spécifiques (Hu et coll 2010, Liu et coll 2010).

Au cours du développement les cellules différenciées accumulent les modifications épigénétiques comme l'acquisition de la méthylation de l'ADN; ces marquages épigénétiques sont différents de ceux présents dans les cellules pluripotentes et sont différents entre les cellules des différents tissus et organes (Reik 2007, Gibney et coll 2010, Laurent et coll 2010)

Les profils de méthylation des îlots CpG sont acquis durant la différenciation cellulaire ainsi les cellules embryonnaires totipotentes des blastocystes sont les types cellulaires dont les îlots CpG sont les moins méthylés, alors que ceux des cellules somatiques présentent des niveaux élevés de méthylation corrélés avec le profil d'expression génique spécifique acquis lors de leurs différenciation (Jaenish R 1999, Sorensen et coll 2010).

Une fois les cellules différenciées, l'état de méthylation des îlots CpG est transmis lors de la division cellulaire, ce qui permet de transmettre de façon héritable de cellule mère à cellule fille certaines régions du génome dans un état hyperméthylé (Bird A 2002). Différents processus précédemment décrits tels que le recrutement de methyl DNA binding proteins MBD et d'histone déacetylases favorisent la compaction de la chromatine des gènes hyperméthylés, réprimant ainsi leur transcription (Bird AP e coll 1999).

Les gènes transcriptionnellement actifs, restent ou redeviennent comparativement hypométhylés. Ainsi les modifications du degré de méthylation des cytosines dans les îlots CpG et la modulation du degré de compaction de la chromatine qu'elles entraînent, représentent une régulation épigénétique cruciale pour déterminer et fixer les destinées cellulaires durant le développement (Wolffe et coll 1999).

Il a été démontré grâce au traitement des souris adultes par l'inhibiteur de la méthylation la 5-azacytidine, qu'elle joue également un rôle dans la différenciation des cellules germinales mâles puisque ces souris présentaient des altérations de la spermatogenèse (Kelly et coll 2003).

Les mutants nuls pour les gènes Dnmt3a et dnmt3L présentaient une différenciation des cellules germinales très altérée (Hata et coll 2005)

Les cellules souche embryonnaires ESC doublement mutées Dnmt3a<sup>-/-</sup> et Dnmt3b<sup>-/-</sup> et mis en culture sont caractérisées par un taux bas de méthylation des dinucléotides CpG associé à un taux élevé d'histones acétylées, et se trouvent bloquées dans leur différenciation (Jakson et coll 2004)

Une différenciation des cellules souches embryonnaires en épiblaste et hypoblaste s'accompagne d'une expression différentielle due à la méthylation au niveau du promoteur du gène Oct-4 qui est considéré comme un marqueur des cellules pluripotentes (Athanasiadou et coll 2010).

Laurent et coll ont comparé le profil de méthylation dans des cellules en culture à des stades successifs de leur différenciation, des cellules souches embryonnaires ESC (Embryonic stem cells), des fibroblastes dérivant des ESC et des fibroblastes néonataux et mis en évidence dans les trois stades, une corrélation entre l'hypométhylation des promoteurs des gènes et le profil de transcription correspondant. Le taux de méthylation global de l'ADN était élevé au niveau des ESC, intermédiaire dans les fibroblastes en différenciation et faible dans les monocytes cellulaires sanguines déjà différenciés ce qui suggère que la méthylation joue un rôle crucial dans la mise en place d'un profil de méthylation spécifique en fonction du stade de différenciation (Laurent et coll 2010)

#### **4. Méthylation de l'ADN et protection du génome :**

Les génomes contiennent généralement une grande variété d'éléments transposables appelés également transposons. Il est possible de distinguer au moins trois grandes classes en fonction des particularités et de l'organisation de leurs séquences : soit de courtes répétitions inversées à chaque extrémité, soit des répétitions terminales directes LTR aux deux extrémités ou une séquence polyA à l'extrémité 3' d'un transcrit (Karp G et coll 2004).

Ces séquences peuvent présenter un danger pour l'intégrité du génome. En effet, elles peuvent s'insérer dans un gène et empêcher sa transcription. En plus, ces séquences répétées peuvent former des appariements en épingle à cheveux dus à une reconnaissance réciproque à l'intérieur d'une même séquence.

Certains vont de place en place dans le chromosome, directement sous forme d'ADN, tandis que beaucoup d'autres se déplacent par un intermédiaire ARN. Dans les deux cas ils peuvent se multiplier et se propager d'un site du génome à une multitude d'autres sites, se comportant parfois comme des parasites néfastes (Karp G et coll 2004, Jelsh et coll 2002).

Compte tenu de leur mécanisme d'insertion, tous les éléments transposables connus induisent une courte duplication du site cible. Lorsque ces éléments s'en vont, ils laissent généralement derrière eux une partie de cette duplication mais souvent aussi d'autres modifications locales de séquences.

Devant ces risques, une régulation importante est nécessaire. La méthylation joue donc un rôle de défense contre les effets délétères de ces molécules en rendant leur expression silencieuse (Kochanek et coll 1995). Elle prévient également les réarrangements de l'ADN liés à ces transposons tels que les translocations et les recombinaisons chromosomiques (Robertson et Wolffe 2000, Bourc'his et coll 2004).

## **5. Méthylation de l'ADN et empreinte parentale :**

### *a. Historique – définition :*

Les expériences de transferts de pronoyaux dans des zygotes de souris réalisées par McGrath ont montré pour la première fois en 1984 que, bien que la contribution génétique des deux génomes parentaux est équivalente, leur contribution épigénétique ne l'est pas. En effet, des zygotes présentant deux génomes haploïdes ovocytaires (gynogénotes) ou deux génomes haploïdes spermatiques (androgénotes) ne pouvaient pas se développer à terme malgré leur composition diploïde (McGrath et coll 1984, Surani 1984).

Les gynogénotes présentaient un développement à peu près normal de l'embryon et un développement anormal des annexes embryonnaires, la situation inverse était observée chez les androgénotes. Contrairement à ce que laisserait supposer la génétique classique, les génomes mâle et femelle, malgré leur constitution génique identique, ne fonctionnent pas de façon équivalente et semblent jouer un rôle symétrique et complémentaire.

Ces observations ont permis donc de révéler l'existence d'un phénomène de marquage des génomes parentaux, appelé empreinte génomique parentale (Gabory et coll 2005). L'empreinte parentale est donc un mécanisme épigénétique qui contrôle l'expression de certains gènes en particulier chez les mammifères et conduit à leur expression monoallélique selon leur origine parentale.

En 1985, Cattanach et Kirk mettent en évidence ce phénomène d'empreinte en démontrant que des souris disomiques pour le chromosome 11, c'est-à-dire qui ont hérité deux copies du chromosome 11 d'un seul parent (disomie uniparentale), présentent des phénotypes différents selon que la disomie est paternelle ou maternelle (Cattanach et coll 1985). En 1991 le premier gène soumis à empreinte est identifié, il s'agit de *Igf2* pour « *insuline growth factor 2* », ce gène est exprimé exclusivement à partir de l'allèle hérité du père et code pour une protéine intervenant dans le développement embryonnaire (DeChiara et coll 1991) Actuellement une centaine de gènes soumis à empreinte ont été identifiés chez l'homme (Miyoshi et coll 2006) et la souris.



***b. Caractéristiques de l'empreinte :***

Parmi, les gènes soumis à empreinte identifiés, seuls quelques-uns ont été étudiés de manière extensive, mais les résultats obtenus donnent une idée générale des principales caractéristiques retrouvées dans les régions soumises à l'empreinte et des mécanismes permettant d'assurer l'expression différentielle entre les deux allèles parentaux (Tycko et coll 2002)

Ces gènes sont regroupés en grandes régions chromosomiques (*clusters*) plutôt que dispersés dans le génome. Ces domaines, peuvent couvrir jusqu'à 4 Mb et comportent des gènes exprimés aussi bien à partir de l'allèle paternel qu'à partir de l'allèle maternel. Leur organisation suggère l'existence d'éléments capables de contrôler à distance des gènes multiples. En effet, presque tous les gènes soumis à empreinte sont associés à une ou plusieurs régions différemment méthylées appelés DMR (pour differentially methylated regions), dont le niveau de méthylation sur l'allèle maternel et paternel est différent. Ces sites de méthylation différentielle jouent un rôle primordial dans la régulation de l'expression des gènes soumis à empreinte (Murrell et coll 2004). Ils peuvent être localisés dans le gène ou à distance de lui, et sont caractérisés par un asynchronisme de réplication c'est à dire une cinétique différente de réplication des deux allèles parentaux. Cette asynchronie est indépendante de la méthylation de l'ADN et dans la très grande majorité des cas étudiés, l'allèle paternel se réplique avant l'allèle maternel (Gribnau et coll 2003, Razin et coll 1994, Surani et coll 1998). Au niveau du domaine Igf2/H19, la protéine CTCF (CCCTC-binding Factor) régule l'asynchronie de réplication entre les allèles maternels et paternels (Bergstrom et coll 2007).

Certaines DMR cibles de la méthylation différentielle, ont été définies comme centre d'empreinte ICR (imprinting control regions). Ces séquences sont considérées comme des DMR primaires, dont la méthylation a lieu dans les gamètes, par opposition aux DMR secondaires, dont la méthylation différentielle est plus aléatoire et peut avoir lieu après la fécondation (Lopes et coll 2003, Kobayashi et coll 2006). Ces ICR sont des éléments régulateurs capables de contrôler en cis l'expression monoallélique de l'ensemble des gènes d'un domaine (Lopes et coll 2003)

***c. Bases moléculaires de l'empreinte parentale :***

La méthylation différentielle des dinucléotides CpG entre les deux allèles parentaux représente une des modifications épigénétiques majeure à l'origine de l'expression monoallélique paternelle ou maternelle des gènes soumis à empreinte. Elle joue un rôle

central dans le phénomène d'empreinte *via* son action sur la conformation de la molécule d'ADN. Contrôlée par les DNA méthyltransférases la méthylation des cytosines va entraîner une modification de l'architecture de la fibre de chromatine qui aboutit à une compaction des nucléosomes, empêchant l'accès des facteurs transcriptionnels ou des protéines de liaison en général. En effet, les souris déficientes en Dnmt1 montrent une dérégulation de l'expression des gènes soumis à empreinte (Li et coll 1992, Li et coll 1993)

Cependant, la méthylation n'est pas le seul mécanisme mis en jeu, elle est associée à diverses modifications des histones qui composent les nucléosomes (Grandjean et coll. 2001; Wagschal et coll 2008). En effet, l'étude de Dindot et coll de 11 gènes soumis à empreinte par puces à haute densité, révèle l'implication de la méthylation de l'ADN et de la méthylation des histones H3K4 et H3K9 dans le processus de différenciation des deux allèles parentaux (Dindot et coll. 2009).

Des études révèlent la présence de plusieurs micro ARN au niveau des domaines d'empreinte et suggèrent une implication possible d'ARN non-codant et des micro ARN dans l'expression allèle-spécifique des gènes soumis à empreinte (O'Neill 2005)

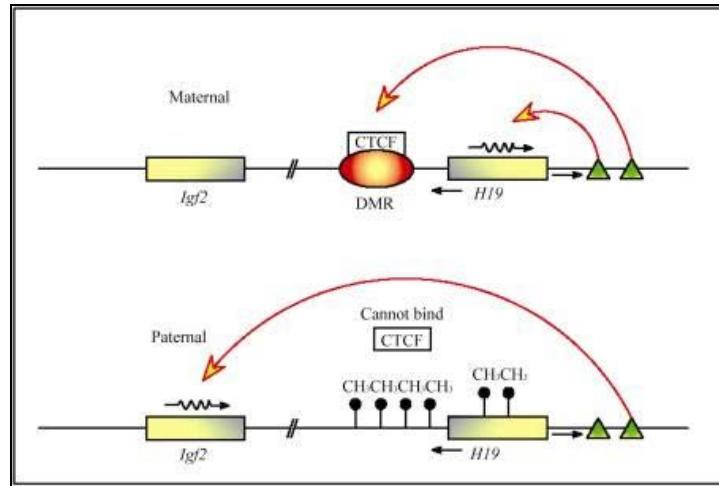
***d. Régulation des gènes soumis a empreinte parentale, exemple du locus 11p15.5 :***

Jusqu'à présent deux mécanismes de régulation ont été décrits : la régulation par les isolateurs (chromatin insulators) et la régulation par les ARN non-codants (Lewis et coll 2006, Wan et coll 2008)

**Régulation par les isolateurs :**

Ce sont des séquences d'ADN qui en se liant à des protéines deviennent capables d'isoler les promoteurs des éléments activateurs (enhancers) ou inhibiteurs (silencers) (Filippova 2008).

Comme exemple on peut citer la régulation du locus Igf2/H19 par l'intermédiaire de la protéine CTCF (CCCTC-Binding factor). En effet, au niveau de l'allèle maternel du locus Igf2/H19 les isolateurs ne sont pas méthylés, CTCF se lie à l'ADN et permet l'expression du gène Igf2 et la répression du gène H19. Par contre sur l'allèle paternel la méthylation de ces séquences inhibe la liaison de CTCF et entraîne l'expression du gène Igf2 et la répression du gène H19.



**Fig 27: Régulation de l'expression des gènes *Igf2/H19* soumis à empreinte par un isolateur (CTCF)**

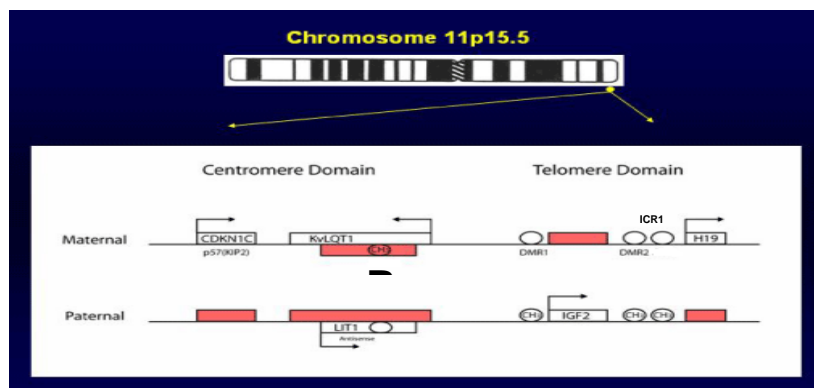
**Régulation par les ARN non codants**

Ces ARN agissent en *cis* au niveau des gènes soumis à empreinte et entraînent une répression transcriptionnelle de ces gènes comme l'exemple de l'ARN antisens Lit1 (Long intronic transcript 1) complémentaire du gène *KvLQT1* ou l'ARN *Xist* dans l'inactivation de l'un des deux chromosomes X chez le sexe féminin (Heard 2004; Regha et coll. 2006)

Le locus 11p15.5 chez l'homme constitue un exemple intéressant et largement étudié des centres de contrôle différemment méthylés et régulant l'expression de plusieurs gènes soumis à empreinte.

**Le locus 11p15.5 chez l'Homme :**

Le locus 11p15.5 chez l'homme est contrôlé par deux centres d'empreinte : le premier nommé H19 DMR ou ICR1 et le second *KvDMR1* ou ICR2.



**Fig 28 : Locus 11p15.5 chez l'homme qui contient deux centres d'empreinte, ICR1 et ICR2.**

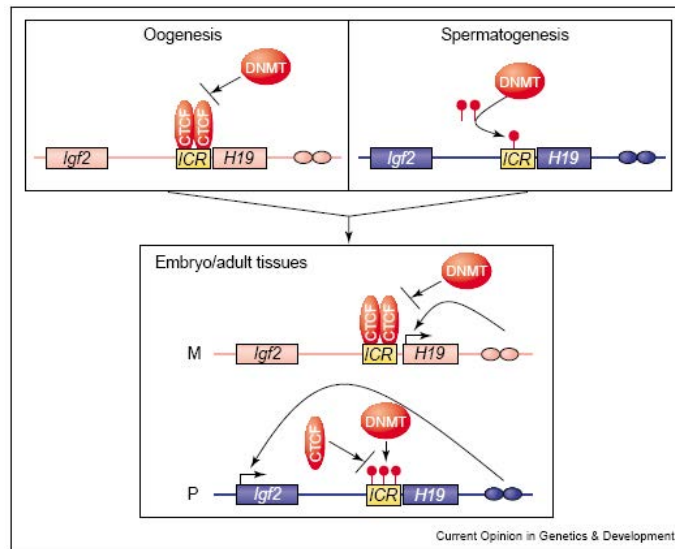
❖ **ICR1 ou H19 DMR** : c'est le domaine le plus étudié parmi les ICR des gènes soumis à empreinte, il contrôle l'expression de deux gènes H19 et Igf2. Le gène H19 est exprimé à partir de l'allèle maternel et Igf2 à partir de l'allèle paternel (Bartolomei et coll 1991, Zhang et Tycko 1992). H19 code pour un ARN non transcrit (Brannan et coll. 1990) qui joue un rôle de répresseur de tumeur (Juan et coll 2000, Yoshimizu et coll 2008), alors que Igf2 code pour un facteur de croissance.

ICR1 contient des sites de fixation pour la protéine CTCF (CCCTC-Binding factor) qui contrôle *en cis* l'expression de H19 et Igf2 (Hark et coll 2000, Kandouri et coll 2000). Elle joue le rôle d'une protéine insulatrice capable de constituer des barrières au sein d'une unité transcriptionnelle. Sur l'allèle maternel ICR1 est non méthylé, ce qui permet à CTCF de se lier à ses sites de reconnaissance et d'isoler ainsi le promoteur d'Igf2 de l'amplificateur, en conséquence Igf2 est réprimé et H19 est exprimé. Par contre sur l'allèle paternel ICR1 est méthylé empêchant ainsi CTCF, de se lier à l'ADN, ce qui permet à l'amplificateur d'accéder au promoteur d'Igf2 qui sera exprimé alors que H19 sera réprimé.

Des dérégulations de l'empreinte au niveau d'ICR1 sont associées au syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) et de nombreuses tumeurs (Sparago et coll 2004, Prawitt et coll 2005).

Le gène H19 est contrôlé aussi par son promoteur qui subit une méthylation *de novo* après la fécondation. Ce promoteur est méthylé sur l'allèle paternel et non méthylé sur l'allèle maternel (Bartolomei et coll 1993, Tremblay et coll 1995)

Deux autres domaines différemment méthylés, DMR1 et DMR2, semblent impliqués aussi dans ce mécanisme en tant que DMR secondaires. Selon Murrell et ses collaborateurs ces DMR permettent un changement de la structure de la chromatine entre les deux allèles et par suite Igf2 serait dans un domaine actif sur l'allèle paternel et un domaine silencieux sur l'allèle maternel (Murrell et coll. 2004). Yoon et coll décrivent la formation d'une boucle grâce à l'interaction entre l'ICR1 et le promoteur inactif d'Igf2 (Yoon et coll. 2007).

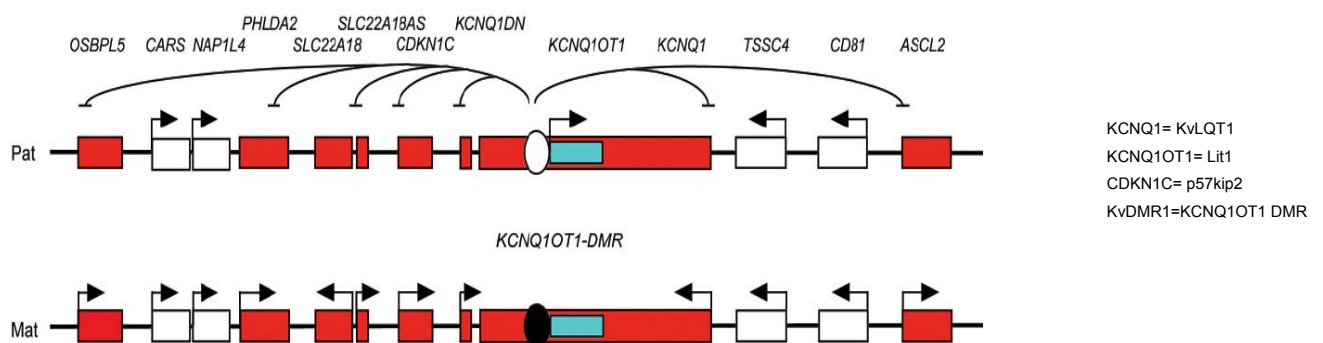


**Fig 29 : Mise en place de l’empreinte parentale au cours de la gamétogenèse et dans l’embryon au niveau du centre de contrôle ICR1 ou H19 DMR.**

❖ **ICR2 ou KvDMR1** : ce centre régule l’empreinte de nombreux gènes comprenant : KCNQ1 (KvLQT1), KCNQ1OT1 (LIT1 ou KvLQT1AS), TSSC4, ASCL2, Cd81 (centromériques), CDKN1C ou p57<sup>kip2</sup>, PHLDA2, Osbp15 et SLC22A1L (télomériques) (Kanduri et coll 2006).

Cette DMR se situe au niveau d’un îlot CpG dans l’intron 10 du gène KvLQT1 (KCNQ1) entourant le promoteur du gène KCNQ1OT1 ou LIT1 (Long QT Intronic transcript) ; ce dernier gène, code pour un long ARN de plus de 80 Kb, non transcrit et antisens du gène KvLQT1.

ICR2, méthylé sur l’allèle maternel, empêche ainsi l’expression de KCNQ1OT1 et par conséquence il n’y a pas de synthèse d’ARN antisens du gène KvLQT1 qui s’exprime dans ce cas.



**Fig 30: ICR 2 ou KvDMR1 =KCNQ1O1 DMR et l’ensemble des gènes qu’il régule.**

La délétion du promoteur du gène KCNQ1OT1 chez l'homme ou la souris dérégule l'empreinte de huit gènes situés au niveau du même locus et normalement exprimés par l'allèle maternel et entraîne leur expression biallélique (Horike et coll 2000, Fitzpatrick et coll 2002).

Dans plus de 50% des cas d'enfants atteints du syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) on trouve une déméthylation de l'ICR2 sur l'allèle maternel et en conséquence une surexpression de KCNQ1OT1 (DeBaun et coll 2002)

Le mécanisme exact par lequel la transcription de KCNQ1OT1 inhibe l'expression des gènes est encore mal connu ; il implique le recrutement de protéines et des modifications post-traductionnelles des histones réprimant la chromatine de l'allèle paternel (Thakur et coll 2004, Umlauf et coll 2004, Lewis et coll 2006). La longueur de l'ARN antisens semble influencer le degré de répression des gènes (Kanduri et coll 2006, Mohammed et coll 2008). Des études récentes suggèrent un second mécanisme impliquant la protéine CTCF dans la régulation des gènes sous le contrôle d'ICR2 ou KvDMR1 (Lewis et coll 2006, Shin et coll 2008). En effet, deux sites de liaison au CTCF ont été mis en évidence au niveau de KvDMR1 chez la souris (Fitzpatrick et coll 2007)

***e. Reprogrammation de l'empreinte :***

A chaque génération, les modifications épigénétiques sont réversibles y compris l'empreinte parentale. Cette réversibilité est indispensable pour assurer une transmission correcte de l'information selon l'origine parentale de chaque allèle.

En effet, il existe un cycle de l'empreinte au cours des générations successives, caractérisé par des étapes d'effacement et de réécriture lors de la gamétogenèse pour adapter l'empreinte au niveau des gamètes au sexe du nouvel individu. Inversement, pour l'ensemble des cellules somatiques de l'individu, l'empreinte héritée des parents doit être maintenue au cours des générations cellulaires.

➤ **Empreinte parentale au début du développement :**

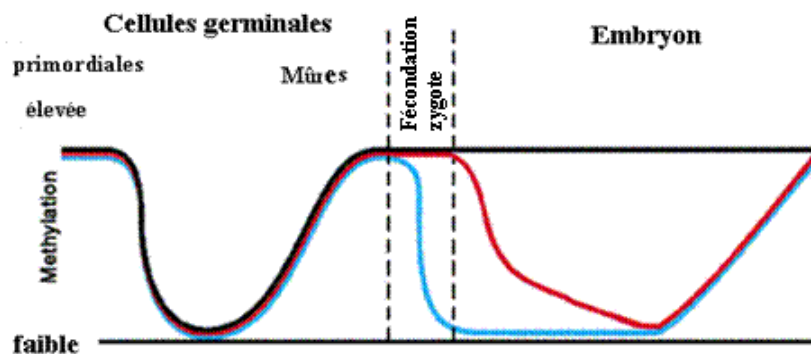
Après la fécondation, survient une vague de déméthylation globale qui est maximum à la fin de la première semaine de développement suivie d'une réméthylation après l'implantation (Paragraphe D chapitre IV). Ces deux phénomènes de déméthylation/réméthylation épargnent les DMRs des gènes soumis à l'empreinte. Par conséquent leur méthylation différentielle sera maintenue ce qui joue un rôle crucial dans le bon développement embryonnaire (Abu-Amero et coll 2006). Ces empreintes de méthylation primaires seront

ensuite lues dans les cellules somatiques de l'embryon et les tissus extra-embryonnaires, aboutissant à l'expression d'un des deux allèles suivant son origine parentale. A cette lecture s'ajoute celle de l'empreinte des DMRs secondaires établie après la fécondation.

Geuns et coll ont montré que la méthylation de l'allèle maternel du gène SNRPN, menant à une expression monoallélique, est conservée au cours du développement embryonnaire chez l'homme (Geuns et coll 2003).

Plusieurs facteurs interviennent dans le maintien de la méthylation différentielle des gènes soumis à empreinte après la fécondation, on peut citer, la Dnmts1 qui joue un rôle important (Hirasawa et coll 2008) ainsi que les modifications des histones. D'autre part, la protéine PGC7/Stella, facteur maternel essentiel pour le développement embryonnaire précoce, joue aussi un rôle important dans le maintien de la méthylation, puisque il a été démontré chez les embryons portant une délétion du gène PGC7/Stella une perte de la méthylation d'au moins cinq DMR, dont celle de la DMR primaire du locus H19/Igf2 (Nakamura et coll 2007).

Pour le cas particulier du gène H19, MBD3 semble jouer un rôle essentiel. En effet, une diminution du taux de la protéine MBD3 dans des blastocystes entraîne une activation de l'expression paternelle de H19 ainsi qu'une perte de la méthylation du locus H19 (Reese et coll 2007).



**Fig 30: Niveau de méthylation des gènes soumis et non soumis à empreinte au cours du développement et de la gamétogenèse.**

■ Le taux méthylation des gènes soumis à empreinte qui ne subissent pas la déméthylation au début du développement

■ Le taux de méthylation des séquences non soumises à empreinte dans le génome paternel

■ Le taux de méthylation des séquences non soumises à empreinte dans le génome maternel

➤ **Effacement de l'empreinte :**

Au cours du développement embryonnaire pré et postimplantatoire, les PGC subissent un remaniement épigénétique très important dès leur arrivée au niveau des crêtes génitales. Il y a tout d'abord une déméthylation active d'un grand nombre de séquences ADN y compris les gènes soumis à empreinte parentale (Li E 2002, Kelly et coll 2004). Certaines études montrent un début de déméthylation de quelques gènes soumis à empreinte pendant la migration des PGC (Sato et coll 2003). Chez la femme, dans l'ovocyte au stade VG le marquage du gène H19 est totalement effacé (Borghol et coll 2006, Sato et coll 2007).

Actuellement, les mécanismes qui contrôlent cet effacement sont partiellement identifiés grâce aux études de Popp et coll 2010 et Okada et coll 2010 déjà cités.

Par la suite, quand la gamétogenèse démarre, l'empreinte correspondant au sexe de l'individu est mise en place de façon que les DMRs au niveau des gamètes soient méthylés ou non en fonction des loci (Surani et coll 1998, Tycko et coll 2002). Pour les DMRs étudiées, il a été observé que l'acquisition de la méthylation se faisait avant l'entrée en méiose des spermatogonies, une fois que celles-ci étaient engagées dans le processus de la spermatogenèse. Il semble que la chronologie soit la même lors de l'ovogenèse, mais il est possible que le phénomène d'écriture se poursuive après l'entrée en méiose.

➤ **Mise en place de l'empreinte maternelle :**

Elle débute avec la croissance ovocytaire et intéresse les gènes avec une chronologie différente. Chaque gène reçoit sa « marque d'empreinte » à un moment spécifique au cours de la méiose de l'ovocyte (Hajkova et coll 2002). Chez la souris Obata et Kono ont montré que l'établissement de l'empreinte s'effectue entre le passage du stade follicule primordial au stade follicule primaire pour les gènes *Snrpn*, *Znf127* et *Ndn*, au stade follicule secondaire pour *Peg3*, *Igf2r* et *P57<sup>kip2</sup>*, au stade follicule tertiaire et préantral pour le gène *Peg1* et au stade antral pour *Impact* (Obata et coll 2002).

Imamura démontre lui que la méthylation définitive du gène *Peg1/Mest* chez la souris n'est acquise qu'après l'ovulation et avant la fécondation (Imamura et coll 2005). Hiura et coll ont montré que l'établissement de l'empreinte maternelle se fait en fonction de la taille et de la croissance des ovocytes, en étudiant le profil de méthylation de 9 DMR de gènes soumis à empreinte : *Igf2r*, *Lit1*, *Zac1*, *Snrpn*, *Peg1/Mest*, *Impact*, *Meg1/Grb10* et *H19* (Hiura et coll 2006).



Les études sur la reprogrammation de l'empreinte maternelle au cours de l'ovogenèse chez l'espèce humaine sont limitées à cause de raisons éthiques ainsi que des contraintes techniques et matérielles du fait du faible nombre d'ovocytes disponibles.

L'étude d'Arima et coll 2006 sur le gène soumis à empreinte maternelle PLAGL1 montre que la mise en place de la méthylation de la DMR HYMAI/ PLAGL1 est complète au stade préantral dans l'espèce humaine (Arima et Wake 2006).

Pour le premier gène soumis à empreinte étudié en 2001 dans l'espèce humaine SNRPN, les données sont contradictoires. Selon El-Maarri et coll en 2001, l'établissement de l'empreinte du gène SNRPN dans l'ovocyte humain n'est complet qu'après la fécondation (El-Maarri et coll 2001). Alors que l'étude de Geuns et coll en 2003 montre que la méthylation du gène SNRPN est complètement établie au stade VG et maintenue au stade MI et MII (Geuns et coll 2003). Cette même équipe montre que la méthylation d'une région du gène KCNQ1OT1 ou LIT1 est déjà acquise au stade vésicule germinative dans les ovocytes humains (Geuns et coll 2007). Ces résultats sont apparemment contradictoires avec ceux publiés par Khoueiry et coll (2008) qui démontrent que la mise en place de la méthylation au niveau de KvDMR1 dans les ovocytes humains, s'étale tout au long de l'étape de maturation (VG, MI et MII) jusqu'au stade Métaphase II (Khoueiry R, Ibal-Romdhane S et coll. 2008). Cette apparente contradiction pourrait résulter du petit nombre d'allèles séquencés et étudiés par Geuns et coll.. Elle peut également être l'expression de la différence de position des régions étudiées sur KvDMR1 par les deux équipes ; ce point sera discuté dans la discussion de l'article 1.

L'étude de Sato et coll de trois gènes soumis à empreinte maternelle (KCNQ1OT1, ZAC et PEG1) dans des ovocytes humains, issus de femme adultes, au stade follicule primordial, primaire et antral montre qu'au stade antral l'empreinte est déjà acquise pour les trois gènes (Sato et coll 2007).

➤ **Mise en place de l'empreinte paternelle :**

L'étude de l'état de méthylation des DMRs aux divers stades cellulaires de la spermatogenèse a permis de suivre la chronologie de mise en place de l'empreinte paternelle. Pour les DMRs étudiées il semble que l'acquisition de la méthylation se fasse avant l'entrée en méiose et elle semble complète dans les spermatogonies, une fois que celles-ci sont engagées dans le processus de la spermatogenèse puisque certains auteurs ont montré que des spermatocytes primaires, secondaires et même des spermatides rondes sont capables de féconder (Kimura et coll 1995)

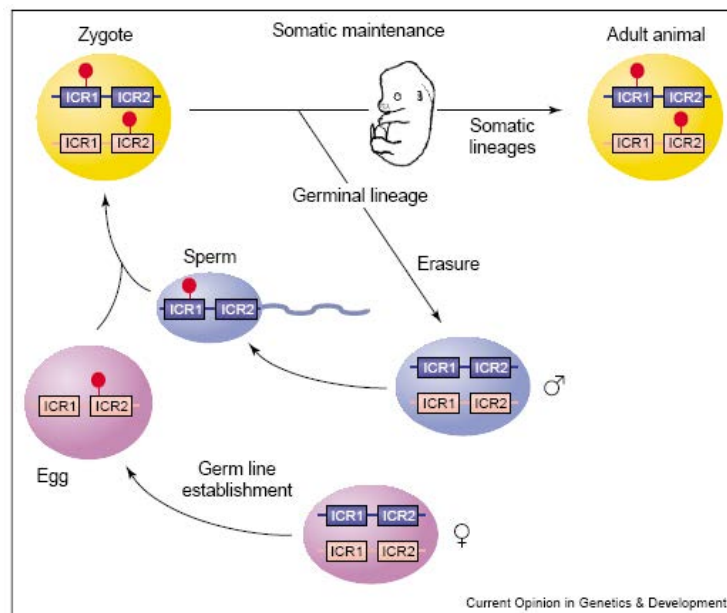
Yanagimachi et coll en 2005, constate que la capacité à féconder augmente en allant des spermatocytes primaires aux spermatozoïdes ce qui suggère que l’empreinte est un processus graduel et que ce processus n’est définitivement mis en place qu’à la fin de la méiose (Solter 2006) et persiste durant toute la vie reproductive du mâle (Davis et coll 2000, Li et coll 2004).

La méthylation du gène H19 soumis à empreinte paternelle, est initialement détectée au cours du développement embryonnaire dans les spermatogonies en mitose, quiescentes et après la naissance avant le début de la méiose (Davis et coll 2000, Ueda et coll 2000).

Elle est complète au stade pachytène de la méiose I (Lucifero et coll 2002). Kerjean et coll retrouvent le même résultat dans l’espèce humaine où la méthylation de H19 apparaît d’abord dans un lot de spermatogonies adultes ; cette empreinte sera ensuite conservée durant toutes les étapes de la spermatogenèse (Kerjean et coll 2000)

Une empreinte paternelle altérée du gène H19 a été montrée par Marques et coll en 2008 chez des hommes oligozoospermiques, résultats retrouvés par d’autres auteurs et suggérant qu’une dérégulation de la méthylation au niveau des gènes soumis à l’empreinte serait associée à l’oligozoospermie et à l’infertilité masculine (Marques et coll 2008).

La mise en place définitive de l’empreinte à partir des DMRs protégées des vagues successives de méthylation et de déméthylation du génome se fait sous le contrôle des centres d’empreinte qui semblent être indispensables à une diffusion correcte de l’empreinte dans toute la région pour assurer une co-régulation harmonieuse des gènes soumis à l’empreinte de la région (Surani et coll 1998).



**Fig 31: Cycle de l’empreinte génomique dans ICR1 et ICR2.**

# **CHAPITRE V**

---

## **DEREGULATIONS EPIGENETIQUES ET AMP**

Les nouvelles connaissances sur l'épigénome soulignent l'importance des perturbations épigénétiques dans l'étiologie de pathologies telles que les cancers (Jones et coll 2002, Herman et coll 2003), le syndrome métabolique (Gallou et coll 2005) la maladie d'Alzheimer (Basset et coll 2006), la schizophrénie (Petronis A 2004), l'asthme (Vercelli 2004) ou l'autisme (Lopez-Rangel et coll 2006). Les liens entre l'environnement et les modifications épigénétiques font l'objet d'intenses recherches. Celles-ci concernent en particulier l'identification des facteurs environnementaux affectant la méthylation de l'ADN ou la structure de la chromatine, l'identification de régions épigénétiquement labiles ainsi que la caractérisation des périodes de susceptibilité aux dérégulations des états épigénétiques pendant le développement embryonnaire ou foetal. L'élucidation des mécanismes épigénétiques devrait conduire à une meilleure compréhension de l'ontogenèse de certaines maladies humaines et offrir par-là de nouvelles perspectives prophylactiques et thérapeutiques.

## **A. METHYLATION DE L'ADN ET PATHOLOGIES HUMAINES :**

### **1. Méthylation de l'ADN et Cancer :**

Une implication de la méthylation de l'ADN dans le développement des cancers a été démontrée pour la première fois en 1983. En effet, la première modification épigénétique décrite était une hypométhylation globale caractéristique des cellules cancéreuses par comparaison aux mêmes types cellulaires normaux (Feinberg et coll 1983).

Il est maintenant établi que des perturbations des profils de méthylation de l'ADN jouent un rôle au moins aussi important que l'accumulation des mutations génétiques (Deltour et coll 2005). En général, deux événements majeurs et indépendants semblent étroitement liés et impliqués dans la tumorigenèse; l'hypométhylation globale et l'hyperméthylation régionale (Ehrlich M 2002, Robertson KD 2001)

#### ***a. Hypométhylation globale :***

L'hypométhylation du génome des cellules cancéreuses se caractérise par une baisse de 20 à 60 % de la teneur en 5-méthylcytosine par rapport à des cellules normales. Bien que les mécanismes responsables de cette hypométhylation ne soient pas clairement définis, les conséquences n'en sont pas moins bien établies. Elle entraîne une activation d'éléments transposables (LINE, SINE et rétrovirus, normalement méthylés et réprimés) responsable d'une instabilité génomique (Bestor et coll 1996, Yoder et coll 1997, Rauch et coll 2008). Elle caractérise les séquences satellites péri-centromériques, ce qui prédisposerait l'ADN à des

cassures et des remaniements chromosomiques. De tels événements sont fréquemment observés au cours de plusieurs cancers comme le cas de la tumeur de Wilms, qui présente des translocations chromosomiques non équilibrées au niveau de l'ADN péri-centromérique des chromosomes 1 et 16. De larges régions de plusieurs méga bases hypométhylées ont été identifiées dans les cellules du cancer du colon (Weber et coll 2005) et récemment observées dans les cellules du cancer du sein (Shann et coll 2008).

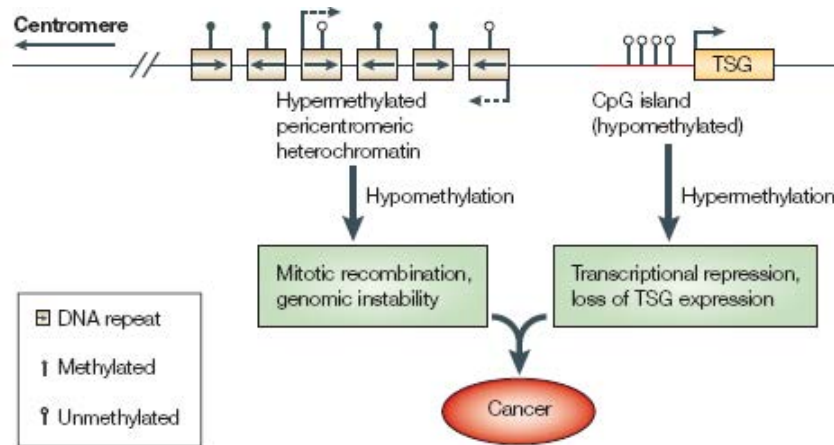
L'hypométhylation se fait également sur des régions importantes du génome au niveau des oncogènes dont l'activation va stimuler la division des cellules et induire la formation de métastases. Dans certaines tumeurs cette hypométhylation est corrélée à la sévérité et au potentiel métastatique du cancer (Widschwendter et coll 2004)

***b. Hyperméthylation et inactivation génique :***

Parallèlement à cette déméthylation globale, se produit une hyperméthylation régionale au niveau des îlots CpG responsable, dans certains cancers, de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués normalement dans des fonctions essentielles pour la cellule, comme le contrôle du cycle cellulaire, la réparation des dommages d'ADN et l'apoptose (Baylin 2005).

Nombreux sont les exemples de gènes dont la méthylation dans les cancers, au même titre que des mutations, est responsable de leur inactivation. L'hyperméthylation de la région promotrice des gènes *Rb*, *VHL*, *BRCA1*, *STK11* est responsable de l'inactivation de ces gènes dans les formes familiales de rétinoblastome (Stirzaker et coll 1997, Jones et coll 2002, Herman et coll 2003), de cancers rénaux (Herman et coll 1994), du sein (Esteller, Silva et coll 2000) ou du côlon (Esteller, Avizienyte et coll 2000). Par ailleurs, des études sur des cas sporadiques de carcinomes colorectaux présentant une grande instabilité microsatellitaire ont révélé une haute fréquence de méthylation du promoteur du gène de réparation de l'ADN *hMLH1* (Herman et coll 1998, Feinberg 2004).

De façon assez générale, l'hyperméthylation de gènes dans les tumeurs est un phénomène assez étendu. Bien sûr, la fréquence de ces événements épigénétiques varie selon les types de tumeurs. Ils ont une fréquence élevée dans certaines tumeurs telles que les tumeurs coliques ou les gliomes et les leucémies myéloïdes aiguës, moins élevée dans les cancers du sein ou des testicules. Par ailleurs, des anomalies de méthylation sont détectées à la fois dans les tumeurs de bas et de haut grade, indiquant qu'il s'agit là d'un événement précoce dans la cascade d'événements entraînant la dégénérescence tumorale.



**Fig 31 : Hypométhylation des séquences satellites péricentromériques**  
**Hyperméthylation et répression des gènes suppresseurs de tumeurs TSG**

Concernant les mécanismes moléculaires qui interviennent, une faible augmentation de l'activité des DNMT a été observée dans les cellules transformées, mais elle ne semble pouvoir expliquer, à elle seule, ni les méthylations aberrantes, ni surtout le ciblage de certains promoteurs. Cette spécificité pourrait être le fait de facteurs de transcription, qui recruteraient les DNMT au niveau du promoteur de leurs gènes cibles, comme dans le cas de la protéine de fusion PML-RAR $\alpha$  (promyelocytic leukemia-récepteur  $\alpha$  de l'acide rétinoïque) impliquée dans des leucémies promyélocyaires aiguës (Claus et coll 2003).

Selon Das et Singal cette méthylation de l'ADN est impliquée dans plus de 65% des cancers (Das et Singal 2004) mais les données les plus récentes laissent penser que ces anomalies épigénétiques se produisant dans les cellules cancéreuses ne sont pas restreintes à la seule méthylation de l'ADN et englobent également les histones et leurs modifications post-traductionnelles (Fraga et coll 2005)

## 2. La méthylation de l'ADN et les pathologies non cancéreuses :

### a. Syndrome ICF et DNMT3 :

Le syndrome ICF (*immunodeficiency centromeric heterochromatin instability and facial anomalies*) est une maladie extrêmement rare, autosomique récessive. Ce syndrome est caractérisé par des images caryotypiques exceptionnelles impliquant les chromosomes 1, 9 et 16 et une immunodéficience marquée par une réduction variable du taux sérique

d'immunoglobulines responsable de troubles respiratoires sévères. Les patients présentent par ailleurs des anomalies faciales et des retards mentaux. Les régions hétérochromatiques des chromosomes de patients atteints d'ICF sont le siège d'importants réarrangements liés à une hypométhylation et une instabilité des régions centromériques. En 1999, des études ont fait le lien entre le défaut de méthylation observé et des mutations du gène DNMT3b localisé sur le chromosome 20q11.2 (Hansen et coll 1999, Xhu et coll 1999).

***b. Syndrome de Rett et MeCP2 :***

Le syndrome de Rett est une maladie dominante liée au chromosome X et représente une des causes les plus communes de retard mental sporadique chez la femme (incidence 1 pour 10 000-15 000). Il est caractérisé par une période de développement normal suivie d'une dégénérescence neurologique progressive à partir de 6 à 18 mois. Il aura fallu beaucoup de temps pour découvrir la cause moléculaire du syndrome de Rett, jusqu'à la mise en évidence du gène MeCP2, sur le chromosome X (Xq28), dont les mutations sont indiscutablement responsables de cette encéphalopathie essentiellement féminine (Amir et coll 1999).

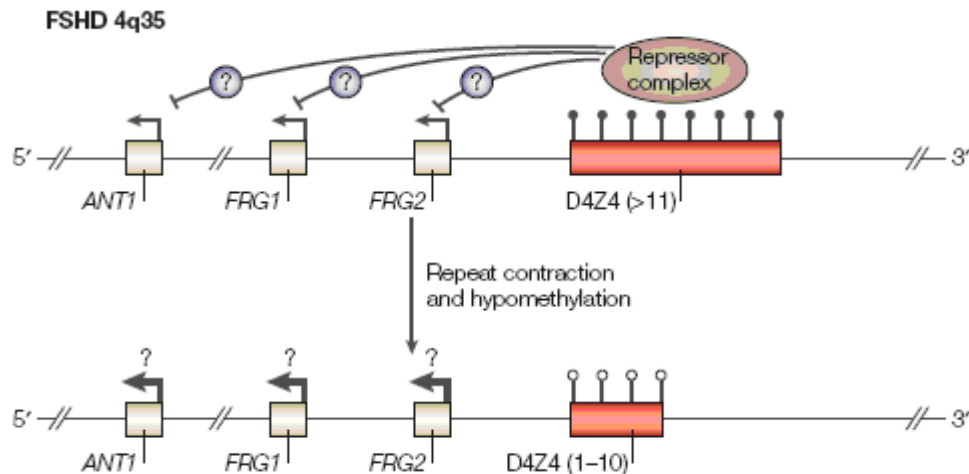
***c. Syndrome de l'X fragile et FMR1 :***

Le syndrome de l'X fragile est la forme la plus fréquente des retards mentaux héréditaires (incidence 1/5 000 hommes) ; il affecte principalement les hommes et le gène responsable a été localisé sur le chromosome Xq27.3. Le défaut moléculaire de ce syndrome est associé au gène FMR1 (*fragility mental retardation*) qui porte de nombreuses répétitions de séquences CGG sur sa région promotrice associées à une augmentation aberrante de la méthylation, responsables d'une inactivation de celui-ci (Oberle et coll 1991). Le traitement par la 5aza-cytidine réactive le gène FMR1 et déméthyle les îlots CpG de la région du promoteur. De même, les drogues responsables de l'hyperacétylation des histones potentialisent la réactivation du gène induite par 5aza-cytidine (Coffe et coll 2002)

***d. La dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale : (DFSH) :***

Maladie autosomique dominante. Elle se manifeste par une atteinte des muscles du visage, des épaules et des bras caractérisée par une destruction progressive des fibres musculaires qui entraîne une atrophie et une faiblesse musculaire s'aggravant progressivement, avec, cependant, une grande variabilité infra-familiale du degré des atteintes. Elle est due à une anomalie génétique située sur le chromosome 4 correspondant à une diminution du nombre de

répétitions d'une région appelée D4Z4; normalement de 11 à 100 répétitions présentes chez les individus sains, on passe à 1 à 10 répétitions chez les personnes atteintes. Cette délétion d'un certain nombre de répétitions réduit le nombre de complexes répresseurs et entraîne la surexpression inappropriée des gènes adjacents. Les patients atteints présentent tous une hypométhylation de la région D4Z4 suggérant qu'elle est un facteur causal important (Van Overveld et coll 2003)



**Fig 32 : Perte de la méthylation au niveau D4Z4 dans le syndrome de la dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale.**

## B. PATHOLOGIES DE L'EMPREINTE PARENTALE :

Une centaine de gènes soumis à empreinte parentale sont caractérisés par une expression monoallélique et contrôlés par une méthylation différentielle des dinucléotides CpG se trouvant dans leurs régions régulatrices. Le dérèglement de ce mécanisme d'expression monoallélique est corrélé à des perturbations dans l'expression des gènes concernés et peut conduire à certaines maladies humaines (Verona et coll 2003).

Ces maladies sont souvent associées à des pertes d'hétérozygotie résultant de duplications maternelle ou paternelle d'une région à empreinte parentale, entraînant soit l'extinction, soit la surexpression des gènes concernés. Au début on a supposé que ces gènes n'étaient impliqués que dans le développement embryonnaire parce que les perturbations de l'empreinte affectaient la croissance de l'embryon, comme c'est le cas par exemple des gènes situés dans le locus 15q11-q13 associé aux syndromes de Prader-Willi et d'Angelman, ou de la région 11p15 associée au syndrome de Beckwith-Wiedemann (Jiang et coll 2004).



Mais des études ont démontré par la suite que certains gènes à empreinte parentale sont impliqués dans différents cancers ; parmi ceux-ci, les gènes codant pour le facteur de croissance insulin-like growth factor IGF2 et son récepteur IGF2R (Feinberg et coll 2004)

### **1. Empreinte parentale et tumorigenèse :**

Plusieurs études chez la souris et chez l'Homme montrent que la perte de l'empreinte d'IGF2 constitue un véritable risque de développement de tumeur, notamment quand elle est associée à des événements d'ordre génétique (Sakatani et coll 2005, Cui et coll 2003). En effet, il est dérégulé dans de nombreuses tumeurs solides telles que le cancer du colon, du foie, du poumon et du sein (Feinberg et coll 2002). Cette dérégulation est caractérisée par une expression biallélique souvent associée à un gain de méthylation au niveau de l'ICR de ce domaine soumis à empreinte chez 70% des patients atteints de tumeur de Wilms (cancer rénal embryonnaire). (Robertson 2005)

Le gène CDKN1C (cyclin dependent kinase inhibitor gene) ou p57<sup>kip2</sup> soumis à empreinte et impliqué dans le cycle cellulaire est un gène suppresseur de tumeur. Il est souvent inactivé dans des tumeurs via l'acquisition d'une méthylation de l'ADN sur l'allèle normalement non méthylé (Higashimoto et coll 2006)

La perte de méthylation de KvDMR1, l'ICR régulant l'expression de CDKN1C, est aussi liée à d'autres tumeurs comme le cancer colorectal et le cancer de l'œsophage. Ces données impliquent que les gènes soumis à empreinte, de par leur fonction et leur mécanisme de régulation, ont de fortes chances d'être impliqués dans des cancers. Mais là encore, les mécanismes restent énigmatiques. Certaines études suggèrent que les modifications des histones pourraient participer à la mise en place de la méthylation de l'ADN au niveau des gènes suppresseurs de tumeur (Bachman et coll 2003). Cette piste d'exploration pourrait aussi s'avérer prometteuse au niveau des gènes soumis à l'empreinte.

### **2. Empreinte parentale et syndromes liés à la croissance fœtale:**

Plusieurs syndromes liés à des anomalies de la croissance fœtale peuvent être causés par des perturbations de la méthylation de l'ADN au niveau des ICR, celles-ci se produisant lors des premiers stades du développement. En effet, après la fécondation et pendant le stade préimplantatoire a lieu une importante reprogrammation qui, si elle est défectueuse, pourrait être à l'origine de ces pathologies.

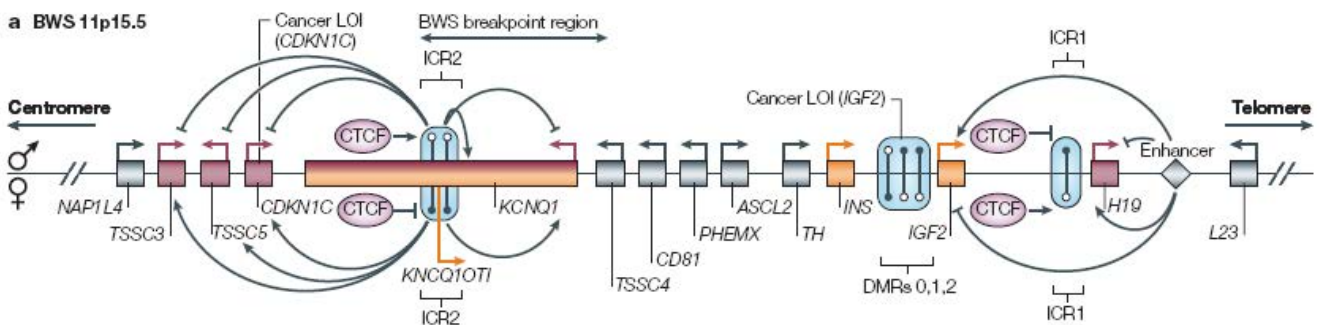
#### ***a. Syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW)***

Le syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW), est caractérisé par une surcroissance foetale et des défauts de développement comme une macroglossie (grosse langue) ou une hypertrophie

de certains organes. Par ailleurs, les enfants atteints de ce syndrome ont un risque 1000 fois plus important de développer des tumeurs embryonnaires particulièrement la tumeur de Wilms (néphroblastome) et des corticosurrénales (Diaz-Meyer et coll. 2005).

L'incidence du syndrome de Beckwith-Wiedemann est de ~1/14 000 naissances (Weksberg et coll. 2009), environ 83% sont des cas sporadiques, 15% des cas familiaux et 2% des cas d'anomalies cytogénétiques (Engel et coll. 2006). Plusieurs gènes soumis à empreinte situés au niveau du chromosome 11p15.5 sont impliqués dans les différents cas du syndrome: *CDKN1C* ou  $p57^{kip2}$ , *KCNQ1* et *H19* et les gènes soumis à empreinte maternelle *IGF2* et *KCNQ1OT1*. Le gain de méthylation au niveau de l'ICR1 (*H19DMR*), qui conduit à la surexpression du gène *IGF2* et la répression du gène *H19*, est observé dans 5 à 10% des cas sporadiques du syndrome de Beckwith-Wiedemann, alors que l'hypométhylation de l'ICR2 (*KvDMR1*) est observé dans plus de 50% des cas sporadiques (Weksberg et coll. 2001).

Les disomies uniparentales (UPD pour UniParental Disomy) entraînant une augmentation de l'expression d'*IGF2* et une réduction de l'expression de  $p57^{kip2}$  représentent 10 à 20% des cas sporadiques.



**Fig 33: Le locus 11p15.5 et les différents gènes contrôlés par ICR1 et ICR2**

Des études récentes révèlent que le locus 11p15.5 n'est touché que dans 75 à 80% des cas du syndrome de Beckwith-Wiedemann et que d'autres locus sont impliqués. En effet, certains patients atteints de BWS présentaient des hypométhylations au niveau de l'ICR des allèles maternels des gènes : *MEST*, *IGF2R*, *PLAGL1* et *GNAS/NESPAS* (Bliek et coll. 2009).

### ***b. Syndrome de Silver Russel (SSR)***

Le syndrome de Silver-Russell (SSR) présente un phénotype contraire à celui du syndrome de BWS : retard de croissance intra-utérin et postnatal (Eggermann et coll 2008). Ce phénotype

inversé s'explique par un défaut épigénétique opposé à celui du BWS. En effet, le syndrome de Silver-Russell est génétiquement hétérogène, Une déméthylation de l'ICR1 de H19/IGF2 a été mis en évidence dans près de 60% des SRS. La déméthylation de l'allèle paternel de l'ICR1 permettrait la fixation du facteur CTCF au niveau des deux allèles, impliquant ainsi la répression biallélique qui mène à la perte d'expression d'IGF2, et en conséquence, à un retard de croissance (Gicquel et coll 2005). Dans 10% des cas on retrouve une disomie uniparentale maternelle sur le chromosome 7 (Eggermann et coll 2001). En 2007, Schonherr et coll rapportent le premier cas de SRS avec une épimutation au niveau de l'ICR2 (KvDMR1) du locus 11p15.5 chez l'homme (Schonherr et coll 2007).

### **3. Empreinte parentale et syndromes de déficience mentale:**

#### ***a. Syndrome d'Angelman (SA) :***

Ce syndrome est caractérisé par une déficience mentale profonde avec absence de langage, des accès de rire inappropriés et/ou une humeur joyeuse, une ataxie, un faciès caractéristique, une épilepsie, des altérations de l'EGG et un retard du développement moteur (Williams et coll 2006). Dans la majorité des cas la maladie est sporadique, avec quelques cas de réarrangements chromosomiques familiaux.

Soixante à 80% des patients ont une délétion interstitielle du chromosome 15q11q13. Le chromosome anormal est toujours d'origine maternelle (Horsthemke et Wagstaff 2008), alors qu'il est d'origine paternelle dans le syndrome de Prader-Willi. Une disomie uniparentale et des anomalies de l'empreinte génétique sont des causes rares décrites dans 2 à 5% des cas.

Dans 10% des cas, une mutation du gène (UBE3A, ubiquitin-protein ligase, exprimé par l'allèle maternel dans le cerveau) a été identifiée chez des patients atteints du syndrome d'Angelman et dans 15 à 20 % des cas le mécanisme est non identifié (Van Buggenhout. Et coll 2009)

#### ***b. Syndrome de Prader-Willi (SPW) :***

Il associe une hypotonie, une obésité avec hyperphagie, une petite taille des mains et des pieds et une déficience mentale.

Environ 70% des sujets atteints de ce syndrome ont une délétion interstitielle de la région 15q11q13 sur le chromosome d'origine paternelle (Horsthemke et Buiting 2006). Dans 30% des cas environ, il s'agit d'une disomie maternelle du chromosome 15 (les deux chromosomes

15 d'origine maternelle). Dans de rares cas environ 1%, il s'agit d'une anomalie d'empreinte sur le chromosome 15 paternel.

Toutes ces lésions conduisent à un déficit de l'expression des gènes soumis à empreinte exprimés par l'allèle paternel : MKRN3, MAGEL2, NDN et SNURF-SNRPN.

***c. Syndrome ostéodystrophique d'Albright (pseudo-hypo-parathyroïdisme)***

Caractérisé par une petite taille et un faciès arrondi, une obésité modérée, des calcifications sous-cutanées, des anomalies de la main et un retard mental. Il existe inconstamment une hypocalcémie et une hyperphosphatémie. La manifestation clinique dépend de la nature de la mutation au niveau du locus de GNAS. Ce gène est localisé chez l'homme sur le bras long du chromosome 20 en position q13.2-q13.13 et code pour la sous-unité  $\alpha$  (G $\alpha$ s) de la protéine de liaison à GTP responsable de la transmission du signal hormonal intra-cellulaire après la fixation de la PTH (hormone parathyroïdienne) sur son récepteur (Lalande 2001).. Les promoteurs des deux allèles paternel et maternel sont actifs dans la plupart des tissus sauf au niveau de certains tissus à réponse hormonale comme le tubule proximal rénal, la thyroïde et les gonades où le promoteur de l'allèle paternel est silencieux.

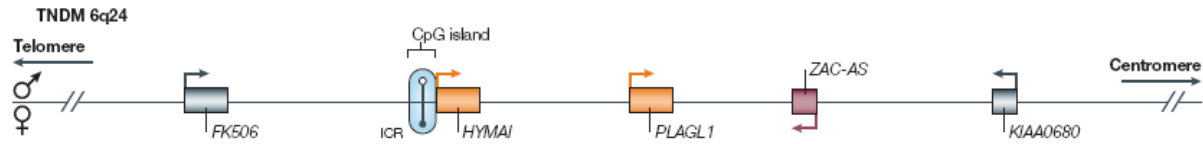
Une transmission paternelle de la mutation entraîne une ostéodystrophie héréditaire d'Albright. Par contre une transmission maternelle de la mutation aboutit à une pseudohypoparathyroïdie de type Ia (PHP-Ia). Les patients atteints d'une PHP-Ia possèdent une résistance rénale à la parathormone (PTH) qui se traduit par une hypercalcémie et une hypophosphorémie et qui s'associe aux symptômes de l'ostéodystrophie héréditaire d'Albright.

**4. Empreinte parentale et syndrome métabolique :**

***a. Diabète néonatal transitoire mellitus (transient neonatal diabetes mellitus ou TNDM :***

C'est une maladie rare, caractérisée dès les premiers jours de la vie par une hyperglycémie, un taux indécélable d'insuline, une glycosurie et un retard de croissance intra-utérin. Un défaut épigénétique sur le chromosome 6 est la cause dans 90% des cas. Il s'agit d'une perte de la méthylation de l'allèle maternel ou une duplication de l'allèle paternel au niveau de la DMR du locus 6q24 qui mènent à une surexpression de gènes (ZAC1) qui est probablement à l'origine du diabète (Temple et Shield 2002; Mackay et coll. 2005). En effet, deux gènes soumis à empreinte maternelle, le gène ZAC1/PLAGL1 (zinc finger apoptosis, cell cycle arrest or pleiomorphic adenoma of the salivary gland gene-like 1) et le gène HYMAI

(hydatidiform mole-associated and imprinted transcript) sont localisés au niveau du locus 6q24 (Varrault et coll. 2001). ZAC1 code pour un facteur de transcription impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et le contrôle autocrine de la sécrétion d'insuline par les îlots pancréatiques (Spengler et coll. 1997; Varrault et coll. 2001) et HYMAI est un gène non transcrit à fonction inconnue (Diatloff-Zito et coll. 2007).



**Fig 34: Profil de méthylation de l'ICR du locus 6q24 dans les deux allèles parentaux.**

➔ Expression maternelle

- Expression paternelle

## 5. Empreinte parentale et infertilité :

Chez l'homme, différentes études ont montré des perturbations de la mise en place de l'empreinte parentale dans les cellules germinales qui peuvent être à l'origine d'une infertilité. Un défaut de la mise en place de l'empreinte a été apporté par l'analyse des môles hydatidiformes. Les môles hydatidiformes complètes font partie des maladies trophoblastiques gestationnelles. Elles donnent lieu à une prolifération excessive des villosités placentaires et à une absence d'embryon (Van Den Veyver et coll 2006) et peuvent potentiellement se développer en choriocarcinomes. La plupart de ces môles résultent d'une fécondation dispermique. L'étude de Judson et coll d'un cas familial, a démontré que les tissus issus de la môle présentaient une absence globale de méthylation au niveau des ICR qui ont une méthylation d'origine maternelle (Judson et coll 2002). Cela suggère que cette pathologie est due à un défaut de mise en place de l'empreinte dans les cellules germinales femelles. Cependant, des études toujours des cas familiaux de môles hydatidiformes complètes montrent que DNMT3L et DNMT3A ne sont pas impliquées dans cette pathologie (Hayward et coll 2003). D'autres protéines pourraient être impliquées mais le mécanisme reste aujourd'hui un mystère (Henkel et coll 2008).

Une étude récente, ayant comparé le profil de méthylation des DMR de 7 gènes soumis à empreinte, du promoteur du gène NANOG et le gène suppresseur de tumeur APC dans des échantillons de villosités chorales issues de produits d'avortement après AMP ou après grossesses spontanées ne révèle pas de différence significative sauf pour LIT1 et H19

(Tierling et coll. 2009). Cette équipe a aussi relevé un taux élevé de méthylation de PEG3 et APC par rapport aux autres gènes étudiés. Ceci suggère la sensibilité plus grande de certains gènes à une dérégulation de l’empreinte (Zechner et coll 2009).

Des analyses menées au cours de la spermatogenèse ont permis de mettre en évidence que l’infertilité masculine peut être liée à des défauts de l’empreinte génomique. Une étude réalisée sur des patients infertiles oligozoospermiques (nombre de spermatozoïdes  $< 20 \cdot 10^6$ ) portant sur la méthylation de l’ICR du domaine IGF2-H19, qui est normalement fortement méthylé dans le sperme révèle une baisse de la méthylation chez 25 % des patients (Marques et coll 2004). Kobayashi et coll ont pu démontrer aussi chez 14% des patients oligozoospermiques étudiés une méthylation réduite au niveau des ICRs paternels, chez 20% une méthylation aberrante au niveau des ICR maternels, alors que le reste du génome semblait correctement méthylé (Kobayashi et coll 2007)

Une diminution de la méthylation de H19DMR, plus spécifiquement au niveau des sites de liaisons du facteur CTCF est observée chez des patients présentant des dérégulations de la spermatogenèse (Marques et coll. 2009).

L’étude de Boissonnas et coll a montré dans groupe de patients atteints de térazoospermie (% de formes atypiques  $> 70\%$ ) une perte de méthylation de différents CpG de la DMR2 secondaire de IGF2 et/ou au niveau du 6<sup>ème</sup> site de fixation de CTCF inclus dans la DMR1; dans un autre groupe de patients atteints d’oligo-asthéo-térazoospermie, une perte sévère de méthylation au niveau du 6<sup>ème</sup> site de fixation de CTCF. Cette étude suggère que les perturbations de méthylation au niveau du 6<sup>ème</sup> site de liaison de CTCF de H19DMR pourraient être un biomarqueur de défauts de la spermatogenèse chez l’homme (Boissonnas et coll. 2009).

Les mécanismes impliqués semblent complexes et actuellement, il est impossible de déterminer si ces dérégulations épigénétiques sont dues à un défaut d’acquisition ou à l’effacement des empreintes dans les cellules germinales mâles.

## **C. PATHOLOGIES EPIGENETIQUES LIEES AMP**

La prise en charge de l’infertilité n’a cessé d’être améliorée grâce au développement des techniques d’AMP. En effet, elle a débuté par la réalisation de l’insémination artificielle,

technique interférant peu avec le processus de reproduction puisque l'étape de fécondation se déroule *in vivo*. Ensuite, vers les années 80 apparaît la technique de FIV nécessitant une stimulation hormonale, un recueil des gamètes et une fécondation *in vitro* au laboratoire, suivie d'une culture et du transfert embryonnaire. Enfin, l'arrivée de l'ICSI a permis de révolutionner la prise en charge de l'infertilité masculine sévère puisqu'elle permet d'obtenir un embryon par la simple injection d'un spermatozoïde éjaculé, ou immature prélevé chirurgicalement à la suite d'une ponction épидидymaire ou une biopsie testiculaire.

Malgré leur succès dans la prise en charge du couple infertile, ces techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) suscitent de nombreuses interrogations concernant leur innocuité et les risques potentiels sur la santé des enfants conçus.

Les premières études de suivie de ces enfants montrent qu'ils sont dans la majorité des cas normaux. Des études ultérieures constatent une diminution du poids de naissance de 2,6 fois plus important chez les enfants conçus par AMP non pas seulement en cas de grossesses multiples mais aussi en cas de grossesse unique (Bergh et coll 1999, Schieve et coll 2002).

Ils révèlent aussi, une augmentation de l'incidence des malformations congénitales (Wennerholm et coll 2000, Bonduelle et coll 2005, Reefhuis et coll 2009) confirmé par une étude récente de (Kallén et coll 2010) avec augmentation du risque des cardiopathies congénitales par apport à d'autres types de malformation. Une augmentation des anomalies chromosomiques (Van Steirteghem et coll 2002) ainsi que des retards de développement psychomoteur (Stromberg et coll 2000, Ludwig et coll 2006) ont été également observés. Bien que les résultats de ces études soient parfois contestés à cause des biais présents, il semble que les techniques d'AMP ne sont pas complètement innocentes (Fauque et coll 2008). Des études menées chez l'animal ont permis d'incriminer ces techniques dans des pathologies de l'empreinte. En effet, Khosla et coll ont démontré des effets délétères de la culture *in vitro* sur des gènes soumis à empreinte parentale ainsi que sur le développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste chez la souris (Khosla et coll 2001).

Récemment, la notion de risque épigénétique, dû aux techniques d'AMP, a été évoquée. Parmi les enfants atteints de pathologies liées à l'empreinte parentale chez l'homme, comme le syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS), de Prader Willi (PWS), d'Angelman (AS) et de Silver-Russell (SRS), la proportion de ceux nés après AMP est remarquable (Cox et coll 2002, Sutcliffe et coll 2006).

## **1. Syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW):**

De nombreuses études ont montré une augmentation du pourcentage de patients nés après AMP parmi la population de patients BWS (Cox et coll 2002, Sutcliffe et coll 2006). En effet, le risque d'avoir un BWS chez un enfant né après AMP a été estimé à 1/4000 naissances, il est quatre à neuf fois plus élevé que celui observé dans la population générale (Cox et coll 2002, Halliday et coll et coll 2004).

L'étude de DeBaun a démontré chez 6 cas sporadiques de BWS testés que 5 présentaient une hypométhylation de LIT1 ou KCNQ1OT, 1 une hyperméthylation de H19 et 1 sans aucune anomalie. Ils ont estimé l'incidence des cas de BWS nés *via* l'AMP à 4,6% dans les registres de BWS, ce qui est significativement élevé par rapport aux 0,76% estimés dans la population normale aux USA en 1999 (DeBaun et coll 2003).

En 2007, Doornbos et coll rapporte un pourcentage élevé aussi de 5.6% d'enfants nés *via* l'AMP sur 71 cas de BWS comparé à 0,92% dans la population normale. Ils suggèrent que ce taux élevé pourrait être en rapport avec les problèmes de fertilité chez les parents (Doornbos et coll 2007)

Gicquel et coll ont montré dans une étude rétrospective sur 149 patients atteints de BWS que les 6 qui sont nés *via* l'AMP présentaient tous de façon sporadique une hypométhylation de degré variable de l'allèle maternel de KvDMR1 de la région KCNQ1OT (Gicquel et coll 2003). Dans une étude récente, Lim et coll retrouvent cette hypométhylation au niveau de KvDMR1 chez 24 patients sur 25 atteints de BWS issus de l'AMP (Lim et coll. 2009). La particularité de ces patients BWS nés après AMP est qu'ils présentent dans la majorité des cas la même anomalie épigénétique qui correspond à une déméthylation du gène KCNQ1OT (Anastasiou et Mandelbum 2006). Ce qui suggère soit une défaillance de la mise en place de l'empreinte maternelle au niveau de l'ICR2 (KvDMR) dans la lignée germinale femelle ou bien une déméthylation lors de la période du développement embryonnaire préimplantatoire.

## **2. Syndrome de Silver-Russell (SSR) :**

Cinq cas ont été rapportés dans la littérature chez les enfants nés après AMP (Svensson et coll. 2005; Bliiek et coll. 2006; Kagami et coll. 2007; Galli-Tsinopoulou et coll. 2008). L'analyse moléculaire trouve dans un cas une perte de la méthylation de l'ICR1 du locus H19/IGF2 entraînant une répression de la transcription d'IGF2 (Bliiek et coll. 2006) et dans l'autre, une hyperméthylation de l'allèle paternel du gène PEG/MEST (ch 7q32) (Kagami et coll. 2007) . Cette dernière anomalie reste inconnue parce que l'hyperméthylation de MEST n'est pas responsable du SRS. D'autant qu'elle a aussi été détectée chez le père de la fillette atteinte.



### **3. Syndrome de Prader-Willi (SPW):**

Deux études rapportent 13 cas du PWS après AMP dont 4 après FIV/ICSI, 1 après insémination artificielle, 1 après stimulation hormonale et 7 traités par des médicaments pour l'infertilité (Sutcliffe et coll. 2006; Doornbos et coll. 2007). Aucun cas de PWS après AMP n'a révélé une atteinte épigénétique jusqu'à ce jour.

Une analyse d'un registre de 6052 enfants nés après AMP ne détecte aucun cas de PWS ce qui doit être interprété avec prudence, compte tenu du faible nombre de patients issus de l'AMP par rapport à la population contrôle qui compte 442 349 enfants (Lidegaard et coll. 2005).

### **4. Syndrome d'Angelman (SA):**

Neufs cas de SA après AMP sont rapportés dans la littérature dont 6 après ICSI, 1 après FIV et 2 après inséminations artificielles (Cox et coll. 2002; Orstavik et coll. 2003; Ludwig et coll. 2006; Sutcliffe et coll. 2006).. L'analyse génique révèle un défaut de l'empreinte au niveau de SNRPN dans cinq cas. En 2007, Doornbos et coll rapportent trois cas de SA issus d'une induction de l'ovulation des mères sur 63 patients étudiés (Doornbos et coll. 2007)..

Tous ces résultats sont contestés par deux études. La première ne rapporte aucun cas de SA sur 1524 enfants nés *via* l'AMP (Bowdin et coll. 2007) et la deuxième montre qu'aucune dérégulation de l'empreinte du locus 15q11-13 n'est détectée chez 92 patients nés par ICSI (Manning et coll. 2000). Mais le faible nombre de cas analysés dans ces deux études ne permet pas de détecter une augmentation du risque d'AS lié à des épimutations liées à l'AMP. Jusqu'à présent, aucun cas de diabète néonatal transitoire mellitus ni de Syndrome ostéodystrophique d'Albright (pseudo-hypo-parathyroïdisme) n'a été signalé chez les enfants nés suite à l'assistance médicale à la procréation (Amor et Halliday 2008).

Cependant, trois publications récentes définissent l'existence d'un nouveau syndrome appelé syndrome d'hypométhylation maternelle correspondant à une hypométhylation de l'allèle maternel sur plusieurs loci (ZAC (6q24), KCNQ1OT1 (11p15.5), GRB10 (7p11.2-12), PEG3 (19q13), PEG1/MEST (7q32), and NESPAS (20q13)) . Ce syndrome a été retrouvé chez 3 patients sur 11 (27%) atteint de BWS et conçus *via* l'AMP ainsi que chez 7 patients sur 29 (24%) conçus d'une façon naturelle (Rossignol et coll. 2006)..

### **5. Rétinoblastome :**

Il s'agit d'une tumeur rare dont l'incidence a été calculée à 1/17000 naissances (Moll et coll 1997). Elle est sporadique et unilatérale dans 60% et héréditaire et bilatérale dans 40% des cas (Anastasiou et Mandelbaum 2006, M. Owen et coll 2009).

Moll et coll ont rapporté 5 cas de rétinoblastome après AMP aux Pays-Bas entre fin 2000 et début 2002; au cours de cette période entre 1 et 1.5% des enfants sont nés après AMP, ils estiment alors un risque relatif de RB de l'ordre de 4,9-7,2 chez les enfants issus de l'AMP (Moll et coll 2003).

A part l'étude de Moll et coll aucune autre étude n'a trouvé de relation entre AMP et RB. Bradbury et coll ne trouve aucun cas de RB après AMP sur les 24 cas identifiés sur 12 années d'étude (Bradbury et coll 2004). De même, l'étude d'une large cohorte danoise de 6052 enfants nées après AMP et suivie durant environ 4 ans ne trouve aucun cas de rétinoblastome (Lidegaard et coll 2005, M. Owen et coll 2009). Devant ces cas isolés de RB rapportés dans la littérature la responsabilité de l'AMP est loin d'être prouvée (Anastasiou et Mandelbum 2006).

## **6. Faible poids de naissance après AMP :**

Schieve et coll trouvent un risque d'hypotrophie 2,6 fois supérieur chez les singletons issus d'AMP par rapport à ceux conçus naturellement (Schieve et coll 2002). Le même phénomène a été observé dans un groupe de naissance après AMP après stimulation ovarienne par rapport à un second groupe issu de cycle naturel sans stimulation (Keizer et coll 2004).

Une explication possible est que le traitement hormonal permet la maturation d'ovocytes épigénétiquement anormaux qui n'auraient pas été ovulés sans la stimulation exogène ou que cette dernière perturbe les profils de méthylation globale et spécifique qui ne sont définitivement acquis que durant la phase de maturation finale du gamète femelle (Anastasiou et Mandelbum 2006).

D'après Mayer et coll, le développement embryonnaire est sous le contrôle de deux groupes de gènes soumis à empreinte parentale. Le groupe de gènes comportant IGF2, PEG1/MEST et PEG3 sont exprimés par l'allèle paternel et stimulent le développement foetal, quand au groupe de gènes à expression maternelle, comme H19, IGF2R, CDKN1C, ils ont l'effet opposé. Le faible poids de naissance pourrait ainsi être dû à des anomalies d'empreinte du génome paternel (Mayer et coll 2000)

Il n'est toujours pas clairement établi que les altérations épigénétiques et les maladies observées chez les enfants conçus par les techniques de l'AMP sont effectivement la conséquence de ces manipulations et non liées à l'infertilité des parents elle-même (Ludwig et coll. 2005; Doornbos et coll. 2007; Kobayashi et coll. 2007) , en particulier l'utilisation en ICSI de spermatozoïdes anormaux de patients dont l'empreinte peut être dérégulée.

Toutefois, ces études ne concernent qu'un petit nombre de cas et elles ne permettent pas à l'heure actuelle, d'incriminer plus particulièrement telle ou telle procédure, que ce soit la stimulation ovarienne, l'ISCI, la culture prolongée ou la congélation embryonnaire. La particularité commune à tous ces modèles de pathologies après AMP évoqués ci-dessus est la perturbation de l'empreinte parentale par modification des marques épigénétiques.

## **D. TECHNIQUES D'AMP ET DEREGULATIONS EPIGENETIQUES :**

Une reprogrammation majeure de l'empreinte prend place dans les cellules germinales primordiales caractérisée par un effacement des marques afin de restaurer la totipotence. Ces marques seront ensuite apposées durant la spermatogenèse ou l'ovogenèse en fonction du sexe. Après la fécondation, il existe une déméthylation globale du génome qui sera suivie d'une vague de méthylation de novo, mais qui épargne les loci soumis à l'empreinte.

Ainsi, la gamétogenèse et la période précoce post fécondation représentent des fenêtres critiques de perturbation de la mise en place de l'empreinte par des facteurs extérieurs comme la stimulation ovarienne, la manipulation des gamètes, la maturation *in vitro*...il est donc nécessaire d'évaluer le risque épigénétique induit par les techniques d'AMP.

Peu d'études chez l'humain sont disponibles en raison des considérations éthiques et des restrictions législatives. En effet, l'essentiel des connaissances a été établi à partir des modèles animaux. Il apparaît par conséquent que des dérégulations des gènes soumis à empreinte pourraient être induites par chacune des étapes des techniques d'AMP (Fauque et coll 2008).

### **1. Stimulation ovarienne :**

Plusieurs études s'intéressant à la mise en place de l'empreinte maternelle au cours de l'ovogenèse s'accordent sur le fait que cette acquisition de l'empreinte se déroule de manière progressive et asynchrone selon les gènes tout au long de la croissance ovocytaire (Luciféro et coll 2004). Ceci semble être aussi dépendant de la taille des ovocytes et de la synthèse ovocytaire d'enzymes nécessaires à la méthylation de l'ADN comme la Dnmto (Lucifero et coll. 2004; Hiura et coll. 2006). Donc une stimulation hormonale qui aurait pour but d'accélérer et d'amplifier la croissance et la maturation des ovocytes va faire craindre l'apparition d'une dérégulation de la mise en place du marquage épigénétique maternel.

En 2005, Imamura et coll observe une hétérogénéité au niveau du profil de méthylation du gène *Peg1/Mest* au sein d'une cohorte d'ovocytes issus de souris superovulées (Imamura et coll. 2005). Sato et coll montre un gain de méthylation de H19DMR après hyperstimulation hormonale (Sato et coll. 2007). Chez l'humain, Borghol et coll montrent une hyperméthylation au niveau de H19DMR des ovocytes au stade MI et MII prélevés chez des femmes stimulées (Borghol et coll. 2006). Sato et coll montre aussi une dérégulation de l'empreinte des gènes PEG/MEST et H19 dans des ovocytes de femmes stimulées (Sato et coll 2007)

Notre équipe a montré, dans des ovocytes humains mûris *in vitro* issus de femmes ayant subi un traitement de superovulation, un pourcentage de méthylation significativement plus faible au niveau de KvDMR1 par rapport aux ovocytes mûris *in vitro* sans hyperstimulation ovarienne préalable (Khoueir et coll. 2008).

Une étude récente d'Anckaert et coll montre un profil normal des gènes H19, *Snrpn* et *Igf2r* dans des ovocytes prélevés matures (MII) de souris hyperstimulés (Anckaert et coll 2009). Ces résultats suggèrent une variabilité des régulations épigénétiques d'une espèce à l'autre et par conséquent une interférence variable d'une même technique d'AMP avec la mise en place de l'empreinte dans des espèces différentes.

## **2. Maturation in vitro des ovocytes :**

Kerjean et coll montre des dérégulations de l'empreinte dans trois gènes H19, *Mest* et *Igf2r* après 11 jours de MIV des follicules préantraux de souris (Kerjean et coll 2003). Imamura et coll (2005) rapporte une diminution du taux de CpG méthylés pour le gène *Mest/Peg1* après une culture prolongée d'ovocytes de souris. Une surexpression des gènes soumis à empreinte *PLAGL1* et *MEST*, a été rapportée dans des ovocytes de singe rhésus mûris *in vitro* (Lee et coll. 2008).

A l'opposé, l'étude d'Anckaert et coll ne trouve aucune dérégulation de l'empreinte des gènes *Snrpn*, H19 et *Igf2r* au niveau d'ovocytes de souris mûris *in vitro* (Anckaert et coll. 2009) . Ces constatations différentes peuvent être dues à la différence entre les régions étudiées par les différentes équipes ainsi qu'à la différence des procédures et durée de MIV adoptées par chacune.

Dans notre équipe, l'analyse du profil de méthylation de H19DMR d'ovocytes de femmes muris *in vitro* révèle un profil hétérogène dans ceux recueillis au stade MI et qui sont restés bloqués même après 24 h de MIV, alors que la majorité de ceux ayant atteints le stade MII présentaient le profil hypométhylé attendu sauf dans deux lots d'ovocytes provenant de 2

patientes différentes où des profils méthylés anormaux ont été rapportés (Borghol et coll. 2006). Le même type d'analyses effectuées pour KvDMR1 montrent que la MIV (28h de culture) permet la mise en place de la méthylation de cette DMR tout au long de la maturation *in vitro* avec toutefois un taux de méthylation légèrement inférieur aux taux observés au niveau des ovocytes mûris *in vivo* (Khoueiry et coll. 2008).

### **3. FIV et l'ICSI :**

La seule étude à ce jour qui a évalué les conséquences de la fécondation *in vitro* proprement dite, conclue à une perte de méthylation dans la DMR du gène H19 chez la souris (Fauque et coll 2007)

Chez l'homme, le faible nombre de données et la grande hétérogénéité de conditions entre les différentes études ne permet pas de conclure définitivement quant à l'innocuité sur le plan épigénétique de la FIV ou de l'ICSI.

Les risques encourus en cas d'ICSI sont théoriquement de deux ordres : d'une part liés à la technique elle-même, et d'autre part en rapport avec l'étiologie, c'est-à-dire avec une pathologie parentale, essentiellement masculine, qui pourra toucher l'enfant si la barrière physiologique que constitue la stérilité est franchie. Ce d'autant plus que des études récentes montrent des dérégulations épigénétiques dans le sperme des hommes infertiles pris en charge en ICSI (Marques et coll 2004, Marques et coll 2009, Kobayashi et coll 2007)

### **4. Culture prolongée des embryons :**

Au cours du développement embryonnaire préimplantatoire, les marques épigénétiques des gènes soumis à empreinte sont apposées et doivent être maintenues. Cette spécificité des gènes soumis à empreinte les expose à des perturbations de méthylation au cours des cultures *in vitro* (Fauque et coll 2008)

En effet, dans le modèle murin, plusieurs études rapportent des dérégulations épigénétiques de gènes soumis à empreinte au stade préimplantatoire (Doherty et coll 2000, Sasaki et coll 1995) et au stade postimplantatoire (Mann et coll 2004, Khosla et coll 2001), lorsque le développement a été réalisé *in vitro* dans certains milieux de culture.

L'expression des gènes H19, Igf2 et Grb10 est altérée dans les fœtus de souris issus de blastocystes cultivés *in vitro* en présence de sérum de veau fœtal (SVF) (Khosla et coll. 2001). Chez la souris la culture *in vitro* perturbe le maintien de la méthylation du gène H19 (Fauque

et coll. 2007). La culture embryonnaire prolongée ainsi que le clonage induit des épimutations au niveau du gène *Snrpn* (Suzuki et coll. 2009).

Chez les moutons et les bovins, Young et coll (1998 et 2001) ont montré que des anomalies épigénétiques étaient impliquées dans la survenue du « Large offspring syndrome » (LOS). Les animaux atteints présentaient différents symptômes dont une macrosomie foetale. Dans les deux espèces, ce syndrome apparaît après exposition à des facteurs environnementaux inhabituels pour l'embryon entre le stade de fécondation et le stade blastocyste. Le LOS est lié à la perte de l'empreinte du gène codant pour le récepteur d'IGF2 qui permet l'internalisation et la dégradation d'IGF2 et a ainsi une action anti-proliférative. (Young et coll 1998, Young et coll 2001)

### **5. Transfert embryonnaire :**

La manipulation des embryons avant leur transfert pourrait affecter les gènes soumis à empreinte. Selon Rivera, des perturbations épigénétiques au niveau des gènes *Igf2*, *Ascl2* et *Kcqlot1* pourraient survenir suite aux manipulations des embryons de souris lors du transfert embryonnaire à 9,5 jours post coïtum (Rivera et coll. 2008). La culture embryonnaire semble augmenter ces perturbations.

Toutes ces études nous incitent à réfléchir avant toute application à l'homme des approches interventionnistes; même si le but est louable, permettre à des couples d'enfanter, on ne peut ignorer la complexité et la fragilité de ces premières étapes de la vie que sont le zygote et l'embryon durant son développement précoce. D'où l'intérêt du suivi à long terme des enfants nés de la FIV ou de l'ICSI, voire de leur descendance ainsi que le recensement dans les études à mener ultérieurement des détails des différents protocoles utilisés, de la stimulation ovarienne jusqu'aux milieux de cultures utilisés.

# PREMIER ARTICLE

## **Dynamic CpG methylation of the KCNQ1OT1 gene during maturation of human oocytes**

Rita Khoueiry, Samira Ibala-Rhomdane, Lionel Méry, Thierry Blachère, Jean-François Guérin, Jacqueline Lornage, Annick Lefèvre.

**Journal of Medical Genetics**, 2008 Sep; 45(9):583-8.

### **Introduction :**

Les deux génomes parentaux sont programmés différemment au cours de leur formation lors de la gamétogenèse pour permettre le développement du zygote après leur réunion, chacun étant porteur d'une information spécifique et indispensable assurée par les gènes soumis à empreinte.

Ces gènes ont la caractéristique de s'exprimer à partir d'un seul allèle paternel ou maternel grâce à une empreinte spécifique de chacun d'entre eux, mise en place différemment selon qu'il s'agit de la spermatogenèse ou de l'ovogenèse.

Cette acquisition de l'empreinte différentielle dans des gènes organisés en domaines qui comportent aussi bien des gènes à expression maternelle et d'autres à expression paternelle par conséquent à régulation complexe, peut les rendre particulièrement sensibles aux facteurs environnementaux telles que les techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP). Ces techniques impliquent la manipulation *in vitro* des gamètes telle que la ponction d'ovocytes immatures suivie de leur mise en culture *in vitro* (MIV), dans le but d'obtenir des ovocytes mûrs qui subiront une fécondation assistée. Par la suite, les embryons obtenus seront à leur tour mis en culture durant leur phase de développement préimplantatoire jusqu'au transfert embryonnaire à J2-3 ou J5-6 post fécondation. Par conséquent, ces différentes étapes coïncident avec les deux phases importantes de remaniement de l'épigénome qui sont la période la plus précoce du développement embryonnaire et la gamétogenèse (Chapitre IV- F-e).

Récemment, la notion de risque épigénétique, dû aux techniques d'AMP a été évoquée et une augmentation du nombre de désordres épigénétiques, plus particulièrement au niveau des gènes soumis à empreinte, chez les enfants issus des techniques de l'AMP a été rapporté.

On note une proportion élevée et remarquable de certains syndromes avec dérégulation de l’empreinte telle que le syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW), de Prader-Willi (PW), d’Angelman (SA) et de Silvers-Russel (SSR) chez les enfants nés après FIV/ICSI (DeBaun et coll 2003, Gicquel et coll 2003, Maher et coll 2003, Ostravik et coll 2003, Sevansson et coll 2005, Kagami et coll 2007). Certaines dérégulations de l’épigénome peuvent être mêmes à l’origine de cancers et de maladies neurologiques et métaboliques (Voir chapitre V).

Des études montrent que la mise en place de l’empreinte dans l’ovocyte se fait de manière progressive et asynchrone selon les gènes sur un temps long, de la croissance à la maturation (Obata et coll 2002, Lucifero et coll 2004). L’ovocyte est donc le siège d’importantes modifications épigénétiques durant sa croissance, essentielles pour lui conférer la capacité de supporter le développement embryonnaire et sa mise en culture lors de la MIV le rend particulièrement vulnérable aux facteurs environnementaux. Le développement d’un procédé fiable de maturation *in vitro* (MIV) d’ovocytes prélevés immatures est cependant une alternative très attractive aux traitements actuels mis en œuvre dans les centres d’AMP.

Des études chez la souris ont montré des effets délétères de la culture *in vitro* sur le profil de méthylation ainsi que l’expression des gènes comme H19, Igf2, Grb 7 et Grb 10, conduisant à une réduction du développement au stade blastocyste avec faible poids de naissance (Khosla et coll 2001)

La stimulation ovarienne adoptée dans la très grande majorité des cycles de fécondation *in vitro* (FIV ou ICSI) dans le but d’obtenir un nombre élevé d’ovocytes, donc d’embryons, et ainsi d’augmenter les chances de grossesse par rapport à un cycle spontané, peut être aussi un agent perturbateur potentiel de l’empreinte dans l’ovocyte (Anastasiou et Mandelbaum 2006). En effet, elle est le seul facteur commun retrouvé chez des patients atteints de syndrome de Beckwith-Wiedman issus de l’AMP (Halliday et coll 2004)

Étant donné que toute modification épigénétique portée par les gamètes est susceptible d’être transmise à la descendance, il était important pour notre équipe d’étudier l’effet sur l’épigénome ovocytaire de la stimulation hormonale et de la maturation *in vitro* ou MIV. Pour atteindre ces objectifs, nous avons analysé le profil de méthylation de la région KvDMR1 du gène KCNQ1OT1 dans des ovocytes humains à différents stades de leur maturation après stimulation hormonale ou non, mûris *in vivo* ou *in vitro*. La région KvDMR1 est normalement méthylée sur l’allèle maternel; elle régule l’expression du gène KCNQ1OT1 qui exprime un ARN antisens (LIT1) du gène KvLQT1. L’analyse du profil de méthylation de KvDMR1 revêt un intérêt particulier parce qu’il est altéré dans presque tous les cas de BWS constaté chez les enfants nés *via* l’AMP.



Les ovocytes utilisés pour la MIV ont été recueillis immatures, soit chez des patientes ayant reçu une hyperstimulation ovarienne par FSH et hCG, dans le cadre d'ICSI, soit au cours de cycles naturels, après avoir obtenu le consentement écrit des patientes. Les ovocytes immatures, recueillis 36 h après injection de HCG le jour de la ponction (J0) sont placés dans un milieu de culture proposé en expérimentation par la firme Médicult (Danemark). Après 28h de culture (J1), les ovocytes ont subi une décoronisation chimique par de la hyaluronidase puis sont regroupés par patiente et selon leur stade de maturation, bloqués en prophase I (VG à J1) ou métaphase I (MI à J1), ou mûrs en métaphase II (MII à J1).

Les ovocytes n'ayant pas été mis en culture sont tous issus de cycles stimulés, ils ont été décoronisés par action de la hyaluronidase le jour du recueil et regroupés en trois stades : VG à J0, MI à J0 et MII à J0.

Le profil de méthylation de la région KvDMR1 a été analysé par mutagenèse de l'ADN par le bisulfite de sodium. Les ovocytes de chaque patiente ont été préalablement traités à la protéinase K pour éliminer la ZP et toute cellule somatique qui lui resterait attachée et serait une source d'artefact. Le bisulfite de sodium transforme les cytosines non méthylées en uracile, qui apparaissent sous forme de thymidine après amplification par PCR de la région d'intérêt, clonage et séquençage. Cette technique permet d'évaluer de façon fine au niveau de chaque CpG de la région KvDMR1 amplifiée, le niveau de méthylation initial, et d'analyser de petits échantillons. Afin de s'assurer qu'il n'y a pas de biais de clonage, les résultats obtenus ont été validés par digestion enzymatique du produit de la PCR nichée avec des enzymes de restriction. Ces derniers possèdent des séquences CG dans leur site de restriction, permettant ainsi de différencier entre CpG méthylé et CpG non méthylé transformé par le bisulfite de sodium.

Notre étude a montré que la mise en place de la méthylation différentielle au niveau de KvDMR1 se fait tout au long de la maturation ovocytaire jusqu'au stade MII *in vivo* ainsi que *in vitro* avec une diminution significative de la méthylation des MII à J1. Cette diminution est peut être due aux conditions de culture *in vitro*. Nos résultats suggèrent aussi que l'hyperstimulation induit le recrutement de petits follicules qui sont à un stade de développement insuffisant pour permettre la mise en place de l'empreinte parentale.

## Discussion et perspectives :

Les profils de méthylation de l'ADN sont en majorité, stables au cours du développement comme dans les tissus somatiques de l'adulte. Ceci est dû aux sites CpG qui fournissent une base moléculaire pour la transmission semi conservative de la méthylation de l'ADN après réplication. Deux périodes, cependant, sont caractérisées par une reprogrammation globale de la méthylation de l'ADN, la période la plus précoce du développement embryonnaire et la gamétogenèse. Au cours de la première période du développement préimplantatoire, cette reprogrammation épargne les gènes soumis à empreinte parentale. Pour que chaque gamète transmette l'empreinte liée à son sexe, celle-ci est effacée dans les cellules précurseurs des cellules germinales (PGCs), suivie d'une méthylation *de novo* spécifique dans les cellules germinales mâles et femelles. Dans la lignée germinale femelle, le marquage spécifique correspondant à l'empreinte maternelle a lieu après la naissance, dans les ovocytes primaires en croissance.

Cette reprogrammation au sein des cellules germinales est nécessaire pour rétablir les empreintes génomiques caractéristiques des deux types de gamètes et indispensable au bon développement ultérieur de l'embryon. On sait en effet, depuis les expériences de Surani et coll. et de Mc Grath et coll. (1984) qui ont montré que ni les androgénotes, ni les gynogénotes, malgré leur constitution génomique diploïde, ne pouvaient se développer, qu'un développement embryonnaire normal requiert obligatoirement la présence d'un génome paternel marqué d'une empreinte paternelle et d'un génome maternelle marqué d'une empreinte maternelle. Cette empreinte repose en partie sur une méthylation différentielle des dinucléotides CpGs situés dans des régions régulatrices et se traduit par l'expression monoallélique, monoparentale des gènes concernés. Toute dérégulation de ce phénomène sera à l'origine d'une perturbation de l'expression de ces gènes.

Dans les gonocytes femelles et après une phase d'effacement de l'empreinte dans les cellules germinales primordiales, la mise en place de la méthylation spécifique des gènes soumis à empreinte maternelle s'étale tout au long de l'ovogenèse avec une cinétique propre à chaque gène. Le marquage de l'empreinte au cours de l'ovogenèse semble s'effectuer au niveau de l'allèle d'origine maternelle avant celui d'origine paternelle pour le gène *Snrpn* chez la souris (Lucifero et coll 2004); à l'inverse dans les cellules germinales mâles, l'acquisition de la méthylation spécifique du gène *H19* s'effectue plus précocement sur l'allèle d'origine paternelle (Davis et coll 2000, Lucifero et coll 2004).

Tout au long de sa maturation et de sa différenciation, l'ovocyte est le siège d'importantes modifications épigénétiques qui sont essentielles pour qu'il acquière la capacité à supporter le développement embryonnaire. Le dérèglement de ces mécanismes aura comme conséquence une perturbation de l'expression des gènes concernés ce qui peut conduire à l'apparition de certaines maladies humaines (Voir chapitre V) (Veronal et coll 2003). Ces maladies sont souvent associées à des pertes d'hétérozygotie résultant de duplications maternelle ou paternelle d'une région à empreinte parentale, entraînant soit l'extinction soit la sur expression des gènes correspondants.

Plusieurs études rapportent un lien entre les manipulations *in vitro* des gamètes et des embryons et des dérégulations au niveau de l'empreinte parentale. Imamura et coll observe une hétérogénéité au niveau du profil de méthylation du gène Peg1/Mest au sein d'une cohorte d'ovocytes issus de souris superovulées. Sato et coll montre un gain de méthylation de H19DMR après hyperstimulation hormonale chez l'homme et la souris (Sato et coll 2007).

La notion de risque épigénétique a été évoquée et un lien entre AMP et pathologies associées à des anomalies de l'empreinte parentale a été suggéré, en particulier dans le cas du syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW). Plusieurs études, ont montré une augmentation de l'incidence de ce syndrome chez les enfants nés après AMP (Debaun et coll 2003, Gicquel et coll 2003, Maher et coll 2003, Halliday et coll 2004, Bodwin et coll 2007). La particularité de ces patients est qu'ils présentent dans 90 à 100% des cas la même anomalie épigénétique, une déméthylation du gène KCNQ1OT sur l'allèle maternel (Gomes et coll 2009). Cette anomalie est la plus décrite dans la genèse de ce syndrome en général, elle est aussi la seule rapportée chez les patients SBW conçus par AMP (Anastasiou et Mandelbum 2006). Plusieurs facteurs susceptibles de provoquer un tel dérèglement épigénétique ont été rapporté dans la littérature, comme l'infertilité des patients, les protocoles de stimulation, la culture *in vitro* avec l'effet aussi des milieux de culture, les techniques de fécondation ainsi que le transfert embryonnaire (Cox et coll 2002, DeBaun et coll 2003, Gicquel et coll 2003, Gomes et coll 2009). Deux facteurs parmi ceux décrits étaient communs à presque tous les cas de BWS reliés à l'AMP, la stimulation hormonale des patientes et la culture *in vitro*. Il s'est donc avéré nécessaire d'évaluer la capacité de ces deux procédures à interférer ou non avec la mise en place de l'empreinte parentale.

Notre équipe dans un premier temps a analysé le profil de méthylation de la DMR (ICR1) des gènes H19/IGF2 au cours de la maturation ovocytaire (Borghol et coll 2006). Les résultats ont mis en lumière la nécessité d'effectuer une évaluation de la qualité épigénétique des ovocytes

obtenus après MIV et la fiabilité de notre étude faite à partir de petits échantillons. Cette étude a pu montrer que la majorité des ovocytes au stade VG analysés présentaient un profil maternel hypométhylé au niveau de H19DMR. Il semble donc que l'effacement du marquage paternel de H19DMR est complet, et que l'état non méthylé propre à l'allèle maternel est établi de façon stable au stade VG, avant la reprise de la méiose. La majorité des ovocytes en MI, notamment ceux qui avaient été recueillis à ce stade et qui n'avaient pas évolué en culture, montraient un profil hétérogène pour H19 DMR, en particulier au niveau du site de fixation de CTCF. La méthylation de son site de fixation ne permet pas au facteur CTCF de se lier à l'ADN au niveau de H19DMR et permet potentiellement l'expression d'IGF2 à partir l'allèle paternel et l'inhibition de H19 dans les ovocytes correspondants. La plupart des ovocytes ayant atteint le stade MII après 24h de culture présentaient le profil hypométhylé attendu. Néanmoins, 2 échantillons d'ovocytes provenant de 2 patientes différentes présentaient des profils méthylés anormaux pour H19 DMR. Tous les ovocytes utilisés pour cette étude provenaient de patientes hyperstimulées. Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'hyperméthylation de H19 dans les ovocytes après MIV: soit cette méthylation est acquise au cours de la culture *in vitro* des ovocytes, les conditions de culture induisant une perte de la protection de H19 maternel contre une méthylation *de novo*, soit cette méthylation correspond à un défaut d'effacement de l'empreinte paternelle au début de l'ovogenèse.

En continuité avec ce premier travail et afin d'évaluer l'impact de la maturation *in vitro* et de la stimulation hormonale sur la mise en place et le maintien de la méthylation différentielle, nous avons analysé le profil de méthylation de KvDMR1 dans des ovocytes humains à différents stades de leur maturation (VG, MI ou MII), issus de cycles stimulés mûris ou non *in vitro*, ainsi que dans des ovocytes issus de cycles naturels et mûris *in vitro*.

Les ovocytes étudiés ont été recueillis le jour de l'ICSI chez des patientes ayant subi une induction hormonale par des gonadotrophines dans le but d'augmenter le nombre d'ovocytes le jour de la tentative afin d'améliorer les chances de réussite. Ils étaient immatures au stade VG ou MI; ceux obtenus au stade MII n'avaient pu être microinjectés par manque de spermatozoïdes.

Le milieu de culture utilisé est un milieu de culture proposé en expérimentation par la firme Médicult (Danemark), supplémenté en hCG et FSH ainsi que par le sérum des patientes. Le sérum des patientes représente une source protéique pour l'ovocyte et la présence de FSH semble induire la maturation nucléaire (Van Tol et coll 1994). Dans les protocoles de MIV décrits dans la littérature la durée de culture varie entre 24h et 48h. Mikkelsen a montré que le taux d'implantation est plus important après une durée de 36h de MIV par rapport à 48h

(Mikkelsen et coll 1999). Smith et coll ne trouve aucun changement du taux de grossesse que les ovocytes aient été mûris pendant 28h ou 36h (Smith et coll 2000). Une durée de maturation *in vitro* prolongée de 42h à 48h augmente le taux d'ovocytes matures mais n'affecte pas le taux de fécondation et de développement (Barnes et coll 1996). Ces données nous ont mené à choisir une durée de culture *in vitro* courte de 28h.

Les ovocytes ayant terminé leur maturation cytoplasmique et possédant un diamètre de 120 à 150  $\mu\text{m}$  ont été sélectionnés pour notre étude. La taille des ovocytes semblent influencer la mise en place de l'empreinte parentale ainsi que la maturation *in vitro*. La capacité de l'ovocyte à mûrir *in vitro* augmente en fonction de l'augmentation de la taille de l'ovocyte (Durinzi et coll 1995). Lucifero et coll suggère que la mise en place de la méthylation des gènes soumis à empreinte chez la souris se fait en parallèle avec la croissance ovocytaire parce qu'elle nécessite l'accumulation de certains enzymes et facteurs (Lucifero et coll 2004).

Nous avons utilisé la technique de mutagenèse au Bisulfite de sodium suivie de séquençage de la région étudiée. Cette technique a les avantages de permettre l'analyse à partir d'une faible quantité d'ADN et peut s'appliquer à un nombre limité de cellules. Elle est basée sur la modification chimique des résidus cytosines par le bisulfite de sodium (Frommer et coll 1992). Elle consiste en une sulfonation suivie de désamination des cytosines en présence de bisulfite de sodium, ce qui va les transformer en uracile sulfonate. La désulfonation à un pH basique (présence de NaOH) complète la transformation des cytosines en uracile. Cette désamination est plus rapide lorsque les cytosines sont déméthylées. Cette constatation permet d'ajuster les conditions de traitement pour que les cytosines méthylées ne soient pas modifiées. L'information épigénétique est donc transformée en polymorphisme facilement détectable après PCR et séquençage.

En optimisant chaque étape de la technique de mutagenèse au bisulfite de sodium en particulier les conditions de PCR par le dessin des amorces, nous avons pu analyser de très petits échantillons de 1 à 3 ovocytes (~ 10 pg d'ADN par ovocyte) ce qui est parfaitement adapté à notre étude en clinique humaine. Cette technique à aussi l'avantage de permettre l'analyse de l'état de méthylation au niveau de chaque CpG et sur des allèles différents contrairement à d'autres techniques, comme le pyroséquençage qui analyse un profil de méthylation pour tous les doublets CG d'une région donnée sans aucune indication quant aux haplotypes de méthylation c'est à dire quant à la répartition des CG méthylés et déméthylés sur les deux allèles. Le traitement au bisulfite de sodium a l'inconvénient d'être très délétère pour l'ADN, avec la dégradation de ~ 75% de l'ADN traité. L'analyse des résultats obtenus à

partir de petits échantillons doit donc prendre en compte les limites de la technique. Après séquençage nous avons considéré que 2 profils différents amplifiés dans la même PCR correspondaient à 2 allèles indépendants, de même que 2 profils identiques obtenus à partir de 2 PCR différentes (c'est-à-dire de 2 échantillons d'ADN différents).

Afin d'éliminer tout biais lié à l'échantillon ou à la technique nous avons analysé le profil de méthylation par mutagenèse au bisulfite de sodium de spermatozoïdes humains, de cellules lymphocytaires humaines et de cellules de cumulus ovocytaire. Les spermatozoïdes présentent un profil 100% non méthylé alors que les cellules somatiques, comme attendu, ont 50% des allèles non méthylés et 50% des allèles méthylés ; ces tests ont permis de s'assurer que les amorces utilisées amplifient aussi bien les allèles méthylés que les allèles non méthylés à partir de petits échantillons de cellules traités au bisulfite de sodium. Nous avons aussi vérifié que les amorces employées n'amplifient pas l'ADN génomique non traité.

Afin d'éliminer tout risque de contamination des résultats par des cellules du cumulus, chaque ovocyte est décoronisé par la hyaluronidase suivi d'un traitement par la protéinase K.

Dans le but de s'assurer qu'il n'y a pas de biais de clonage après traitement au bisulfite et PCR, les produits de la PCR ont été digérés par des enzymes contenant dans leurs sites de restriction des CG ; ces enzymes ne coupent l'ADN que si les cytosines sont méthylées à l'origine et donc pas transformées. La limite de ce contrôle est qu'il ne permet de vérifier que l'état de méthylation de quelques CpG; il confirme néanmoins l'absence d'artefact au moment du clonage.

Dans les ovocytes au stade VG issus de cycles stimulés et non mûris *in vitro* (VG à J0) on trouve que ~ 63 % des CpG étudiés au niveau KvDMR1 étaient méthylés. Ce qui suggère que la mise en place de l'empreinte maternelle n'est pas complète à ce stade de maturation ovocytaire. Nos résultats sont différents de ceux obtenus par Geuns et coll qui montrent qu'au stade VG, la méthylation de KvDMR1 est déjà établie et que tous les allèles étudiés à ce stade portaient le profil de méthylation maternelle. Cette apparente dissemblance au niveau des résultats entre ces deux études pourrait être due au faible nombre d'allèles indépendants étudiés par l'équipe de Geuns (7 allèles) par rapport à notre équipe (55 allèles). Elle pourrait aussi s'expliquer par le fait que la région étudiée par cette équipe est située à 1239 pb de la région que nous avons étudiée. Ce qui suggère l'existence de deux régions au niveau de KvDMR1 dont le marquage s'effectuerait à deux temps différents de l'ovogenèse. En effet, il a été démontré que l'acquisition du marquage épigénétique dans l'ovocyte se fait de manière progressive et asynchrone, selon les gènes (Obata et coll 2002, Lucifero et coll 2004).

Nos résultats montrent aussi que la cinétique de mise en place de l’empreinte est différente d’une espèce à l’autre, puisque chez la souris l’empreinte parentale au niveau de KvDMR1 est déjà établie au stade VG avant la reprise de la méiose. Cette différence dans la chronologie de la mise en place de l’empreinte maternelle entre la femme et la souris montre qu’il est difficile d’extrapoler à l’homme les résultats obtenus dans un modèle animal, et souligne la nécessité de réaliser des études chez l’homme concernant l’épigénétique.

Les ovocytes recueillis au stade MI après stimulation et non mûris *in vitro* (MI à J0) présentaient un taux de méthylation plus élevé, ~ 67 % de CpG méthylés. Ce taux continue à augmenter avec la maturation ovocytaire pour atteindre ~ 90 % des CpG méthylés dans les ovocytes recueillis mûrs au stade MII (MII à J0). Ces résultats montrent que KvDMR1 acquiert sa méthylation maternelle spécifique tout au long de la maturation ovocytaire, et notamment après la reprise de la méiose. Ce qui confirme les résultats montrant que la mise en place de l’empreinte maternelle s’effectue, avec une cinétique propre à chaque gène, au cours de la croissance et la maturation ovocytaire après la reprise de la première division méiotique, à l’inverse de l’empreinte paternelle du gène H19 qui semble se mettre en place dans les cellules germinales mâles au stade de spermatogonies avant le début de la méiose (Davis et coll 2000, Ueda et coll 2000).

Au stade MII à J0 quelques allèles restent hypométhylés ce qui n’exclue pas la possibilité que la mise en place de l’empreinte maternelle au niveau de KvDMR1 puisse se poursuivre après la fécondation. Une mise en place de l’empreinte maternelle après la fécondation dans le gène SNRPN humain a été suggérée par El-Maari et coll en 2001, contredit par l’étude de Geuns et coll en 2003 qui montrent que la méthylation du gène SNRPN est complètement établie au stade VG de l’ovocyte.

Afin d’évaluer l’effet de la culture *in vitro* nous avons mis en culture pendant 28h des ovocytes recueillis au stade VG, issus de cycles stimulés (VG à J0). A 28h, certains de ces ovocytes avaient atteint le stade MII (MII à J1), alors que d’autres restaient bloqués en VG (VG à J1) ou avaient atteint le stade MI et restaient bloqués à ce stade (MI à J1). L’analyse du profil de méthylation de KvDMR1 montre que la mise en place de la méthylation s’effectue *in vitro* après la reprise de la méiose, comme nous l’avions observé dans le cas des ovocytes mûris *in vivo*. Les VG et MI à J1 présentaient un taux de méthylation presque identique à celui observé dans les ovocytes VG et MI obtenus sans culture *in vitro*. En revanche, une différence significative est observée entre le taux de méthylation des ovocytes en MII après culture par rapport aux ovocytes en MII sans MIV. A J1 les ovocytes MII présentaient ~ 78 % d’allèles méthylés comparés aux ~ 90% dans les ovocytes mûris *in vivo*. Cette différence

---

significative peut être due à la durée relativement courte (28h) d'incubation en culture *in vitro* par rapport au temps physiologique de la maturation ovocytaire *in vivo* (36 à 40h). Ce temps est peut être insuffisant à l'ovocyte pour acquérir sa maturation épigénétique.

Cependant, des perturbations au niveau de l'empreinte parentale de certains gènes ont été rapportées après un temps long d'incubation. Une diminution du taux de CpG méthylés au niveau du gène *Mest/Peg1* est observée chez la souris après une culture prolongée (Imamura et coll 2005) ; la culture *in vitro* pendant 11 jours d'ovocytes de souris du stade pré-antral au stade antral aboutit à un gain de méthylation au niveau de H19DMR et à une diminution de la méthylation au niveau des gènes *Igf2r* et *Mest/Peg1* (Kerjean et coll 2003).

L'effet de la manipulation *in vitro* semble être dépendant aussi du milieu utilisé pour la culture *in vitro* ; une expression biallélique due à la perte de méthylation paternelle du gène H19 est observé après une culture *in vitro* d'embryons de souris avec le milieu Whitten's alors qu'une expression monoallélique maternelle normale est retrouvée après culture avec le milieu KSOM+AA (Doherty et coll 2000).

Afin d'étudier l'impact éventuel de la stimulation hormonale sur la mise en place et/ou le maintien de la méthylation au niveau de KvDMR1 nous avons analysé le profil de méthylation d'ovocytes de femmes issus de cycles naturels, sans stimulation hormonale, et mûris *in vitro*. La comparaison du taux de méthylation de ces ovocytes avec ceux mûris *in vitro* et issus de cycles stimulés nous a permis d'évaluer l'effet du traitement hormonal. Seuls les ovocytes au stade VG et MI ont été analysés. Ceux ayant atteint le stade MII ont été utilisés en clinique pour le projet parentale des patientes. On a observé chez les ovocytes au stade VG et MI issus des cycles naturels une augmentation significative du taux de méthylation comparé aux ovocytes issus des cycles stimulés.

La stimulation hormonale, utilisée fréquemment dans les centres d'AMP, permet une croissance plus rapide des follicules ovariens (1,7 mm/jour comparés à 1,4mm/ jour dans les cycles naturels), mais elle est associée à un faible intervalle entre la sélection folliculaire et l'ovulation (Baerwald et coll 2009). L'effet biologique de cette augmentation de la croissance folliculaire et du raccourcissement de l'intervalle de temps de l'ovulation est à déterminer chez les femmes hyperstimulées.

Dans la mesure où les ovocytes issus de cycles naturels (non stimulés) étaient ponctionnés chez des femmes aux ovaires polykystiques et afin de vérifier un éventuel lien entre l'augmentation de méthylation observée et l'étiologie de l'infertilité (ovaires polykystiques), nous avons comparé le taux de méthylation de KvDMR1 des ovocytes au stade VG et MI à J1 issus des cycles naturels avec celui des ovocytes toujours au même stade (VG et MI à J1)



issus des cycles stimulés et provenant de patientes également à ovaires polykystiques. On retrouve la même différence significative que celle observée en prenant en compte la totalité des patientes. Ceci exclue que le taux de méthylation supérieure observé dans les ovocytes issus de patientes non stimulés soit le reflet de la pathologie particulière de ces patientes.

Le taux élevé de méthylation observé dans les ovocytes au stade VG (sans stimulation) et l'augmentation de ce taux dû à la méthylation *de novo* entre les stades VG et MI suggèrent que la méthylation des allèles maternels est probablement accomplie au stade MII.

Ces résultats suggèrent, selon l'hypothèse la plus vraisemblable, que l'induction de l'ovulation cause le recrutement de follicules de petites tailles qui sont à un stade de développement insuffisant pour acquérir une empreinte complète après reprise de la méiose.

Généralement, nos résultats sont concordants avec ceux obtenus par différentes études qui suggèrent un lien entre les techniques de l'AMP, en particulier l'hyperstimulation hormonale et les perturbations de la mise en place de l'empreinte. Des dérégulations de l'empreinte du gène H19 ont été rapportées dans les ovocytes de femmes après une superovulation (Borghol et coll 2006). En 2007, Sato et coll observe une perte de méthylation du gène PEG1 et un gain de méthylation au niveau de H19 dans des ovocytes de femmes superovulées, ainsi que des dérégulations de l'empreinte dans les ovocytes de souris superovulées. Par contre, une étude plus récente contredit ces résultats chez la souris en montrant un profil normal des gènes H19, Snrpn et Igf2r dans des ovocytes au stade métaphase II mûris *in vivo* et issus d'ovaires hyperstimulés (Anckaert et coll 2009). Ces différents résultats mettent en évidence la sensibilité de l'épigénome à l'environnement. Ils peuvent être dus à la spécificité de la mise en place de l'empreinte de chaque gène, à la différence des conditions de manipulations et aux différents protocoles et traitements de stimulation ovarienne.

La région KvDMR1 régule l'expression de KCNQ1OT1, qui code pour un ARN antisens LIT1 par l'intermédiaire duquel il régule l'expression de plusieurs autres gènes du domaine 11p15.5, en particulier le gène CDKN1C ou p57<sup>kip2</sup> un des facteurs régulateurs du cycle cellulaire. Une perturbation dans la mise en place de l'empreinte maternelle du KvDMR1 pourrait éventuellement perturber le développement embryonnaire par défaut d'expression du gène CDKN1C.

Il a été rapporté chez les patients atteints de SBW que la perte de la méthylation de KvDMR1 affectant 50% des cas, s'associe à une dérégulation de l'expression du gène CDKN1C ce qui prédisposerait au risque de développer des cancers dans cette maladie (Diaz-Meyer et coll 2006, Higashimoto et coll 2006). En conséquence, l'hypométhylation de ce locus retrouvée

dans notre travail au niveau de quelques ovocytes matures (MII) pourrait aboutir à un développement embryonnaire anormal ou à une augmentation du risque du syndrome de BWS. Il serait donc pertinent de vérifier l'état de méthylation de KvDMR1 ainsi que l'expression des gènes régulés par cette DMR chez les enfants nés de mères ayant subi une hyperstimulation hormonale.

Plusieurs études récentes rapportent un effet perturbateur de la stimulation ovarienne sur la mise en place de l'empreinte dans la descendance. Fauque et coll montre une dérégulation de l'empreinte de H19 dans des blastocystes de souris superovulées (Fauque et coll 2007).un effet perturbateur dose dépendant est rapporté par l'étude de Market-Velker et coll sur les gènes *Snrpn*, *Kcnq1ot1*, *Peg3* et *H19* dans les blastocystes de souris suite à l'induction ovarienne (Market-Velker et coll 2009).

Ces différents résultats soulignent ainsi la nécessité d'évaluer par d'autres études et sur d'autres gènes, les effets de la MIV avant la banalisation de son usage en clinique ainsi que l'induction ovarienne par de fortes doses de gonadotrophines régulièrement utilisée en AMP.

La mise en place de l'empreinte ainsi que son maintien indispensable au bon développement de l'embryon sont régulés par des DNA méthyltransférases (DNMTs). En conséquence, l'étude de leur expression et de leur localisation dans les ovocytes issus de MIV et de stimulations hormonales permettrait de faire un lien éventuel avec les dérégulations observées au niveau de la méthylation de tels ovocytes.

D'autres phénomènes épigénétiques, telle que les modifications post-traductionnelles des histones et le remodelage chromatinien qu'elles engendrent, interviennent aussi dans le remise en place de l'empreinte (Kacem et coll 2009) et régulent ainsi l'expression des gènes. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet des différentes techniques de l'AMP sur ses marqueurs épigénétiques.

Au total de nombreux facteurs sont capables d'interférer avec l'établissement ou le maintien de l'empreinte parentale à chacune des étapes des techniques d'AMP. Cependant le faible nombre d'études menées dans l'espèce humaine et les résultats parfois contradictoires des études ne permettent pas d'incriminer plus particulièrement telle, ou telle procédure. Il apparaît donc nécessaire de développer encore plus des protocoles de recherche sur les gamètes et les embryons et surtout d'associer un suivi des grossesses et des naissances à long terme puisque certaines anomalies d'empreinte se manifestent à l'âge adulte sous forme de susceptibilité au développement de cancers, de diabète ou de pathologies cardiovasculaires.

# Deuxième Article:

## **Analysis of H19 methylation in control and abnormal embryos, sperm and oocytes.**

Samira Ibala-Romdhane , Mohamed Al-Khtib, Rita Khoueiry, Thierry Blachère, Jean-François Guérin, Annick Lefèvre.

### **Introduction :**

Deux phases de reprogrammation épigénétique du génome des mammifères sont indispensables au bon développement de l'embryon, une première lors du développement embryonnaire préimplantatoire et une seconde au cours du développement de la lignée germinale. Cette reprogrammation débute après la fécondation et avant même que la 1<sup>ère</sup> division cellulaire du zygote ne commence, par une phase de déméthylation active et massive du génome paternel. Par la suite, entre la première division et le stade morula, le génome maternel subit également une déméthylation dite « passive » liée à la réplication de l'ADN. En effet, les brins d'ADN nouvellement synthétisés ne subiront pas une méthylation faute de Dnmt1 (la Dnmt de maintien) qui reste exclue du noyau durant la majorité de la phase préimplantatoire (Cilio et coll 2008). La phase de déméthylation passive est suivie d'une phase de méthylation *de novo* spécifique selon la lignée entre le stade morula et le stade blastocyste (Fulka et coll 2004). Elle touche les cellules de la masse cellulaire interne (ICM) du blastocyste, alors que les cellules trophoectodermiques qui fourniront les tissus extra embryonnaires resteront dans un état de méthylation voisin de celui du stade morula.

Tout au long de cette période du développement préimplantatoire ainsi que dans l'embryon post-implantatoire, il faut que les gènes soumis à empreinte conservent leur marque épigénétique (sauf dans les cellules germinales) afin qu'ils puissent être correctement exprimés au cours du développement (Delaval et coll 2004). Certains sont indispensables au bon développement embryonnaire, d'autres contrôlent la croissance des annexes (Reik W et coll 2003).

Ainsi, les génomes maternel et paternel qui se rencontrent dans l'œuf fécondé, malgré leur constitution génique identique, ne fonctionnent pas de façon équivalente car ils sont marqués

différemment au niveau des gènes soumis à empreinte dont l'expression est monoallélique, dépendante de l'origine parentale.

L'importance de ce phénomène découle de l'impossibilité du développement ni des gynogénètes (deux génomes maternels) ni des androgénètes (deux génomes paternels) malgré leur constitution génomique diploïde (Surani et coll 1984, McGrath et coll 1984) ce qui explique que la parthénogenèse n'est pas observée chez les mammifères et qu'un développement embryonnaire normal requiert obligatoirement la présence d'un génome paternel marqué d'une empreinte paternelle et d'un génome maternel marqué d'une empreinte maternelle.

L'établissement des différences épigénétiques entre les deux chromosomes parentaux a lieu au cours de la gamétogenèse mâle et femelle. Ce phénomène est précédé par un effacement de l'empreinte des parents par perte de la méthylation différentielle de l'ADN, dans les cellules germinales primordiales (PGC); les nouvelles empreintes seront établies selon le sexe du nouvel embryon (Hajkova et coll 2002) donc différemment selon qu'il s'agit de la spermatogenèse ou de l'ovogenèse.

Étant donné que la majorité des gènes soumis à empreinte joue un rôle clé dans le développement embryonnaire ainsi que dans la formation des feuillets embryonnaires (Morison et coll 2005), une altération de l'empreinte entraînant une modification de l'expression de ces gènes aura pour conséquence possible un arrêt et/ou une perturbation du développement. Plusieurs études réalisées chez l'homme et chez l'animal montrent des dérégulations épigénétiques dans la descendance, suite à l'utilisation des techniques d'assistance médicale à la procréation, suggérant qu'elles interfèrent avec la reprogrammation de l'épigénome (DeBaun et coll 2003, Gicquel et coll 2003, Maher et coll 2003, Bowdin et coll 2007).

Les études réalisées jusqu'à présent concernant l'effet des dérégulations de l'empreinte sur le développement de l'embryon ont ciblé en majorité le développement post-implantatoire (Kobayashi et coll. 2009) et post natal (Chopra et coll. 2010).

Deux hypothèses sont possibles quant à l'origine de ces anomalies constatées chez les enfants nés après AMP : la première est que ces anomalies préexistaient dans les gamètes avant la fécondation, potentiellement liées à la cause de l'infertilité. La seconde est que ces

dérégulations sont la conséquence des manipulations *in vitro* des gamètes et/ou des embryons (Grace et coll 2009). En effet, les causes d'échec du développement chez l'homme sont très largement méconnues. Dans la mesure où plusieurs gènes indispensables au bon développement embryonnaire sont soumis à empreinte parentale, et que l'embryon préimplantatoire subit un intense remodelage épigénétique, il nous a semblé pertinent de vérifier l'état de cette empreinte dans les embryons en échec de développement, afin d'évaluer le lien éventuel entre arrêt du développement et altération de l'empreinte. Nous avons pour cela choisi d'analyser le profil de méthylation de H19DMR qui régule l'expression des gènes H19 et IGF2 dans des blastocystes contrôles et dans des embryons bloqués après culture prolongée à différents stades (morula, morula compactée, préblastocyste) ou atypiques ayant atteints le stade blastocyste (J5-J6) mais avec une mauvaise qualité morphologique donc non transférables (Grade B, C selon la classification de Gardner voir chapitre I-E-b). L'autorisation d'utiliser des embryons préimplantatoires pour la recherche nous a été accordée par l'Agence de la Biomédecine le 20 juin 2008.

Afin de vérifier la première hypothèse, c'est-à-dire que les dérégulations observées dans les embryons pourraient préexister dans les gamètes, nous avons analysé le profil de méthylation de H19DMR dans les spermatozoïdes des géniteurs des embryons analysés ayant servi à la microinjection le jour de l'ICSI ainsi que dans des ovocytes dans les quelques cas où ils étaient disponibles.

## **Discussion et perspectives :**

Après la fécondation qui consiste en la fusion de deux cellules hautement différenciées l'ovocyte et le spermatozoïde donnant un zygote, il est indispensable de retrouver l'état de totipotence dans la phase préimplantatoire de l'embryogenèse, afin d'assurer un développement embryonnaire normal (Santos et coll 2002). Cette restauration de la totipotence est assurée par la vague de déméthylation du génome après la fécondation permettant une équivalence de l'état épigénétique des cellules des deux sexes avant leur différenciation. Les gènes soumis à empreinte, malgré cette vague de déméthylation du génome, maintiennent leur méthylation différentielle (Reik et coll 2001). Ce maintien est essentiel pour le bon développement embryonnaire puisque ces gènes sont largement impliqués dans la régulation de la croissance et du développement foetale ainsi que dans celle des annexes (Renfree et coll 2008).

Plusieurs études soulignent l'importance du maintien de l'empreinte puisque elles rapportent des malformations ainsi qu'un arrêt du développement embryonnaire en cas d'anomalie affectant ce processus du maintien de l'empreinte. Ono et coll montrent des déformations au niveau du placenta à l'origine d'une létalité embryonnaire en cas de délétion du gène Peg10 (Ono et coll 2006). Une hypométhylation de l'allèle maternel du gène KCNQ1OT1 est observée dans les tissus extra-embryonnaires d'embryons issus d'avortements spontanés (Sazhenova et coll 2008). La perte de la méthylation au niveau de la DMR du gène KCNQ1OT1 est impliquée dans 50% des cas de BWS, et les patients atteints de BWS possèdent un risque 1000 fois plus important de développer des tumeurs embryonnaires (Diaz-Meyer et coll 2005).

Dans la littérature, les études concernant l'effet de la dérégulation de l'empreinte ont surtout analysé les stades post-implantatoire et post natal. Aujourd'hui l'état de l'empreinte parentale, le mécanisme du maintien de la méthylation des gènes soumis à empreinte ainsi que l'effet de la dérégulation au niveau de ces gènes au début du développement restent très peu connus en particulier chez l'homme. Chez la souris, KvDMR1 maintient sa méthylation différentielle au cours de la phase préimplantatoire (Lewis et coll 2006). Chez l'homme, l'allèle maternel du gène SNRPN conserve sa méthylation au cours du développement embryonnaire (Geuns et coll 2003). Toutefois, Geuns et coll notent des profils de méthylation hétérogènes au niveau du gène SNRPN chez des embryons en arrêt de développement (Geuns et coll 2003). Dans une autre étude cette même équipe détectait aussi un maintien du marquage épigénétique de la

DMR du gène DLK1-GTL2 soumis à empreinte dans des embryons au stade préimplantatoire issus d'ICSI présentant une morphologie normale jusqu'au deuxième stade de clivage, mais montrait la présence d'un état intermédiaire de « relaxation » dans les stades qui suivent (Geuns et coll 2007).

En AMP, quand les embryons sont mis en culture prolongée en vue d'un transfert de blastocyste à J5-J6 post-fécondation, ils peuvent présenter un blocage dans leur développement caractérisé par un arrêt au stade de morula, morula compactée ou préblastocyste à J7 post-fécondation, ou bien atteindre le stade blastocyste mais présenter des déformations au niveau du trophoctoderme et/ou de la masse cellulaire interne, ces embryons sont dits « atypiques ». Normalement, vers J5-J6 post-fécondation, l'embryon atteint le stade blastocyste, il est formé par les cellules de la masse interne, qui forment le bouton embryonnaire (ICM pour Inner cell mass) et qui donneront naissance à l'embryon proprement dit et des cellules périphériques formant le trophoctoderme ou le trophoblaste qui seront à l'origine des structures extra-embryonnaires telle que le placenta et le cordon ombilical. La cause du retard de développement ou des malformations reste à présent méconnue, des dérégulations au niveau des gènes soumis à empreinte pourraient être impliquées, en particulier la DMR des gènes *Igf2/H19*.

En effet, ce locus contrôle de façon opposée deux gènes H19 qui code pour un ARN non transcrit ayant un rôle de suppresseur de tumeur et exprimé à partir de l'allèle maternel (Yoshimizu et coll 2008) et IGF2 (Insulin Growth Factor 2) qui code pour un facteur de croissance essentiel au développement et qui s'exprime à partir de l'allèle paternel.

H19DMR contient des sites de fixation pour la protéine CTCF (CCCTC-Binding factor) qui contrôle *en cis* l'expression de H19 et *Igf2* (Hark et coll 2000, Kandouri et coll 2000). Elle joue le rôle d'une protéine insulatrice capable de constituer des barrières au sein d'une unité transcriptionnelle. Sur l'allèle maternel H19DMR est non méthylée, ce qui permet à CTCF de se lier à ses sites de reconnaissance et d'isoler ainsi le promoteur d'*Igf2* de l'amplificateur, en conséquence *Igf2* est réprimé et H19 est exprimé. Par contre sur l'allèle paternel H19DMR est méthylée empêchant ainsi CTCF de se lier à l'ADN, ce qui permet à l'amplificateur d'accéder au promoteur d'*Igf2* qui sera exprimé alors que H19 sera réprimé.

Des dérégulations au niveau de H19DMR sont détectées après culture *in vitro* par plusieurs études. Une expression altérée des gènes H19, *Igf2* et *Grb10*, soumis à empreinte a été

observée chez les fœtus issus de blastocystes produits par culture *in vitro* (Kholza et coll 2001). Dans une autre étude, certains blastocystes mis en culture *in vitro* présentaient une expression biallélique du gène H19 corrélée à une perte de la méthylation sur l'allèle paternel (Doherty et coll 2000).

Étant donnée la sensibilité de l'empreinte au niveau de ce gène à la culture *in vitro* et son implication dans la croissance et le développement embryonnaire, et afin de détecter un lien éventuel entre défaut d'empreinte et arrêt ou retard du développement préimplantatoire, nous avons choisi d'analyser par la méthode de mutagenèse de l'ADN au bisulfite de sodium le profil de méthylation de H19DMR dans des embryons en retard, atypiques et contrôles issus d'ICSI.

Ensuite, afin de vérifier si une dérégulation dans l'empreinte de ce gène préexistait dans les gamètes nous avons procédé au même type d'analyse par mutagenèse au bisulfite de sodium de l'ADN des spermatozoïdes des géniteurs des embryons analysés auparavant ainsi que dans des ovocytes selon la disponibilité des échantillons.

Au total 33 embryons d'ICSI issus de 11 couples pour indications diverses, féminines et masculines, avec une induction ovarienne selon un protocole long pour toutes les patientes ont été inclus dans notre étude. Les embryons sont donnés pour la recherche avec le consentement éclairé des parents par le service de Biologie de la Reproduction de l'Hôpital Femme Mère Enfant (Bron-Lyon).

Parmi les embryons, 5 correspondaient à des embryons normaux, sans projet parental et seront considérés comme des embryons contrôle, 13 étaient bloqués au stade de morula compactée, 2 au stade morula, 5 au stade préblastocyste et 8 étaient des embryons atypiques, BC selon la classification de Gardner. L'ADN de chaque embryon traité au bisulfite de sodium permet de réaliser 5 PCR indépendantes afin de pouvoir analyser le maximum d'allèles différents. Étant donné que environ 75% de l'ADN est détruit après ce traitement, nous avons considéré que deux profils identiques issus d'une même PCR correspondaient à un seul allèle, alors que deux profils identiques issus de deux PCR différentes correspondaient à deux allèles distincts.

Les ovocytes étudiés, au nombre de 15 provenaient de deux patientes et sont répartis comme suit : 1 VG, 12 MI et 2 MII qui ont atteint le ce stade après la sélection des ovocytes mûrs pour l'ICSI. Notre étude à inclus aussi 11 spermatozoïdes ayant subi un traitement par gradient de



densité dans le but de sélectionner des spermatozoïdes mobiles, de bonne morphologie qui seront utilisés en ICSI. A partir du culot de spermatozoïdes, l'ADN spermatique est extrait selon une méthode standard au phénol/chloroforme puis traité au bisulfite de sodium comme préalablement décrit dans l'article.

Le fragment de H19DMR amplifié et séquencé porte le 6<sup>ème</sup> site de liaison de la protéine CTCF (cggaagtggccgcgcgcg). Il est long de 234 pb et comporte 18 dinucléotides CpG; en son sein, un polymorphisme (SNP) a été identifié: A/C à la position 6236. Nous avons choisi de représenter (Figure 1A et B) en bleu les allèles portant le polymorphisme A en 6236 et en noir ceux portant le polymorphisme C à la même position. Les résultats du séquençage montrent donc l'existence de deux profils alléliques, soit l'allèle porte un C en position 6236, soit un A, aussi bien dans les gamètes que dans les embryons normaux ou en échec de développement.

L'analyse du pool de deux spermes d'hommes fertiles révèle la présence des deux profils relatifs au SNP 6236, A et C et un taux de méthylation de H19DMR élevé (94.01%). Dans les 11 spermes analysés correspondant aux embryons en retard ou atypiques, on note un profil méthylé normal avec un pourcentage de CpG méthylés de  $95.16\% \pm 2.61$ , comparable à celui retrouvé dans les deux spermes d'hommes fertiles. Parmi les 11 spermes, six étaient homozygotes, 3 porteurs du polymorphisme A en 6236, 3 porteurs du polymorphisme C en 6236 et 5 hétérozygotes présentant deux types d'allèles, C et A.

La présence du SNP A/C en position 6236 nous a permis, dans la plupart des embryons, en comparant les profils des embryons avec ceux des gamètes correspondants, de distinguer l'allèle paternel de l'allèle maternel. Parmi les 5 embryons contrôles analysés, 4 sont hétérozygotes pour le SNP 6236, la méthylation marquant vraisemblablement l'allèle paternel étant associée à l'un des profils, par exemple 6236-A, et l'hypométhylation, signant vraisemblablement un allèle maternel, étant associée à l'autre profil, 6236-C dans l'exemple (Figure 1A et 1B). Nos résultats confirment donc ceux trouvés chez la souris ayant montré que H19DMR est bien différentiellement méthylée dans les embryons préimplantatoires conçus par AMP. Notre équipe, dans une analyse parallèle de H19DMR et KvDMR dans des blastocystes atypiques issus d'ICSI, confirme également que ces deux locus sont différentiellement méthylés chez l'homme (Khoueir et coll 2009 article soumis).

L'analyse du sperme a permis, dans 21 embryons en retard ou atypiques parmi les 28 étudiés, de différencier l'allèle paternel de l'allèle maternel (Figure 1A et 1B). Par contre, parmi ces 21 embryons en échec de développement, nos résultats montrent un relâchement significatif de l'empreinte paternelle de H19DMR dans 8 embryons, avec des allèles d'origine paternelle soit partiellement soit totalement hypométhylés.

Cette hypométhylation significative de l'allèle paternel dans 38% des cas intervient indépendamment du stade de blocage. Les autres embryons ont un profil normal de l'allèle paternel ce qui suggère qu'une dérégulation de l'empreinte de H19DMR régulant les gènes H19/IGF2 ne peut pas être à elle seule tenue pour responsable du blocage ou du retard de développement des embryons au stade préimplantatoire. L'hypothèse d'une anomalie préexistante dans les gamètes n'a pas été vérifiée dans ces cas, puisque les spermatozoïdes ayant permis la fécondation à l'origine de ces embryons présentaient un profil normalement hyperméthylé. Pourtant, plusieurs études d'autres équipes révèlent des dérégulations au niveau de l'empreinte dans la descendance héritée des gamètes des parents (Fauque et coll 2007, Market-Velker et coll 2010).

Cependant, cette hypothèse d'anomalies transmises par les gamètes avait été également soulevée dès les premiers résultats obtenus par notre équipe concernant l'empreinte au niveau ovocytaire. En effet, nous avons pu mettre en évidence dans des ovocytes au stade MII, issus de femmes superovulées une hypométhylation au niveau du gène KCNQ1OT1 qui pourrait être transmise aux embryons (Khoueiry et coll 2008). L'étude de Borghol et coll (2006) a montré des dérégulations de l'empreinte de H19DMR au niveau des ovocytes des femmes superovulées, en particulier au niveau du site de fixation de CTCF.

L'étude récente de Kobayashi et coll (2009) a analysé 7 loci soumis à empreinte, H19, GTL2, PEG1, KCNQ1OT1, ZAC, PEG3 et SNRPN dans des produits d'avortement après recours à l'AMP ou après grossesses spontanées et dans des ADN spermatiques des géniteurs. Cette équipe note la présence de dérégulations de l'empreinte paternelle dans H19 et GTL2 qu'elle retrouve dans les spermatozoïdes correspondants. Une autre étude récente montre une dérégulation de l'empreinte paternelle de H19/IGF2 chez un cas de syndrome de Silver-Russel conçus par ICSI utilisant des spermatozoïdes prélevés chirurgicalement au niveau testiculaire (Chopra et coll 2010).

Certes, dans notre étude aucun des spermatozoïdes analysés, quel que soit ses caractéristiques (normozoospermique, oligoasthénospermique), ne montre d'altération du profil méthylé de H19DMR suggérant que les anomalies retrouvées dans les embryons en retard ou atypiques ne peuvent pas être transmises par les spermatozoïdes. Mais devant le faible nombre d'échantillons analysés dans notre étude cette hypothèse ne peut pas être complètement écartée d'autant que plusieurs études mettent en évidence une hypométhylation au niveau de H19DMR dans les spermatozoïdes des hommes infertiles (Boissonnas et coll 2009, Marques et coll 2008, Poplinski et coll 2009).

L'autre hypothèse qui pourrait expliquer la dérégulation de l'empreinte paternelle au niveau des embryons en retard ou atypique serait un défaut de maintien de cette empreinte dans les embryons au stade préimplantatoire. Un rôle important joué par DNMT1 a été suggéré dans le maintien du marquage des gènes soumis à empreinte au cours du développement embryonnaire préimplantatoire. Hirasawa et coll montrent qu'une délétion touchant *Dnmt1s* et *Dnmt1o* serait à l'origine d'une perte de la méthylation de plusieurs gènes soumis à empreinte dans des blastocystes de souris (Hirasawa et coll 2008). Notre équipe a mis en évidence une expression normale de DNMT1 dans des embryons atypiques avec perte de méthylation du gène *KCNQ1OT1* mais n'a pas démontré l'existence d'une protéine en quantité normale et fonctionnelle, ce qui reste indispensable à vérifier avant d'affirmer qu'une altération de l'expression de DNMT1 n'est pas responsable de l'hypométhylation observée (Khoueiry et coll 2010, article soumis). Il est aussi important d'étudier les autres facteurs intervenant dans le maintien de l'empreinte comme celui dont l'implication a été récemment démontrée, MBD3 qui joue un rôle dans le maintien de l'empreinte paternelle de H19DMR, ainsi que dans la répression de l'allèle paternel de H19 (Reese et coll 2007). La protéine PGC7/Stella pourrait également être impliquée, puisque les embryons ayant une délétion pour le gène *PGC7/Stella* perdent la méthylation d'au moins cinq DMRs, en particulier au niveau de H19DMR (Nakamura et coll 2007). Les résultats de ces études suggèrent que plusieurs facteurs joueraient un rôle dans le maintien de la méthylation des gènes soumis à empreinte au début du développement, et que certains facteurs seraient spécifiques du maintien de la méthylation de certains gènes et pas d'autres. L'analyse du taux d'expression de ces différents facteurs au niveau des embryons à différents stades de blocage ou atypique ainsi que des embryons normaux serait nécessaire pour vérifier ou non leur implication dans les altérations du maintien de la méthylation.

Cette déméthylation dans des embryons mis en culture à été rapportée par plusieurs études, Young et coll rapportent dans des embryons ovins mis en culture jusqu'au stade blastocyste une forte diminution de la méthylation au niveau de l'ICR du gène *Igf2R* (Young et coll. 2001). Selon Gardner et coll (2005), la présence d'ammonium dans les milieux de culture d'embryons pré-implantatoires serait liée à des dérégulations de l'empreinte parentale. Une étude récente contredit ces propos en montrant que l'accumulation d'ammonium et l'utilisation d'huile pour la culture *in vitro* ne dérégule pas le maintien de la méthylation des gènes *Snrpn*, *Igf2r* et *H19* dans les embryons de souris (Anckaert et coll. 2009). La différence de résultats entre ces différentes équipes est peut-être due à des différences de conditions et de système de culture utilisés.

Dans le cas de deux embryons, 5.4 et 33.3, nous avons pu analyser le sperme et les ovocytes. Dans le cas de l'embryon 5.4, le père est homozygote 6236-C alors que la mère est hétérozygote 6236-C/A, ce qui permet de distinguer l'allèle d'origine paternelle, forcément 6236-C, de l'allèle d'origine maternelle, 6236-A dans l'embryon en question (Figure 1A). Les allèles d'origine maternelle sont normalement hypométhylés alors que les allèles d'origine paternelle sont significativement hypométhylés ( $p < 0.001$ ). L'hypométhylation des copies d'origine paternelle n'est pas, comme précédemment discutée, transmise par le sperme qui présente un taux de méthylation de 96,66%. Par contre, si l'analyse de 2 ovocytes au stade MII, porteurs du polymorphisme 6236-A, montre des allèles normalement déméthylés, l'analyse d'un ovocyte au stade VG montre des allèles porteurs du polymorphisme 6236-C hyperméthylés. Ces résultats sont en adéquation avec ceux précédemment publiés (Borghol et coll. 2006) mettant en évidence une hyperméthylation significative des ovocytes n'ayant pas achevé leur méiose le jour du recueil.

Concernant l'embryon 33.3, l'analyse de 12 ovocytes en MI a montré que les ovocytes sont hétérozygotes et présentent deux profils alléliques, des allèles 6236-A normalement hypométhylés et des allèles 6236-C fortement méthylés. Le sperme correspondant est également hétérozygote 6236-C/A et hyperméthylé. L'hétérozygotie des deux parents rend l'identification de l'origine des allèles dans l'embryon moins aisé. Cependant, pour l'allèle porteur du SNP 6236-A nous avons analysé deux séquences hyperméthylées porteuses d'un T en position 6194, correspondant au 7<sup>ème</sup> CpG. Or, cette particularité est retrouvée dans tous les allèles du sperme porteurs du polymorphisme 6237-A. Ajoutés au fait que dans l'embryon 33.3, les allèles 6236-A sont hyperméthylés comparés aux allèles 6236-C, on peut

raisonnablement spéculer que les allèles 6236-A sont hérités du père (Figure 2). Auquel cas, on note une hypométhylation significative des allèles paternels ( $p < 0.001$ ). Dans cette hypothèse, les allèles 6236-C seraient d'origine maternelle et présenteraient une hyperméthylation anormale significative ( $p < 0.001$ ). Cette méthylation touchant l'allèle maternel a été aussi constatée dans 8 autres embryons avec des pourcentages variables, comme par exemple l'embryon 52.2 qui présente 20.14% de CpG méthylés au niveau des allèles d'origine maternelle.

Les résultats des couples 5 et 33 permettent de spéculer quand à l'origine de la méthylation de H19DMR dans les ovocytes; deux hypothèses sont envisageables : soit cette méthylation est héritée, correspondant à une absence d'effacement de l'empreinte sur les allèles d'origine paternelle au niveau des PGC, soit elle correspond à une méthylation *de novo* anormale au cours de l'ovogenèse, lorsque l'empreinte maternelle est mise en place. Cette deuxième hypothèse semble peu vraisemblable, car une méthylation *de novo* des allèles procéderait au hasard, et en cas d'hétérozygotie de la mère, elle marquerait indifféremment les allèles 6236-C et 6236-A, ce qui n'est pas le cas. Dans les ovocytes des couples 5 et 33, seuls les allèles portant le même polymorphisme étaient méthylés (les allèles 6236-C dans les deux exemples). Reste donc l'hypothèse d'un défaut d'effacement de l'empreinte paternelle au tout début du développement, dans ce cas les allèles méthylés seraient d'origine paternelle comme nous en faisons l'hypothèse dans la figure 3.

Si notre hypothèse est juste, dans l'embryon 33.3 le profil de H19DMR est paradoxalement déméthylé au niveau des allèles paternels et méthylé au niveau des allèles maternels. Globalement, une hypométhylation au niveau d'un allèle parental peut être compensée par l'hyperméthylation de l'autre allèle parental ; ce phénomène a été rapporté par Market-Velker et coll. (2010) qui observent un gain de méthylation au niveau de H19DMR maternelle et une perte de méthylation au niveau de l'allèle paternel dans des embryons issus de souris superovulées, mais l'expression de *Igf2* n'a pas été étudié dans ces embryons pour vérifier que l'expression globale du gène n'était pas affectée.

Dans ce travail nous avons pu montrer une dérégulation de l'empreinte de H19DMR aussi bien paternelle que maternelle dans certains embryons bloqués ou en retard alors que ceux à développement normal étaient correctement et différenciellement méthylés.

Deux mécanismes possibles ont été suggérés : un défaut d'effacement de l'empreinte paternelle dans la lignée germinale femelle et un défaut de maintien de l'empreinte paternelle au cours du développement embryonnaire préimplantatoire.

Les conséquences les moins problématiques de ces anomalies touchant les gènes soumis à empreinte impliqués dans l'embryogenèse précoce, seraient l'échec de fécondation et du développement embryonnaire ce qui réduirait l'efficacité des procédures d'AMP mais sans conséquence à long terme. Plus inquiétante sont les maladies d'empreinte décrites après AMP qui mettent en lumière la possible relation entre troubles de l'épigenèse et reproduction assistée, mais elles restent des cas sporadiques dont le lien de causalité n'est pas encore définitivement établi et l'infertilité elle-même pouvant être un facteur déclenchant ou favorisant (Anastasiou et Mandelbaum 2006).

# CONCLUSION GÉNÉRALE

## ET PERSPECTIVES :

En réponse à des programmes génétiques et épigénétiques orchestrés avec précision, les tissus et les organes sont façonnés, alternant prolifération, différenciation et apoptose. De nombreuses études ont montré que le programme épigénétique est crucial au cours du développement et que sa stabilité est essentielle pour le maintien des fonctions de chaque type cellulaire au cours de la vie d'un organisme. En effet, la cellule transmet à sa descendance outre le programme génétique ayant comme support la séquence d'ADN, un programme épigénétique sous forme de « code épigénétique » qui va permettre à certains gènes de s'exprimer alors que d'autres restent silencieux, de manière transitoire ou permanente.

Ce marquage épigénétique au niveau de chaque cellule est réversible, il est susceptible d'être modifié par des facteurs environnementaux menant parfois au développement de phénotypes anormaux. L'implication des altérations épigénétiques dans diverses maladies et syndromes ne fait plus aucun doute. Le génome cellulaire subit une reprogrammation épigénétique qui se déroule au cours de deux périodes majeures : la gamétogenèse et le début du développement embryonnaire. Le bon déroulement de cette reprogrammation est important, des perturbations au niveau de ce processus sont impliqués dans différentes maladies comme le cancer, BWS, SRS, AS, etc. Les techniques utilisées par l'assistance médicale à la procréation (AMP) impliquent la manipulation des gamètes et des embryons pendant ces périodes de remaniement épigénétique, présentent donc un risque de perturber cette reprogrammation.

En effet, dès l'introduction de la FIV et surtout depuis celle de l'ICSI, s'est posée la question de l'innocuité de ces méthodes. Ces technologies de l'AMP n'ont cessé d'innover et de se développer. Elles ont d'abord utilisé des gamètes produits *in vivo* après stimulation hormonale. Puis elles se sont aventuré plus loin, en essayant à la maturation *in vitro* des gamètes, en particulier le développement de la maturation *in vitro* des ovocytes du stade vésicule germinative au stade métaphase II. Le développement de ces dernières technologies de l'AMP sans qu'il y ait eu au préalable d'études approfondies chez l'animal a ouvert un débat concernant la sécurité de leur usage en clinique humaine. L'évaluation de l'innocuité de ces techniques et manipulations vis-à-vis de l'épigénome s'est avéré nécessaire après que des études récentes aient suggéré un lien entre le recours à l'AMP et une fréquence accrue d'erreurs épigénétiques et des syndromes liées à ses dérégulations (BWS, AS, etc).

La première partie de notre travail a consisté à évaluer l'impact de la maturation *in vitro* et de la stimulation hormonale sur la mise en place et le maintien de la méthylation du gène soumis à empreinte maternelle KCNQ1OT1 dans des ovocytes humains. Nos résultats ont montré que la mise en place de la méthylation au niveau de KvDMR1 se fait tout au long de la maturation de l'ovocyte chez la femme *in vivo* et *in vitro* avec une différence significative entre le taux de méthylation des ovocytes MII mûris *in vivo* et ceux mûris *in vitro* pendant 28h. Notre étude incite à la prudence vis-à-vis de la stimulation hormonale, puisque nos résultats montrent un taux de méthylation de KvDMR1 significativement plus faible dans les VG et MI issus de cycle stimulés et mûris *in vitro* par rapport à des VG et MI issus de cycles naturels et mûris *in vitro* (28h). Néanmoins, il serait nécessaire d'analyser le profil de méthylation de KvDMR1 dans des ovocytes mûris *in vitro* pendant une période d'au moins 36h (durée physiologique), afin de mieux comprendre l'effet de la durée de la culture *in vitro* des ovocytes sur la mise en place de l'empreinte parentale.

A ce jour, les études menées sur la mise en place de l'empreinte parentale au cours de la gamétogenèse montrent des différences. Chez la souris Obata et Kono ont montré que l'établissement de l'empreinte du gène Peg1 s'effectue au stade préantral (Obata et coll 2002). Imamura lui suggère que le gène Peg1 reçoit sa méthylation définitive après l'ovulation de l'ovocyte et avant la fécondation (Imamura et coll 2005). Dans l'espèce humaine, les résultats sont contradictoires concernant la mise en place de la méthylation du gène SNRPN : alors qu'El-Maarri et coll suggèrent que l'établissement de l'empreinte du gène SNRPN dans l'ovocyte humain n'est complet qu'après la fécondation (El-Maari et coll 2001), l'équipe de Geuns et coll montrent que la méthylation de SNRPN est complètement établie au stade VG des ovocytes (Geuns et coll. 2003). Le gène KCNQ1OT1 chez l'homme a aussi fait l'objet de deux études aboutissant à des résultats différents. Geuns et coll en 2007 montrent que la mise en place de l'empreinte au niveau des ovocytes de KvDMR1 est déjà acquise au stade vésicule germinative. Par contre, nos résultats montrent que la mise en place de la méthylation au niveau de KvDMR1 dans les ovocytes s'étale tout au long de leur croissance jusqu'au stade Métaphase II (Khoueir et coll 2008). Cette divergence de résultats entre les équipes peut être due à la différence des régions étudiées, ce qui suggère qu'il y aurait au niveau des DMR des gènes soumis à empreinte plusieurs sous-régions dont le marquage épigénétique s'effectuerait à des temps différents de l'ovogenèse. Un tel asynchronisme dans la mise en place de la méthylation a été évoqué et prouvée par Lopes et coll (2003) qui rapportent une cinétique de mise en place de la méthylation différente entre la DMR1 et la DMR2 du locus Igf2/H19. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser au niveau des



ovocytes à différents stades de la gaméto-genèse la méthylation de plusieurs régions appartenant au même gène soumis à empreinte.

La maturation *in vitro* a ouvert la voie à la cryopréservation, en particulier par vitrification d'ovocytes recueillis immatures au stade VG chez des patientes qui devaient subir un traitement stérilisant par chimiothérapie ou radiothérapie. Après dévitrification la culture *in vitro* pendant une période de 36h permet à ces ovocytes d'atteindre le stade MII ; c'est l'une des applications importantes de la MIV. Cette technique innovante, permet de contourner le risque potentiel de dérèglement du fuseau mitotique induit par la cryopréservation d'ovocytes au stade MII. Elle permet également de résoudre le problème éthique de la congélation d'embryons. Notre équipe a choisi d'analyser l'impact éventuel de cette nouvelle technique de l'AMP sur la mise en place et le maintien du marquage de deux gènes soumis à empreinte, l'une maternelle (KCNQ1OT1) et l'autre paternelle (Igf2/H19) dans des ovocytes vitrifiés au stade VG, dévitrifiés et mûris *in vitro* (Al-Khtib et coll 2010 article soumis). En effet, la vitrification nécessite l'utilisation d'agents cryoprotecteurs à des concentrations très élevées (5 à 7 M) pour atteindre l'état vitreux pendant la descente en température et son maintien pendant la remontée en température. La présence des agents cryoprotecteurs pourraient présenter un risque éventuel de dérégulation au niveau de la méthylation des gènes soumis à empreinte.

Aujourd'hui l'état de l'empreinte parentale, le mécanisme du maintien de la méthylation des gènes soumis à empreinte ainsi que l'effet de la dérégulation au niveau de ces gènes au début du développement restent très peu connus en particulier chez l'homme. Nous avons alors choisis en deuxième partie d'étudier le maintien de l'empreinte parentale de H19DMR au niveau de blastocystes humains contrôlés (hors projet parentale) et en retard (morula, morula compacté, préblastocyste à J7 post fécondation) ou atypiques (blastocyste de grade BC).

Dans les embryons contrôlés nos résultats confirment ceux retrouvés chez la souris ayant montré que H19DMR est différentiellement méthylée dans les embryons préimplantatoires conçus par AMP. C'est le cas également des résultats trouvés précédemment par notre équipe lors de l'analyse de H19DMR et KvDMR dans des blastocystes atypiques issus d'ICSI qui montrent que ces deux locus sont différentiellement méthylés (Khoueiry et coll 2010 article soumis).

Dans les embryons en retard ou atypiques, nos résultats suggèrent qu'une dérégulation de l'empreinte au niveau de H19DMR ne peut pas être à elle seule responsable du blocage ou du retard de développement au stade préimplantatoire puisque ce profil était normalement et différentiellement méthylé dans d'autres embryons en retard ou atypiques. L'hypothèse d'une

anomalie préexistante dans les gamètes n'a pas été vérifiée dans les embryons avec hypométhylation au niveau de H19DMR, puisque les spermatozoïdes ayant permis la fécondation à l'origine de ces embryons présentaient un profil normalement hyperméthylé. Mais devant le faible nombre d'échantillons analysés dans notre étude cette hypothèse ne peut pas être complètement écartée d'autant plus que plusieurs études mettent en évidence une hypométhylation au niveau de H19DMR dans les spermatozoïdes des hommes infertiles (Boissonnas et coll 2009, Marques et coll 2008, Poplinski et coll 2009). Une défaillance du mécanisme de maintien de l'empreinte au cours de la culture *in vitro* des embryons est une hypothèse plausible dans notre cas. En effet, cette déméthylation dans des embryons mis en culture a été rapportée par plusieurs études (Young et coll 2001, Gardner et coll 2005)

Un profil H19DMR paradoxalement déméthylé au niveau des allèles paternels et méthylé au niveau allèles maternels a été retrouvé dans un embryon. L'analyse des ovocytes de la mère dans ce cas suggère un défaut d'effacement de l'empreinte maternelle au niveau des cellules germinales primordiales hérité du grand père. Les causes d'altérations de l'empreinte semblent donc diverses. Dans le cas des deux embryons pour lesquels nous avons pu analyser les ovocytes de la mère, nous avons observé une hyperméthylation de H19DMR dans des ovocytes immatures bloqués aux stades VG ou MI. Ces résultats confirment ceux d'une précédente étude de notre équipe (Borghol et coll.2006) et mettent en lien défaut de maturation des ovocytes et altération épigénétique. Il est, par ailleurs, intéressant de noter que dans le cas de ces deux embryons, une indication féminine, PCOs en l'occurrence, s'ajoutait à l'indication masculine dans les couples correspondants. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a pu établir de lien de cause à effet entre une cause d'infertilité donnée et une altération de l'empreinte parentale.

L'embryon humain précoce est le siège de très importantes modifications d'ordre épigénétique qui permettent au développement de procéder normalement. Ces modifications comprennent la déméthylation globale du génome au cours des premiers stades du développement pré-implantatoire, puis sa reméthylation suivant l'implantation et des modifications post-traductionnelles des histones qui entraînent autant de modifications de l'organisation de la chromatine. Toute perturbation de la reprogrammation épigénétique peut se traduire par une perturbation voire un arrêt du développement. D'autres altérations d'ordre épigénétique ayant d'autres cibles que les régions régulatrices des gènes soumis à empreinte pourraient jouer un rôle dans l'arrêt du développement des embryons. La méthylation de l'ADN ne se limite pas aux régions régulatrices des gènes soumis à empreinte, elle joue un rôle important dans la régulation de l'expression de nombreux gènes non soumis à empreinte

(méthylation des promoteurs d'Oct4 et Nanog par exemple). L'expression des protéines Oct4 et Nanog est nécessaire à l'acquisition de la pluripotence par les cellules de l'embryon.

Les régions en 5' de ces 2 gènes sont méthylées dans le spermatozoïde alors qu'elles sont hypométhylées dans l'ovocyte et l'embryon préimplantaire où ils sont transcrits (Farthing et coll 2008).

Par ailleurs, dans les embryons clonés, la méthylation résiduelle de l'allèle paternel d'Oct 4 au delà du stade 2 cellules est associée à un retard de développement. Nanog lui joue un rôle dans le cycle cellulaire chez la souris (Zhang et coll 2009). Or, un certain nombre d'embryons humains obtenus par ICSI sont bloqués dans leur développement au stade 2 ou 4 cellules. Pour mettre en lien ces différentes observations et afin d'étudier d'autres facettes des mécanismes épigénétiques et leur implication au niveau du développement, notre équipe a entrepris d'analyser le profil de méthylation et l'expression de Nanog et Oct4 dans des embryons humains au stade 2 et 4 cellules, non évolutifs ou contrôles (autorisation obtenue auprès de l'Agence de la Biomédecine).

Nos résultats confirment que la mise en place et le maintien de l'empreinte est spécifique des gènes et des espèces. La mise en place de l'empreinte au niveau de KvDMR1 se fait sur un temps long et couvre la période de maturation de l'ovocyte, après la reprise de la méiose chez la femme, alors que chez la souris l'empreinte est déjà établie au stade VG. Cependant, la recherche avec du matériel biologique humain (ovocytes et embryons) est limitée pour des raisons éthiques, et parce que le but de l'AMP est le projet parental du couple infertile. Pour cela l'essentiel du matériel biologique est dévolu à ce projet ; ainsi, les ovocytes en MII issus de cycles naturels et mûris *in vitro* ne sont pas accessibles parce qu'ils sont tous utilisés pour être fécondés dans le cadre du projet parental.

Depuis Août 2004, et ce pour une durée de 5 ans, la recherche sur l'embryon (zygote) est permise par la loi en France mais strictement encadrée. Il est par exemple tout à fait illicite de produire des embryons en dehors d'un projet parental. Les projets de recherche sur l'embryon humain sont autorisés par dérogation de l'Agence de la Biomédecine. L'agence examine et autorise les protocoles de recherche proposés par les équipes scientifiques françaises. Elle garantit également l'identification et la traçabilité des embryons humains utilisés pour les recherches. Les travaux autorisés sont strictement encadrés par l'Agence de la Biomédecine qui s'assure, à chaque étape, de leur conformité avec le cadre légal et les règles éthiques, en procédant régulièrement à des inspections. En cas de non respect des conditions d'autorisation, elle peut suspendre ou retirer l'autorisation délivrée, et donc stopper les travaux en cours. Chaque équipe autorisée pour une recherche doit transmettre à l'Agence un

bilan annuel de ses travaux. L'utilisation des embryons humains « surnuméraires », c'est-à-dire ne faisant l'objet d'un projet parental, reste en débat.

Une autre difficulté à laquelle on est confronté quand on travail avec du matériel biologique humain issus de l'AMP, est la multiplicité des facteurs, spécificité de chaque patient et de son environnement, ainsi que des techniques et traitements adaptés à chaque couple en fonction des causes de son infertilité. Cette diversité des facteurs peut avoir un effet sur les marqueurs épigénétiques. Afin de mieux maîtriser ces facteurs et malgré la différence du point de vue épigénétique entre les espèces, il serait intéressant d'analyser dans un modèle animal autre que la souris, comme la brebis par exemple dont la physiologie de l'ovaire est proche de celle de la femme, l'effet de l'AMP sur les mécanismes épigénétiques. Le modèle animal doit être choisi selon l'étude envisagée et le marqueur épigénétique étudié.

La sécurité des techniques de l'AMP reste encore en débat. Un certain nombre d'articles a tiré la sonnette d'alarme en notant une augmentation des cas pathologiques liés à des dérégulations de l'empreinte parentale chez les enfants nés *via* l'AMP. Les conclusions de ces études sont controversées étant donné la faible incidence des maladies en cause, le petit nombre d'échantillons, la diversité des populations et le manque de cas-contrôles.

L'amélioration de la sécurité des techniques de l'AMP exigent : une étude statistique sur une large cohorte d'enfants nés après AMP, une étude moléculaire sur un nombre plus important d'échantillons ainsi que le développement de techniques fiables, reproductibles et non invasives permettant l'analyse de marqueurs de qualité des gamètes et embryons. Ces marqueurs (protéomiques, métaboliques, morphologiques...) devraient permettre un ajustement des conditions techniques de l'AMP en vue d'une meilleure sécurité des procédures. Enfin, un point essentiel serait que l'application clinique de tout nouveau procédé soit précédée d'études approfondies dans un modèle animal adéquat, prenant en compte en particulier l'aspect épigénétique.

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aapola, U., K. Kawasaki, H. S. Scott, J. Ollila, M. Vihinen, M. Heino, A. Shintani, K. Kawasaki, S. Minoshima, K. Krohn, S. E. Antonarakis, N. Shimizu, J. Kudoh and P. Peterson.** "Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family." **Genomics** **2000**; 65(3): 293-8.
- Abu-Amero, S., D. Monk, S. Apostolidou, P. Stanier and G. Moore.** "Imprinted genes and their role in human fetal growth." **Cytogenet Genome Res** **2006**; 113(1-4): 262-70.
- Adams, R. L.** "DNA methylation. The effect of minor bases on DNA-protein interactions." **Biochem J** **1990**; 265(2): 309-20.
- Adenot PG, Szollosi MS, Geze M, Renard JP.** Dynamics of paternal chromatin changes in live one cell mouse embryo after natural fertilization. **Mol Reprod Dev** **1991**; 28:23-24.
- Agger K, Christensen J, Cloos PA, Helin K .** The emerging functions of histone demethylases. **Curr Opin Genet Dev** **2008**; 18:159–68.
- Agius, F., A. Kapoor and J. K. Zhu.** "Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation." **Proc Natl Acad Sci U S A** **2006**; 103(31): 11796-801.
- Allegrucci C, Thurston A, Lucas E, Yong L.** Epigenetic and germline. **Reproduction** **2005**; 129: 137-149.
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY.** Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. **Nature Genet** **1999**; 23:185-8.
- Amor, D. J. and J. Halliday.** "A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies." **Hum Reprod** **2008**; 23(12): 2826-34.
- Anastasiou O, Mandelbaum J.** Risque épigénétique et assistance médicale à la procréation mt **Médecine de la reproduction** **2006**, vol. 8, n° 3 :190-199.
- Anckaert, E., T. Adriaenssens, S. Romero, S. Dremier and J. Smitz.** "Unaltered imprinting establishment of key imprinted genes in mouse oocytes after in vitro follicle culture under variable follicle-stimulating hormone exposure." **Int J Dev Biol** **2009**; 53(4): 541-8.
- Antequera F and Bird A.** Number of CpG-islands and genes in human and mouse. **Proc Natl Acad Sci USA** **1993**; 90: 11995-11999
- Arima, T. and N. Wake.** "Establishment of the primary imprint of the HYMAI/PLAGL1 imprint control region during oogenesis." **Cytogenet Genome Res** **2006**; 113(1-4): 247-52.
- Arnal PP, Dinger ME, Mercer TR, Mattick JS.** The eukaryotic genome as RNA machine. **Sciences** **2008**; 319: 1787-89.
- Athanasiadou R, de Sousa D, Myant K, Merusi C, Stancheva I, Bird A.** Targeting of De Novo DNA Methylation Throughout the Oct-4 Gene Regulatory Region in differentiating Embryonic Stem Cells. **Plos One.** **2010**; 5(4): e9937.
- Bachman KE, Park BH, Rhee I, et al.** Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. **Cancer Cell** **2003** ; 3 : 89-95.
- Baerwald AR, Walker RA and Pierson.RA** "Growth rates of ovarian follicles during natural menstrual cycles, oral contraception cycles, and ovarian stimulation cycles." **Fertil Steril** **2009**; 91(2): 440-9.

- Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, and Kouzarides T.** Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromodomain. **Nature** **2001**; 410:120-124.
- Bartolomei, M. S., A. L. Webber, M. E. Brunkow and S. M. Tilghman** "Epigenetic mechanisms underlying the imprinting of the mouse H19 gene." **Genes Dev** **1993**; 7(9): 1663-73.
- Barnes, F. L., A. Kausche, J. Tiglias, C. Wood, L. Wilton and A. Trounson** "Production of embryos from in vitro-matured primary human oocytes." **Fertil Steril** **1996**; 65(6): 1151-6.
- Bassett SS, et al.** Further evidence of a maternal parent-of-origin effect on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** **2006**; 141:537-40.
- Basatemur E, Sutcliffe A.** Follow-up of children born after ART. **Placenta**. **2008** Oct;29 Suppl B:135-40.
- Baudot A, Mazuer J, Odin J.** Conserver des elements biologiques par vitrification. **Rev Gen Froid** **1998**;981:35-40.
- Baylin SB.** DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat Clin Pract Oncol** **2005**; 2(supp1): S4-11
- Beaujean N, Martin C, Debey P, Renard JP.** Reprogrammation et épigenèse. **Médecine/Sciences** **2005** (21): 412-421.
- Bell, A. C. and G. Felsenfeld.** "Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene." **Nature** **2000**; 405(6785): 482-5.
- Benahmed M, Mauduit C.** La spermatogenèse.P93. **Médecine et biologie de la reproduction, édition Masson, Paris, 2004.**
- Benkhalifa M, Demiroglu A, Ménézou Y, Balashova E, Abduljalil AK, Abbas S, Giakoumakis I, Gurgan T.** Natural cycle IVF and oocyte in-vitro maturation in polycystic ovary syndrome: a collaborative prospective study. **Biomed Online**. **2009** Jan; 18(1):29-36.
- Benkhalifa M., Menezou Y., Janny L. et al.** Cytogenetics of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF programs. **J.Assist. Reprod. Genet.** **1996** : 13, 140-146.
- Bennett, M. T., M. T. Rodgers, A. S. Hebert, L. E. Ruslander, L. Eisele and A. C. Drohat.** "Specificity of human thymine DNA glycosylase depends on N-glycosidic bond stability." **J Am Chem Soc** **2006**; 128(38): 12510-9.
- Bergh T., Ericson A., Hillensjo T., Nygren K. G., Wennerholm U.B.:** Deliveries and children born after invitro fertilisation in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study. **Lancet** **1999**, 354: 1579-1585.
- Bergstrom, R., J. Whitehead, S. Kurukuti and R. Ohlsson.** "CTCF regulates asynchronous replication of the imprinted H19/Igf2 domain." **Cell Cycle** **2007**; 6(4): 450-4.
- Bessodes N, Baskara I, Niang F, Alouane B.** Métylation et reprogrammation épigénétique. **J Scient Biol René Descartes**.**2005** (4):4-10.
- Bestor TH, Tycko B.** Creation of genomic methylation patterns. **Nature Genet** **1996**; 12: 363-7.
- Bestor TH.** Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of Zn binding regulatory domain. **Eur Molec Biol Organ J** **1992**; 11: 2611-2617.
- Bhattacharya, S. K., S. Ramchandani, N. Cervoni and M. Szyf.** "A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA." **Nature** **1999**; 397(6720): 579-83.

- Bhutani N, Brady JJ, Damien M, Sacco A, Corbel SY, Blau HM.** Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependant DNA demethylation. **Nature** 2010, 643: 10421047.
- Bianchi V, Cottichio G, Distratis V, Di Giusto N, Flamigni C, Borini A.** Differential sucrose concentration during dehydration (0.2 mol/l) and rehydration (0.3 mol/l) increases the implantation rate of frozen human oocytes. **Reprod Biomed Online** 2007; 14:64–71.
- Bird A.** DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev** 2002; 16: 6-21.
- Bird A.** Methylation talk between histones and DNA. **Science** 2001; 294: 2113-2115.
- Bird AP et wolffe AP.** Methylation induced repression- belts, braces, and chromatin. **Cell** 1999; 99:451-4.
- Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M.** Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. **Cochrane Database Syst Rev.** 2007 Oct 17;(4):CD002118.
- Blik, J., G. Verde, J. Callaway, S. M. Maas, A. De Crescenzo, A. Sparago, F. Cerrato, S. Russo, S. Ferraiuolo, M. M. Rinaldi, R. Fischetto, F. Lalatta, L. Giordano, P. Ferrari, M. V. Cubellis, L. Larizza, I. K. Temple, M. M. Mannens, D. J. Mackay and A. Riccio.** "Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including PLAGL1 and GNAS loci in Beckwith-Wiedemann syndrome." **Eur J Hum Genet** 2009; 17(5): 611-9.
- Blik, J., P. Terhal, M. J. van den Bogaard, S. Maas, B. Hamel, G. Salieb-Beugelaar, M. Simon, T. Letteboer, J. van der Smagt, H. Kroes and M. Mannens** «Hypomethylation of the H19 gene causes not only Silver-Russell syndrome (SRS) but also isolated asymmetry or an SRS-like phenotype." **Am J Hum Genet** 2006.78(4): 604-14.
- Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A, Tarlatzis BC, Peters C, Henriët S, Mau C, Victorin-Cederquist A, Van Steirteghem A, Balaska A, Emberson JR, Sutcliffe AG.** A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. **Hum Reprod.** 2005 Feb;20(2):413-9. Epub 2004 Dec 2.
- Boissonnas, C. C., H. E. Abdalaoui, V. Haelewyn, P. Fauque, J. M. Dupont, I. Gut, D. Vaiman, P. Jouannet, J. Tost and H. Jammes.** "Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men." **Eur J Hum Genet.** 2009
- Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG.** International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. **Hum Reprod.** 2007.22:1506–12.
- Boonen, S. E., S. Porksén, D. J. Mackay, E. Oestergaard, B. Olsen, K. Brøndum-Nielsen, I. K. Temple and J. M. Hahnemann.** "Clinical characterisation of the multiple maternal hypomethylation syndrome in siblings." **Eur J Hum Genet** 2008; 16(4): 453-61.
- Borghol, N., J. Lornage, T. Blachere, A. Sophie Garret and A. Lefevre.** "Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation." **Genomics** 2006; 87(3): 417-26.
- Borini A, Cattoli M, Bulletti C, Cottichio G.** Clinical efficiency of oocyte and embryo cryopreservation. **Ann N Y Acad Sci** 2008;1127:49–58.
- Bourc'his, D. and T. H. Bestor.** "Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L." **Nature** 2004; 431(7004): 96-9.
- Bowdin, S., C. Allen, G. Kirby, L. Brueton, M. Afnan, C. Barratt, J. Kirkman-Brown, R. Harrison, E. R. Maher and W. Reardon.** "A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders." **Hum Reprod** 2007; 22(12): 3237-40.
- Boyes J, Bird A.** DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. **Cell** 1991;64(6):1123–1134.

- Bradbury BD, Jick H.** In vitro fertilization and childhood retinoblastoma. **Br J Clin Pharmacol** 2004;58 (2):209–211.
- Brannan, C. I., E. C. Dees, R. S. Ingram and S. M. Tilghman.** "The product of the H19 gene may function as an RNA." **Mol Cell Biol** 1990;10(1): 28-36.
- Breart G. DE Mouzon J.** AMP vigilance. **Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine**, 1995.179(8):1759-1764.
- Camus A, Clairaz P, A. Ersham, Van Kappel A L, Savić G, Staub C.** The comparison of the process of five different vitrification devices. **Gynécol Obstét & Fert** 2006 (34): 737–745.
- Cao YX, Chian RC.** Fertility preservation with immature and in vitro matured oocytes. **Semin Reprod Med.** 2009 Nov;27(6):456-64.
- Cao YX, Xing Q, Li L, Cong L, Zhang ZG, Wei ZL, Zhou P.** Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. **Fertil Steril.** 2009 Oct;92(4):1306-11.
- Carthew, R. W. and E. J. Sontheimer.** "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." **Cell** 2009; 136(4): 642-55.
- Cattanach BM, Kirk M.** Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. **Nature** 1985; 315:496-8.
- Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, et al.** Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril** 2000; 5:978–83.
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK.** Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. **Fertil Steril** 1991; 1:109–13.
- Chan, S. W., I. R. Henderson and S. E. Jacobsen.** "Gardening the genome: DNA methylation in Arabidopsis thaliana." **Nat Rev Genet** 2005; 6(5): 351-60.
- Chian RC, Gulekli B, Buckett WM, Tan SL.** Priming with Human Chorionic Gonadotropin before retrieval of immature oocytes in women with infertility due to the polycystic ovary syndrome. **New Engl J of Med** 1999;21:1624–5.
- Chian RC, Lim JH, Tan SL.** State of the art in in-vitro oocyte maturation. **Curr Opin Obstet Gynecol.** 2004 Jun;16(3):211-9.
- Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL.** In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril** 2001; 5:936–42.
- Chopra M, Amor DJ, Sutton L, Algar E, Mowat D.** Russell-Silver syndrome due to paternal H19/IGF2 hypomethylation in a patient conceived using intracytoplasmic sperm injection. **Reprod Biomed Online.** 2010 Jun;20(6):843-847. E
- Cirio, M. C., S. Ratnam, F. Ding, B. Reinhart, C. Navara and J. R. Chaillet.** "Preimplantation expression of the somatic form of Dnmt1 suggests a role in the inheritance of genomic imprints." **BMC Dev Biol** 2008 8: 9.
- Clark SJ, Harisson J and Frommer M.** CpNpG methylation in mammalian cells. **Nature (London) Genet** (1995); 10: 20-27.
- Claus R, Lübbert M.** Epigenetic target in hematopoietic malignancies. **Oncogene** 2003; 22: 6489-96.



**Cobo A, Kuwayama M, Perez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J.** Comparaison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by cryotop method. **Fertil Steril** 2008;89:1657-64.

**Cobo AC, Requena A, Neuspiller F, Aragones M, Mercader A, Navarro J, et al.** Maturation in vitro of human oocytes from unstimulated cycles: sélection of the optimal day for ovum retrieval based on follicular size. **Hum Reprod** 1999;14:1864-8.

**Coticchio G, Bromfield JJ, Sciajno R, et al.** Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. **Reprod Biomed Online** 2009; 19 Suppl 3:29-34.

**Courot M, Hochereau-De Reviers M, Ortavant R.** Spermatogenesis. **Testis** 1970, 1: 339-432.

**Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL and Horsthemke B.** "Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects." **Am J Hum Genet** 2002.71(1): 162-4.

**Csankovszki, G., A. Nagy and R. Jaenisch** "Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation." **J Cell Biol** 2001; 153(4): 773-84.

**Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, et al.** Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. **Science** 2003 ; 299 : 1753-5.

**Czyba JC et Montella A.** Biologie de la reproduction humaine. Sauramps médical. 1993

**Czyba JC, Girod C, Laurent JL.** Embryologie humaine. SIMEP-EDITIONS. France 1971.

**D'Amours D, Desnoyers S, D'silva I, and Poirier GG.** Poly (ADP-ribosyl) ation reactions in the regulation of nuclear functions. **Biochem** 1999; 342: 249-268.

**Das, P. M. and R. Singal.** "DNA methylation and cancer." **J Clin Oncol** 2004; 22(22): 4632-42.

**Davis, T. L., G. J. Yang, J. R. McCarrey and M. S. Bartolomei** «The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development." **Hum Mol Genet** 2000. 9(19): 2885-94.

**DeBaun M, Niemitz E, Feinberg A, et al.** Association of In Vitro Fertilisation with Beckwith-Wiedemann Syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. **Am J Hum Genet** 2003; 72: 156-60.

**DeBaun, M. R., E. L. Niemitz, D. E. McNeil, S. A. Brandenburg, M. P. Lee and A. P. Feinberg** "Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects." **Am J Hum Genet** 2002.70(3): 604-11.

**DeChiara, T. M., E. J. Robertson and A. Efstratiadis** «Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene." **Cell** 1991;64(4): 849-59.

**Deltour S, Chopin V, Leprince D.** Modifications épigénétiques et cancer. **Med Sci** 2005 ; 21 :405-11.

**Delaval, K. and R. Feil.** "Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting." **Curr Opin Genet Dev** 2004, 14(2): 188-95.

**Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF and Hannon GH.** "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." **Nature** 2004; 432(7014): 231-5.

**Dessolle L, de Larouzière V, Ravel C, Berthaut I, Antoine JM, Mandelbaum J.** Congélation lente et vitrification des ovocytes humains matures et immatures. **Gynécol Obstet Fertil** 2009 (37) : 712-719.

- De Araujo CH, Nogueira D, de Araujo MC, Martins Wde P, Ferriani RA, dos Reis RM.** Supplemented tissue culture medium 199 is a better medium for in vitro maturation of oocytes from women with polycystic ovary syndrome women than human tubal fluid. **Fertil Steril.** 2009 Feb;91(2):509-13.
- Diaz-Meyer, N., Y. Yang, S. N. Sait, E. R. Maher and M. J. Higgins.** "Alternative mechanisms associated with silencing of CDKN1C in Beckwith-Wiedemann syndrome." **J Med Genet** 2005; 42(8): 648-55.
- Dindot, S. V., R. Person, M. Strivens, R. Garcia and A. L. Beaudet.** "Epigenetic profiling at mouse imprinted gene clusters reveals novel epigenetic and genetic features at differentially methylated regions." **Genome Res** 2009; 19(8): 1374-83.
- Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomei MS, Schultz RM.** Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. **Biol Reprod** 2000; 62:1526–35.
- Dominguez F, Gadea B, Mercader A, Esteban FJ, Pellicer A, Simón C.** Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system. **Fertil Steril.** 2010 Feb;93(3):774-782.
- Dong A, Yoder JA, Zhang X, Zhou L, Bestor TH and Cheng X.** Structure of DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant-binding to DNA. **Nucleic Acids Res** 2001; 29: 439-448.
- Donnez, J., M. M. Dolmans, D. Demylle, P. Jadoul, C. Pirard, J. Squifflet, B. Martinez-Madrid and A. van Langendonck.** "Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue." **Lancet** 2004.364(9443): 1405-10.
- Doornbos, M. E., S. M. Maas, J. McDonnell, J. P. Vermeiden and R. C. Hennekam.** "Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: a Dutch study." **Hum Reprod** 2007; 22(9): 2476-80.
- Dupont C, Randall Armand D, Brenner CA.** Epigenetics : definition, Mechanisms and clinical perspective. **Semin Reprod Med.** 2009; 27(5): 351-357.
- Durinzi, K. L., E. M. Saniga and S. E. Lanzendorf** "The relationship between size and maturation in vitro in the unstimulated human oocyte." **Fertil Steril** 1995; 63(2): 404-6.
- Edwards RG.** Maturation in vitro of human ovarian oocytes. **Lancet** 1965, Nov(6) :926-9.
- Eggermann, T., K. Eggermann and N. Schonherr.** "Growth retardation versus overgrowth: Silver-Russell syndrome is genetically opposite to Beckwith-Wiedemann syndrome." **Trends Genet** 2008; 24(4): 195-204.
- Eggermann, T., S. Mergenthaler, K. Eggermann, M. B. Ranke and H. A. Wollmann** "Segmental uniparental disomy of 7q31-qter is rare in Silver-Russell syndrome." **Clin Genet** 2001.60(5): 395-6.
- Ehrlich M.** DNA methylation in cancer: too much, but also too little. **Oncogene** 2002; 21: 5400-13.
- El-Maari, O., K. Buiting, E. G. Peery, P. M. Kroisel, B. Balaban, K. Wagner, B. Urman, J. Heyd, C. Lich, C. I. Brannan, J. Walter and B. Horsthemke.** "Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization." **Nat Genet** 2001; 27(3): 341-4.
- Engel, N., J. L. Thorvaldsen and M. S. Bartolomei.** "CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted H19/Igf2 locus." **Hum Mol Genet** 2006; 15(19): 2945-54.
- Engel, N., J. S. Tront, T. Erinle, N. Nguyen, K. E. Latham, C. Sapienza, B. Hoffman and D. A. Liebermann.** "Conserved DNA methylation in Gadd45a(-/-) mice." **Epigenetics** 2009; 4(2): 98-9.

- Esteller M, Avizienyte E, Corn PG, Lothe RA, Baylin SB, Aaltonen LA, et al.** Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. **Oncogene** **2000**; 19: 164-8.
- Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al.** Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. **J Natl Cancer Inst** **2000**; 92 : 564-9.
- Fadini R, Dal Canto MB, Mignini Renzini M, Brambillasca F, Comi R, Fumagalli D, Lain M, Merola M, Milani R, De Ponti E.** Effect of different gonadotrophin priming on IVM of oocytes from women with normal ovaries: a prospective randomized study. **Reprod Biomed Online.** **2009** Sep;19(3):343-51.
- Fahy GM, Wowr B, Wu J, Paynter S.** Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology** **2004**; 48:22-35.
- Fauque P, Jouannet P, Jammes H.** Empreinte parentale et Assistance médicale à la procréation. **Gynécol Obstét & Fertil** **2008**, 36 : 1139–1146.
- Fauque P, Jouannet P, Lesaffre C, Ripoche MA, Dandolo L, Vaiman D, et al.** Assisted reproductive technology affects developmental kinetics, H19 imprinting control region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. **BMC Dev Biol** **2007**; 7:116.
- Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R.** DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. **Semin Cancer Biol** **2002**; 12: 389-98.
- Feinberg, A. P. and B. Tycko** "The history of cancer epigenetics." **Nat Rev Cancer** **2004**. 4(2): 143-53.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein.** "Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers." **Biochem Biophys Res Commun** **1983**; 111(1): 47-54.
- Feki N, Therond P, Couturier M, Legrand A, Jouannet P, et al.** Human sperm lipid content is modified after migration into human cervical mucus. **Mol Human Reprod** **2004** ; 10 :137-42.
- Filali M, Hesters L, Fanchin R, Tachdjian G, Frydman R, Frydman N.** Retrospective comparison of two media for invitro maturation of oocytes. **Reprod Biomed Online.** **2008** Feb;16(2):250-6.
- Filippova, G. N.** "Genetics and epigenetics of the multifunctional protein CTCF." **Curr Top Dev Biol** **2008**;80: 337-60.
- Fitzpatrick, G. V., E. M. Pugacheva, J. Y. Shin, Z. Abdullaev, Y. Yang, K. Khatod, V. V. Lobanenkov and M. J. Higgins.** "Allele-specific binding of CTCF to the multipartite imprinting control region KvDMR1." **Mol Cell Biol** **2007**; 27(7): 2636-47.
- Fitzpatrick, G. V., P. D. Soloway and M. J. Higgins.** "Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1." **Nat Genet** **2002**; 32(3): 426-31.
- FIVNAT Dossier FIVNAT 1996.** Dix ans d'évolution de la FIV en France. 74p. Paris, 1996.
- FIVNAT Dossier FIVNAT 1999.** Bilan général 1994–1998 en France. 54p. Paris, 1999
- FIVNAT Dossier FIVNAT 2002.** Bilan général 1997–2001 en France. 68. Paris, 2003.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, et al.** Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. **Nat Genet** **2005**; 37: 391-400.
- Friedlander RG, Melchior F.** Concepts in sumoylation: a decade on. **Nat Rev Mol Cell Biol.** **2007** (8): 947-956.

- Frommer, M., L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy and C. L. Paul.** "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." **Proc Natl Acad Sci U S A** **1992**; 89(5): 1827-31.
- Frydman R, Hamamah S, Olivennes F.** Les procréations médicalement assistées. Paris: PUF: coll; 1997
- Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L and kouzarides T.** DNA methyltransferase DNMT1 associates with histone deacetylase activity. **Nat Genet** **2000**; 24: 88-91.
- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP and kouzarides T.** The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. **J Biol Chem** **2003**; 278: 4035-4040.
- Fulka, H., M. Mrazek, O. Tepla and J. Fulka, Jr..** "DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos." **Reproduction** **2004**; 128(6): 703-8.
- Gabory A, Dandolo L.** Épigénétique et développement : l’empreinte parentale. **Med Sci** **2005** ; 21 : 390-5.
- Galli-Tsinopoulou, A., E. Emmanouilidou, P. Karagianni, M. Grigoriadou, J. Kirkos and G. S. Varlamis** "A female infant with Silver Russell Syndrome, mesocardia and enlargement of the clitoris." **Hormones** **2008**.7(1): 77-81.
- Gallou-Kabani C, Junien C.** Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: New perspective against the epidemic. **Diabetes** **2005**;54:1899-906
- Garcia, B. A., C. M. Barber, S. B. Hake, C. Ptak, F. B. Turner, S. A. Busby, J. Shabanowitz, R. G. Moran, C. D. Allis and D. F. Hunt** "Modifications of human histone H3 variants during mitosis." **Biochemistry** **2005**.44(39): 13202-13.
- Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB.** Physiology and culture of the human blastocyst. **J Reprod Immunol.** **2002** May-Jun;55(1-2):85-100
- Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J.** A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in vitro fertilization. **Hum Reprod** **1998**;13(12):3434-40.
- Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, Katz-jaffe C, Larman MG.** Analysis of oocyte’s physiology to improve cryopreservation procedures. **Theriogenology** **2007**;67:64–72.
- Gehring, M., J. H. Huh, T. F. Hsieh, J. Penterman, Y. Choi, J. J. Harada, R. B. Goldberg and R. L. Fischer** "DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation." **Cell** **2006**.124(3): 495-506.
- Geiman TM and Robertson KD.** Chromatin remodelling, Histone modifications, and DNA methylation-How does it all fit together? **J Cell Biochem** **2002**; 87:117-125.
- Ge HS, Huang XF, Zhang W, Zhao JZ, Lin JJ, Zhou W.** Exposure to human chorionic gonadotropin during in vitro maturation does not improve the maturation rate and developmental potential of immature oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril.** **2008** Jan; 89(1):98-103.
- Gelato KA, Fischle W.** Role of histone modifications in defining chromatin structure and function. **Biol Chem** **2008**; 389:353–63.
- Georgiou I, Syrrou M, Pardalidis N, Karakitsios K, Mantzavinos T, Giotitsas N, Loutradis D, Dimitriadis F, Saito M, Miyagawa I, Tzoumis P, Sylakos A, Kanakas N, Moustakareas T, Baltogiannis D, Touloupides S, Giannakis D, Fatouros M, Sofikitis N.** Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. **Asian J Androl.** **2006** Nov;8(6):643-73.

- Geuns, E., M. De Rycke, A. Van Steirteghem and I. Liebaers.** "Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos." **Hum Mol Genet** **2003**; 12(22): 2873-9.
- Geuns, E., P. Hilven, A. Van Steirteghem, I. Liebaers and M. De Rycke.** "Methylation analysis of KvDMR1 in human oocytes." **J Med Genet** **2007**; 44(2): 144-7.
- Gibney ER, Nolan CM.** Epigenetics and gene expression. **Heredity.** **2010** May 12.
- Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi J, Flahault A, Le Bouc Y.** In Vitro Fertilisation may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCNQ1OT gene. **Am J Hum Genet** **2003**; 72: 1338-41.
- Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, et al.** Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. **Nat Genet** **2005**; 37: 1003-7.
- Goll, M. G. and T. H. Bestor.** "Eukaryotic cytosine methyltransferases." **Annu Rev Biochem** **2005**; 74: 481-514.
- Goll, M.G., Kirpekar, F., Maggert, K.A., Yoder, J.A., Hsieh, C.L., Zhang, X., Golic, K.G., Jacobsen, S.E., and Bestor, T.H.** Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. **Science** **2006**, 311: 395–398.
- Gomes, M. V., J. Huber, R. A. Ferriani, A. M. Amaral Neto and E. S. Ramos** "Abnormal methylation at the KvDMR1 imprinting control region in clinically normal children conceived by assisted reproductive technologies." **Mol Hum Reprod** **2009**; 15(8): 471-7.
- Gook DA, Edgar DH, Borg J, Martic M.** Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. **Hum Reprod.** **2008** Feb;23(2):394-402.
- Gook DA, Edgar DH.** Human oocyte cryopreservation. **Hum Reprod Update** **2007**;13(6):591–605.
- Gosden R, Krapez J, Brigg D.** Growth and development of the mammalian oocyte. **Bioessays** **1997**; 19(10):875–82.
- Gougeon A, Lefèvre B.** Folliculogénèse et maturation ovocytaire. **Médecine de la reproduction. Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, 1997**, 48-75.
- Grandjean V.** Transmission héréditaire de l'information épigénétique par le gamète male. **Andrologie** **2009** (19) : 140-147.
- Grace KS, Sinclair KD.** Assisted reproductive technology, epigenetics, and long-term health: a developmental time bomb still ticking. **Semin Reprod Med.** **2009** Sep;27(5):409-16.
- Grandjean, V., L. O'Neill, T. Sado, B. Turner and A. Ferguson-Smith.** "Relationship between DNA methylation, histone H4 acetylation and gene expression in the mouse imprinted Igf2-H19 domain." **FEBS Lett** **2001**; 488(3): 165-9.
- Gribnau, J., K. Hochedlinger, K. Hata, E. Li and R. Jaenisch.** "Asynchronous replication timing of imprinted loci is independent of DNA methylation, but consistent with differential subnuclear localization." **Genes Dev** **2003**; 17(6): 759-73.
- Griffith JS, Mahler HR.** DNA ticketing theory of memory. **Nature** **1969**; 223(5206):580–582.
- Grootegoed JA, Van Der Laan R, Roest HP, Baarends WM.** Aspect's moléculaires de la spermatogénèse: la réparation post-réplication de l'ADN et le système ubiquitine. **Andrologie** **2000**, 10, n 3, 239-242

- Guérin JF.** Prolongation of embryonic cultures and value for blastocyst stage transfer. There is a benefit to prolonging embryonic cultures to the blastocyst stage. **Gynecol Obstet Fertil.** 2002 Feb;30(2):159-63.
- Hajkova, P., S. Erhardt, N. Lane, T. Haaf, O. El-Maarri, W. Reik, J. Walter and M. A. Surani.** "Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells." **Mech Dev** 2002; 117(1-2): 15-23.
- Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar EDJA.** Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. **Am J Hum Genet** 2004; 75:526-8.
- Hamamah S, Conord C, Barrière P.** Fécondation assistée: présent et avenir. **Médecine et biologie de la reproduction.** 2<sup>ème</sup> édition Masson Paris 2004.
- Hammamah S.** Physiopathologie de la fécondation et développement embryonnaire. **Médecine et biologie de la reproduction, édition Masson, Paris, 2004.**
- Hançen RS, Wijmenza C, Luo P et al.** The DNMT3B DNA methyltransferase gene mutated ICF immunodeficiency syndrome. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96: 14412-14417.
- Hansen, R. S., C. Wijmenga, P. Luo, A. M. Stanek, T. K. Canfield, C. M. Weemaes and S. M. Gartler** "The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome." **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96(25): 14412-7.
- Harikrishnan, K. N., M. Z. Chow, E. K. Baker, S. Pal, S. Bassal, D. Brasacchio, L. Wang, J. M. Craig, P. L. Jones, S. Sif and A. El-Osta.** "Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing." **Nat Genet** 2005; 37(3): 254-64.
- Hark, A. T., C. J. Schoenherr, D. J. Katz, R. S. Ingram, J. M. Levorse and S. M. Tilghman.** "CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus." **Nature** 2000; 405(6785): 486-9.
- HAS.** Evaluation de la fécondation in vitro avec micromanipulation (intracytoplasmic sperm injection [ICSI]). Indications, coût-efficacité et risques pour la descendance (mai 2007) **Gynécologie Obstétrique & Fertilité** 35 (2007) 1173-1179
- Hata K, Kusumi M, Yokomine T, Li E, Sasaki H.** Meiotic and epigenetic aberrations in Dnmt3L deficient male germ cells. **Mol Reprod Dev** 2005; 6:6.
- Hata, K., Okano M, Lei Hand Li E.** "Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice." **Development** 2002.129(8): 1983-93.
- Hayward BE, De Vos M, Judson H, et al.** Lack of involvement of known DNA methyltransferases in familial hydatidiform mole implies the involvement of other factors in establishment of imprinting in the human female germline. **BMC Genet** 2003; 4: 2.
- He L, Hañnon GJ.** Micros ARNs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nat Rev Genet** 2004; 5: 522-31.
- Heard, E.** "Recent advances in X-chromosome inactivation." **Curr Opin Cell Biol** 2004; 16(3): 247-55.
- Henckel A, Robert Feil R.** Asymétrie des génomes parentaux : implications en pathologie. **Med Sci** 2008 ; 24 : 747-52.
- Herman JG, Baylin SB.** Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **N Engl J Med** 2003; 349: 2042-54.
- Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, et al.** Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91: 9700-4.

- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al.** Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 95 : 6870-5.
- Herman, J. G. and S. B. Baylin.** "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation." **N Engl J Med** 2003; 349(21): 2042-54.
- Higashimoto K, Soejima H, Saito T, et al.** Imprinting disruption of the CDKN1C/KCNQ1OT1 domain: the molecular mechanisms causing Beckwith-Wiedemann syndrome and cancer. **Cytogenet Genome Res** 2006; 113 : 306-12.
- Hirasawa, R., H. Chiba, M. Kaneda, S. Tajima, E. Li, R. Jaenisch and H. Sasaki.** "Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development." **Genes Dev** 2008; 22(12): 1607-16.
- Hiura, H., Y. Obata, J. Komiyama, M. Shirai and T. Kono.** "Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice." **Genes Cells** 2006; 11(4): 353-61.
- Holliday R, Pugh JE.** DNA modification mechanisms and gene activity during development. **Science** 1975; 187: 226-32.
- Holliday R.** Epigenetics : an overview. **Dev Genet** 1994 (15): 453-7.
- Holliday, R..** "Epigenetics: a historical overview." **Epigenetics** 2006; 1(2): 76-80.
- Holzer H, Scharf E, Chian RC, Demirtas E, Buckett W, Tan SL.** In vitro maturation of oocytes collected from unstimulated ovaries for oocyte donation. **Fertil Steril.** 2007 Jul;88(1):62-7
- Horike, S., K. Mitsuya, M. Meguro, N. Kotobuki, A. Kashiwagi, T. Notsu, T. C. Schulz, Y. Shirayoshi and M. Oshimura.** "Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome." **Hum Mol Genet** 2000; 9(14): 2075-83.
- Houben, A., D. Demidov, A. D. Caperta, R. Karimi, F. Agueci and L. Vlasenko** "Phosphorylation of histone H3 in plants--a dynamic affair." **Biochim Biophys Acta** 2007. 1769(5-6): 308-15.
- Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR.** Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. **Cell.** 2001 Mar 23;104(6):829-38.
- Howlett SK, Reik W.** Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development . **Development** 1991; 113:119-27.
- Hsieh CL.** In vivo activity of murine de novo methyltransferase Dnmt3a and Dnmt 3b. **Mol Cell Biol** 1999; 19: 8211-2218.
- Hu B, Gharaee-Kermani M, Wu Z, Phan SH.** Epigenetic Regulation of Myofibroblast Differentiation by DNA Methylation. **Am J Pathol.** 2010 May 20.
- Huynh KD, Lee JT.** X-chromosome inactivation: a hypothesis linking ontogeny and phylogeny. **Nat Rev Genet** 2005;6(5):410-418.
- Hwang JL, Lin YH, Tsai YL.** In vitro maturation and fertilization of immature oocytes: a comparative study of fertilization techniques. **J Assist Reprod Genet** 2000;17:39-43.
- Imamura, T., A. Kerjean, T. Heams, J. J. Kupiec, C. Thenevin and A. Paldi** "Dynamic CpG and non-CpG methylation of the Peg1/Mest gene in the mouse oocyte and preimplantation embryo." **J Biol Chem** 2005.280(20): 20171-5.

**Jaenish R.** DNA methylation and imprinting : Why brother ? **Trends Genet** **1997**; 13:323-9.

**Jakson M, Krassowska A, Gilbert N, Chevassut T, Forrester L, Ansell J, Ramasahoye B.** Sever global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells. **Mol Cell Biol** **2004**. vol 24, Num 20: 8862-8871.

**Jeanblanc M, Salvaing J, Mason K, Debey P, Beaujean N.** Embryonic genome activation. **Gynécol Obstet and Fertil** **2008** (36): 1126-1132.

**Jeltsch A.** DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. **Chem Bio Chem** **2002**; 3: 274-293.

**Jenuwein T, Allis CD.** Translating the histone code. **Science** **2001**; 293: 1074-80.

**Jiang, YH, Bressler J, Beaudet AL.** Epigenetics and human disease. **Annu Rev Genomics Hum Genet** **2004**

**Johnson JE, Higdon HL 3rd, Boone WR.** Effect of human granulosa cell co-culture using standard culture media on the maturation and fertilization potential of immature human oocytes. **Fertil Steril.** **2008** Nov;90(5):1674-9.

**Jones PA and Daiya T.** The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science** **2001**; 293:1068-1069.

**Jones PA, Baylin SB.** The fundamental roles of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet** **2002**; 3: 415-28.

**Jones PL et al.** Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. **Nature Genet** **1998**; 19:187-191.

**Juan, V., C. Crain and C. Wilson.** "Evidence for evolutionarily conserved secondary structure in the H19 tumor suppressor RNA." **Nucleic Acids Res** **2000**; 28(5): 1221-7.

**Judson H, Hayward BE, Sheridan E, Bonthron DT.** A global disorder of imprinting in the human female germ line. **Nature** **2002** ; 416 : 539-42.

**Kacem, S. and R. Feil.** "Chromatin mechanisms in genomic imprinting." **Mamm Genome** **2009**.

**Kagami, M., T. Nagai, M. Fukami, K. Yamazawa and T. Ogata.** "Silver-Russell syndrome in a girl born after in vitro fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of PEG1/MEST." **J Assist Reprod Genet** **2007**; 24(4): 131-6.

**Kanduri, C., N. Thakur and R. R. Pandey** "The length of the transcript encoded from the Kcnq1ot1 antisense promoter determines the degree of silencing." **EMBO J** **2006**; .25(10): 2096-106.

**Kanduri, C., V. Pant, D. Loukinov, E. Pugacheva, C. F. Qi, A. Wolffe, R. Ohlsson and V. V. Lobanenkov.** "Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive." **Curr Biol** **2000**; 10(14): 853-6.

**Karp G.** Les mécanismes génétiques moléculaires qui créent différents types cellulaires. **Biologie cellulaire et moléculaire. Edition DeBoeck** **2004**: 583-585.

**Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, Okano M, Li E, Nozaki M and Sasaki H.** Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. **Hum Mol Gen** **2007**; Vol. 16, No. 19 2272–2280.

**Kattal N, Cohen J, Barmat LI.** Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. **Fertil Steril.** **2008** Oct; 90(4):1069-76.



- Kearsey, J. M., M. K. Shivji, P. A. Hall and R. D. Wood.** "Does the p53 up-regulated Gadd45 protein have a role in excision repair?" **Science** **1995**; 270(5238): 1004-5.
- Keizer M, Middelburg K, Vogel N, et al.** Birth weight of singletons born after modified natural cycle IVF compared with singletons born after IVF with ovarian hyperstimulation. **Fertil Steril** **2004**; 82: S48; (suppl 2).
- Kelly TL, Li E, Trasler JM.** 5-aza-2'-desoxycytidine induces alterations in murine spermatogenesis and pregnancy outcome. **J Androl** **2003**; 24:822-30.
- Kelly TLJ, Trasler JM.** Reproductive epigenetics. **Clin Genet** **2004**; 65: 247-260.
- Kerjean A, Couvert p, Heams T, et al .** in vitro oocyte growth in mice affect effets maternal primary imprinting establishment . **Eur J Hum Genet** **2003**; 11:493-496.
- Kerjean, A., J. M. Dupont, C. Vasseur, D. Le Tessier, L. Cuisset, A. Paldi, P. Jouannet and M. Jeanpierre** "Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis." **Hum Mol Genet** **2000**. 9(14): 2183-7.
- Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W, Feil R.** Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. **Biol Reprod** **2001**; 64:918–26.
- Khoueiry, R., S. Ibala-Rhomdane, L. Mery, T. Blachere, J. F. Guerin, J. Lornage and A. Lefevre.** "Dynamic CpG methylation of the KCNQ1OT1 gene during maturation of human oocytes." **J Med Genet** **2008**; 45(9): 583-8.
- Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S.** Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA(Cytosine-5) methyltransferases.**The EMBRO** **2002** Jour Vol.21 No.15: 4183-4195.
- Kimura, Y. and R. Yanagimachi.** "Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring." **Development** **1995**; 121(8): 2397-405.
- Klose RJ, Bird AP.** Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends Biochem Sci** **2006**;31(2):89–97.
- Kobayashi H, Sato A, Otsu E, et al.** Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. **Hum Mol Genet** **2007**; 16: 2542-51.
- Kobayashi H., C. Suda, T. Abe, Y. Kohara, T. Ikemura and H. Sasaki** "Bisulfite sequencing and dinucleotide content analysis of 15 imprinted mouse differentially methylated regions (DMRs): paternally methylated DMRs contain less CpGs than maternally methylated DMRs." **Cytogenet Genome Res** **2006**;113(1-4): 130-7
- Kobayashi H, H. Hiura, R. M. John, A. Sato, E. Otsu, N. Kobayashi, R. Suzuki, F. Suzuki, C. Hayashi, T. Utsunomiya, N. Yaegashi and T. Arima.** "DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm." **Eur J Hum Genet.** **2009**.
- Kochanek, S., D. Renz and W. Doerfler.** "Transcriptional silencing of human Alu sequences and inhibition of protein binding in the box B regulatory elements by 5'-CG-3' methylation." **FEBS Lett** **1995**; 360(2): 115-20.
- Kouzarides T.** Chromatin modifications and their function. **Cell** **2007**; 128(4):693–705.
- Kress, C., H. Thomassin and T. Grange** "Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted?" **FEBS Lett** **2001**; .494(3): 135-40.
- Kubicek S, Jenuwein T.** A crack in histone lysine methylation. **Cell** **2004**; 119:903–6.
- Kuwayama M.** Higly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method. **Theriogenology** **2007**; 67:73\_80.

- L.Hartel D and W.Jones E.** Les mécanismes moléculaires de la régulation des gènes (Chapitre 10). **Génétique-les grands principes** (3<sup>ème</sup> édition) DUNOD 2003 :p 392-393.
- Lachner M, O'carroll D, Rea S, Mechtler K and Jenuwein T.** Methylation of histone of H3-lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. **Nature** **2001**; 410: 116-120.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. et coll** "Initial sequencing and analysis of the human genome." **Nature** **2002**; 409(6822): 860-921.
- Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H.** CpG islands as gene markers in the human genome. **Genomics** **1992**; 13: 1095-1107.
- Larsen, W. J. and S. E. Wert.** "Roles of cell junctions in gametogenesis and in early embryonic development." **Tissue Cell** **1988**; 20(6): 809-48.
- Laurent L, Wong E, Li Guoliang, Huynh T, Tsigigos A, Ong CT, Low HM et coll.** Dynamic changes in the human methylome during differentiation. **Genome research** **2010**; 20:320-331.
- Law J, Jacobsen SE.** Dynamic DNA methylation. **Science** **2009**; 323: 1568- 69.
- Lee, Y. S., K. E. Latham and C. A. Vandevoort.** "Effects of in vitro maturation on gene expression in rhesus monkey oocytes." **Physiol Genomics** **2008**; 35(2): 145-58.
- Lefevre B.** Maturation ovocytaire chez les mammifères: rôle du calcium dans la méiose. P 198. **Médecine et biologie de la reproduction, édition Masson, Paris, 2004.**
- Lei, H., Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R and Li E.** "De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells." **Development** **1996** 122(10): 3195-205.
- Lewis, A. and W. Reik.** "How imprinting centres work." **Cytogenet Genome Res** **2006**; 113(1-4): 81-9.
- Li E, Bestor TH and Jaenisch R.** Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell** **1992**; 69: 915-926.
- Li E.** Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature** **2002** 3: 662-673.
- Li Y, Feng HL, Cao YJ, Zeng GJ, Yang Y, Mullen S, et al.** Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro. **Fertil Steril** **2006**; 85:827-32.
- Li, E., C. Beard and R. Jaenisch.** "Role for DNA methylation in genomic imprinting." **Nature** **1993**; 366(6453): 362-5.
- Liu J, Casaccia P.** Epigenetic regulation of oligodendrocyte identity. **Trends Neurosci.** **2010** Apr;33(4):193-201
- Li, J. Y., D. J. Lees-Murdock, G. L. Xu and C. P. Walsh.** "Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse." **Genomics** **2004**; 84(6): 952-60.
- Liang G, Chan MF, Tamigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li. E, Laird PW and Jones PA.** Co-operativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. **Mol Cell Biol** **2002**; 22: 480-491.
- Lidegaard, O., A. Pinborg and A. N. Andersen.** "Imprinting diseases and IVF: Danish National IVF cohort study." **Hum Reprod** **2005**; 20(4): 950-4.

- Lim, D., S. C. Bowdin, L. Tee, G. A. Kirby, E. Blair, A. Fryer, W. Lam, C. Oley, T. Cole, L. A. Brueton, W. Reik, F. Macdonald and E. R. Maher.** "Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies." **Hum Reprod** **2009**; 24(3): 741-7.
- Lin YH, Hwang JL, Mu SC, Seow KM, Chang J et al.** Combination of FSH priming and HCG priming for in vitro maturation of human oocytes. **Hum Reprod** **2003**, 18: 1632-6.
- Lopes, S., A. Lewis, P. Hajkova, W. Dean, J. Oswald, T. Forne, A. Murrell, M. Constancia, M. Bartolomei, J. Walter and W. Reik.** "Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions." **Hum Mol Genet** **2003**; 12(3): 295-305.
- Lopez-Rangel E, Lewis ME.** Loud and clear evidence for gene silencing by epigenetic mechanisms in autism spectrum and related neurodevelopmental disorders. **Clin Genet** **2006**; 69:21-2.
- Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, Tarlatzis BC.** Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. **Fertil Steril.** **2008** Jul;90(1):186-93.
- Lucifero D, Mann MR, Bartolomei MS, Trasler JM.** Gene specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. **Hum Mol Genet** **2004**; 13:839-49.
- Lucifero, D., C. Mertineit, H. J. Clarke, T. H. Bestor and J. M. Trasler.** "Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells." **Genomics** **2002**; 79(4): 530-8.
- Lucifero, D., S. La Salle, D. Bourc'his, J. Martel, T. H. Bestor and J. M. Trasler.** "Coordinate regulation of DNA methyltransferase expression during oogenesis." **BMC Dev Biol** **2007**; 7: 36.
- Ludwig, A. K., A. G. Sutcliffe, K. Diedrich and M. Ludwig.** "Post-neonatal health and development of children born after assisted reproduction: a systematic review of controlled studies." **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** **2006**; 127(1): 3-25.
- Luyet BJ.** The vitrification organic colloids and of protoplasm. **Biodynamica** **1937**; 1:1-14.
- Lyon G et Evrard P.** Troubles des fonctions cognitives. **Neuropédiatrie 2<sup>ème</sup> édition Masson Paris 2000.**
- Lyon MF.** Gene action in the X-chromosome of the mouse. **Nature** **1961**;190:372- 373.
- M. Owen C and James H. Segars Jr., M.D.** Imprinting Disorders and Assisted Reproductive Technology. **Semin Reprod Med.** **2009.** 27(5): 417-428.
- Mackay, D. J., J. L. Callaway, S. M. Marks, H. E. White, C. L. Acerini, S. E. Boonen, P. Dayanikli, H. V. Firth, J. A. Goodship, A. P. Haemers, J. M. Hahnemann, O. Kordonouri, A. F. Masoud, E. Oestergaard, J. Storr, S. Ellard, A. T. Hattersley, D. O. Robinson and I. K. Temple.** "Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57." **Nat Genet** **2008**; 40(8): 949-51.
- Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, Macdonald F, Sampson JR, Barratt CL, Reik W and Hawkins MM.** "Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART)." **J Med Genet** **2003.** 40(1): 62-4.
- Mandelbaum J, Anastasiou O, Lévy R, Guérin JF, De Larouzière V, Antoine JM.** Effect of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** **2004**;113S:S17-23.
- Mangalraj AM, Muthukumar K, Aleyamma T, Kamath MS, George K..** Blastocyst stage transfer vs cleavage stage embryo transfer. **J Hum Reprod Sci.** **2009** Jan;2(1):23-6.

- Manipalviratn S, DeCherney A, Segars J.** Imprinting disorders and assisted reproductive technology. **Fertil Steril.** 2009 Feb; 91(2):305-15.
- Mann MR, Lee SS, Doherty AS, Verona RI, Nolen LD, Schultz RM, et al.** Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. **Development** 2004; 131:3727–35.
- Manning, M., W. Lissens, M. Bonduelle, M. Camus, M. De Rijcke, I. Liebaers and A. Van Steirteghem.** "Study of DNA-methylation patterns at chromosome 15q11-q13 in children born after ICSI reveals no imprinting defects." **Mol Hum Reprod** 2000; 6(11): 1049-53.
- Marmorstein R, Trievel RC.** Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities. **Biochim Biophys Acta** 2009; 1789(1):58–68.
- Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A.** Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. **Lancet** 2004 ; 363 : 1700-2.
- Marques, C. J., P. Costa, B. Vaz, F. Carvalho, S. Fernandes, A. Barros and M. Sousa.** "Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia." **Mol Hum Reprod** 2008; 14(2): 67-74.
- Market-Velker, B. A., L. Zhang, L. S. Magri, A. C. Bonvissuto and M. R. Mann.** "Dual Effects of Superovulation: Loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner." **Hum Mol Genet** 2010.1(19)1:36-51.
- Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T.** Demethylation of the zygotic paternal genome. **Nature** 2000; 403: 501-2.
- McGrath J, Solter D.** Completion of embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. **Cell** 1984; 37:179-83.
- Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N, Nicollet B.** Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. **Hum Reprod** 1992; 7:01-6.
- Menezo Y.J.R., Bellec V., Zaroukian A., Benkhalifa M.** Embryo selection by IVF, coculture and transfer at the blastocyst stage in case of translocation. **Hum. Reprod.** 1997: 12, 2802 – 2803.
- Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S.** In vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. **Hum Reprod** 1999;14: 1847–51.
- Miranda, T. B. and P. A. Jones.** "DNA methylation: the nuts and bolts of repression." **J Cell Physiol** 2007; 213(2): 384-90.
- Miyoshi, N., S. C. Barton, M. Kaneda, P. Hajkova and M. A. Surani** "The continuing quest to comprehend genomic imprinting." **Cytogenet Genome Res** 2006;.113(1-4): 6-11.
- Molinari E, Revelli A, Racca C, Piane LD, Massobrio M.** Slow-freezing-induced changes of birefringent structures in human oocytes are related to responsiveness to ovulation induction. **Reprod Biomed Online.** 2010 Feb 8.
- Moll AC, Imhof SM, Cruysberg JR, Schouten-van Meeteren AY, Boers M, van Leeuwen FE.** Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation. **Lancet** 2003; 361(9354):309–310.
- Moll AC, Kuik DJ, Bouter LM, et al.** Incidence and survival of retinoblastoma in The Netherlands: a register based study 1862–1995. **Br J Ophthalmol** 1997; 81(7):559–562.

- Monniaux, D., C. Huet, N. Besnard, F. Clement, M. Bosc, C. Pisselet, P. Monget and J. C. Mariana.** "Follicular growth and ovarian dynamics in mammals." **J Reprod Fertil Suppl 1997**; 51: 3-23.
- Morange M.** Quelle place pour l'épigénétique ? **Médecien/Sciences 2005** (21): 367-9.
- Morbeck, D. E., W. L. Flowers and J. H. Britt** "Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and epidermal growth factor in vitro." **J Reprod Fertil 1993**. 99(2): 577-84.
- Morgan HD, Santos F, Green K, et al.** Epigenetic reprogramming in mammals. **Hum Mol Genet 2005**; 14(supp1): r47-58.
- Morgan, H. D., Dean, W., Coker, H. A., Reik, W. & Petersen-Mahrt, S. K.** Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. **J. Biol. Chem. 2004**; 279, 52353–52360.
- Morison, I. M., J. P. Ramsay and H. G. Spencer.** "A census of mammalian imprinting." **Trends Genet 2005**, 21(8): 457-65.
- Murrell, A., S. Heeson and W. Reik.** "Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *Igf2* and *H19* into parent-specific chromatin loops." **Nat Genet 2004**; 36(8): 889-93.
- Nagy ZP, Janssenwillen C, Liu J, Loccufier A, Devroey P, Van steirteghem A.** Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured germinal-vesicle stage oocytes: case report. **Fertil Steril 1996**; 65:1047–50.
- Nakamura T, aria Y, Umehara H, et al.** PGC7/Stella protect against DNA déméthylation in early embryogenesis. **Nat Cell Biol 2007**; 9: 64-71.
- Nakayama J, Rice JC, Sthal BD, Allis CD and Grewal SI.** Role of histone H3 -lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. **Science 2001**; 292: 110-113.
- Nan X et al.** Transcriptional repression by the methyl CpG binding protein Me CP2 involves a histone deacetylase complex. **Nature 1998**; 393: 386-389.
- Nan, X., S. Cross and A. Bird.** "Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins." **Novartis Found Symp 1998**; 214: 6-16; discussion -21, 46-50.
- Nathan D, Sterner DE, Berger SL.** Histone modifications: Now summoning sumoylation. **PNAS 2003**, vol 100 num 23: 13128- 13120.
- Naveh-Many T, Cedar H.** Active gene sequences are undermethylated. **Proc Natl Acad Sci U S A 1981**;78(7):4246–4250.
- Nogueira D.** Critères de qualité des blastocystes. **J Gynécol Obstét et Biol de la Reprod 2008** 37 : S18-S21.
- Norris, D. P., N. Brockdorff and S. Rastan.** "Methylation status of CpG-rich islands on active and inactive mouse X chromosomes." **Mamm Genome 1991**; 1(2): 78-83.
- Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ, DePamphilis ML.** regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. **J Biol Chem 1995**; 270: 22077-80.
- Noyes N, Porcu E, Borini A.** Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. **Reprod Biomed Online. 2009** Jun;18(6):769-76.
- Obata, Y. and T. Kono** "Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth." **J Biol Chem 2002**;277(7): 5285-9.

- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, et al.** Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. **Science** **1991**; 252: 1097-102.
- Oka M, Rodic N, Graddy J, Lung JL, Chang LJ, and Terada N.** CpG Sites Preferentially Methylated by Dnmt3a *in Vivo*. **J Biol** **2006**; 281(15) 9901–9908.
- Okada Y, Yamagata K, Hong k, Wakayama T, Zhang Y.** A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation. *Nature* 2010, 463: 554-558.
- Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E.** Epigenetic dynamics of imprinted X during early mouse development. **Science** **2004**; 303 : 644-649.
- Okano M, Bell DW, Haber DA and Li W.** DNA methyltransferase DNMT3A and DNMT3B are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell** **1999**; 99: 247-257.
- Okano, M., S. Xie and E. Li.** "Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases." **Nat Genet** **1998**; 19(3): 219-20.
- Oktay K, Cil AP, Bang H.** Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. **Fertil Steril.** **2006** Jul;86(1):70-80.
- O'Neill, M. J.** "The influence of non-coding RNAs on allele-specific gene expression in mammals." **Hum Mol Genet** **2005**; 14 Spec No 1: R113-20.
- Ono, R., K. Nakamura, K. Inoue, M. Naruse, T. Usami, N. Wakisaka-Saito, T. Hino, R. Suzuki-Migishima, N. Ogonuki, H. Miki, T. Kohda, A. Ogura, M. Yokoyama, T. Kaneko-Ishino and F. Ishino.** "Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality." **Nat Genet** **2006**; 38(1): 101-6.
- Orstavik K, Eiklid K, Van Der Hagen C, et al.** Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic injection. **Am J Hum Genet** **2002**; 72: 218-9.
- Orstavik KH, Eiklid K, Van der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skjeldal O and Buiting K.** "Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection." **Am J Hum Genet** **2003**.72(1): 218-9.
- Oswald, J. et al.** Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. **Curr. Biol.** **2000**; 10, 475–478 .
- Palermo G., Neri QV, J. J. Hariprashad, O. K. Davis, L. L. Veeck and .Rosenwaks.** "ICSI and its outcome." **Semin Reprod Med** **2000**.18(2): 161-9.
- Palermo, G., H. Joris, P. Devroey and A. C. Van Steirteghem** "Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte." **Lancet** **1992**.340(8810): 17-8.
- Parat C, Serres C.** La capacitation in vivo. **Gynécol Obstet et Fertil.** **2009** (37): 536-539.
- Paulson M and C.Ferguson-smith A.** DNA methylation genomic imprinting, development and disease. **Journal of Pathology** **2001**; 195: 97-110.
- Payer B, Lee JT.** X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. **Annu Rev Biol Psychiatry** **2004**; 55:965-70.
- Petronis A.** The origin of schizophrenia: Genetic thesis, epigenetic antithesis, and resolving synthesis. **Biol Psychiatry** **2004**; 55:965-70.
- Picton, H. M.** "Activation of follicle development: the primordial follicle." **Theriogenology** **2001**. 55(6): 1193-210.

- Plath K, Mlynarczyk-Evans S, Nusinow DA, Panning B.** Xist RNA and the mechanism of X inactivation. *Annu Rev Genet* **2002**; 36: 233-278.
- Poirot C, Abirached F, Vauthier-Brouzes D, Lefebvre G, Raccach J, Hugues NJ, Martin-Pont B, Wolf JP, Cédric-Durnerin I.** Maturation in vitro des ovocytes : bilan et perspectives dans l'espèce humaine. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité* **2003**. (31): 803-812.
- Poirot C, Vacher-Lavenu MC, Helardot P, Guibert J, Brugieres L, Jouannet P.** Human ovarian tissue cryopreservation: indications and feasibility. *Hum Reprod* **2002**; 17(6):1447-52.
- Ponger L, Duret L, and Mouchiroud D.** Determinants of CpG Islands: Expression in Early Embryo and Isochore Structure. *Genome research* **2001**, 11:1854-1860.
- Popp C, Dean W, Feng S, Cokus SJ, Andrew S, Pellegrini M, Jacobsen SE, Reik W.** Genome wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* **2010**, 463:1101-1105.
- Pradhan S, Talbot D, Sha M, Benner J, Hornstra L, Li E, Jaenish R and Robests RJ.** Baculovirus-mediated expression and characterization of the full-length murine DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **1997**; 25: 4666-4673.
- Pradhan S And Esteve PO** "Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression." *Clin Immunol* **2003**; 109(1): 6-16.
- Poplinski A, Tüttelmann F, Kanber D, Horsthemke B, Gromoll J.** Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. *Int J Androl.* **2009**, Oct 30.
- Prawitt, D., T. Enklaar, B. Gartner-Rupprecht, C. Spangenberg, M. Oswald, E. Lausch, P. Schmidtko, D. Reutzel, S. Fees, R. Lucito, M. Korzon, I. Brozek, J. Limon, D. E. Housman, J. Pelletier and B. Zabel** "Microdeletion of target sites for insulator protein CTCF in a chromosome 11p15 imprinting center in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**.102(11): 4085-90.
- Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Brid AP AND Jaenich R.** Non CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci USA* **2000**; 97: 5237-5242.
- Rao GD, Tan SL.** In vitro maturation of oocytes. *Semin Reprod Med.* **2005** Aug;23(3):242-7.
- Ratel D, Ravanat JL, Berger F, Wion D.** N6-methyladenine: the other methylated base of DNA. *Bioessays* **2006**;28(3):309-315.
- Ratnam S, Mertineit C, Ding F, Howell CY, Clarke HJ, Bestor TH, Chaillet JR, Trasler JM.** Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development. *Dev Biol.* **2002** May 15; 245(2):304-14.
- Rauch TA, Zhong X, Wu X, et al.** High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **2008**; 105: 252-7.
- Razin A and Cedar H.** DNA methylation and genomic imprinting. *Cell* (**1994**); 77: 473-476.
- Razin A.** CpG methylation, chromatin structure and gene silencing a three-way connection. *EMBO J.* **1998**.17, 4905-4908
- Reefhuis, J., M. A. Honein, L. A. Schieve, A. Correa, C. A. Hobbs and S. A. Rasmussen.** "Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States." *Hum Reprod* **2009**; 24(2): 360-6.

- Reese, K. J., S. Lin, R. I. Verona, R. M. Schultz and M. S. Bartolomei.** "Maintenance of paternal methylation and repression of the imprinted H19 gene requires MBD3." **PLoS Genet** 2007; 3(8): e137.
- Regha, K., P. A. Latos and L. Spahn.** "The imprinted mouse Igf2r/Air cluster--a model maternal imprinting system." **Cytogenet Genome Res** 2006; 113(1-4): 165-77.
- Reik W and Dean W.** DNA methylation and mammalian epigenetics. **Electrophoresis** 2001; 22: 2838-2843.
- Reik W, Dean W and Walter J.** Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science** 2001; 293: 1089-1093.
- Reik, W., F. Santos, K. Mitsuya, H. Morgan and W. Dean** "Epigenetic asymmetry in the mammalian zygote and early embryo: relationship to lineage commitment?" **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 2003.358(1436): 1403-9.
- Reik, W.** Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature** 2007; 447, 425-432.
- Renfree, M. B., E. I. Ager, G. Shaw and A. J. Pask** "Genomic imprinting in marsupial placentation." **Reproduction** 2008; 136(5): 523-31.
- Requena A, Neuspiller F, Cobo A, Aragonés M, Remohi J, Simon C, et al.** The potential use of maturation in vitro of human oocytes in low responder patients. **J Assist Reprod Genet** 2000; 17: 239-44.
- Requena A, Neuspiller F, Cobo AC, Aragonés M, Garcia-Velasco JA, Remohi J, et al.** Endocrinological and ultrasonographic variations after immature oocyte retrieval in a natural cycle. **Hum Reprod** 2001; 9:1833-7.
- Riggs AD.** X inactivation, differentiation, and DNA methylation. **Cytogenet Cell Genet** 1975; 14: 9-25.
- Robertson KD.** DNA methylation, methyltransferases, and cancer. **Oncogene** 2001; 20: 3139-55.
- Robertson, K. D. and A. P. Wolffe.** "DNA methylation in health and disease." **Nat Rev Genet** 2000; 1(1): 11-9.
- Robertson, K. D..** "DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web." **Oncogene** 2002; 21(35): 5361-79.
- Rossignol, S., V. Steunou, C. Chalas, A. Kerjean, M. Rigolet, E. Viegas-Pequignot, P. Jouannet, Y. Le Bouc and C. Gicquel.** "The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region." **J Med Genet** 2006; 43(12): 902-7.
- Rossin B, Pouly JL, Belaisch-Allart J, J. de Mouzon (groupe FIVNAT).** La stimulation de l'ovulation pour fécondation in vitro, en France choix et résultats en fonction des protocoles et des gonadotrophines. **Gynécol Obstét & Fertil** 37 (2009) 864-872
- Rottach, A., H. Leonhardt and F. Spada.** "DNA methylation-mediated epigenetic control." **J Cell Biochem** 2009; 108(1): 43-51.
- Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB and A.M. Mahmoud AM.** WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male, **Cambridge University Press (2000)** (91p).
- Royère D.** Journée thématique de la SFEF (Paris, 17 mai 2004). Insémination intra-utérine : état des lieux chez l'humain. **Gynécol Obstét & Fertil** 32 (2004) 873-879
- Royo H, Cavallé J.** Non coding RNAs in imprinted gene clusters. **Biol Cell** 2008; 100: 149-66.



**Rubio C, Simón C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Remohí J, Pellicer A.** Clinical experience employing co-culture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells. **Hum Reprod.** 2000 Dec;15 Suppl 6:31-8.

**Ruby JG, Jan CH and Bartel DP.** "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing." **Nature** 2007.448(7149): 83-6.

**Sado T, Fenner MH, Tan SS, Tam P, Shioda T, Li E.** X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. **Dev Biol** 2000; 225(2):294–303.

**Sakatani T, Kaneda A, Iacobuzio-Donahue CA, et al.** Loss of imprinting of Igf2 alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. **Science** 2005; 307: 1976-8.

**Santos F, Handrich b, Reik W, Dean W.** dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. **Dev Biol** 2002; 241:172-80.

**Santos F, Peters AH, Otte AP, Reik W, Dean W.** Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. **Dev Biol** 2005. 280: 225-236.

**Sanz LA, Kota SK, Feil R.** Genome-Wide DNA demethylation in mammals. **Gen Biol** 2010; 11:110.

**Sarraf, S. A. and I. Stancheva** "Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly." **Mol Cell** 2004; 15(4): 595-605.

**Sasaki H, Ferguson-Smith AC, Shum AS, Barton SC, Surani MA.** Temporal and spatial regulation of H19 imprinting in normal and uniparental mouse embryos. **Development** 1995;121: 4195–202.

**Sasaki H, Matsui Y.** epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. **Nat Rev Genet** 2008; 9: 129-40.

**Sato, A., E. Otsu, H. Negishi, T. Utsunomiya and T. Arima** "Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes." **Hum Reprod** 2007; 22(1): 26-35.

**Sato, S., T. Yoshimizu, E. Sato and Y. Matsui** "Erasure of methylation imprinting of Igf2r during mouse primordial germ-cell development." **Mol Reprod Dev** 2003.65(1): 41-50.

**Sazhenova, E. A. and I. N. Lebedev.** "Epimutations of the KCNQ1OT1 imprinting center of chromosome 11 in early human embryo lethality." **Genetika** 2008; 44(12): 1609-16.

**Schermelleh, L., A. Haemmer, F. Spada, N. Rosing, D. Meilinger, U. Rothbauer, M. C. Cardoso and H. Leonhardt.** "Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation." **Nucleic Acids Res** 2007; 35(13): 4301-12.

**Schieve L.A., Meiklese S.F., Ferre C. et al.:** Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. **N. Engl. J. Med.** 2002, 346: 731-737.

**Schönherr, N., E. Meyer, A. Roos, A. Schmidt, H. A. Wollmann and T. Eggermann.** "The centromeric 11p15 imprinting centre is also involved in Silver-Russell syndrome." **J Med Genet** 2007; 44(1): 59-63.

**Sevensson, J., A. Bjornstahl and S. A. Ivarsson** «Increased risk of Silver-Russell syndrome after in vitro fertilization?» **Acta Paediatr** 2005.94(8): 1163-5.

**Shann YJ, Cheng C, Chiao CH, et al.** Genome-wide mapping and characterization of hypomethylated sites in human tissues and breast cancer cell lines. **Genome Res** 2008; 18: 791-801.

**Shin, J. Y., G. V. Fitzpatrick and M. J. Higgins.** "Two distinct mechanisms of silencing by the KvDMR1 imprinting control region." **EMBO J** 2008; 27(1): 168-78.

- Singal, R. and G. D. Ginder.** "DNA methylation." **Blood** 1999. 93(12): 4059-70.
- Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, Alegretti JR, Motta EL** Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. **Fertil Steril.** 2010
- Smith SD, Mikkelsen AL, Lindenberg S.** Development of human oocytes matured in vitro for 28 or 36 hours. **Fertil Steril** 2000;73: 541–4.
- Solter, D.** "Imprinting today: end of the beginning or beginning of the end?" **Cytogenet Genome Res** 2006; 113(1-4): 12-6.
- Sontheimer EJ and Carthew RW.** "Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs." **Cell** 2005. 122(1): 9-12.
- Sparago, A., F. Cerrato, M. Vernucci, G. B. Ferrero, M. C. Silengo and A. Riccio.** "Microdeletions in the human H19 DMR result in loss of IGF2 imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome." **Nat Genet** 2004; 36(9): 958-60.
- Spicer, L. J., E. Alpizar and S. E. Echternkamp** "Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro." **J Anim Sci** 1993. 71(5): 1232-41.
- Stephoe P.C. Edwards R.G.** Birth after the reimplantation of a human embryo. **The Lancet** 1978. 2(8085):366
- Stirzaker C, Millar DS, Paul CL, Warnecke PM, Harrison J, Vincent PC, et al.** Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. **Cancer Res** 1997; 57: 2229-37.
- Strahl BD. and Allis CD.** "The language of covalent histone modifications." **Nature** 2000. 403(6765): 41-5.
- Stromberg, B., G. Dahlquist, A. Ericson, O. Finnstrom, M. Koster and K. Stjernqvist.** "Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population-based study." **Lancet** 2002; 359(9305): 461-5.
- Steel AJ, Sutcliffe A.** Long-term health implications for children conceived by IVF/ICSI. **Hum Fertil (Camb).** 2009 Mar;12(1):21-7.
- Suikkari AM** In-vitro maturation: its role in fertility treatment. **Curr Opin Obstet Gynecol.** 2008 Jun;20(3):242-8.
- Suikkari AM, Tulppala M, Tuuri T, Hovatta O, Barnes F.** Luteal phase start of low-dose FSH priming of follicles results in an efficient recovery, maturation and fertilization of immature human oocytes. **Hum Reprod** 2000; 15:747–51.
- Surani MA, Barton S, Norris m.** Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. **Nature** 1984; 308: 548-50.
- Surani MA.** Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. **Cell** 1998; 93: 309-312.
- Sutcliffe AG, Peters CJ, Bowdin S, Temple K, ReardonW, Wilson L, et al.** Assisted-reproductive therapies and imprinting disorders – a preliminary British survey. **Hum Reprod** 2006;21:1009–11.
- Tajima K, Orisaka M, Mori T, Kotsuji F.** Ovarian theca cells in follicular function. **Reprod Biomed Online.** 2007 Nov; 15(5):591-609.

- Tan SL, Child TJ, Gulekli B.** In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated ovaries: Predicting the number of immature oocytes retrieved by early follicular phase ultrasonography. **Am J Obstet Gynecol** 2002; 186:684–9.
- Teixeira FK, Fabiana Heredia F, Sarazin A, Roudier F, Boccara M, Ciaudo C, Cruaud C, Poulain J, Berdasco M et al .** A Role for RNAi in the Selective Correction of DNA Methylation Defects. **Science** 2009; 323: 1600.
- Testart J. Frydman R.** Naissance à terme après implantation intra-utérine d'un embryon obtenu par fécondation in vitro. **J Gynécol Obstet et Biol (Paris)**, 1982. 11(7):855-859.
- Thakur, N., M. Kanduri, C. Holmgren, R. Mukhopadhyay and C. Kanduri.** "Bidirectional silencing and DNA methylation-sensitive methylation-spreading properties of the Kcnq1 imprinting control region map to the same regions." **J Biol Chem** 2003; 278(11): 9514-9.
- Theresa MG and Keith DR.** Chromatin remodelling, histone modifications, and DNA methylation: How does it fit together. **J Cell Biochem** 2002 (87): 117-125.
- Thibault, C. and Levasseur MC.** La reproduction chez les mammifères et l'homme 2001: 928.
- Tomasz P. Jurkowski, Meusburger M, Phalke S, Helm M, Nellen W, Reuter G, And Albert Jeltsch A.** Human DNMT2 methylates tRNA<sup>Asp</sup> molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism. **RNA** 2008, 14:1663–1670.
- Toth TL, Baka SG, Veeck LL, Jones HW, Muasher S, Lanzendorf SE.** Fertilization and in vitro development of cryopreserved human prophase I oocytes. **Fertil Steril** 1994; 61(5):891–4.
- Tremblay, K. D., J. R. Saam, R. S. Ingram, S. M. Tilghman and M. S. Bartolomei.** "A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene." **Nat Genet** 1995; 9(4): 407-13.
- Trounson A, Wood C, Kausche A.** In vitro maturation and fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. **Fertil Steril** 1994;62:353–62.
- Tsafiri A, Pomerantz SH, Channing CP.** Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluid: partial characterization of the inhibitor. **Biol Reprod** 1976, 14: 511-516.
- Tycko B, Morison IM.** Physiological functions of imprinted genes. **J Cell Physiol** 2002; 192: 245-258.
- Ueda, T., K. Abe, A. Miura, M. Yuzuriha, M. Zubair, M. Noguchi, K. Niwa, Y. Kawase, T. Kono, Y. Matsuda, H. Fujimoto, H. Shibata, Y. Hayashizaki and H. Sasaki.** "The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development." **Genes Cells** 2000; 5(8): 649-59.
- Umlauf, D., Y. Goto, R. Cao, F. Cerqueira, A. Wagschal, Y. Zhang and R. Feil.** "Imprinting along the Kcnq1 domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes." **Nat Genet** 2004; 36(12): 1296-300.
- Van Buggenhout G and Fryns JP.** Angelman syndrome. **European Journal of Human Genetics** 2009; 17, 1367–1373;
- Van den Veyver IB, Al-Hussaini TK.** Biparental hydatidiform moles : a maternal effect mutation affecting imprinting in the offspring. **Hum Reprod Update** 2006 ; 12 : 233-42.
- Van der Heijden GW, Dieker JW, Derijck AA, et al.** Assymetrie in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early embryo. **Mech dev** 2005; 122: 1008-22.

- Van der Westerlaken L, Helmerhorst F, Dieben S, Naaktgeboren N.** Intracytoplasmic sperm injection as a treatment for unexplained total fertilization failure or low fertilization after conventional in vitro fertilization. **Fertil Steril.** 2005 Mar;83(3):612-
- Van Overveld, P. G. M. et al.** Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy. **Nature Genet.** 2003; 34, 315–317.
- Van Steirteghem A, Bonduelle M, Devroey P, Liebaers I.** Follow-up of children born after ICSI. **Hum Reprod Update.** 2002 Mar-Apr;8(2):111-6.
- Van Steirteghem, A. C., Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A and Devroey P.** "High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection." **Hum Reprod** 1993. 8(7): 1061-6.
- Van Tol, H. T., F. A. de Loos, H. M. Vanderstichele and M. M. Bevers** "Bovine activin A does not affect the in vitro maturation of bovine oocytes." **Theriogenology** 1994, 41(3): 673-9.
- Vastenhouw NL, Brunschwing K, Okihara KL, et al.** Gene expression: long term gene silencing by RNAi. **Nature** 2006; 442: 882.
- Veeck L, Wortham E, Witmyer J, Sandow B, Acosta A, Garcia J, et al.** Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. **Fertil Steril** 1983; 39: 594–602.
- Vercelli D.** Genetics, epigenetics, and the environment: Switching, buffering, releasing. **J Allergy Clin Immunol** 2004;113:381-6.
- Verona RI, Mann MR, Bartolomei MS.** Genomic imprinting: Intricacies of epigenetic regulation in clusters. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19:237-59.
- Waddington C.** L'épigénotype. **Endeavour** 1942 (1): 18-20.
- Waechter DE, Baserga R.** Effect of methylation on expression of microinjected genes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1982;79(4):1106–1110.
- Wagschal, A., H. G. Sutherland, K. Woodfine, A. Henckel, K. Chebli, R. Schulz, R. J. Oakey, W. A. Bickmore and R. Feil.** "G9a histone methyltransferase contributes to imprinting in the mouse placenta." **Mol Cell Biol** 2008; 28(3): 1104-13.
- Wan, L. B. and M. S. Bartolomei.** "Regulation of imprinting in clusters: noncoding RNAs versus insulators." **Adv Genet** 2008; 61: 207-23.
- Wang, J., S. Hevi, J. K. Kurash, H. Lei, F. Gay, J. Bajko, H. Su, W. Sun, H. Chang, G. Xu, F. Gaudet, E. Li and T. Chen** "The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation." **Nat Genet** 2009.41(1): 125-9.
- Watanabe D, Suetake I, Tada T, Tajima S.** Stage and cell specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. **Mech Develop** 2002; (118): 187-190.
- Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, & Weiner AM.** Le fonctionnement des gènes d'eucaryotes supérieurs. *Biologie moléculaire du gène*. Traduction de la 4e édition américaine 1989.762-763.
- Watt F, Molloy PL.** Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor
- Weber M, Davies JJ, Wittig D, et al.** Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. **Nat Genet** 2005 ; 37 : 853-62.
- Weber M.** Profils de méthylation de l'ADN dans les cellules normales et cancéreuses. **Médecine/Sciences** 2008; 24: 731-3.

- Weeck L, Wortham E, Witmeyer J, Sandow B, Acosta A, Garcia J, et al.** Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. **Fertil steril** 1983; 39:594-602.
- Weksberg, R., C. Shuman and J. B. Beckwith.** "Beckwith-Wiedemann syndrome." **Eur J Hum Genet.** 2009
- Weksberg, R., J. Nishikawa, O. Caluseriu, Y. L. Fei, C. Shuman, C. Wei, L. Steele, J. Cameron, A. Smith, I. Ambus, M. Li, P. N. Ray, P. Sadowski and J. Squire.** "Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1." **Hum Mol Genet** 2001; 10(26): 2989-3000.
- Wennerholm U.B., Bergh C., Hamberger L. et al.:** Incidence of congenital malformations in children born after ICSI. **Hum. Reprod.** 2000, 15: 944-948.
- Wennerholm UB, Söderström-Anttila V, Bergh C, Aittomäki K, Hazekamp J, Nygren KG, Selbing A, Loft A.** Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data. **Hum Reprod.** 2009 Sep; 24(9):2158-72.
- Widschwendter M et coll.** DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. **Cancer Res** 2004 (64): 4472-4480
- Wollfe AP, Matzke MA.** Epigenetics: regulation through repression. **Science** 1999; 286:481-6.
- Wu, Ct; Morris, JR.** Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. **Science** 2001; 293(5532):1103–1105.
- Wynn P, Picton HM, Krapez JA, Rutherford AJ, Balen AH, Gosden R.** Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in vitro maturation. **Hum Reprod** 1998; 11:3132–8.
- Xu GL, Bestor Th, Bourc'his D et al.** Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in DNA methyltransferase gene. **Nature** 1999; 402: 187-191.
- Yamazaki T, Yamagata K, Baba T.** Time-lapse retrospective analysis of DNA methylation in mouse preimplantation embryos by live cell imaging. **Dev Biol** 2007; 304: 409-19.
- Yamazawa, K., M. Kagami, M. Fukami, K. Matsubara and T. Ogata 2008.** "Monozygotic female twins discordant for Silver-Russell syndrome and hypomethylation of the H19-DMR." **J Hum Genet** 53(10): 950-5.
- Yanagimachi, R.** "Fertilization and developmental initiation of oocytes by injection of spermatozoa and pre-spermatozoal cells." **Ital J Anat Embryol** 2005.110(2 Suppl 1): 145-50.
- Yavin S, Arav A.** Measurement of essential properties of vitrification solutions. **Theriogenology** 2007; 67:81–9
- Yoder JA, Soman NS, Verdine GL And Bestor TH.** DNA (cytosine-5) methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. **J Mol Biol** (1997); 270: 385
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH.** Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends Genet** 1997; 13 : 335-40
- Yokomine, T., K. Hata, Tsudzuki M and Sasaki H.** "Evolution of the vertebrate DNMT3 gene family: a possible link between existence of DNMT3L and genomic imprinting." **Cytogenet Genome Res** 2006; 113(1-4): 75-80.
- Yoon, Y. S., S. Jeong, Q. Rong, K. Y. Park, J. H. Chung and K. Pfeifer.** "Analysis of the H19ICR insulator." **Mol Cell Biol** 2007; 27(9): 3499-510.

Yoshimizu, T., A. Miroglio, M. A. Ripoché, A. Gabory, M. Vernucci, A. Riccio, S. Colnot, C. Godard, B. Terris, H. Jammes and L. Dandolo. "The H19 locus acts in vivo as a tumor suppressor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**; 105(34): 12417-22.

Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* **1998**; 3: 155–63.

Young, L. E., K. Fernandes, T. G. McEvoy, S. C. Butterwith, C. G. Gutierrez, C. Carolan, P. J. Broadbent, J. J. Robinson, I. Wilmut and K. D. Sinclair. "Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture." *Nat Genet* **2001**; 27(2): 153-4.

Zardo G, Reale A, De Matters G, Buontempo S, and Caiafa P. A role for poly (ADP-ribosyl) ation in DNA methylation. *Biochem Cell Biol* **2003**; 81:197-208.

Zhang X, Zerafa A, Wong J, Armstrong D, Khamsi F. Human menopausal gonadotropin during in vitro maturation of human oocytes retrieved from small follicles enhances in vitro fertilization and cleavage rates. *Fertil Steril* **1993**; 59:850–3.

Zhang Y and Reiberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **2001**; 15: 2343-2360.

Zhang Yi. Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes Dev.* **2003** (17): 2733-2740.

Zhang, Y. and B. Tycko. "Monoallelic expression of the human H19 gene." *Nat Genet* **1992**; 1(1): 40-44.

Zhang, X., I. Neganova, S. Przyborski, C. Yang, M. Cooke, S. P. Atkinson, G. Anyfantis, S. Fenyk, W. N. Keith, S. F. Hoare, O. Hughes, T. Strachan, M. Stojkovic, P. W. Hinds, L. Armstrong and M. Lako "A role for NANOG in G1 to S transition in human embryonic stem cells through direct binding of CDK6 and CDC25A." *J Cell Biol* **2009**.184(1): 67-82.

Zhao JZ, Zhou W, Zhang W, Ge HS, Huang XF, Lin JJ. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated ovaries in infertile women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* **2009** Jun; 91(6):2568-71

Zhu B, Benjamin D, Zheng Y, Angliker H, Thiry S, Siegmann M and Jost JP. Over expression of 5-methyl-cytosine DNA glycosylase in human embryonic kidney cells Ec R293 demethylates the promoter of a hormone regulated reporter gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**; 24: 5031-5036.

Zhu K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Ann Rev Genet* **2009**; 43: 143-66.

Zhu, B., Y. Zheng, H. Angliker, S. Schwarz, S. Thiry, M. Siegmann and J. P. Jost "5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence." *Nucleic Acids Res* **2000**; 28(21): 4157-65.

# **ANNEXES**

---

## Protocole (ovocytes)



1 à 3 ovocytes traités à la  
hyaluronidase et à  
la protéinase K/ patiente



Mutagenèse de l'ADN par le bisulfite de sodium: l'information  
épigénétique est transformée en un type de polymorphisme

CpG  $\xrightarrow{\text{facilement identifiable}}$  UpG  
C<sup>m</sup>pG  $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$  C<sup>m</sup>pG

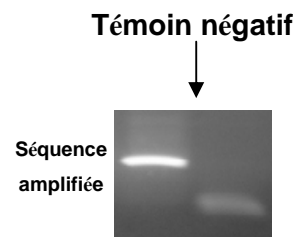


Purification de l'ADN traité sur colonne



Amplification par PCR nichée de l'ADN traité

PCR1 : amorces externes, PCR2 : amorces internes  
amorces spécifiques ne contenant pas de sites CpG  
(1 PCR nichée par tube d'ovocytes traités)



Purification de la bande amplifiée



Ligature, plasmide pGEM®-T



Transformation bactérienne

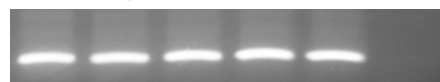


PCR

Clonage

Vérification de l'incorporation du gène au niveau du plasmide

Témoin négatif



Culture bactérienne des clones positifs, extraction de l'ADN plasmidique,  
séquençage

5 clones séquencés par tube d'ovocytes traités et PCR



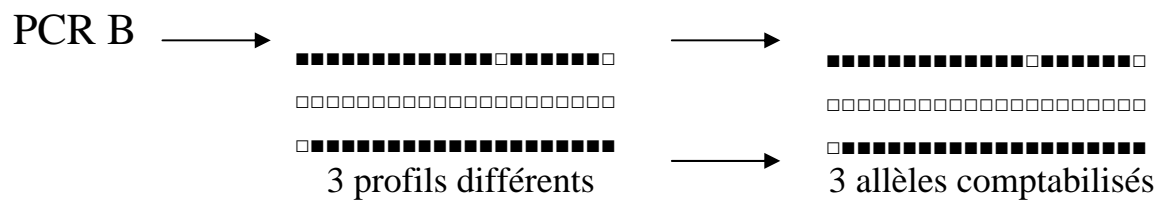
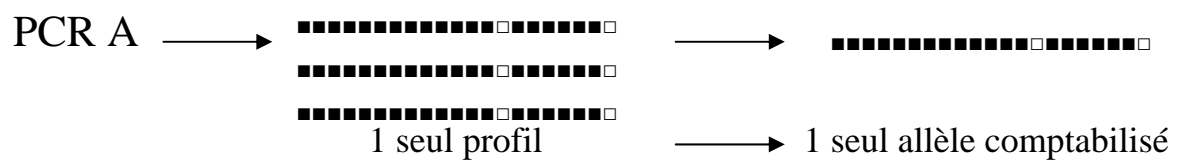


Analyse des résultats en profils alléliques:

Un million de cellules : 2 clones séquencés=2 allèles indépendants

**Quelques cellules: 2 clones séquencés = 2 allèles indépendants si :**

- 2 profils différents
- 2 profils identiques mais issus de PCR indépendantes



PCRA+PCRB → 4 allèles comptabilisés

## Protocole (embryon)



1 embryon traité à  
la protéinase K/ patiente



**Mutagenèse de l'ADN par le bisulfite de sodium: l'information épigénétique est transformée en un type de polymorphisme**

CpG  $\xrightarrow{\text{facilement identifiable}}$  UpG  
C<sup>m</sup>pG  $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$  C<sup>m</sup>pG



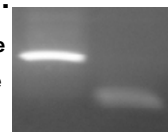
**Purification de l'ADN traité sur colonne**



**Amplification par PCR nichée simple ou en duplex de l'ADN traité**  
 PCR nichée simple  $\rightarrow$  PCR1 : 1 couple d'amorces externes, PCR2 : amorces internes  
 PCR nichée duplex  $\rightarrow$  PCR1 : 2 couples d'amorces externes, 2 PCR2 : 1 couple d'amorces internes par PCR  
 amorces spécifiques ne contenant pas de sites CpG  
 (5 PCR nichées par tube d'embryons traités)

Témoin négatif

Séquence  
amplifiée



**Purification de la bande amplifiée**



Clonage

**Ligature, plasmide pGEM®-T**



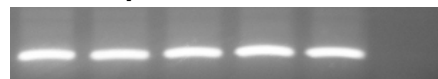
**Transformation bactérienne**



**PCR**

**Vérification de l'incorporation du gène au niveau du plasmide**

Témoin négatif



**Culture bactérienne des clones positifs, extraction de l'ADN plasmidique, séquençage**

**5 clones séquencés par PCR**

**25 clones séquencés par embryon si toutes les PCR nichées étaient positives**



# **PUBLICATIONS**

---

---

---



## Dynamic CpG methylation of the KCNQ1OT1 gene during maturation of human oocytes

R Khoureiry, S Ibalá-Rhondane, L Méry, T Blachère, J-F Guérin, J Lornage and A Lefèvre

*J. Med. Genet.* 2008;45:583-588;  
doi:10.1136/jmg.2008.057943

---

Updated information and services can be found at:  
<http://jmg.bmj.com/cgi/content/full/45/9/583>

---

*These include:*

### References

This article cites 34 articles, 16 of which can be accessed free at:  
<http://jmg.bmj.com/cgi/content/full/45/9/583#BIBL>

### Rapid responses

You can respond to this article at:  
<http://jmg.bmj.com/cgi/eletter-submit/45/9/583>

### Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article

---

### Notes

---

To order reprints of this article go to:  
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to *Journal of Medical Genetics* go to:  
<http://journals.bmj.com/subscriptions/>

# Dynamic CpG methylation of the *KCNQ1OT1* gene during maturation of human oocytes

R Khoureiry,<sup>1</sup> S Ibalá-Rhomdane,<sup>1,2</sup> L Méry,<sup>1</sup> T Blachère,<sup>1</sup> J-F Guérin,<sup>1</sup> J Lornage,<sup>1</sup> A Lefèvre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U846, Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Faculté de Médecine, Lyon, France; <sup>2</sup>Service de Cytogénétique et Biologie de la Reproduction, CHU Farhat Hached, Sousse, Tunisia

Correspondence to: Dr A Lefèvre, INSERM U846, Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Faculté de Médecine, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 8, France; [annick.lefevre@inserm.fr](mailto:annick.lefevre@inserm.fr)

RK and SI-R contributed equally to this work

Received 25 January 2008  
Revised 10 April 2008  
Accepted 21 April 2008

## ABSTRACT

**Background:** Imprinted genes, many of which are involved in development, are marked during gametogenesis to allow their parent-of-origin specific expression, and DNA methylation at CpG islands is part of this epigenetic mark. Maternal imprint is apposed on oocyte during growth and maturation. Factors interfering with normal oocyte differentiation such as gonadotrophin stimulation and in vitro maturation (IVM) may possibly alter imprint resetting.

**Methods:** We examined the methylation of the *KCNQ1OT1* differentially methylated region (KvDMR1) in human oocytes at different stages of their development: germinal vesicle (GV), metaphase I (MI) or metaphase II (MII).

**Results:** About 60% of alleles were fully methylated in GV oocytes and that full imprint is acquired in most MII oocytes. Similarly to in vivo, de novo methylation of DNA occurred in vitro during oocyte maturation. Following in vitro culture for 28 h, GV and MI oocytes are significantly more methylated when they are obtained from natural cycles than from patients undergoing gonadotrophin stimulation.

**Conclusion:** This observation suggests that hyperstimulation likely recruits young follicles that are unable to acquire imprint at KvDMR1 during the course of the maturing process.

Mammalian oocytes are arrested at prophase of the first meiotic division before induction of maturation by the preovulatory luteinising hormone surge. Oocyte maturation corresponds to the re-initiation and completion of the first meiotic division, with progression from the diplotene to the metaphase II stage. It is characterised by disappearance of the germinal vesicle (GV), chromosome condensation, spindle formation, and separation of homologous chromosomes, extrusion of the first polar body, and arrest of the meiotic process at metaphase II.

To increase the number of mature oocytes, standard in vitro fertilisation (IVF) protocols require ovarian stimulation with high dosage of gonadotrophins, with the accompanying risk of developing an ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). Infertile women with polycystic ovaries (PCO) or polycystic ovary syndrome (PCOS) are particularly sensitive to stimulation with exogenous gonadotrophins, and are at increased risk of developing OHSS. In vitro maturation (IVM) of immature oocytes, retrieved from unstimulated ovaries, would overcome this risk. Since reports of the first successful births,<sup>1–3</sup> more than 1000 children have been born from IVM procedures, particularly in patients with PCOS.<sup>4–5</sup> However,

after IVM, the pregnancy rates remained lower than after regular IVF.<sup>6–7</sup>

Recent reports have associated artificial reproductive techniques (ARTs) with increased incidence of imprinting disorders such as Beckwith–Wiedemann syndrome (BWS),<sup>8–11</sup> Angelman syndrome,<sup>12–13</sup> and retinoblastoma<sup>14</sup> in children conceived with the use of these procedures. Genomic imprinting is an epigenetic form of gene regulation that leads to a parent-of-origin monoallelic expression of certain genes. Their allele specific expression is mainly regulated by the differential methylation of cytosine residues, within CpG dinucleotides, at differentially methylated regions (DMR).<sup>15</sup> Imprints are erased in primordial germ cells early in fetal life, and re-established according to the sex during gametogenesis. In the mouse, de novo methylation of CpG sites in DMRs occurs during the oocyte growth phase, in a size dependent manner, and with an independent timing for each imprinted gene.<sup>16–17</sup> Therefore, the use of gonadotrophin in classical IVF procedures may cause the release of immature oocytes with incomplete or labile imprints. Similarly, the establishment of maternal imprints might be affected by in vitro maturation of oocytes since embryo culture has been demonstrated to influence the methylation status and the expression of murine *H19/Igf2*<sup>18–20</sup> and *Kcnq1ot1*,<sup>19</sup> and human oocytes matured in vitro harboured methylation at *H19* DMR1.<sup>21</sup>

*KCNQ1OT1* lies on human chromosome 11p15.5, a region organised into two domains controlled by two distinct imprinting control regions, DMR1 and KvDMR1. DMR1 is methylated on the paternal allele and regulates the expression of *H19/IGF2*. KvDMR1 is located in the promoter of the non-coding *KCNQ1OT1* gene and is maternally methylated. *KCNQ1OT1* is paternally expressed and is thought to regulate negatively the expression of several maternally expressed genes.<sup>22</sup> Loss of methylation (LOM) on the maternal allele has been observed in 40–50% of all sporadic BWS cases<sup>23–25</sup> and in the majority of BWS patients conceived through ART.<sup>10–11</sup> To evaluate the impact of either ovarian stimulation with gonadotrophin or in vitro maturation on the establishment and/or maintenance of the maternal imprint, we analysed the methylation profile of the imprinting centre KvDMR1 in human oocytes at different phases of their maturation.

## MATERIAL AND METHODS

### Source of human oocytes and embryos

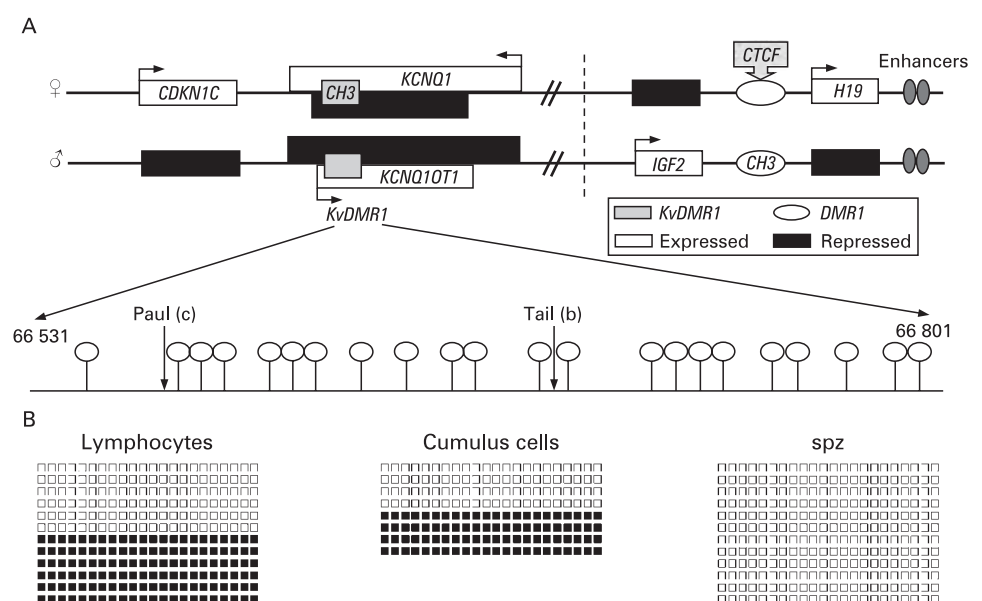
The oocytes were donated for research by patients of Laboratoire de Biologie de la Reproduction at

Edouard Hériot Hospital, after they had given their consent. A total of 167 oocytes were collected from 52 patients included in an intracytoplasmic sperm injection (ICSI) protocol and undergoing standard long term stimulation with follicle stimulating hormone (FSH) and human chorionic gonadotrophin (HCG). Most of the women do not have any known infertility problems, but 11 suffered from PCO, three from dysovulation, four had endometriosis, and one autoimmune lupus. The oocytes collected for research were immature (either at germinal vesicle (GV) or at metaphase I (MI)), or at metaphase II (MII) stages. Immature oocytes were either directly saved for methylation analysis or matured in vitro during a 28 h period<sup>26</sup> before analysis. A total of 70 oocytes were collected from patients with PCO during natural cycles, following a 28 h culture in vitro. The in vitro medium was from Medicult R (Mollehaven, Jyllingy, Denmark) supplemented with FSH, HCG, and 10% serum from the patient. The oocytes were denuded of cumulus cells by repeated pipetting in a hyaluronidase solution (150 units, type VII; Sigma, La Chapelle sur Erdre, France). Zona pellucida and any remaining somatic cells attached were removed by digestion with proteinase K (9 units/ml). One to six oocytes at the same stage of maturation and from the same cycle were pooled.

### DNA methylation analysis

The methylation profile of KvDMR1 was determined by bisulfite mutagenesis and sequencing as previously described.<sup>21</sup> We analysed a total of 22 CpG sites in a 260 bp fragment (66531–66801 bp, U90095) following nested polymerase chain reaction (PCR). To set up the bisulfite sequencing technique at the single cell level, particular care was taken in the choice of primers for nested PCR: selected external primers should typically give a good signal on agarose gel, starting with 1 ng of bisulfite treated genomic DNA, and internal primers should give a signal amplifying the first PCR product obtained with 10 pg of genomic DNA. Primers specific for bisulfite converted DNA: external forward, 5'-TGTTTTTGTAGTTTATATGG AAGGGTTAA-3'; external reverse, 5'-CTCACCCCTAAAAA CTTAAAACCTC-3'; internal forward, 5'-GTTAGGGAAGTT TTAGGGTGTGAAT-3'; internal reverse, 5'-AAACATACC AAACCACCCACCTAACAAA-3'.

**Figure 1** (A) Map of the 11p15 imprinted region comprising KvDMR1. The enlargement below the map shows the position of the differentially methylated CpGs analysed as well as Paul and Tail sites. Base numbering is according to GenBank accession number U90095. (B) Bisulfite sequencing analysis of KvDMR1 in lymphocytes, cumulus cells and spermatozoa. Each line represents a single allele. A black square indicates a methylated CpG, an open square denotes an unmethylated CpG.



The PCR products were cloned into pGEM-T (Promega) and sequenced. Four to six clones were sequenced for each product. Because of the limiting starting material and the destruction of the DNA that is inherent to bisulfite treatment, identical sequences from separated PCRs are certain to represent distinct chromosomes, but identical sequences from one product are counted only once, as previously discussed.<sup>27</sup> The frequency of the two methylation states found in different oocyte populations were analysed using distribution free tests.<sup>28</sup>

Approximately 100 ng of the same PCR product used for cloning and sequencing was digested with Tail (ACGT/) and Paul (G/CGCGC).

## RESULTS

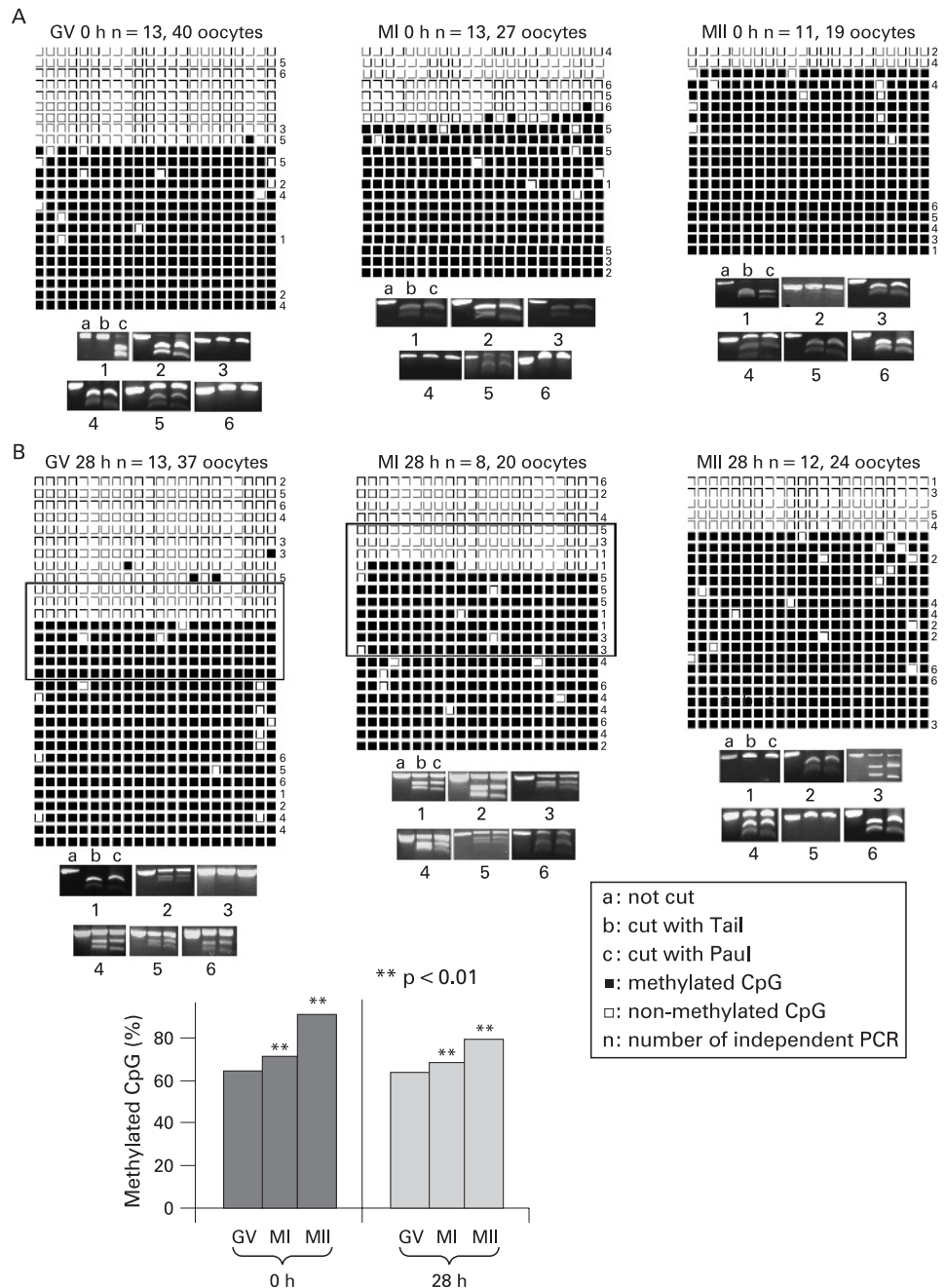
### Analysis of the methylation status of KvDMR1 in oocytes from stimulated cycles

To determine whether the maternal methylation profile of imprinted genes was established in fully grown GV oocytes and whether the 28 h culture period necessary to mature GV oocytes in vitro could influence the establishment/maintenance of the imprint, we examined the methylation pattern of the KvDMR1 region in oocytes at GV, MI or MII stages, retrieved from stimulated cycles. A total of 167 oocytes from 52 stimulated cycles were included in this study. Eleven patients had PCO, three suffered from dysovulation, two from endometriosis, one had an autoimmune lupus, and the other 33 exhibited normal fertility parameters. Forty oocytes at the GV stage from 12 patients (mean (SD) age 31.36 (1.36) years), 27 oocytes at the MI stage from 12 patients (30.25 (1.38) years), and 19 oocytes at the MII stage from three patients (31.11 (1.66) years) were collected for analysis immediately after retrieval. The methylation status of a 22 CpG site segment within KvDMR1 (fig 1A) was determined using bisulfite sequencing analysis adapted to the single cell level. KvDMR1 is unmethylated in spermatozoa, as expected, and both methylated and unmethylated alleles were equally obtained from either lymphocytes or cumulus cells (fig 1B), which exclude any bias in the PCR amplification between methylated and unmethylated strands. Optimisation of the bisulfite sequencing protocol at the few-cell level allow us to analyse oocytes (1–3 oocytes per PCR amplification cycle) from each



**Figure 2** Methylation status of KvDMR1 in oocytes from stimulated cycles.

Bisulfite sequencing analysis was performed on oocytes at different stages of their development—germinal vesicle (GV), metaphase I (MI) or metaphase II (MII): (A) directly following collection (0 h) or (B) following in vitro culture for 28 h. The number of independent experiments (n =) and the total number of oocytes analysed are indicated for each stage. Each row of squares represents a single allele. A black square indicates a methylated CpG, an open square denotes an unmethylated CpG. The numbers on the right correspond to the polymerase chain reaction (PCR) products shown below each diagram, uncut (a) or following digestion with Tail (b) or Paul (c). Dynamics of methylation change during oocyte maturation is summarised in the diagrams below the figure. In panel B, encircled alleles are from patients with polycystic ovaries; they correspond to four independent PCRs performed on 15 oocytes' DNA for GV and three independent PCRs performed on eight oocytes' DNA for MI. For each sample, the methylation data were analysed by computing the percentage of methylated CpGs out of the total number of CpGs analysed and subjected to statistical analysis using distribution free tests.<sup>28</sup>



patient individually. The efficiency of PCR amplification was 63.8% (99 positive PCR amplifications/155). Fully grown GV oocytes (120–150  $\mu$ m in humans) exhibited heterogeneous methylated profiles, with 62.5% of the alleles being methylated, corresponding to 60.4% of the total CpG sites analysed (319/528) (fig 2A). The percentage of methylated alleles in MI oocytes was more elevated than in GV oocytes (66.6%/62.5%, corresponding to 308 methylated CpG sites/462 analysed CpGs;  $p < 0.01$ ) (table 1). In contrast, most alleles were methylated in MII oocytes (89.5%, corresponding to 364 methylated CpG sites/418 analysed CpGs), although two alleles from two different patients remained hypomethylated at this last stage of oocyte differentiation before fertilisation. Therefore, de novo methylation of KvDMR1 occurred with meiosis II progression.

To evaluate the effect of in vitro culture on the ontogeny of the methylation at KvDMR1, GV oocytes retrieved from

patients treated with gonadotrophins for ICSI were cultured in an in vitro maturing medium for 28 h.<sup>26</sup> At the end of the culture period, the oocytes either stayed at the GV stage of their first meiotic division (37 oocytes from 10 patients, four of which had PCO; 32.38 (0.87) years) or remained arrested at the MI stage (20 oocytes from eight patients, three of which had PCO; 28.75 (1.29) years) or undergo their second meiotic division up to the normal block before fertilisation at MII (24 oocytes from 12 patients, 32.08 (1.23) years). Following this 28 h culture period, arrested GV or MI oocytes exhibited a heterogeneous methylated profile similar to oocytes at the same stage which were not subjected to in vitro culture (61.2%/62.5% methylated alleles, corresponding to 408 methylated CpG sites/682 analysed CpGs compared to 319/528,  $p > 0.05$  for GV and 65.2%/66.6% methylated alleles, corresponding to 327 methylated CpG sites/506 analysed CpGs compared to 308/462,  $p > 0.05$  for MI

oocytes) (fig 2B) (table 1). De novo methylation of KvDMR1 also occurred in MII oocytes matured in vitro, but the methylation level was lower in this case (78.3%/89.5% methylated alleles, corresponding to 380 methylated CpG sites/506 analysed CpGs compared to 364/418;  $p < 0.01$ ). It is of note that the methylation level of GV and MI oocytes from stimulated PCO patients (encircled alleles in fig 2B) matched that of the total population of in vitro cultured GV and MI oocytes from stimulated cycles (62.5%/61.2% methylated alleles, corresponding to 107 methylated CpG sites/176 analysed CpGs compared with 408/682 for GV  $p \geq 0.9$  and 63.6%/65.2% methylated alleles, corresponding to 157 methylated CpG sites/242 analysed CpGs compared with 327/506 for MI,  $p \geq 0.9$ ).

Because the bisulfite treatment was done on a limited number of copies, restriction analysis with enzymes that cleave only the methylated template was performed to verify that the sequencing results reflect the overall methylation profile of KvDMR1 in the oocytes analysed. Digestion with *Paul* (G/CGCGC) and *TaiI* (ACGT/) were carried out on every PCR product before cloning. As can be seen in the examples shown under the methylation profiles for each group of oocytes (fig 2), if the sequencing shows only unmethylated profiles, the PCR product was not cut by both enzymes and appears on agarose gel as a band of 291 bp; methylated templates gave fully digested bands, *Paul* generates two fragments of 195 and 95 bp, *TaiI* generates two fragments of 161 and 129 bp; and digestion of heterogenous methylated templates revealed a mixture of uncut and cut products. With the reservation that this gives information on four CpG sites only, the results of restriction enzyme analysis are analogous to those obtained from sequencing, excluding any bias during cloning.

#### Analysis of the methylation status of KvDMR1 in oocytes from unstimulated cycles

To determine the possible interference of gonadotrophin treatments with the ontogeny of methylation at KvDMR1, we examined the methylation pattern of 70 oocytes that were retrieved from 16 natural cycles in women with PCOs and underwent in vitro maturation. MII oocytes were not available for analysis because they were subjected to sperm injection in the course of the parental project of the couple. Oocytes remaining arrested at GV (36 oocytes from nine patients, 29.5 (0.85) years) or MI stages (34 oocytes from eight patients, 30.5 (0.97) years) were de facto excluded from the parental project and were included in the study. Following a 28 h culture period, the percentage of methylated alleles was significantly increased in MI oocytes compared to GV oocytes (70.3%/67.8%, corresponding to 413 methylated CpG sites/594 analysed CpGs compared to 414/616;  $p < 0.01$ ) and KvDMR1 was significantly more methylated in GV oocytes retrieved from natural cycles than in GV oocytes from stimulated patients

(67.8%/61.2% methylated alleles, corresponding to 414 methylated CpG sites/616 analysed CpGs compared to 408/682;  $p < 0.001$ ) (fig 3) (table 1). This is also true when only GV from PCOs stimulated patients are considered (67.8%/62.5% methylated alleles, corresponding to 107 methylated CpG sites/176 analysed CpGs compared to 414/616;  $p < 0.01$ ) (fig 2B and fig 3). Likewise, KvDMR1 is more methylated in MI oocytes from natural cycles than from stimulated cycles in both the general population (70.3%/65.2% methylated alleles, corresponding to 413 methylated CpG sites/594 analysed CpGs compared to 327/506;  $p < 0.01$ ) and the PCO population (70.3%/63.6% methylated alleles, corresponding to 413 methylated CpG sites/594 analysed CpGs compared to 157/242;  $p < 0.01$ ).

As previously explained, digestions with *Paul* and *TaiI* were carried out on each PCR product to be cloned and sequenced, and results of restriction enzyme analysis are comparable to those obtained from sequencing (examples are given under the methylation profiles of each group of oocytes in fig 3).

#### DISCUSSION

A series of recent observations has indicated an increased risk of conceiving a child with an imprinting defect leading to several diseases and syndromes in couples who procreated using ART. In particular, the risk of BWS was up to nine times greater in the ART population than in the general population.<sup>29</sup> BWS is characterised by pre- and/or postnatal overgrowth, a series of abnormalities, and a predisposition to embryonal tumours (MIM 130650). ART related BWS is specifically associated with loss of maternal methylation at the KvDMR1 imprinting control region. In all the published cases of ART related BWS, no common factor could be identified—the causes of infertility, the stimulatory protocol, the culture media used, the biological technique, as well as the timing of embryo transfer varied.<sup>10 11 29</sup> The only general feature is the use of ovarian stimulation protocol and, in most of the cases, of in vitro culture. IVM of immature oocytes retrieved from unstimulated ovaries may overcome a possible disturbing effect of hormonal stimulation on methylation of the maternal genome, but will not eliminate the potential risk associated with the in vitro culture of the oocytes. The availability of immature oocytes at the GV or MI stages from stimulated and unstimulated cycles gave us an opportunity to appreciate the impact of each factor on the methylation status of KvDMR1.

We first show that the hypermethylated pattern characteristic of the maternal allele of KvDMR1 in somatic cells is only established in two thirds of total alleles analysed in fully grown GV oocytes from stimulated cycles. These results are apparently divergent from those of Geuns *et al*<sup>30</sup> who showed a fully methylated pattern in GV oocytes. The discrepancy between both studies could be due to the small number of independent alleles randomly sequenced in Geuns *et al*<sup>30</sup> (seven for GV and seven for MI in Geuns *et al*<sup>30</sup> compared to 55 and 44, respectively, in this study). More likely, since the region analysed by this group is situated 1239 bp downstream from the region in the present study, it may reflect a dichotomy between two regions within the DMR whose imprinting schedule would be dissociated. The fact that methylation would not occur by linear spreading along the chromosome has been previously documented for the H19-Igf2 locus: a hierarchy in the methylation process has been observed during early post-implantation development, the methylation of DMR1 preceding that of DMR2 in the kidney.<sup>31</sup>

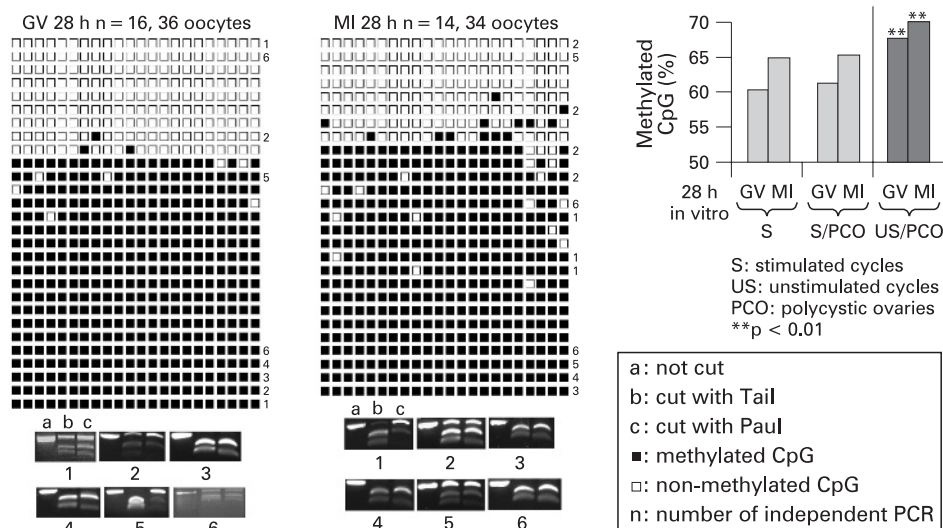
In mice, KvDMR1 is entirely methylated in early antral follicles, before meiosis resumption.<sup>17</sup> This contrast between

**Table 1** Percentage of methylated alleles in germinal vesicle (GV), metaphase I (MI) and metaphase II (MII) oocytes in the different experimental situations

	Stimulated cycles			Unstimulated cycles PCO/matured in vitro
	Matured in vivo	Matured in vitro	PCO/matured in vitro	
GV	62.5	61.2	62.5	67.8
MI	66.6	65.2	63.6	70.3
MI	89.5	78.3	–	–

PCO, polycystic ovaries.

**Figure 3** Methylation status of KvDMR1 in oocytes obtained from natural cycles in patients with polycystic ovaries (PCO). Only germinal vesicle (GV) and metaphase I (MI) oocytes could be analysed. Details are described in fig 2. Comparisons with results obtained from stimulated cycles in all patients or in PCO patients only are summarised in the diagram. For each sample, the methylation data were analysed by computing the percentage of methylated CpGs out of the total number of CpGs analysed and subjected to statistical analysis using distribution free tests.<sup>28</sup>



mice and humans emphasises the need for studies on humans. De novo methylation progresses through meiosis I and II, and almost all matured MII oocytes were fully methylated at KvDMR1. As a few DNA copies remained unmethylated at the MII stage, we cannot exclude the possibility that maternal methylation of KvDMR1 could occur at later stages. Some of the oocytes that were immature at the time of collection succeeded in completing maturation in vitro within 28 h. Since the imprint was not thoroughly established in fully grown GV oocytes, we wondered whether the culture media could influence the de novo methylation of KvDMR1. Following in vitro culture, immature oocytes from stimulated cycles that remained at the GV stage or progressed to MI exhibited the same degree of methylation than oocytes matured in vivo, but MII oocytes showed a significant deficit in methylation. Several hypotheses may account for this observation. It could be attributed to the shorter time given to GV oocytes to mature in vitro compared to the in vivo maturing period (28 h/36–40 h), which does not allow the methylation process to go to completion. On the other hand, prolonged culture of MII oocytes has been shown to induce demethylation of Peg1/Mest DMR in the mouse.<sup>32</sup>

In the natural human menstrual cycle about 15 follicles are recruited for growth. After some 14 days, only one or two of these follicles reach maturation and are ovulated. In standard ART, the large dose of gonadotrophins used to rescue the growth of small follicles could cause the premature release of oocytes that are at an earlier developmental stage. These oocytes have escaped selection and may not be able to overtake their delay in acquisition of the imprint and therefore exhibit a hypomethylated pattern at MII. The hypothesis that gametic imprints are sensitive to in vitro conditions is supported by previous work: a gain of methylation has been described at H19/Igf2 DMR following in vitro culture of preimplantation embryos, couple with altered development,<sup>19, 33</sup> and a loss of methylation at the Igf2R and Peg1/Mest loci in fully grown GV oocytes produced by in vitro development of preantral follicles.<sup>34</sup> Thus, we cannot exclude the possibility that the impaired de novo methylation of KvDMR1 observed in stimulated oocytes matured in vitro may be due in part to the composition of the culture media that does not exactly match the in vivo environment.

Oocytes obtained from unstimulated cycles have been subjected in vivo to a surge of circulating FSH that stimulates follicular recruitment, but they are collected before dominance and atresia of the subordinate follicles. They represent a valuable control to evaluate a potentially negative impact of superovulatory gonadotrophin treatments on imprint establishment. At the end of the in vitro maturing process, MII oocytes were never available because they were selected for the ICSI procedure. We observed in both GV and MI oocytes from natural cycles a significant increase in methylation as compared to oocytes at the same stage of maturation retrieved from stimulated cycles. This is particularly true when oocytes in both cycles were exclusively from POC patients; this means that the higher methylated state observed in natural cycles is not related to the aetiology of infertility—that is, PCOs in this case. One may fear that in PCO patients the oocytes recovered from natural cycles might include degenerating and atretic follicles which we did not observe. The high methylated state observed in GV and MI oocytes, and the increase of de novo methylation observed between both stages, are in favour of full imprint establishment by MII stage, though MII in vitro matured oocytes from natural cycles are not available, so it cannot be verified. The deficit of methylation in oocytes from stimulated cycles is likely to reflect the recruitment of small follicles that are at an earlier stage of development. Those oocytes may not be able to acquire full imprint by MII, even though they appeared mature in other respects and could be fertilised.

Our study on a large cohort of human oocytes demonstrated that imprint establishment proceeds during in vitro maturation, which is of particular importance for the thousands of children born from IVF oocytes. We also showed that the high concentration of gonadotrophins provided to antral follicles before recruitment to terminal growth led to the selection of some oocytes that failed to acquire full imprint at KvDMR1, particularly when they were matured in vitro, very likely because they were at an earlier stage of development. Our results are in agreement with other studies on epigenetic disorders in children born from ART that could not establish a correlation between a particular technique and the imprinting defect observed, with the exception of the hormonal treatment.

**Acknowledgements:** We thank Robert Dante and Luisa Dandolo for critical reading of the manuscript.

**Funding:** RK was a recipient of Organon and Lebanon CNRS fellowships. This work was supported by a grant from Agence de la Biomédecine "R06106CC".

**Competing interests:** None declared.

## REFERENCES

1. **Cha KY**, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991;**55**:109–13.
2. **Trounson A**, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994;**62**:353–62.
3. **Barnes FL**, Kausche A, Tiglias J, Wood C, Wilton L, Trounson A. Production of embryos from in vitro-matured primary human oocytes. *Fertil Steril* 1996;**65**:1151–6.
4. **Chian RC**. In-vitro maturation of immature oocytes for infertile women with PCOS. *Reprod Biomed Online* 2004;**8**:547–52.
5. **Le Du A**, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier MC, Chevalier N, Fanchin R, Chian RC, Tachdjian G, Frydman R, Frydman N. In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Hum Reprod* 2005;**20**:420–4.
6. **Soderstrom-Anttila V**, Makinen S, Tuuri T, Suikari AM. Favourable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients. *Hum Reprod* 2005;**20**:1534–40.
7. **Cha KY**, Chung HM, Lee DR, Kwon H, Chung MK, Park LS, Choi DH, Yoon TK. Obstetric outcome of patients with polycystic ovary syndrome treated by in vitro maturation and in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2005;**83**:1461–5.
8. **Maher ER**, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, Macdonald F, Sampson JR, Barratt CL, Reik W, Hawkins MM. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet* 2003;**40**:62–4.
9. **Sutcliffe AG**, Peters CJ, Bowdin S, Temple K, Reardon W, Wilson L, Clayton-Smith J, Brueton LA, Bannister W, Maher ER. Assisted reproductive therapies and imprinting disorders – a preliminary British survey. *Hum Reprod* 2006;**21**:1009–11.
10. **DeBaun MR**, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 2003;**72**:156–60.
11. **Gicquel C**, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN10T gene. *Am J Hum Genet* 2003;**72**:1338–41.
12. **Cox GF**, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002;**71**:162–4.
13. **Orstavik KH**, Eiklid K, van der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skjeldal O, Buiting K. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet* 2003;**72**:218–9.
14. **Moll AC**, Imhof SM, Cruysberg JR, Cruysberg JR, Schouten-van Meeteren AY, Boers M, van Leeuwen FE. Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation. *Lancet* 2003;**361**:309–10.
15. **Reik W**, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001;**2**:21–32.
16. **Lucifero D**, Mann MR, Bartolomei MS, Trasler JM. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* 2004;**13**:839–49.
17. **Hiura H**, Obata Y, Komiyama J, Shirai M, Kono T. Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice. *Genes Cells* 2006;**11**:353–61.
18. **Khosla S**, Dean W, Brown D, Reik W, Feil R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod* 2001;**64**:918–26.
19. **Rivera RM**, Stein P, Weaver JR, Mager J, Schultz RM, Bartolomei MS. Manipulation of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development. *Hum Mol Genet* 2008;**17**:1–14.
20. **Fauque P**, Jouannet P, Lesaffre C, Ripoché MA, Dandolo L, Vaiman D, Jammes H. Assisted reproductive technology affects developmental kinetics, H19 imprinting control region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. *BMC Dev Biol* 2007;**7**:116.
21. **Borghol N**, Lornage J, Blachère T, Sophie Garret A, Lefèvre A. Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation. *Genomics* 2006;**87**:417–26.
22. **Horike S**, Mitsuya K, Meguro M, Kotobuki N, Kashiwagi A, Notsu T, Schulz TC, Shirayoshi Y, Oshimura M. Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 2000;**9**:2075–83.
23. **Smilnich NJ**, Day CD, Fitzpatrick GV, Caldwell GM, Lossie AC, Cooper PR, Smallwood AC, Joyce JA, Schofield PN, Reik W, Nicholls RD, Weksberg R, Driscoll DJ, Maher ER, Shows TB, Higgins MJ. A maternally methylated CpG island in KvLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:8064–9.
24. **Engel JR**, Smallwood A, Harper A, Higgins MJ, Oshimura M, Reik W, Schofield PN, Maher ER. Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 2000;**37**:921–6.
25. **Gaston V**, Le Bouc Y, Soupre V, Burglen L, Donadieu J, Oro H, Audry G, Vazquez MP, Gicquel C. Analysis of the methylation status of the KCN10T and H19 genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2001;**9**:409–18.
26. **Mikkelsen AL**, Smith S, Lindenberg S. Possible factors affecting the development of oocytes in in-vitro maturation. *Hum Reprod* 2000;**15**(Suppl 5):11–17.
27. **Borghol N**, Blachère T, and Lefèvre A. Transcriptional and epigenetic status of protamine 1 and 2 genes following round spermatids injection into mouse oocytes. *Genomics* 2008;**91**:415–22.
28. **Kozioł JA**, Maxwell DA, Fukushima M, Colmerauer ME, Pilch YH. A distribution-free test for tumor-growth curve analyses with application to an animal tumor immunotherapy experiment. *Biometrics* 1981;**37**:383–90.
29. **Halliday J**, Oke K, Breheny S, Algar E, J Amor D. Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. *Am J Hum Genet* 2004;**75**:526–8.
30. **Geuns E**, Hilven P, Van Steirteghem A, Liebaers I, De Rycke M. Methylation analysis of KvDMR1 in human oocytes. *J Med Genet* 2007;**44**:144–7.
31. **Lopes S**, Lewis A, Hajkova P, Dean W, Oswald J, Forné T, Murrell A, Constancia M, Bartolomei M, Walter J, Reik W. Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. *Hum Mol Genet* 2003;**12**:295–305.
32. **Imamura T**, Kerjean A, Heams T, Kupiec JJ, Thenevin C, Paldi A. Dynamic CpG and non-CpG methylation of the Peg1/Mest gene in the mouse oocyte and preimplantation embryo. *J Biol Chem* 2005;**280**:20171–5.
33. **Doherty AS**, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomei MS, Schultz RM. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 2000;**62**:1526–35.
34. **Kerjean A**, Couvert P, Heams T, Chalas C, Poirier K, Chelly J, Jouannet P, Paldi A, Poirrot C. In vitro follicular growth affects oocyte imprinting establishment in mice. *Eur J Hum Genet* 2003;**11**:493–6.

Access all our original articles online even before they appear in a print issue!

Online First is an exciting innovation that allows the latest clinical research papers to go from acceptance to your browser within days, keeping you at the cutting edge of medicine.

Simply follow the Online First link on the homepage and read the latest Online First articles that are available as unedited manuscripts in downloadable PDF form. The articles are peer reviewed, accepted for publication and indexed by PubMed but not yet included in a journal issue, so you'll be among the first to read them!

## **Analysis of H19 methylation in control and abnormal embryos, sperm and oocytes**

Samira Ibala-Romdhane, M.D.<sup>♯</sup>, Mohamed Al-Khtib<sup>•</sup>, Rita Khoueiry, Ph.D.<sup>•</sup>, Thierry Blachère<sup>•</sup>, Jean-François Guérin, M.D., Ph.D.<sup>•♯</sup>, Annick Lefèvre, Ph.D.<sup>•\*</sup>.

<sup>•</sup>: INSERM U846, Institut Cellule Souche et Cerveau, 18 Av Doyen Lépine, 69500 Bron, France.

<sup>♯</sup>: Service de Biologie de la Reproduction, Hôpital Femme Mère Enfants, 69500 Bron, France.

<sup>♯</sup>: Service Cytogénétique et Biologie de la Reproduction, Hôpital Farhat Hached, 4000 Sousse, Tunisie.

\*: corresponding author: Annick Lefèvre, INSERM U846, Institut Cellule Souche et Cerveau, 18 Av Doyen Lépine, 69500 Bron, France. E-mail : [annick.lefevre@inserm.fr](mailto:annick.lefevre@inserm.fr), telephone : 33 4 78 77 28 79, fax : 33 4 78 77 72 64.

**Abstract:**

ART is suspected to generate increased imprinting errors in the lineage. Following an ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) procedure, a certain number of embryos fail to develop normally and imprinting disorders may be implicated in their developmental failure.

To evaluate this hypothesis, we analysed the methylation profile of H19DMR, a paternally imprinting control region, in high graded blastocysts suitable for transfer and in embryos showing developmental anomalies, in the matching sperm and in oocytes of the concerned couples, when they were available.

Significant hypomethylation of the paternal allele was observed in half of the embryos, independently of the stage at which they were arrested (morula, compacted morula, pre blastocyst or BC graded blastocysts). Oppositely, some embryos showed significant methylation on the maternal allele while both, hypomethylation of the paternal allele and abnormal methylation of the maternal allele, could be observed in a few others. All the matched sperm of the embryos exhibited normal methylated H19 patterns. Thus, hypomethylation of the paternal allele in the embryos does not appear inherited from the sperm but likely reflects instability of the imprint during the demethylating process occurring in the early embryo. Analysis of a few oocytes suggests that defect in erasure of the paternal imprint in the maternal germ line may be responsible for the residual methylation of the maternal allele in some embryos. None of these imprinting alterations could be related with arrest of development.

## Introduction

Normal mammalian development requires that both a paternal and a maternal genome be properly expressed. Therefore, epigenetic marks acquired in the germ line drive the monoallelic expression, according to parent of origin, of so called “imprinted genes” in the embryo <sup>1</sup>. Many imprinted genes are involved in the regulation of fetal and/or placental growth <sup>2</sup>. Imprinted genes are regulated through DNA sequences known as imprinting control regions (ICRs) that are differentially methylated, DNA methylation at CpG sequences typically resulting in gene repression. Methylation of ICRs is erased early in life and reset in the germ line, according to the sex <sup>3</sup>. Another wave of genome-wide demethylation followed later by *de novo* methylation occurs during preimplantation development from which imprinted genes are protected <sup>4</sup>.

Several reports have supported the idea that artificial reproductive techniques (ARTs) would favour the acquisition of imprinting errors <sup>5-9</sup>. Epigenetic abnormalities in ART could be related to the parental infertility, corresponding to imprinting errors in the gametes, transmitted at fertilisation, or to the *in vitro* manipulation of gametes and embryos <sup>10</sup>. Therefore, looking for imprinting defects in embryos that failed to normally develop and in the gametes would provide informations on whether unsuitable imprint in the gametes could be transmitted and led to developmental arrest. Thus we have analysed the methylation profile of H19 DMR in control blastocysts, initially suitable for transfer and preimplantation embryos arrested at different stages of their development: morula, preblastocyst and blastocyst showing poor morphology (graded B C), in parental sperm and in the oocytes of the couples when they were available.

The locus H19DMR is one of the 3 imprinting control region that acquire methylation in the paternal germ line. It regulates the expression of two oppositely imprinted genes <sup>11</sup>: H19 codes an untranslated RNA with tumour suppressor activity <sup>12</sup> and is expressed from the maternal allele ; IGF2 (insulin growth factor 2) which codes a growth factor essential for development (). H19DMR harbours several CTCF (CCCTC-binding factor) binding sites <sup>13</sup>. CTCF binds to the maternal unmethylated DMR and prevents IGF2 from accessing the common enhancers. Oppositely, methylation on the paternal DMR prevents the binding of CTCF, permitting IGF2 expression. Hypermethylation of H19 maternal allele is linked to Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) in some patients <sup>5</sup>, while hypomethylation of the paternal allele is associated with Silver-Russell syndrome <sup>14</sup>, both syndromes showing opposed growth disorders.

## **Material and methods**

### ***Source of human embryos, oocytes and sperm:***

A total of 33 embryos from 11 different couples, derived from fertilised ICSI oocytes, were donated for research by patients of Laboratoire de Biologie de la Reproduction at Femme Mère Enfant Hospital (Bron, France), after they have given their informed consent. The women included in this study were stimulated prior to ICSI procedure with standard long term stimulation protocol using FSH and HCG. Five embryos considered as control embryos were high graded ICSI blastocysts; the abnormal embryos were distributed as follows: 5 pre-blastocysts, 8 abnormal BC blastocysts (according to Gardner et al. grading system: the inner cell mass contained several cells, loosely grouped and the trophectoderm contained very few large cells forming a loose epithelium), 13 compacted morula and 2 morula. Protocols were approved by the French legal institution for research on human embryos. ICSI indications were heterogeneous as shown in table I, but all embryos originated from super ovulated oocytes. Zona pellucida and attached cumulus cells were removed by digestion with proteinase K (9 units/ml). Denuded embryos were carefully examined under an inverted microscope with Hoffman Modulation Contrast optics (Leica DM IRB) and only cumulus cell-free embryos were selected for analysis and stored individually at -80°C.

After oocyte collection, the cumulus-oocyte complexes were partially denuded of cumulus cells by repeated pipetting in a hyaluronidase solution (150 units, type VII; Sigma) and the oocytes were evaluated for maturity; the immature partially denuded oocytes, either at the germinal vesicle (GV) or at metaphase I (MI) stage, at the time of retrieval were used for experiments. A total of 15 oocytes from 2 patients (**years old for patient 5 and years old for patient 33**) were included in this study: 1GV, 12 MI and 2 MII that were retrieved immature and spontaneously matured after the selection of MII oocytes suitable for the ICSI procedure took place. Zona pellucida and any remaining somatic cells attached were removed by digestion with proteinase K (9 units/ml). After careful examination under an inverted microscope with Hoffman Modulation Contrast optics (Leica DM IRB), only cumulus cell-free oocytes were selected for analysis.

The ejaculated sperm samples were collected from the male partner the day of the ICSI procedure was programmed. Routine semen analysis was performed (volume, counting rates of motility, morphology) and motile sperm cells were purified using the swimming up method that eliminates somatic cell contamination. The sperm were washed repeatedly and placed in phosphate-buffered saline, and DNA was extracted by a standard method.



### ***DNA methylation analysis***

The methylation profile of H19 DMR was determined by bisulphite mutagenesis and sequencing.

#### ***Bisulphite treatment:***

The embryos were thawed and placed in 100µl of a lysis solution (50 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8, 0.14µg/µl proteinase K and SDS 0.2%) and incubated for 2 h at 55°C. Three µg of DNA carrier (salmon sperm DNA 10mg/ml, Invitrogen) were added to each sample. Following alkaline denaturation (30' incubation at 37°C after addition of 20 µl of NaOH 3M), DNA was incubated in 3 M sodium bisulphite (350 µL) containing 1 mM hydroquinone (50 µl) for 16 h 30 min at 50°C. After purification using the Wizard DNA Clean-Up System (Promega), the DNA was desulfonated in 0.3 M NaOH and precipitated with ethanol, then resuspended in 50 µl of sterile water. After treatment with bisulphite and purification the DNA was immediately used for duplex PCR.

#### ***PCR:***

The 50 µl of treated DNA were utilised to perform 5 independent nested PCRs. We analysed 18 CpG sites in a 234 bp fragment of H19DMR (6097-6330 bp, AF087017) harbouring a single nucleotide polymorphism (SNP) A/C at nucleotide 6236. This 234 bp fragment contains the 6<sup>th</sup> CTF binding site.

The PCR reaction mix contained 10 µl of treated DNA, 1 µl of each primer set (25 pmol/µl), 2 µl of dNTPs (10 pmol/µl), 5 µl of 10X PCR buffer, 3 µl of MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.66 µl of Hot start Taq DNA Polymerase (HOT BIOAmp DNA Polymerase, Biofidal) in a total volume of 50 µl. The following PCR program was used for the first round: 15 min of denaturation at 95°C followed by 40 cycles of 45 s at 95°C, 1 min at 56°C and 45 s at 72°C and a final extension for 10 min at 72°C in a Mastercycler personal Eppendorf.

One µl of the first round PCR product was used as DNA input for amplification in the second round nested PCR with the following program: 15 min denaturation at 95°C followed by 38 cycles of 45 s at 95°C, 1 min at 56°C and 45 s at 72°C and a final extension for 10 min at 72°C. The second round nested PCR mix contained one primer set and 1 µl of dNTP (10pmol/µl). The primers used are the following: external forward: 5'-AATAATGAGGTGTTTTAGTTTTATGGATG-3'; external reverse: 5'-ACTTAAATCCCAAACCATAA CACTAAAAC-3'; internal forward: 5'-TTGTATAGTATATGGGTATTTTTGGAGGTT-3'; internal reverse: 5'-ACTCCTATAAATATCCTATTCCCAAATAACCCC-3'.

### *Cloning and sequencing:*

The PCR products were sub cloned into pGEM-T plasmid (Promega). Five clones were sequenced for each PCR product (Biofidal, Lyon, France). Identical sequences from separated PCRs are considered to represent distinct chromosomes, but identical sequences from one product are counted only once, as previously discussed.

### **Statistics**

Statistical analysis were done using non parametric t-Test or ANOVA, and a difference was considered significant when  $p \leq 0.05$ .

### **Results**

#### ***Control blastocysts***

Control blastocysts were cryopreserved for 2 to 9 years before they were donated for research. The SNP localised within the amplified sequence allow parental allele discrimination in 4 out of the 5 analysed blastocysts as shown in fig.1. Thus, even though the corresponding sperms were not available, all methylated sequences carrying the same SNP are likely to be from paternal origin while all unmethylated sequences carrying the other SNP are likely to be from maternal origin. Therefore, control blastocysts appeared differentially methylated, as expected, with an average of  $85.42\% \pm 2.76$  methylated CpGs (615 CpGs being methylated out of 720 analysed) for the presumed paternal allele and  $1.08\% \pm 0.95$  methylation (8 methylated CpGs out of 738 analysed) for the presumed maternal allele. A pool of 2 sperms from fertile men exhibited 94.01% methylation. Thus, the highly methylated state of the paternal allele of H19 was conserved in blastocysts, even though with a 8.6% significant leakage. According to the SNP depicted, the strands were distributed into two profiles, 6236-C or 6237-A.

#### ***Embryos with developmental failure***

Sperms that matched embryos showing developmental failure belonged to various patients, presenting normal or altered sperm parameters, either severe sperm morphology abnormalities (teratozoospermia), mobility defect (asthenozoospermia), or associated sperm morphology, mobility and concentration defects (oligo-astheno-teratozoospermia), as shown in table I. All exhibited normal high methylation at H19 as shown in fig.1, with an average of  $95.16\% \pm 2.61$ , which is comparable to that observed in sperms from fertile men. Six were homozygous (6236-C or 6236-A) and five were heterozygous (6236-C and 6236-A) for the SNP described

In 21 embryos out of 28, the SNP observed permitted parental allele discrimination, as shown in fig.1 and 2. Embryos included in this study were blocked at various stages, from morula to compacted morula and pre-blastocyst stage, while 5 embryos reached the blastocyst stage but with poor morphology (graded BC). Embryos from the same couple could be arrested at different stages of development, and there was no correlation between the stage of blockage and any infertility factor (table I and II). We observed significant relaxation of H19 paternal imprint in 8 embryos out of 21 where parental allele discrimination was possible, the altered strands being partially to totally unmethylated (Fig. 1 and 2). Moreover, 8 of these embryos exhibited significant even minor methylation of the maternal allele, with 2 embryos, 33.3 and 52.2, showed up to 15.87% and 20.14 % methylation respectively. Altered methylation patterns on the paternal and the maternal alleles were not correlated, nor were they associated with a particular stage of developmental arrest (table II).

The methylation status of the oocytes could be analysed for 2 couples (fig.1). In couple 5, the father was homozygous C while the mother was heterozygous A or C. One germinal vesical stage (GV) oocyte, carrying the SNP 6236-A, exhibited hypermethylated alleles while a pool of 2 mature MII oocytes, carrying the SNP 6236-A, showed normal hypomethylation. One may speculate that the hypermethylated 6236-C alleles were inherited from the grand father and corresponded to alleles that escaped from the erasure of paternal marks that takes place early during oogenesis, as hypothesised in figure 3. Thus, embryo 5.4 inherited a paternal 6236-C allele, the corresponding sperm being homozygous 6236-C and carries a maternal 6236-A allele showing normal hypomethylation that is likely to be inherited from the grand mother. The paternally inherited 6236-C allele exhibited significant hypomethylation ( $p < 0.001$ ). In couple 33, both the father and the mother were heterozygous 6236-C and 623C-A. Twelve immature metaphase one (MI) oocytes could be collected and analysed. They showed two different allelic profiles: 6236-A, normally hypomethylated and presumably inherited from the mother or 6236-C, highly methylated (35 methylated CpGs out of 36 analysed) and presumably paternally inherited alleles that escaped from the erasure of paternal marks early during oogenesis, as previously discussed. Thus, embryo 33.3 is likely to originate from a paternal spermatozoon carrying a 6236-A methylated allele, since the two methylated 6236-A strands carried an unmethylated 6194-C bp, as can be seen in all 6236-A sperm alleles, and an oocyte carrying a 6236-C methylated allele for H19, likely inherited from the grand father as speculated in figure 3. The presumed paternal allele is significantly hypomethylated (39 methylated CpGs out of 72 analysed  $p < 0.001$ ) while the presumed maternal one is significantly methylated (20 methylated CpGs out of 126 analysed,  $p < 0.001$ ).

## Discussion

Because imprinted genes are extensively involved in embryo development<sup>15</sup>, it appears pertinent to suspect a dis-functioning in the imprinting process when development fails. Imprinting is both heritable and reversible; in the early embryo, epigenetic information is erased from the genome on a large scale to permit the return of developmental pluripotency to embryonic cells, and this limit the amount of epigenetic information that can be inherited across generation<sup>16</sup>. Imprinted genes that carry such heritable epigenetic information must be protected against this powerful remodelling of the epigenome that proceeds during preimplantation development. Considering the sensor gene H19, the paternal allele normally escapes the active demethylation of the male genome that occurs in the pronucleus soon after fertilisation and the maternal allele is protected against the *de novo* DNA methylation of the zygote in the morula to blastocyst stage<sup>4</sup>.

Very little is known concerning the differential methylation of imprinted genes in preimplantation human embryos. We previously shown that both the maternally KCNQ1OT1 and the paternally H19 imprinted genes were differentially methylated in human ICSI blastocysts (Khoueir et al to be published). In the present work, using an SNP within H19DMR we could determine the differential methylation status of 4 out of 5 control blastocysts and of 21 out of 28 abnormal embryos. Our results from control embryos confirmed that, as observed in the mouse, H19 is differentially methylated in human blastocysts conceived *via* ART. In contrast, 38% of the developmentally failing embryos exhibited significant hypomethylation of the paternal allele, independently of the type of developmental failure: blockage at the compacted morula or pre blastocyst stage, or poor morphology at the blastocyst stage. Since normal methylation of the paternal allele was observed in the other abnormal embryos, imprinting errors at H19/IGF2 are likely not to be primarily involved in the developmental failure of human ICSI embryos.

Embryos showing hypomethylated paternal alleles may originate from sperm in which resetting of the imprint has been only partially accomplished. Recently, Kobayashi et al.<sup>17</sup> showed that hypomethylation of H19DMR in aborted ART concepti originated from the parental sperm. A case of Silver-Russel syndrome due to paternal H19DMR hypomethylation in an ICSI patient has been likewise documented<sup>18</sup>. In fact, in none of the parental sperm examined, whatever was their biological characteristics, from normozoospermic to oligo-astheno-teratospermic, we found any alteration of the normal methylated pattern of H19, demonstrating that the alterations in DNA methylation seen in certain arrested embryos did not pre exist in the father's germ line. It is interesting to note that, in sperm carrying the SNP

A, the cytosine corresponding to the 4<sup>th</sup> CpG of the 6<sup>th</sup> CTCF binding site (nucleotide 6194) currently appeared as a thymidine (in out of total alleles), presumably corresponding to an unmethylated CpG in the original strand. Renda et al.<sup>19</sup> demonstrated that methylation of the first and the second CpGs of the CTCF binding sequence was sufficient to inhibit the binding of CTCF, the methylation of the first CpG being the more powerful. On the other hand, in most arrested embryos, hypomethylation of the paternal allele did not particularly target these key CpGs, suggesting normal expression of IFG2. However, the number of samples analysed remained limited, and sperm-transmitted aberrant hypomethylation of the paternal allele of H19 in arrested embryos cannot be totally excluded, since H19 hypomethylation in sperm has been associated with paternal infertility in a number of articles<sup>20-22</sup>. Thus, considering that resetting of methylation during gametogenesis has normally proceeded, it could be hypothesised that the hypomethylation observed is due to an alteration of the methylation maintenance in the early embryo. Maintenance of DNA methylation at imprinting DMRs in preimplantation embryos as been assigned recently to the somatic and the oocyte form of DNMT1, in cooperation. Maternal deletion of both isoforms, DNMT1s and DNMT1o, caused loss of methylation at multiple imprinted loci in mouse blastocysts<sup>23</sup>. Thus, lowered expression of DNMT1 in the embryos could account for a deficit of methylation of the paternally inherited H19 allele. We previously showed (Khoueir et al. 2010) that, in embryos where a deficit in KCNQ1OT1 methylation was observed, the expression of DNMT1 was normal. But, we did not demonstrate that the protein was present in the nucleus and thus possibly efficient. Both would have to be verified in embryos exhibiting loss of H19 imprint. In addition, there are also other trans-acting factors critical for the maintenance of methylation at imprinted genes that have been recently identified, such as MBD3 that as is required to maintain the methylation of the paternal H19 allele and its silencing<sup>24</sup>. Depletion in MBD3 protein in the embryos may, possibly, explained a deficit of H19 methylation in the embryos and the presence of MBD3 will have to be evaluated.

Some embryos exhibited significant methylation of the maternal allele. Results from couples 5 and 33 whose oocytes were available allow speculating. In both couples, the paternal allele show some relaxation of the imprint, probably due to alterations in DNA methylation maintenance as previously discussed. In both couples some immature GV and MI oocytes were highly methylated. We previously evidence such an altered pattern of methylation in human oocytes, particularly in oocytes that were immature the day of retrieval, but also in mature oocytes<sup>25, 26</sup>. While the maternally originating H19 strands were not methylated in embryo 5.4, they were significantly methylated in embryo 33.3. Both the father

and the mother were heterozygous in couple 33. The allele likely inherited from the father carried the A SNP; it was initially methylated since, the sperm appeared normally methylated, and partially demethylated in the course of cell divisions. The allele likely inherited from the mother carried the C SNP. We may postulate, as shown in figure 3, that the maternal allele was initially methylated and then partially demethylated in the embryo. Methylated H19 strands in the oocytes may correspond to acquisition of abnormal methylation on the maternal allele during oogenesis or lack of erasure of the paternal imprint early in the gonocytes. Since the mother oocytes showed either unmethylated A-SNP-H19 strands or methylated C-SNP-H19 strands, methylation apposition during oogenesis is unlikely, otherwise, it would have also marked at random A-SNP-H19 strands. Lack of erasure of the copies originating from the grand father in the gonocytes of the mother is a more credible scenario. Thus, all methylated copies seen in the oocytes likely originated from paternal copies, the imprint of which has not been erased. Paradoxally, IGF2 expression may be unaltered in embryo 33.3: half paternal alleles exhibited unmethylated CTCF binding sites and could potentially bind CTCF, inducing the silencing of IGF2 and the expression of H19; on the contrary, some maternal alleles showed methylated CTCF binding sites that thus could not bind CTCF, possibly conducting to abnormal silencing of H19 and expression of IGF2 from the maternal allele. This hypothesis is supported by a recent study that observed expression of H19 from the paternal allele following superovulation <sup>27</sup>. Thus, opposite methylation alteration in some embryos would lead to normal expression of the concerned genes; it remains to be demonstrated by analysis of IGF2 allele specific expression in arrested embryos. Such a gain of maternal methylation and a loss of paternal methylation at H19DMR has been recently documented in mouse blastocysts and was attributed to superovulation induced imprinting disorders <sup>28</sup>. The authors did not give information on the imprint in the oocytes themselves. On the other hand, we found almost no residual methylation on the maternal allele of control human blastocysts while Market-Velker et al. (2010) showed an average methylation of the maternal allele of H19 up to 15% in mouse blastocysts obtained from spontaneously ovulated female, demonstrating one more time the discrepancies existing between species at the level of the epigenome regulation.

In the present work, we show that, some but not all, arrested preimplantation embryos harbour altered H19 imprints on both the paternal and the maternal alleles, while blastocysts suitable for transfer were normally imprinted. Our results suggested both a failure of erasure of the paternally inherited imprint in the maternal germ line and a lack of methylation maintenance on the paternal allele. The question remains of whether there is a link between

imprinted errors and parental infertility. No evident link appeared between imprint anomalies and developmental failure.

*Acknowledgments:* we are very grateful to all the couples that donated embryos and gametes for research and to the staff of “Service de Biologie de la Reproduction” at FME Hospital, Bron, particularly to Jacqueline Lornage and Astrid Perret. This work was supported by Université Claude Bernard Lyon 1.

## References

1. Surani MA. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. *Cell* 1998;**93**(3):309-12.
2. Reik W, Constancia M, Fowden A, *et al.* Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes. *J Physiol* 2003;**547**(Pt 1):35-44.
3. Hajkova P, Erhardt S, Lane N, *et al.* Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 2002;**117**(1-2):15-23.
4. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001;**293**(5532):1089-93.
5. DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 2003;**72**(1):156-60.
6. Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, *et al.* In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN10T gene. *Am J Hum Genet* 2003;**72**(5):1338-41.
7. Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, *et al.* Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet* 2003;**40**(1):62-4.
8. Orstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, *et al.* Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet* 2003;**72**(1):218-9.
9. Bowdin S, Allen C, Kirby G, *et al.* A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders. *Hum Reprod* 2007;**22**(12):3237-40.
10. Grace KS, Sinclair KD. Assisted reproductive technology, epigenetics, and long-term health: a developmental time bomb still ticking. *Semin Reprod Med* 2009;**27**(5):409-16.
11. Zemel S, Bartolomei MS, Tilghman SM. Physical linkage of two mammalian imprinted genes, H19 and insulin-like growth factor 2. *Nat Genet* 1992;**2**(1):61-5.
12. Yoshimizu T, Miroglio A, Ripoche MA, *et al.* The H19 locus acts in vivo as a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**(34):12417-22.
13. Takai D, Gonzales FA, Tsai YC, *et al.* Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer. *Hum Mol Genet* 2001;**10**(23):2619-26.
14. Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, *et al.* Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet* 2005;**37**(9):1003-7.
15. Constancia M, Hemberger M, Hughes J, *et al.* Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 2002;**417**(6892):945-8.
16. Santos F, Hendrich B, Reik W, *et al.* Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2002;**241**(1):172-82.

17. Kobayashi H, Hiura H, John RM, *et al.* DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *Eur J Hum Genet* 2009;**17**(12):1582-91.
18. Chopra M, Amor DJ, Sutton L, *et al.* Russell-Silver syndrome due to paternal H19/IGF2 hypomethylation in a patient conceived using intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biomed Online* 2010; **20**(6):843-847.
19. Renda M, Baglivo I, Burgess-Beusse B, *et al.* Critical DNA binding interactions of the insulator protein CTCF: a small number of zinc fingers mediate strong binding, and a single finger-DNA interaction controls binding at imprinted loci. *J Biol Chem* 2007;**282**(46):33336-45.
20. Boissonnas CC, Abdalaoui HE, Haelewyn V, *et al.* Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet*; **18**(1):73-80.
21. Marques CJ, Costa P, Vaz B, *et al.* Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2008;**14**(2):67-74.
22. Poplinski A, Tuttelmann F, Kanber D, *et al.* Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. *Int J Androl* 2009.
23. Hirasawa R, Chiba H, Kaneda M, *et al.* Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev* 2008;**22**(12):1607-16.
24. Reese KJ, Lin S, Verona RI, *et al.* Maintenance of paternal methylation and repression of the imprinted H19 gene requires MBD3. *PLoS Genet* 2007;**3**(8):e137.
25. Khoueiry R, Iballa-Rhomdane S, Mery L, *et al.* Dynamic CpG methylation of the KCNQ1OT1 gene during maturation of human oocytes. *J Med Genet* 2008;**45**(9):583-8.
26. Borghol N, Lornage J, Blachere T, *et al.* Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation. *Genomics* 2006;**87**(3):417-26.
27. Fortier AL, Lopes FL, Darricarrere N, *et al.* Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta. *Hum Mol Genet* 2008;**17**(11):1653-65.
28. Market-Velker BA, Zhang L, Magri LS, *et al.* Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet* 2010;**19**(1):36-51.



## Figure legends

**Figure 1 A and B:** bisulphite sequencing analysis of H19DMR in control blastocysts and control sperm, and in arrested embryos and their matching sperm and oocytes (when available, couples 5 and 33). Each line represents a single allele. A black square indicates a methylated CpG and an open square denotes an unmethylated CpG. Blue lines correspond to alleles exhibiting a nucleotide 6236 A, while black lines correspond to alleles carrying a nucleotide 6237 T. In H19 DMR, sequence from 6097bp to 6330bp, the SNP A/C, bp 6236, is indicated in blue while the 6<sup>th</sup> CTCF binding site is indicated in red.

**Figure 2:** Proposed origine for the methylation alterations observed in embryos 5.4 and 33.3:

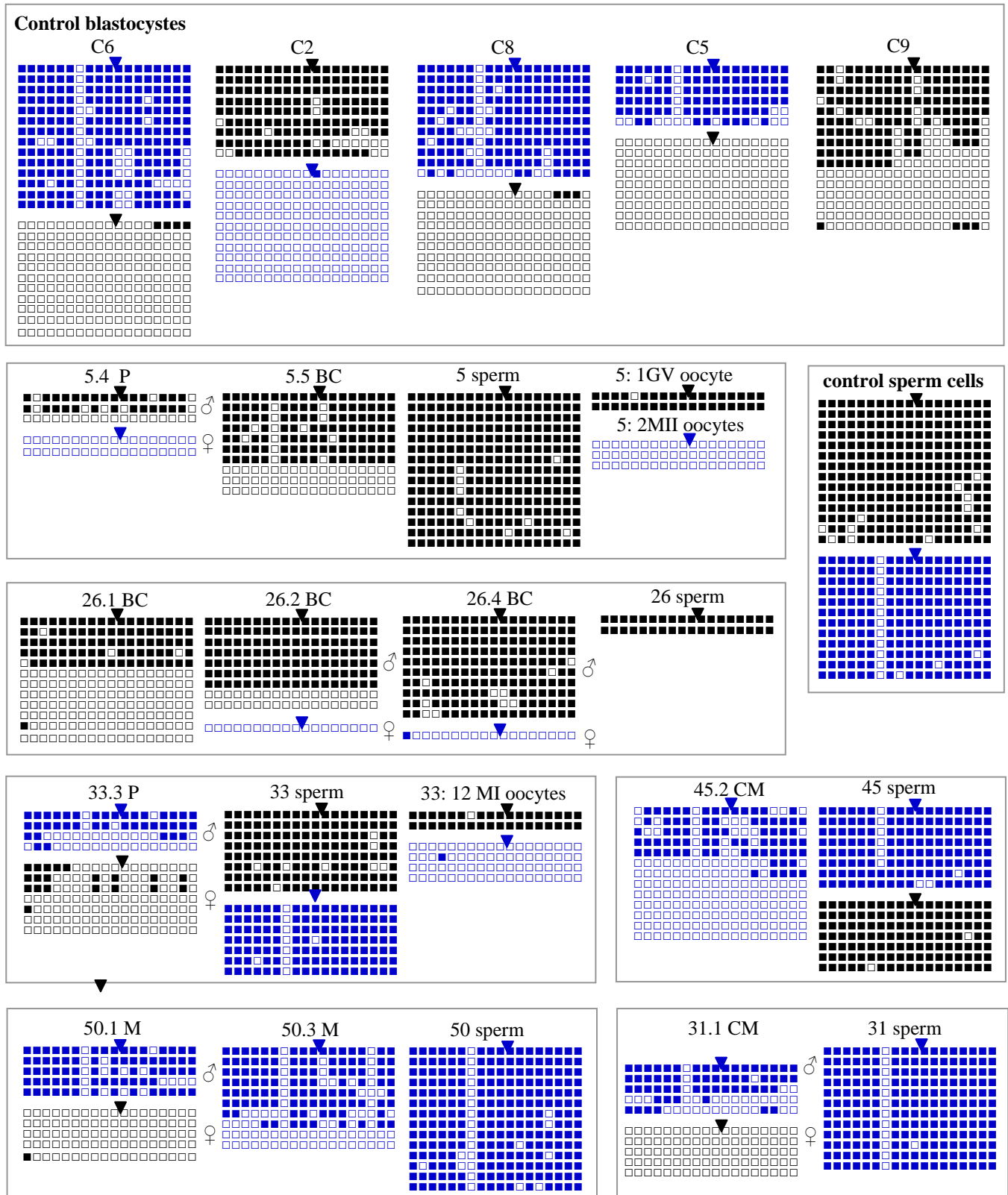
**Table 1:** ICSI indication *per* couple. PCOs: polycystic ovary syndrome. Mar test +: presence of sperm antibody.

**Table II:** % of methylation of paternal and maternal alleles of all tested embryos and of the matching sperm.

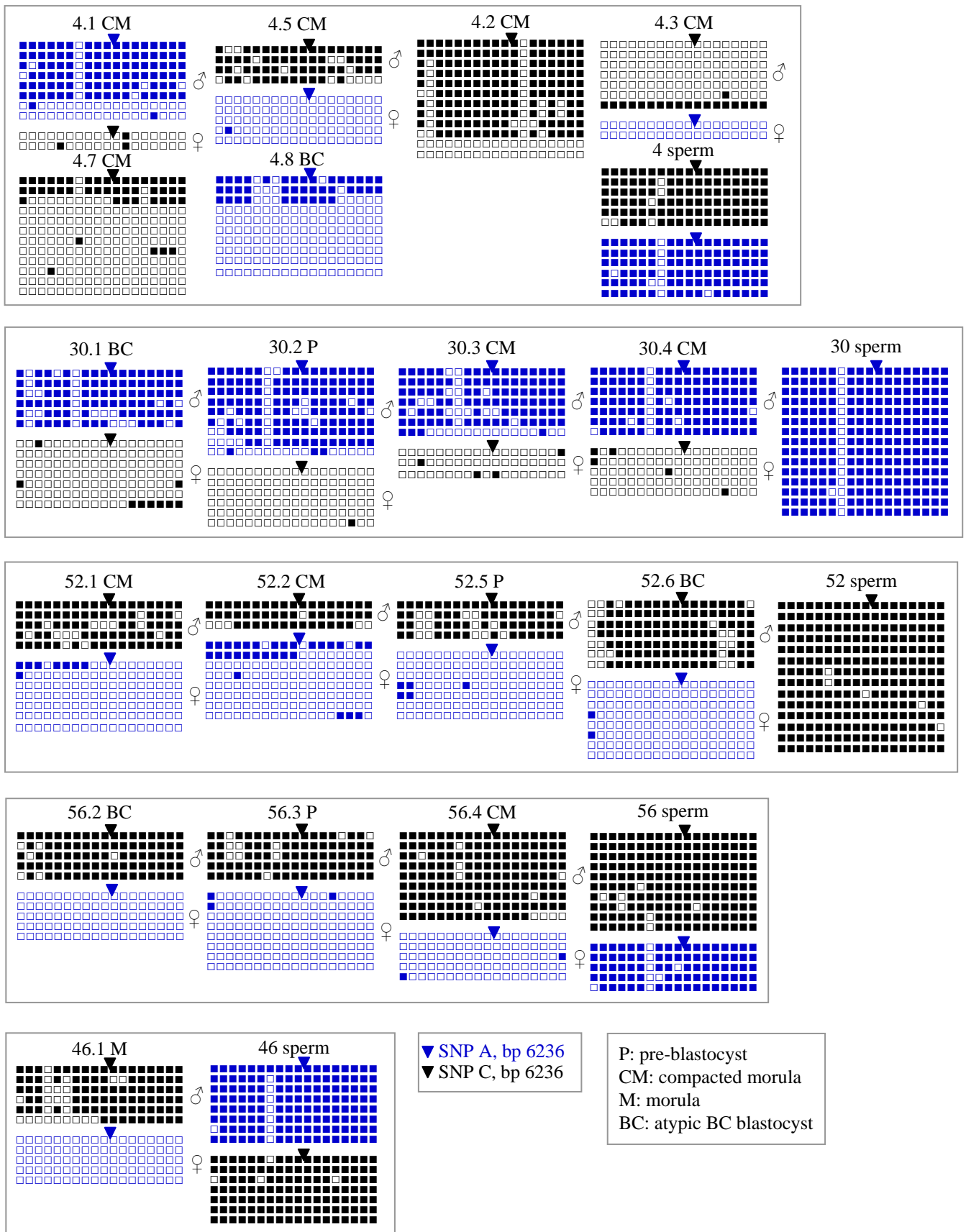
**Figure 1 A**

H19DMR (6097-6330 bp, Genbank AF087017)

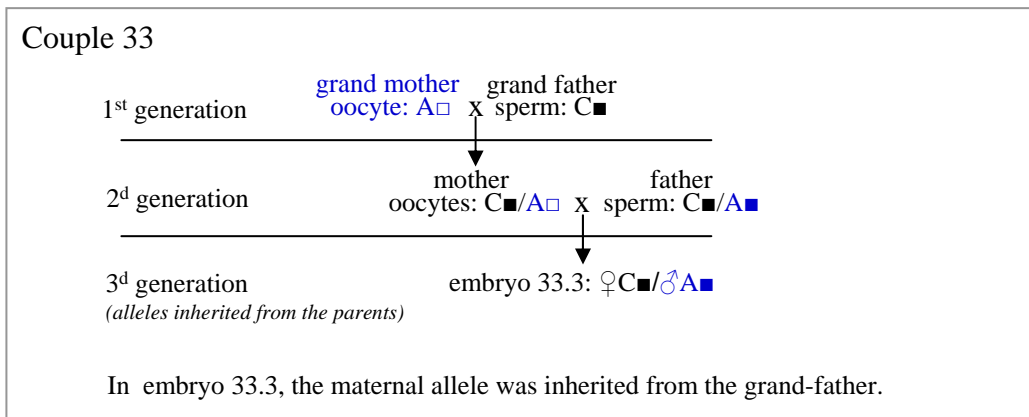
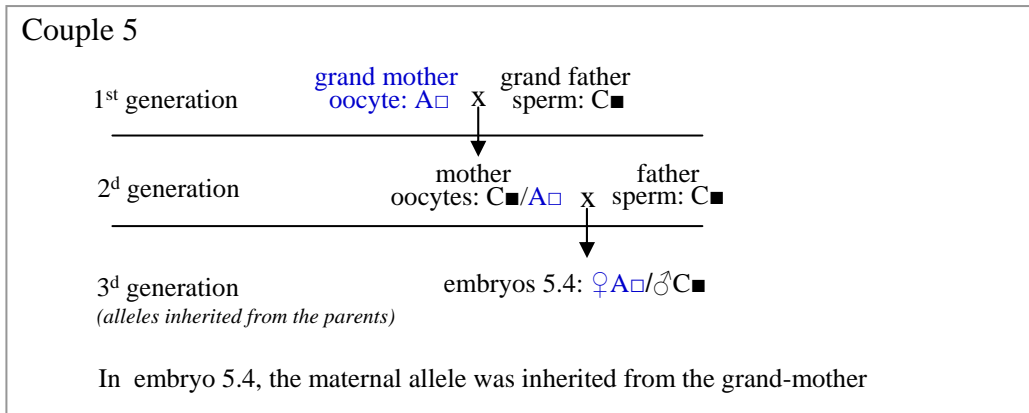
ttgc atagcacatg ggtattctg gaggettctc ctteggcttc accgcctgga tggcacggaa ttggtgtag  
 ttgtggaatc **ggaagtggcc gcgcggcggc** agtgcagct cacacatcac agccccagcc cccccA/Cact  
 ggggtcgc cgtggaaacg tcccgggtca cccaagccac gcgtcgcagg gttcacgggg gtcactggg  
 aataggacac tcattaggagc



**Figure 1B**



**Figure 2**



- ■ methylated H19 alleles
- □ unmethylated H19 alleles
- A: snp A base 6236
- C: snp C base 6236

Table I

N° of couple	♂ infertility factor	♀ infertility factor
4	oligo-astheno-teratozoospermy	
5	asthenozoospermy	PCOs
26	oligo-astheno-teratozoospermy	
30	asthenozoospermy	PCOs
31	asthenozoospermy	PCOs+ hydrosalpinx
33	astheno-teratozoospermy	fallopian tube obstruction
45	Mar test +, normozoospermy	
46	astheno-zoospermy, Mar test +	
50		fallopian tube obstruction
52	Mar test +, astheno-teratozoospermy	PCOs
56	normozoospermy	fallopian tube obstruction

Table II

N° of embryo	Embryo type	♂ allele % methylation	♀ allele % methylation	Sperm % methylation
4.1	CM	68.75 (99/144)	8.34 (3/36)	93.25 (/)
4.3	CM	15.07 (19/145)	0 (0/36)	93.25 (/)
4.5	CM	79.17 (57/72)	1.11 (1/90)	93.25 (/)
5.4	P	51.85 (28/54)	0 (0/36)	96.66 (261/270)
26.2	BC	77.78 (126/162)	0 (0/18)	100 (36/36)
26.4	BC	94.11 (170/180)	5.56 (1/17)	100 (36/36)
30.1	BC	78.70 (85/108)	2.56 (9/117)	94.07 (/)
30.2	P	75.93 (123/162)	0.93 (1/108)	94.07 (/)
30.3	CM	75.39 (95/126)	7.40 (4/50)	94.07 (/)
30.4	CM	90.48 (114/126)	5.55 (5/90)	94.07 (/)
31.1	CM	69.44 (75/108)	0 (0/90)	94.01 (/)
33.3	P	54.17 (39/72)	15.87 (20/126)	93.7 (/)
46	CM	78.7 (85/108)	0 (0/72)	95.92 (/)
50.1	M	81.11 (73/90))	1.11 (1/90)	90.87 (/)
52.1	CM	84.44 (76/90)	6.35 (8/126)	98.01 (/)
52.2	CM	88.89 (48/54)	20.14 (29/144)	98.01 (/)
52.5	P	80.56 (58/72)	3.96 (5/126)	98.01 (/)
52.6	BC	81.75 (103/126)	1.39 (2/144)	98.01 (/)
56.2	BC	93.33 (84/90)	0 (0/90)	94.44 (/)
56.3	P	88.89 (80/90)	2.08 (3/144)	94.44 (/)
56.4	CM	93.21 (151/162)	2.22 (2/90)	94.44 (/)
2	control	89.5 (145/162)	0 (0/198)	
5	control	83.33 (90/108)	0 (0/162)	
6	control	84.92 (214/252)	0 (0/198)	
8	control	85.18 (184/216)	1.66 (3/177)	
Control sperm				94.01 (440/468)

---

## **Résumé en français**

Les techniques d'assistance médicale à la procréation particulièrement l'induction de l'ovulation, la maturation *in vitro* des ovocytes et la culture embryonnaire prolongée impliquent la manipulation des gamètes ainsi que les embryons à des moments critiques de leur maturation et développement qui sont également des étapes clé du remodelage épigénétique. Par conséquent, elles pourraient interférer avec la reprogrammation épigénétique, en particulier la mise en place de la méthylation des gènes soumis a empreinte au cours de l'ovogenèse, ou son maintien au cours du développement préimplantatoire.

Afin d'évaluer ce risque nous avons analysé le profil de méthylation de KvDMR1, qui régule l'expression de KCNQ1OT1, dans des ovocytes humains mûris *in vivo* ou *in vitro*, provenant de patientes stimulées ou non. Nos résultats montrent que la mise en place de la méthylation au niveau de KvDMR1 se poursuit au cours de la maturation de l'ovocyte du stade VG au stade MII, *in vivo* et *in vitro* et que l'induction ovarienne des patientes génère des ovocytes épigénétiquement immatures. Par ailleurs, l'étude de la méthylation de H19 DMR qui régule l'expression d'Igf2 et H19 dans des embryons d'ICSI, atypiques bloqués en culture prolongée et dans les spermés correspondants met en évidence une hypométhylation de l'allèle paternel et une méthylation de l'allèle maternel dans certains embryons, sans que l'on puisse établir de lien entre les dérégulations de l'empreinte et l'arrêt du développement au stade blastocyste.

---

## **Titre en anglais**

Assisted reproductive technologies and quality of gametes and embryos: evaluation of the epigenome.

---

## **Résumé en anglais**

Assisted reproductive technologies particularly the induction of ovulation, oocytes *in vitro* maturation, and prolonged embryo culture require *in vitro* manipulation of gamete and embryos at critical times of their maturation and development. In consequence, they may interfere with epigenetic reprogramming and affect particularly demethylation and remethylation of imprinted genes.

To evaluate such a risk, we have determined the methylation profile of KvDMR1, the region that regulates KCNQ1OT1 imprinted gene, in human oocytes retrieved from stimulated or unstimulated cycles, at different phases of their maturation *in vivo* or *in vitro*. Our results show that the timing of establishment of the methylation profile of KvDMR1 covers the maturation phase of oocyte growth, *in vivo* and *in vitro*, and that hyperstimulation likely recruits young follicles epigenetically immature. Analysis of the methylation profile of H19DMR (DMR of IGF2/H19) in atypical ICSI embryos and corresponding sperm suggests that imprinting disorders are not responsible of embryo developmental failure prior the blastocyst stage.

---

## **Discipline**

Biologie moléculaire – Génétique

---

**Mots-clés** : Aide Médicale à la Procréation, maturation *in vitro*, épigénétique, empreinte, méthylation, développement préimplantatoire, embryon, ovocyte, sperme, KCNQ1OT1, H19.

**Keywords:** Assisted Reproduction Technologies, *In vitro* Maturation, epigenetic, imprinting, methylation, preimplantation development, embryo, oocyte, sperm, KCNQ1OT1, H19.

---

**Unité Inserm U846 « Institut Cellules Souches et Cerveau »**

18 avenue du Doyen Lépine 69500 Bron, France