



Clonage chez le bovin, modèle de reprogrammation nucléaire : Effets épigénétiques dans les tissus extra-embryonnaires

Audrey Prézelin

► To cite this version:

Audrey Prézelin. Clonage chez le bovin, modèle de reprogrammation nucléaire : Effets épigénétiques dans les tissus extra-embryonnaires. Biologie moléculaire. 2016. hal-01414853

HAL Id: hal-01414853

<https://ephe.hal.science/hal-01414853>

Submitted on 12 Dec 2016

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.

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE, ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES**

Science de la Vie et de la Terre

Mémoire présenté par :

PRÉZELIN Audrey

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Clonage chez le bovin, modèle de reprogrammation nucléaire :
Effets épigénétiques dans les tissus extra-embryonnaires**

Soutenu le Mardi 6 Décembre 2016 devant le jury suivant :

Pr MIGNOTTE Bernard – Président
Dr JAMMES Hélène – Tuteur scientifique
Dr PALDI Andràs – Tuteur pédagogique
Dr COUSTHAM Vincent – Rapporteur
Dr BONNET-GARNIER Amélie – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr JAMMES Hélène, INRA Jouy-en-Josas

et de

Dr PALDI Andràs, EPHE, Génomique Evry

effectué dans

L'UMR 1198 INRA-ENVA, Biologie du Développement et Reproduction dirigée par
Dr. COTINOT Corinne,
Allée de Vilvert 78352 Jouy-en-Josas.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de diplôme EPHE SVT d'avoir accepté cette tâche : Bernard MIGNOTTE comme président de jury, Vincent COUSTHAM comme rapporteur et Amélie BONNET-GARNIER comme examinatrice.

Je remercie aussi Corinne COTINOT et Hélène JAMMES d'avoir permis que ce projet soit possible en acceptant que je passe ce diplôme et Andràs PALDI, qui a accepté d'être mon tuteur pédagogique, pour son encadrement EPHE durant tout mon cursus.

Un autre grand merci plus particulier à Hélène JAMMES qui a été tout au long de ses 3 années une tutrice scientifique hors-pair avec une grande disponibilité, surtout lors de l'écriture et la correction du mémoire de fin d'étude.

Mes sincères remerciements à Jean Philippe PERRIER qui m'a porté et supporté au quotidien, avec les pauses cafés qui m'ont aidé à souffler tout le long de l'écriture de ce mémoire. Je tiens à remercier Anne GABORY pour son aide précieuse dans la mise en forme du mémoire, même sur son temps personnel, et pour le temps consacré à répondre à mes questions. Un immense merci à Sarah VOISIN pour sa disponibilité aussi bien pour le travail en statistiques sous R que pour nos petites sessions de fitness entre filles.

Je remercie les autres personnes de mon équipe, Mélanie JOUIN, Hélène KIEFER, Maxime GASSELIN et Sara FNEICH pour leur bonne humeur.

Je souhaite remercier Audrey SAINT-ALBIN DELIOT pour son soutien sans faille, avec toujours un moyen de me remonter le moral même au 36^{ème} dessous ainsi que mes amies, Ludivine LAFFONT, Céline CIOBORARU, Jenna FIX, Marjolaine ANDRE et Clara GOBE.

Je ne serais pas arrivée au bout de ce mémoire sans la présence constante de Hugo THOMAS qui m'a convaincu de reprendre mes études et qui, malgré des hauts et des bas, reste mon plus grand soutien.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	4
INTRODUCTION	8
1) Evolution du concept d'« Epigénétique » à travers l'histoire	8
2) L'épigénétique, implication dans la régulation de l'expression génique	10
2-1) Modification post-traductionnelle des histones.....	10
2-2) Méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN.....	11
2-2-1) Méthylation de l'ADN	11
2-2-2) Hydroxyméthylation de l'ADN	13
2-2-3) Exemple de l'état de méthylation d'un gène	13
2-3) Les ARN non codants.....	14
2-4) Influence de l'environnement sur l'épigénome	15
3) La reproduction sexuée chez les mammifères	16
3-1) De la fécondation au stade blastocyste.....	16
3-2) Reprogrammation du génome embryonnaire	18
4) Implantation et formation du placenta, un organe clé du développement embryonnaire.....	19
4-1) Anatomie utérine	19
4-2) Formation du placenta	20
4-3) Classification des placentas.....	21
4-3-1) Morphologie des placentas.....	21
4-3-2) Histologie des placentas	22
4-4) Fonctions placentaires.....	23
4-4-1) Fonction immune.....	23
4-4-2) Fonction d'échanges.....	24
4-4-3) Fonction hormonale	24
4-5) Formation des annexes embryonnaires	26
4-5-1) Le sac vitellin	26
4-5-2) L'amnios.....	26
4-5-3) L'allantoïde	26
5) Le clonage, un modèle de perturbation de la reprogrammation épigénétique	27
5-1) Clonage par transfert de noyau	27
5-1-1) Protocole couramment utilisé.....	27
5-1-2) Facteurs affectant le clonage ainsi que son efficacité	28
5-2) La « normalité » du clone.....	28
5-3) Applications du clonage chez le bovin	29
5-3-1) Outil pour la sélection bovine	29
5-3-2) Reproduction de phénotypes rares ou en voie de disparition.....	30
5-4) Ethique et législation.....	30
5-5) Etude des perturbations de la reprogrammation du noyau somatique.....	31
5-6) Pathologie liée au clonage : le syndrome du gros veau	32
6) Méthodes d'étude de la méthylation de l'ADN	33
6-1) Méthodes de préparation de l'ADN.....	33
6-1-1) Utilisation d'endonucléases de restriction	33
6-1-2) Conversion de l'ADN au bisulfite de sodium.....	34
6-1-3) Enrichissement de régions méthylées par affinité.....	34
6-2) Méthode d'analyse globale.....	35
6-2-1) HPLC ou Chromatographie liquide haute performance.....	35

6-2-2) Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse.	35
6-2-3) ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)	35
6-2-4) LUMA (LUminometric Methylation Assay)	36
6-3) Méthodes d'analyse pangénomique	36
6-3-1) RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing).....	36
6-3-2) Identification des régions immunoprécipitées.....	37
6-3-3) Bisulfite- Séquençage.....	37
6-3-4) Bisulfite-Infinium.....	37
6-4) Méthode d'analyse gène candidat.....	38
6-4-1) Bisulfite/Pysoséquencage.....	38
6-4-2) Bisulfite puis PCR et clonage/séquencage.....	38
6-4-3) PCR classique ou quantitative	38
6-5) Analyse de l'hydroxyméthylation de l'ADN : quelles possibilités ?.....	39
6-5-1) Méthodes développées pour l'analyse de la méthylation	39
6-5-2) Glycosylation de l'ADN	39
6-5-3) Oxydation de l'ADN.....	40
7) Objectifs du projet	40
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	42
1) Animaux et collection de tissus.....	42
1-1) Cohortes analysées.....	42
1-1-1) Cohorte souris.....	42
1-1-2) Cohorte bovine.....	42
2) Extraction de l'ADN génomique et quantification	43
2-1) Extraction de l'ADN génomique	43
2-2) Quantification de l'ADN.....	45
2-2-1) Quantification par l'absorbance	45
2-2-2) Quantification par la fluorescence.....	45
3) Sexage des fœtus par amplification Polymerase Chain Reaction (PCR) du gène <i>SRY</i>	46
4) Analyse de la méthylation de l'ADN par LUMA.....	46
4-1) Digestion enzymatique	47
4-2) Pyroséquencage.....	47
4-3) Mesures, calculs et analyses.....	48
5) Méthode de mesure différentielle de la méthylation et de l'hydroxy- méthylation de l'ADN.....	48
5-1) Principe de la mesure de l'hydroxyméthylation par glycosylation de l'ADN	49
5-2) Adaptation de la mesure de l'hydroxyméthylation par glycosylation de l'ADN.....	49
5-3) Quantification de la méthylation et de l'hydroxyméthylation de l'ADN par la méthode ELISA.....	50
5-3-1) Méthode	51
5-3-2) Mesures, calculs et analyses.....	51
6) Quantification de l'expression des gènes codant les protéines responsables de la méthylation et l'hydroxyméthylation de l'ADN.....	52
6-1) Extraction des ARN totaux.....	52
6-2) Traitement à la Dnase et purification des ARN totaux	53
6-3) Contrôle qualité des ARN totaux purifiés sur le Bioanalyseur 2100.....	54
6-4) RT-PCR quantitative	55
6-4-1) Reverse transcription (RT).....	55
6-4-2) Dessin des amorces.....	56
6-4-3) Mise en place d'un test d'efficacité des amorces pour les gènes <i>Tet</i>	56

6-4-4) PCR quantitative.....	58
6-4-5) Analyse des résultats bruts	59
6-4-6) Sélection des gènes de référence et Normalisation des données	60
7) Statistiques	61
RÉSULTATS	62
1) Optimisation de la technique de LUMA : quelques résultats	62
1-1) Validation du normalisateur EcoRI.....	62
1-2) Résistance de la digestion par MspI lorsque l'ADN est hydroxyméthylé	63
1-3) Mesure de la sensibilité du LUMA	64
1-4) Qualité de l'ADN génomique	65
1-5) Variation inter-essai	66
1-6) Mesure de la méthylation globale chez la souris adulte	67
1-7) Mesure de la méthylation globale de tissus embryonnaires IA chez le bovin à 60 jours de gestation.....	69
2) Méthylation globale de l'ADN dans des tissus extra-embryonnaires bovins.....	69
2-1) Cinétique de la méthylation du lignage trophoblastique au cours de la gestation	70
2-2) Comparaison du taux de méthylation entre les différentes les annexes embryonnaires à 60 jours de gestation.....	71
2-3) Méthylation des tissus extra-embryonnaires et placentaires en fonction de la modalité de production des embryons	72
2-4) Comparaison du taux de méthylation entre les différentes races bovines IA sur leurs annexes extra-embryonnaires à 60 jours de gestation.....	73
3) Proportion de méthylation et de d'hydroxyméthylation dans les tissus présentant un différentiel de méthylation globale	74
4) Expression des gènes responsables de l'apposition/maintien de la méthylation et de l'hydroxyméthylation de l'ADN	75
4-1) Cinétique de l'expression des gènes <i>Dnmt</i> et <i>Tet</i> dans les tissus placentaires au cours de la gestation.....	75
4-2) Niveau d'expression des gènes <i>Dnmt</i> et <i>Tet</i> dans les tissus placentaires au cours de la gestation.....	76
4-3) Expression des gènes <i>Dnmt</i> et <i>Tet</i> dans les tissus maternels à 60 jours de gestation	78
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	79
ANNEXE : Liste des échantillons de la cohorte bovine et utilisations	86
BIBLIOGRAPHIE	93

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Le paysage épigénétique selon Conrad Waddington.....	9
Figure 2 : Représentation des marques épigénétiques principales.....	10
Figure 3 : Cellule en microscopie électronique.....	10
Figure 4 : Les histones, leurs organisations et leurs modifications post-traductionnelles.....	10
Figure 5 : Séquences cibles de la méthylation de l'ADN.....	12
Figure 6 : Réaction enzymatique de la méthylation, puis de l'hydroxyméthylation d'une cytosine... 12	12
Figure 7 : Représentation des DNA méthyltransférases, DNMT.....	12
Figure 8 : Voies théoriques de la déméthylation active de l'ADN.....	13
Figure 9 : Souris agouti et méthylation.....	13
Figure 10 : Chatte avec le pelage « écaille de tortue » ou chat mosaïque.....	15
Figure 11 : Différence sur la DMR Igf2 entre individus exposés à la famine pendant la grossesse précoce et leurs frères et sœurs non exposés.....	16
Figure 12 : Les différentes étapes de la fécondation.....	17
Figure 13 : Développement de l'embryon bovin du stade blastocyste jusqu'à l'organogénèse.....	18
Figure 14 : Variation de la méthylation de l'ADN pendant la reprogrammation épigénétique au cours du développement.....	18
Figure 15 : Organisation de la méthylation de l'ADN dans l'œuf, juste après la fécondation chez la souris et le bovin.....	18
Figure 16: Blastocyste bovin avant son implantation dans l'utérus.....	19
Figure 17 : Différents types d'utérus chez les mammifères.....	19
Figure 18 : Les différentes formes de placenta chez les mammifères.....	21
Figure 19 : Arbre phylogénétique et placentation des mammifères.....	22
Figure 20 : Photo de la première vache clonée en 1998, à l'INRA de Jouy-en-Josas : Marguerite.....	27
Figure 21 : Principe du clonage par transfert de noyau chez le bovin.....	27
Figure 22 : Evolution de la gestation chez le bovin après transfert d'embryons clonés.....	28
Figure 23 : Photo de la vache bleue de Bazougers clonée, Aurore et son fils, descendant de clone... 30	30
Figure 24 : Organisation de la méthylation de l'ADN dans les blastocystes bovins obtenus par FIV ou clonage.....	31
Figure 25 : Syndrome du gros veau à 150 jours de gestation et à 215 jours de gestation.....	32
Figure 26 : Photo des clones de la vache 5538.....	33
Figure 27 : Réaction de conversion au bisulfite de sodium.....	34
Figure 28 : Classement de différentes techniques d'analyse de la méthylation en fonction du nombre de CpG analysé par échantillon et le nombre d'échantillons totaux traités.....	34
Figure 29 : LUMA (LUMinometric Methylation assay).....	36
Figure 30 : Réaction spécifique de glycosylation de la 5-hydroxyméthylcytosine de l'ADN.....	39
Figure 31 : Dissection d'une souris C57B6, de face et de dos.....	42
Figure 32 : Embryon de ruminant à 18 jours de gestation et à 60 jours de gestation.....	43
Figure 33 : Représentation du système enzymatique du pyroséquençage.....	47
Figure 34 : Mesure de l'hydroxyméthylation de l'ADN par glycosylation, digestion enzymatique et PCR.....	49
Figure 35 : Mesure de l'hydroxyméthylation de l'ADN par glycosylation, digestion enzymatique et pyroséquençage.....	49
Figure 36 : Partie linéaire de la gamme 5mC et 5hmC du kit ELISA.....	51
Figure 37 : Distribution des réactifs dans la puce ARN Nano, Agilent.....	54
Figure 38 : Electrophorégrammes du marqueur de poids moléculaire, d'un ARN intègre et d'un ARN dégradé.....	55
Figure 39 : Représentation du plasmide pGEM®-T-Easy.....	58
Figure 40 : PCR quantitative : programme du thermocycleur, courbes d'amplification en temps réel, courbes de dissociation d'un amplicon, et gamme étalon.....	59
Figure 41 : Paramètres d'une boîte de dispersion.....	61
Figure 42 : Cinétique d'incorporation de A et T pour l'enzyme de restriction EcoRI dans le mélange réactionnel MspI ou HpaII et de C et G pour les enzymes de restriction MspI et HpaII.....	63

Figure 43 : Mesure de l'incorporation des nucléotides spécifiques du site EcoRI (A et T) en fonction de la variation de la quantité d'ADNg utilisée, avant la digestion enzymatique ou avant le pyroséquençage.....	65
Figure 44 : Mesure de l'incorporation des nucléotides spécifiques du site MspI (C et G) en fonction de l'incorporation des nucléotides spécifiques du site EcoRI (A et T) dans l'amnios, l'allantoïde, le chorion et les cotylédons chez le bovin Holstein à 60 jours de gestation.....	66
Figure 45 : Méthylation globale de l'ADNg dans des tissus de souris mâles adultes.....	67
Figure 46 : Analyse bioinformatique de la distribution des sites CCGG dans le génome murin et bovin.....	68
Figure 47 : Méthylation globale de l'ADN des tissus embryonnaires Holstein x Holstein obtenus par IA à 60 jours de gestation.....	69
Figure 48 : Taux de méthylation de l'ADN du lignage trophoblastique au cours de la gestation.....	70
Figure 49 : Méthylation globale de l'ADN des tissus extra-embryonnaires Holstein x Holstein à 60 jours de gestation.....	71
Figure 50 : Taux de méthylation de l'ADN dans l'amnios, l'allantoïde, le chorion et les cotylédons.....	72
Figure 51 : Taux de méthylation de l'ADN dans les cotylédons en fonction de leurs poids totaux dans le placenta et leurs poids individuels.....	72
Figure 52 : Taux de méthylation de l'ADN dans les cotylédons de 60 à 280 jours de gestation.....	73
Figure 53 : Méthylation globale de l'ADN des annexes extra-embryonnaires bovines à 60 jours de gestation après croisements Holstein x Holstein, Holstein x Charolais et <i>Bos taurus taurus</i> x <i>Bos taurus indicus</i>	73
Figure 54 : Méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN dans le trophoblaste à 18 jours, dans l'amnios et dans les tissus embryonnaires à 60 jours de gestation	74
Figure 55 : Expression des gènes <i>Dnmt</i> et <i>Tet</i> dans les tissus issus du lignage trophoblastique de 18 à 60 jours de gestation en séparant les IA mâles, les IA femelles et les clones : niveau d'expression de <i>Dnmt1</i> , <i>Dnmt3a</i> , <i>Dnmt3b</i> , <i>Tet1</i> , <i>Tet2</i> et de <i>Tet3</i>	75
Figure 56 : Expression des gènes <i>Dnmt</i> et <i>Tet</i> dans les tissus issus du lignage trophoblastique de 18 à 60 jours de gestation : niveau d'expression de <i>Dnmt1</i> , <i>Dnmt3a</i> , <i>Dnmt3b</i> , <i>Tet1</i> , <i>Tet2</i> et de <i>Tet3</i>	76
Figure 57 : Expression des gènes <i>Dnmt</i> et <i>Tet</i> chacun regroupés dans un des tissus issus du lignage trophoblastique de 18 à 60 jours de gestation.....	77
Figure 58 : Expression des gènes <i>Dnmt</i> et <i>Tet</i> dans les caroncules et l'intercaroncule à 60 jours de gestation.....	78
Figure 59 : Représentation des résultats du devenir de la méthylation et de l'hydroxyméthylation de l'ADN dans le lignage trophoblastique.....	79
Figure 60 : Immunohistofluorescence de la méthylation et de l'hydroxyméthylation de l'ADN dans les placentomes bovins obtenus par IA à 60 jours de gestation et à terme ou obtenus par clonage par transfert de cellules somatiques adultes à terme.....	80

Tableau 1 : Amorces utilisées pour le sexage des embryons bovins à 18 jours de gestation par amplification PCR.....	46
Tableau 2 : Amorces utilisées pour la PCR quantitative.....	56
Tableau 3 : Amorces utilisées pour la fabrication de matrices par PCR.....	57
Tableau 4 : Utilisation de différentes enzymes de normalisation pour le LUMA.....	62
Tableau 5 : Comptage des motifs d'intérêt pour la technique du LUMA dans le génome murin et bovin.....	63
Tableau 6 : Variation de la concentration d'ADNg avant ou après la digestion par les 3 enzymes de restriction.....	64

ABRÉVIATIONS

5cac : 5-carboxycytosine
5fc : 5-formylcytosine
5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine
5mC : 5-méthylcytosine
A : Adénine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg : Acide désoxyribonucléique génomique
ANR : Agence nationale de la recherche
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ARNnc : Acide ribonucléique non codant
ATP : Adénosine Tri-phosphate
βGT-T4 : β-glucosyl-transférase T4
C : Cytosine
Cellule ES : Cellule souche embryonnaire
Cellule NK : Cellule *Natural killer*
Cellule dNK : Cellule *natural killer* déciduale
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CpG : Cytosine suivie d'une guanine
COMETHEA : Comité d'éthique appliqué à l'expérimentation animale
Cp : *Crossing point*
Cq : Cycle quantifiable
Ct : *Threshold cycle*
DAPI : Diamidino-phénylindole
DMR : *Differentially methylated region* ou région différenciellement méthylée
dNTP : Dinucléotide tri-phosphate
DNMT : *DNA methyltransferase* ou ADN méthyltransférase
DTT : Dithiotréitol
EDTA : Éthylène diamine tétra-acétique
EIF2B2 : *Eukaryotic initiation factor-2B*
ELISA : *Enzyme linked immunosorbent assay*
FIV : Fécondation in vitro
G : Guanine
GSE : Gène soumis à l'empreinte parentale
HAC : Histone acétyl-transférase
HCl : Chlorure d'hydrogène
HDAC : Histone désacétylase
HLA : *Human leukocyte antigen* ou antigène leucocytaire humain
HPRT1 : Hypoxantine phosphoribosyltransférase 1
IA : Insémination artificielle
ICR : *Imprinting center region* ou centre de l'empreinte
Igf2 : *Insulin-like growth 2* ou facteur de croissance insulinique 2
INT : Interféron tau
INRA : Institut national de la recherche agronomique
KCl : Chlorure de potassium
KRuO₄ : Perruthénate de potassium

LB : Luria-Bertani
 LINE : *Long interspersed nuclear element* ou petit élément nucléaire intercalé
 LUMA : *Luminometric methylation assay*
 MBD : *Methyl CpG binding domain* ou domaine de fixation au CpG méthylé
 MCI : Masse cellulaire interne
 MeDIP : *Methylated DNA immunoprecipitation* ou Immuno-précipitation de l'ADN méthylé
 MgCl₂ : Chlorure de magnésium
 MIQE : *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*
 MnCl₂ : Chlorure de manganèse
 NaCl : Chlorure de sodium
 NCBI : *National center of biological information*
 NGS : *Next generation sequencing* ou séquençage nouvelle génération
 (NH₄)₂SO₄ : Sulfate d'ammonium
 miARN : micro acide ribonucléique
 MS-HRM : *Methylation-sensitive high resolution melting*
 PAG : *Pregnancy Associated glycoprotein* ou protéine associée à la gestation
 PCR : *Polymerisation Chain reaction* ou réaction par polymérisation en chaîne
 PFA : Paraformaldéhyde
 piARN : piwi acide ribonucléique
 PPi : Pyrophosphate
 RIN : *RNA integrity number* ou numéro d'intégrité de l'ARN
 RPL19 : *Ribosomal protein L19*
 RPLP0 : *Ribosomal protein large P0*
 RRBS : *Reduced representation bisulfite sequencing*
 RT : Réverse transcription
 SAM : *S-Adenosyl methionine*
 SBW : Syndrome de Beckwith-Weidemann
 SDHA : *Succinate dehydrogenase complex, subunit A*
 SDS : Sodium dodécyl sulfate
 siARN : Acide ribonucléique silencieux
 SINE : *Short interspersed nuclear element* ou long élément nucléaire intercalé
 SRY : *Sex-determining region of Y chromosome*
 T : Tyrosine
 TBE : Tris-borate éthylène diamine tétra-acétique
 TE : Tris-éthylène diamine tétra-acétique
 TET : *Ten eleven translocation*
 TG : Thiocyanate de guanidinium
 TN : Transfert nucléaire
 TSA : Trichostaline A
 U : Uracile
 UDPG : Uridine diphosphate glucose
 UV : Ultra violet

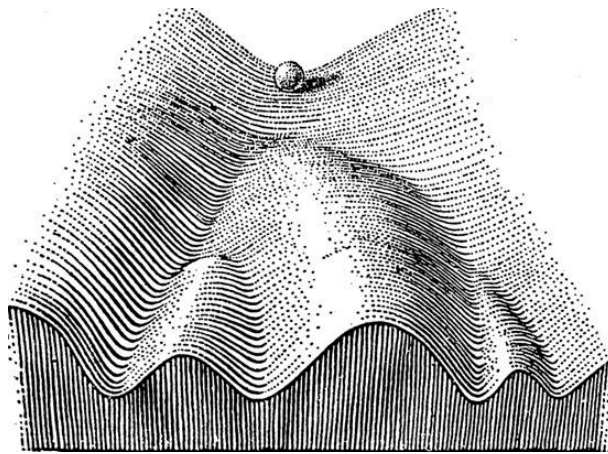
INTRODUCTION

Ce projet a été initié dans l'équipe Mécanismes Epigénétiques dans la Construction et Prédiction des phénotypes (MECP2) dirigée par le Dr Hélène JAMMES, au sein de l'Unité Mixte de Recherche Biologie du Développement et Reproduction (UMR BDR 1198) dirigée par le Dr Corinne COTINOT. L'unité s'inscrit dans le département de Physiologie Animale et Système d'Elevage de l'INRA (PHASE). L'unité a une longue histoire en biologie du développement derrière elle : de nombreux travaux ont été menés concernant les méthodes de reproduction comme la FIV ou le clonage. En effet, en 1998 est née la première vache clonée au laboratoire. Depuis, la méthode de clonage a été très utilisée au laboratoire, en essayant d'améliorer le protocole pour un meilleur rendement final, et sur différentes espèces. Actuellement, le clonage est surtout utilisé comme un modèle de perturbation de la reprogrammation épigénétique nécessaire à la mise en route d'un programme de développement embryonnaire à partir d'un noyau somatique. De nombreux travaux ont analysé les stades précoces de développement et décrit les pathologies placentaires de la gestation. Dans ce travail nous avons cherché à identifier les conséquences épigénétiques du clonage dans les tissus extra-embryonnaires.

Dans l'introduction, je développerai tout d'abord la notion d'« épigénétique ». Avant de présenter les principes du clonage par transfert de noyau et les pathologies placentaires associées, je décrirai la reproduction sexuée et le développement du placenta chez les mammifères. Enfin j'exposerai les principales techniques d'analyses de la méthylation et de l'hydroxyméthylation de l'ADN, marques épigénétiques auxquelles nous nous sommes intéressées.

1) Evolution du concept d'« Epigénétique » à travers l'histoire

Dès le 4^{ème} siècle avant Jésus-Christ, Aristote est le premier à évoquer l'apparition de nouvelles structures embryonnaires *de novo* et à proposer le concept d'épigenèse. Au 17^{ème} siècle, l'idée du préformationnisme s'y oppose, postulant que l'individu est préformé dans les gamètes mâles, le gamète femelle fournissant uniquement le matériel nécessaire à la croissance du petit « Etre » dans le ventre de sa mère. Les 2 théories suscitent de nombreux débats. Puis au 19^{ème} siècle, l'embryologie et la théorie cellulaire apparaissent, avec la possibilité de voir les cellules au microscope (cytologie descriptive, tout organisme vivant est composé d'une ou de plusieurs cellules élémentaires à la vie qui se divisent pour donner un



[\(Wang et al., 2011\)](#)

Figure 1 : Le paysage épigénétique selon Conrad Waddington. La bille en haut de la vallée a plusieurs destins possibles. Ce destin est ici représenté par les reliefs de la vallée dessinés par l'expression des gènes. L'ensemble des gènes exprimés dans un type cellulaire dépend de l'épigénome.

être complexe). En parallèle, Gregor Mendel définit les lois de l'hérédité, en se basant sur des expérimentations effectuées en croisant différentes espèces de petits pois. La génétique en tant que concept est née, ainsi que les termes de dominance et récessivité d'un caractère sans que les mots « chromosome », « gène » ou « allèle » n'aient encore été définis. A la fin du 19^{ème} siècle, la théorie de Darwin sur la sélection naturelle est publiée, stipulant que des espèces dotées de certains caractères héréditaires leur permettant une adaptation à leur environnement, tendent à avoir des taux de survie et de reproduction plus élevés que les autres. Cette théorie s'oppose à celle du transformisme proposé par Lamarck selon laquelle les espèces peuvent se transformer en d'autres espèces produisant des lignées sans origine commune. De par ses observations de la nature Lamarck proposait que l'évolution ne puisse s'expliquer que par des changements évolutifs graduels. L'évolution des espèces se concrétise par des modifications sur le long terme d'une espèce, donnant naissance à 2 ou plusieurs autres espèces, qui elles-mêmes vont évoluer, établissant la diversité du vivant que l'on connaît aujourd'hui. Au début du 20^{ème} siècle, les progrès de la microscopie permettent l'observation des chromosomes qui sont alors considérés comme le support de l'hérédité. Dans la première moitié du 20^{ème} siècle, Waddington, embryologiste, paléontologue et généticien propose son modèle de « paysage épigénétique » (**figure 1**) ([Wang et al., 2011](#)). Au cours du développement embryonnaire précoce, la cellule, représentée par la bille en haut de la colline, a plusieurs destins possibles selon le chemin qu'elle va emprunter. Cette représentation suggère l'idée d'une différenciation cellulaire sous tendue par des informations complémentaires, au patrimoine génétique identique dans toutes les cellules de l'embryon. Ainsi dans la construction d'un phénotype (ensemble des caractères), il est à prendre en compte le génotype (ensemble des gènes) et l'ensemble des informations apposé sur le génome, qui sera plus tard nommé « épigénome ». Quelques années plus tard, la structure en double hélice de l'ADN est découverte par Franklin, Watson et Crick et décrite comme porteuse de l'information génétique. Le code génétique universel est alors établi : il permet, à partir de la séquence d'ADN, la transcription d'un gène en ARN messagers et la traduction des ARN messagers en protéines. Les protéines ayant des fonctions particulières, elles contribuent à la mise en place des phénotypes cellulaires. L'ADN a ensuite été beaucoup étudié avec la découverte des enzymes de restriction ou encore l'utilisation de vecteurs plasmidiques et le développement d'outils de plus en plus puissant comme le séquençage de Sanger. A la fin du 20^{ème} siècle, les chercheurs ont beaucoup misé sur le séquençage complet du génome, considérant que cela pouvait fournir de grandes informations sur le fonctionnement d'un être aussi complexe que l'Homme (projet Apollo pour le séquençage du

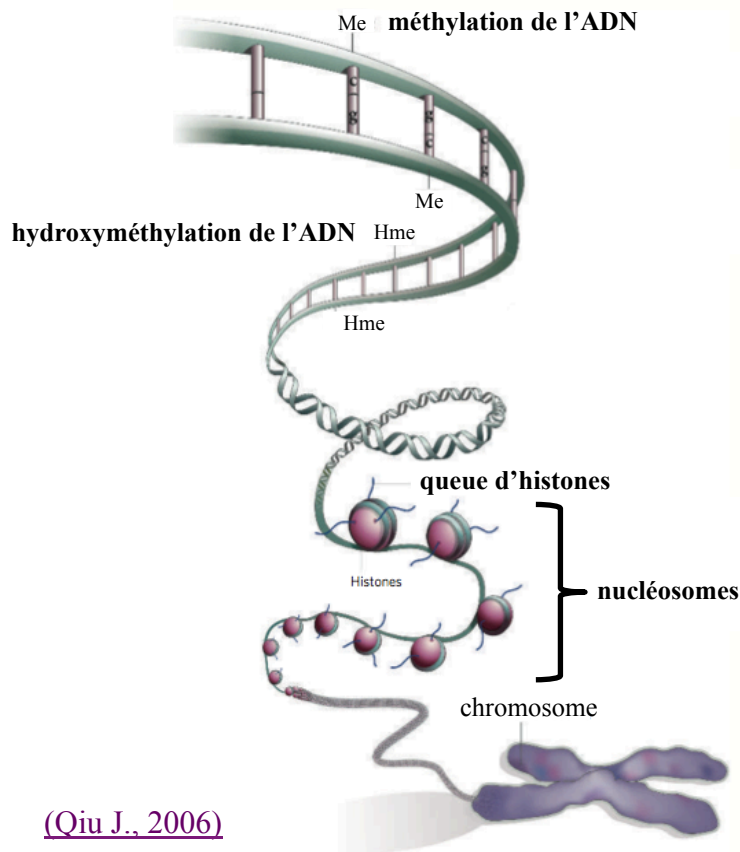


Figure 2 : Représentation des principales marques épigénétiques. La méthylation et l'hydroxyméthylation sont directement apposées sur les cytosines de l'ADN. Les queues d'histones, constituant des nucléosomes, subissent des modifications post-traductionnelles pilotant la compaction de la chromatine.

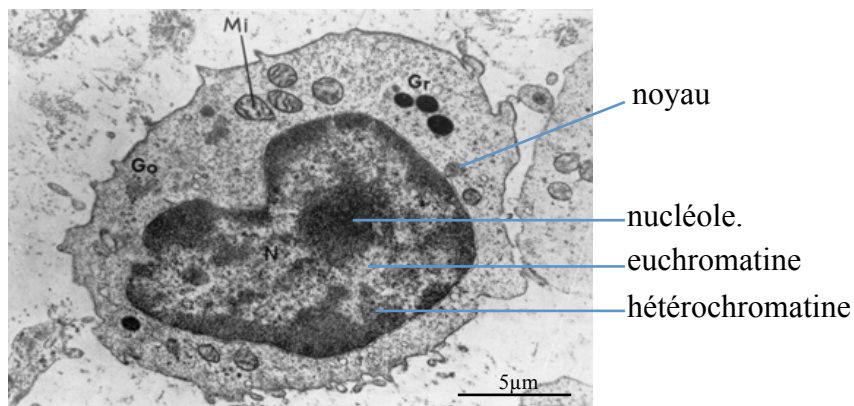


Figure 3 : Cellule observée en microscopie électronique. Dans le noyau (N) de la cellule, on retrouve l'hétérochromatine (sombre) à la périphérie du noyau et l'euchromatine (en plus clair) autour du nucléole.

génomique humaine). Le séquençage des génomes entiers n'a pas permis de comprendre la signification totale du génome puisque seulement 30% de l'ADN chez l'homme correspond à environ 25000 gènes codant pour des protéines. Les 70% d'ADN restant ont longtemps été considérés comme de l'ADN « poubelle ». Cet ADN « poubelle » est aujourd'hui très étudié. Il est impliqué dans la régulation de la structure de la chromatine et donc dans la régulation de l'expression des gènes et fait intervenir de nombreuses marques épigénétiques. Les notions évoquées dans le reste de ce chapitre sont valables chez les mammifères, sauf si précisé.

2) L'épigénétique, implication dans la régulation de l'expression génique

L'épigénétique est aujourd'hui définie comme l'étude des changements de l'expression des gènes sans altération de la séquence nucléotidique de l'ADN, transmissibles d'une cellule à l'autre au cours de la mitose voire de la méiose et perdurant après la disparition du stimulus initiateur. Parmi les processus pilotant ces changements dans l'expression des gènes, on citera la méthylation/hydroxyméthylation de l'ADN, la condensation différentielle de la chromatine par des modifications post-traductionnelles des histones (méthylation, acétylation...), les ARN non codants (**figure 2**) ([Qiu, 2006](#)).

Ces mécanismes sont en interaction et contribuent à la mise en place d'une organisation nucléaire spécifique. Ils entraînent soit un état chromatinien relaxé, correspondant à l'**euchromatine**, avec un relâchement des nucléosomes (structure associant des histones en octamères sur laquelle l'ADN s'enroule) avec la possibilité de transcription des gènes, soit un état condensé des nucléosomes avec une transcription majoritairement réprimée, correspondant à l'**hétérochromatine** (**figure 3**).

Nous allons tout d'abord décrire l'apposition et le rôle des modifications post-traductionnelles des histones puis la méthylation / hydroxyméthylation de l'ADN. L'existence de variants d'histones ainsi que celle des petits et longs ARNs non codants participent aussi aux processus épigénétiques, mais ils ne seront pas décrits dans ce manuscrit.

2-1) Modification post-traductionnelle des histones

Le cœur des nucléosomes est formé d'un octamère constitué des histones H2A, H2B, H3 et H4 présentes en double exemplaire (**figure 4A**). Autour de ce cœur s'enroule la double hélice d'ADN environ 1,8 tours soit 146 paires de bases. L'histone H1 stabilise la structure nucléosomale. Les modifications des protéines histones s'effectuent en général au niveau de la partie N-terminale accessible à l'extérieur du nucléosome et appelée « queue d'histones » mais aussi au cœur des histones ([Tessarz et Kouzarides, 2014](#)). Elles sont constituées de

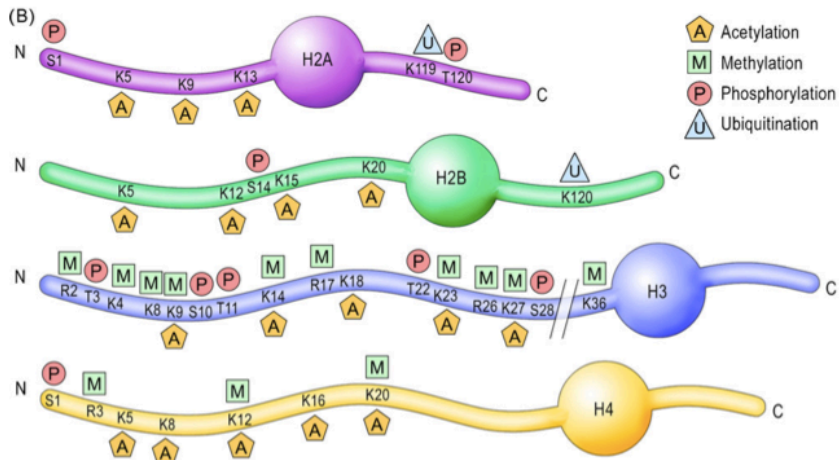
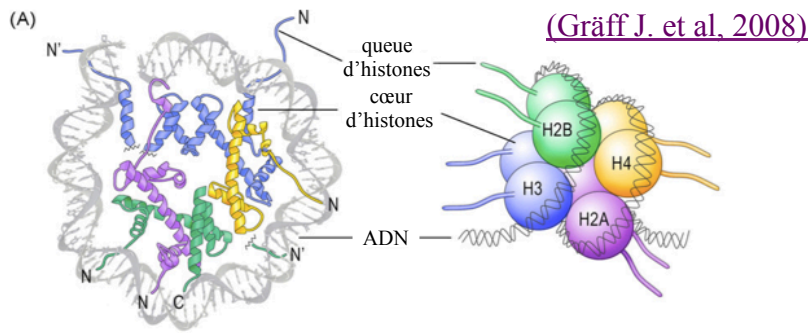


Figure 4 : Les histones, leurs organisations et leurs modifications post-traductionnelles.

A) Organisation des histones en octamère au sein d'un nucléosome. B) Principales modifications post-traductionnelles des résidus cibles des « queues » d'histones (acétylation, méthylation, phosphorylation et ubiquitination).

résidus pouvant subir différentes modifications comme une acétylation, une méthylation, une phosphorylation, une ubiquitination, une sumoylation... (**figure 4B**) ([Gräff et Mansuy, 2008](#)). A ce jour, une centaine de combinaisons de modifications post-traductionnelles a été décrite et constitue un code appelé « Code des histones ». Chaque combinaison induit un état de compaction de la chromatine ([Strahl et Allis, 2000](#)). Par exemple, l'acétylation est plutôt associée à une structure chromatinienne ouverte, avec activation de la transcription alors que la méthylation a tendance à compacter la chromatine, la rendant inaccessible aux facteurs de transcription. Le code des histones est basé sur la combinaison de l'ensemble des modifications portées par les différents acides aminés impliqués (lysine, arginine, sérine ou thréonine), mais dépend aussi de leur succession et de leur emplacement sur la queue des histones. Un même acide aminé peut subir différentes modifications successives. Ces modifications sont donc modulables au cours du temps à l'aide d'enzymes permettant leurs appositions (appelées « Writers ») et d'autres enzymes permettant leur élimination (« Erasers »). Par exemple, les histones acétyl-transférases (HAT) sont impliquées dans la réaction d'acétylation de certains résidus des queues d'histones alors que les histones déacétylases (HDAC) sont impliquées dans la réaction d'élimination de l'acétylation sur ces résidus. De par une lecture de chacune de ces marques assurée par les protéines, appelées « Readers », tous ces changements entraînent une modulation de l'expression des gènes en fonction de la cellule et de son environnement et sont héritable au cours de la mitose. En plus, il existe des variants d'histones pouvant prendre place au sein des nucléosomes à des stades particuliers (pendant le développement embryonnaire précoce ou encore pendant les processus de réparation de l'ADN), dans certains types de cellules (les spermatozoïdes par exemple), ou associés à des pathologies comme le cancer.

2-2) Méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN

2-2-1) Méthylation de l'ADN

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN est apposée sur le carbone 5 des cytosines (C) incluses dans les dinucléotides CpG (G = guanine, p étant la phosphorylation entre les 2 bases) de l'ADN. Chez les plantes la méthylation peut aussi toucher des CpHpG ou CpHpH (H étant A (adénosine), T (thymine) ou C). Ce type de méthylation est aussi retrouvé en petite proportion dans les cellules souches embryonnaires ES. Chez les levures, les nématodes et une partie des insectes la méthylation sur l'ADN n'est pas observée. La distribution de la méthylation de l'ADN n'est pas aléatoire et conditionne le rôle de la région concernée ([Jammes et al., 2011](#)). Les régions régulatrices d'éléments transposables, les

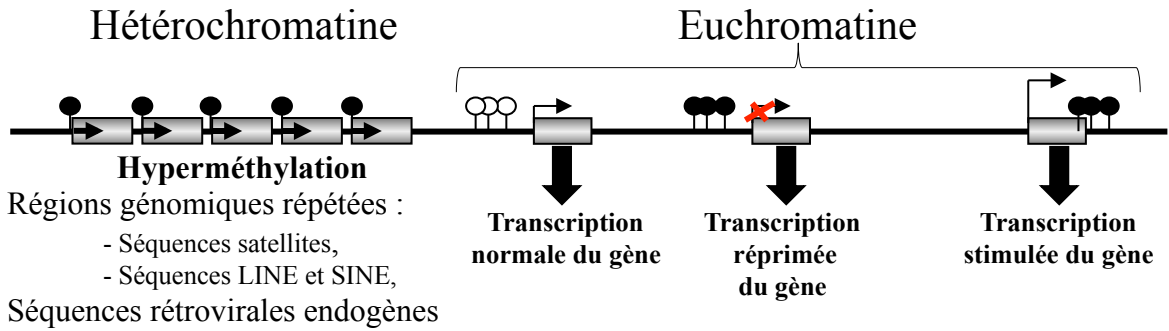


Figure 5 : Séquences cibles de la méthylation de l'ADN. Les régions génomiques répétées et les séquences rétrovirales endogènes sont la cible d'une forte méthylation de l'ADN, ce qui a pour conséquence la formation d'hétérochromatine (chromatine compacte). Au niveau d'un gène, lorsque le promoteur n'est pas méthylé, la transcription a lieu normalement. Par contre lorsque la région promotrice d'un gène est hyperméthylée, la transcription du gène est souvent réprimée. Et lorsque la méthylation est dans le corps du gène, plutôt en fin de séquence, la transcription du gène est stimulée. Ces différents scénarios ont lieu dans l'euchromatine (chromatine relâchée).

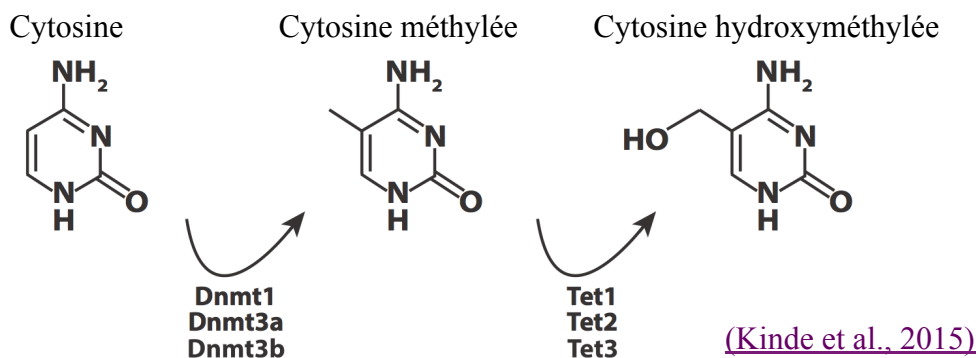


Figure 6 : Réaction enzymatique de la méthylation, puis de l'hydroxyméthylation d'une cytosine. DNMT1, DNMT3a et DNMT3b permettent l'apposition du groupement méthyl sur la cytosine. TET1, TET2 et TET3 oxydent la cytosine méthylée qui devient alors une cytosine hydroxyméthylée.

séquences répétées (SINE et LINE) et les promoteurs de gènes sont des cibles de la méthylation (**Figure 5**). Quand des régions sont riches en CpG (50-55% minimum) et de taille variant entre 200 et 1000pb, elles sont appelées îlots CpG. Lorsqu'elles sont méthylées, ces régions sont soit elles-mêmes réprimées (inhibition de la réplication du transposon), soit répriment la transcription de régions plus ou moins loins dans le génome. Ces séquences régulatrices peuvent inclure des sites de fixation de facteurs de transcription, des « Enhancers » ou des « Silencers ». Lorsque la méthylation est observée dans le corps d'un gène, à proximité de sites de transcription, le gène est au contraire transcriptionnellement hyperactif. La méthylation de l'ADN joue un rôle important dans l'inactivation d'un des chromosomes X chez la femelle et sur l'apposition de l'empreinte parentale ; les 2 notions sont développées plus loin dans ce chapitre.

Le SAM ou S-Adenosyl methionine est le donneur universel du groupement méthyl pour l'ADN, les protéines et les lipides. Ce donneur peut être synthétisé avec l'apport d'aliments riches en choline (viande, poisson, œuf...) et en folate (brocolis, poivron, chou fleur, noix...). L'apposition du groupement méthyl sur la cytosine est un processus enzymatique actif dû à des DNA methyltransferases (DNMT) (**figure 6**) ([Kinde et al., 2015](#)).

La famille des DNMT des mammifères se répartie en 4 catégories différentes (**figure 7**) aux fonctions différentes : maintien de la méthylation, méthylation de novo, activité de cofacteur et méthylation des ARN. Seules DNMT1, DNMT3a et DNMT3b possèdent un site catalytique permettant la méthylation de l'ADN. Elles possèdent toutes en leur partie N-terminale une séquence régulatrice ([Bestor, 2000](#)). DNMT2 est plutôt décrite comme une ARN méthyltransférase, impliquée dans la méthylation et la stabilité de certains ARN de transfert ([Jeltsch et al., 2016](#)). DNMT3l est un cofacteur des DNMT3, impliquée dans l'établissement de la méthylation pendant la gamétogénèse et pendant le stade embryonnaire contribuant au processus d'empreinte parentale dans l'ovocyte, et dans les spermatozoïdes que nous évoquerons dans un prochain chapitre. DNMT1 est impliquée dans le maintien de la méthylation lors de la réplication de l'ADN. Un isoforme de DNMT1 : DNMT1o est retrouvée dans l'ovocyte et maintien la méthylation de l'ADN dans celui-ci. Cette enzyme reconnaît l'ADN hémiméthylé (un brin méthylé et l'autre brin non méthylé) et restaure une méthylation symétrique. Cette fonction assure l'héritabilité de cette marque épigénétique. DNMT3a et DNMT3b sont des méthyltransférases *de novo*. Elles jouent un rôle fondamental dans les cellules germinales et au cours du développement précoce de l'embryon. DNMT3a appose une méthylation *de novo* plutôt sur les séquences régulatrices de l'expression des gènes et DNMT3b cible plutôt les séquences satellites des centromères.

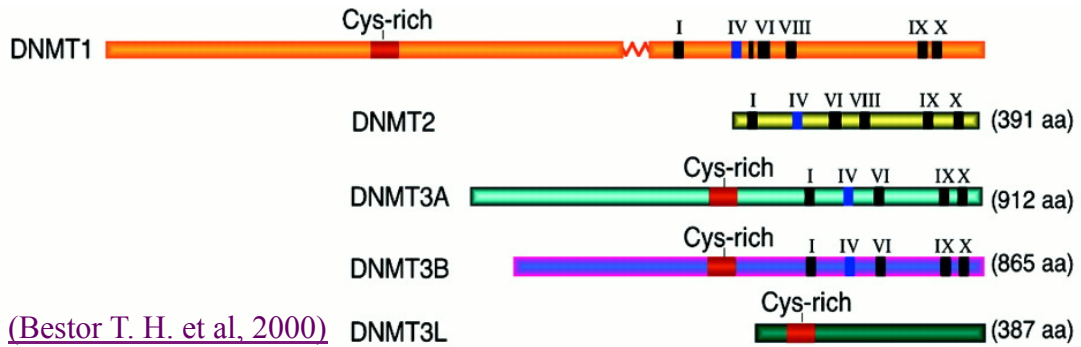


Figure 7 : Représentation des DNA méthyltransférases, DNMT. Six protéines de la famille des DNMT ont été découvertes à ce jour (DNMT1o ovocytaire n'étant pas représentée). DNMT1, DNMT3a, DNMT3b et DNMT2 ont un site catalytique en partie C-terminale (représenté par les chiffres romains) et DNMT3L n'en a pas. Elles possèdent un site de fixation à l'ADN en N-terminale sauf DNMT2.

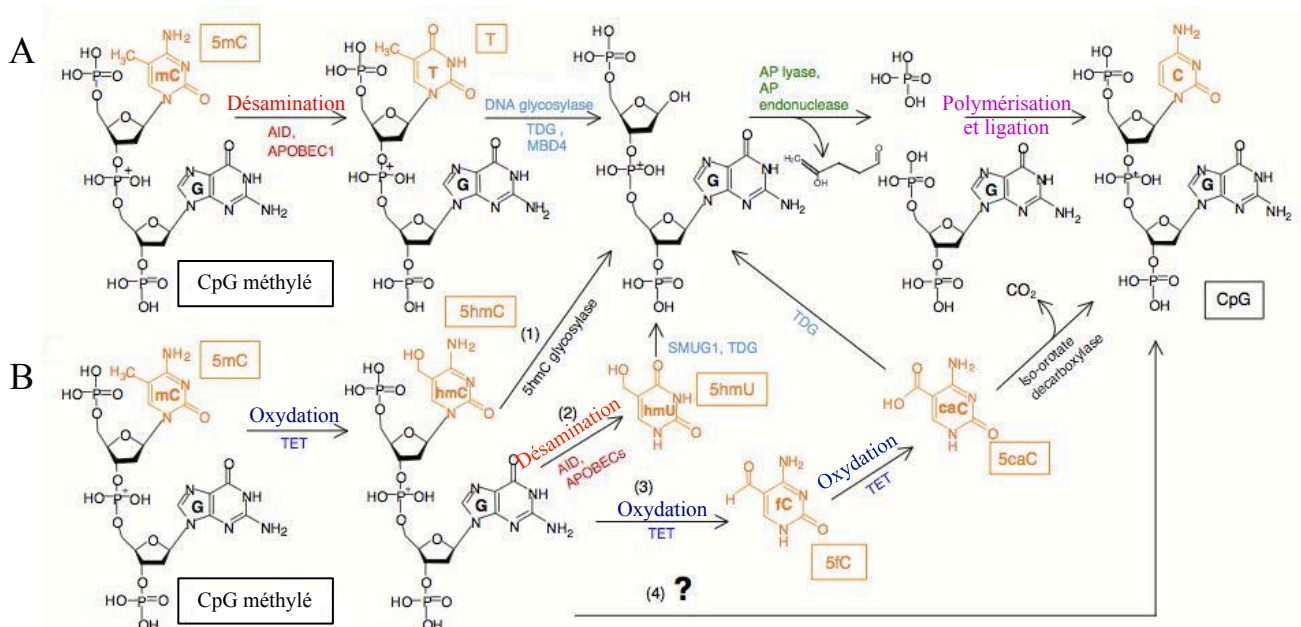


Figure 8 : Voies théoriques de la déméthylation active de l'ADN. A) La 5mC subit une désamination et devient une Thymine. Un mésappariement T/G est détecté par le système de réparation de l'ADN de la cellule qui élimine la thymine et réintègre une cytosine non méthylée. B) La 5mC est oxydée et devient une 5hmC. Plusieurs théories de déméthylation sont possibles à partir de la 5hmC. (1) La 5hmC subit une glycosylation qui enlève la base C ainsi que son groupement hydroxyméthyle. L'ADN est ensuite pris en charge par le système de réparation qui réintègre une cytosine non méthylée en face du G. (2) La 5hmC subit une désamination puis est pris en charge par le système de réparation de l'ADN. (3) La 5hmC subit des oxydations successives à l'aide des enzymes TET : elle devient une 5hmC, puis une 5fC (5-formylcytosine), une 5caC (5-carboxylcytosine) et enfin une cytosine non méthylée. (4) La 5hmC est directement convertie en cytosine non méthylée par une enzyme inconnue.

La déméthylation de l'ADN peut se faire de 2 façons : soit de façon passive en absence de l'enzyme de maintien DNMT1 au niveau nucléaire, soit par un mécanisme de déméthylation active. Plusieurs théories sont actuellement proposées pour expliquer le mécanisme de la déméthylation active ([Saitou et al., 2012](#)) . Il s'agit d'une désamination suivie par la prise en charge par le système de réparation de l'ADN, soit à partir de l'oxydation à l'aide des enzymes TETs en 5hmC :

- Une glycosylation ou une désamination de la 5hmC puis une prise en charge par le système de réparation de l'ADN
- Une succession d'oxydation par les enzymes TET qui entraîne le passage de la méthylation à l'hydroxyméthylation, puis de l'hydroxyméthylation à la formylation et de la formylation à la carboxylation de la cytosine.
- Un passage directe de la 5hmC à la cytosine non méthylée par une enzyme inconnue.

Une cytosine déméthylée qui peut ensuite être reméthylée (**figure 8**).

2-2-2) Hydroxyméthylation de l'ADN

Les enzymes TET (ten-eleven translocation) sont impliquées dans la conversion de la méthylation en hydroxyméthylation par oxydation. L'hydroxyméthylation est considérée aujourd'hui comme une marque épigénétique à part entière. En faible proportion dans les différents tissus testés, l'hydroxyméthylation est observée en plus grande quantité dans le cerveau. Son rôle est encore inconnu mais lorsque la méthylation devient hydroxyméthylation, la répression de la transcription des gènes semblent moins forte voire levée.

Il existe 3 enzymes TET : TET1, TET2 et TET3. Elles oxydent la cytosine méthylée en cytosine hydroxyméthylée mais seraient peut-être aussi impliquées dans des oxydations successives comme développées précédemment, qui aboutissent à l'obtention de cytosines pouvant être à nouveau cibles de méthylation.

Des études restent à mener sur cette marque épigénétique, sur son rôle et aussi sur sa possible implication à la déméthylation active de l'ADN.

2-2-3) Exemple de l'état de méthylation d'un gène

L'exemple des souris agouti est parfaitement adapté pour souligner l'importance de la méthylation de l'ADN. Ces souris présentent des poils jaunes aux pointes et noirs aux racines leur donnant cette couleur de pelage brun chiné ou agouti. (**figure 9**, souris de gauche). Un transposon est présent en amont du gène responsable de la couleur jaune du pelage. Quand ce

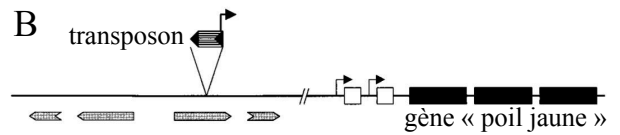
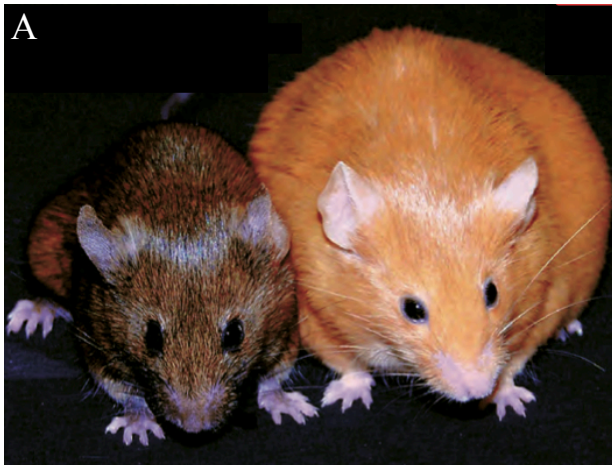


Figure 9 : Souris agouti et méthylation. ([science et santé n°11, 2012;](#) [Morgan et al., 1999](#))

A) la souris agouti est à gauche et la souris à « poil jaune » à droite. B) Le gène qui donne la couleur du poil à la souris possède un transposon en amont. Lorsque ce transposon est méthylé, il est réprimé et la souris a une expression du gène (petite flèche) codant le poil jaune normal, avec un arrêt de la transcription au cours de la pousse du poil (pointe jaune et racine noire, à gauche). Lorsque le transposon est non méthylé, le promoteur contenu dans celui-ci (grande flèche) permet une surexpression continue du gène « poil jaune », donnant la souris à poil totalement jaune (à droite).



Figure 10 : Chatte avec le pelage « écaille de tortue » ou chatte mosaïque. La couleur du pelage est en partie portée par le chromosome X. Par exemple lorsqu'un chat noir est croisé avec une chatte rousse homozygote, le chromosome X est inactivé au hasard dans les cellules aux stades précoces du développement. Certaines cellules vont exprimer l'allèle « pelage noir » et d'autres exprimeront l'allèle « pelage roux » formant ainsi le pelage mosaïque. La couleur blanche du pelage à certain endroit s'explique pas un gène porté par un chromosome autosomique indépendant du chromosome X.

transposon est méthylé, le promoteur qu'il contient est inactivé et le gène « poil jaune » est exprimé au début de l'apparition des poils (pointe jaune), puis le promoteur du gène est réprimé et les poils poussent noirs à la racine. Par contre, lorsque le transposon n'est pas méthylé, le promoteur qui l'accompagne permet l'expression du gène « poil jaune » en continue, même lorsque le promoteur du gène lui même est réprimé. Les souris ont alors un poil totalement jaune (**figure 9**). La couleur jaune des poils ne semblent pas être handicapant pour la vie de la souris mais lorsque ce gène n'est pas réprimé par exemple dans le cerveau, les souris perdent la sensation de satiété, continuent à manger, deviennent obèses et sont susceptibles de développer des maladies telle que le diabète de type II. De plus ce phénotype peut être transmis à la génération suivante ([Morgan et al., 1999](#)) par un mauvais effacement des marques dans la lignée germinale femelle.

2-3) Les ARN non codants

Les ARN non codants sont une catégorie de marques épigénétiques très diverse. En effet il existe plusieurs sortes d'ARN non codants : les longs ARN et les petits ARN. Dans la catégorie des petits ARN, on retrouve les miARN, les siARN et les piARN. Les microARN (miARN) et les petits ARN interférents (siARN) sont impliqués dans la dégradation de l'ARN messager par fixation complémentaire et recrutement du complexe RISC. Les piwi ARN (piARN) sont plutôt impliqués dans la régulation des transposons endogènes. Les longs ARN non codants sont eux aussi impliqués dans la régulation épigénétique. Par exemple l'ARN non codant Xist est responsable de l'inactivation d'un des chromosomes X chez la femelle. En effet toutes les cellules d'une femelle possèdent 2 chromosomes X, et l'expression des gènes à partir de ces 2 X conduit à un surdosage protéique qui est délétère. L'inactivation d'un X est donc nécessaire. Elle est mise en place à un stade très précoce du développement chez la souris. L'inactivation de l'X met en jeu l'expression d'un grand ARN non codant : Xist exprimé à partir de l'allèle paternel dans le placenta au cours des premières phases de développement et à partir de l'un des 2 allèles de façon aléatoire dans l'embryon. Pour les autres espèces (lapin, bovin, homme), l'inactivation du chromosome X est mise en place tardivement de façon aléatoire, après le stade blastocyste. L'ARN non codant Xist recouvre le chromosome à partir duquel il est transcrit et initie l'inactivation du chromosome X qui est alors maintenue au cours des division cellulaires. Le mosaïsme du pelage de certaines chattes est une illustration de l'inactivation du chromosome X. Le gène codant la couleur du pelage chez le chat est situé sur le chromosome X. Lorsque une chatte XX rousse homozygote est croisée avec un chat XY noir, les descendantes femelles auront un pelage

mosaïque (ou écailles de tortue) dû à l'inactivation au hasard du chromosome X dans les stades précoces du développement (**figure 10**).

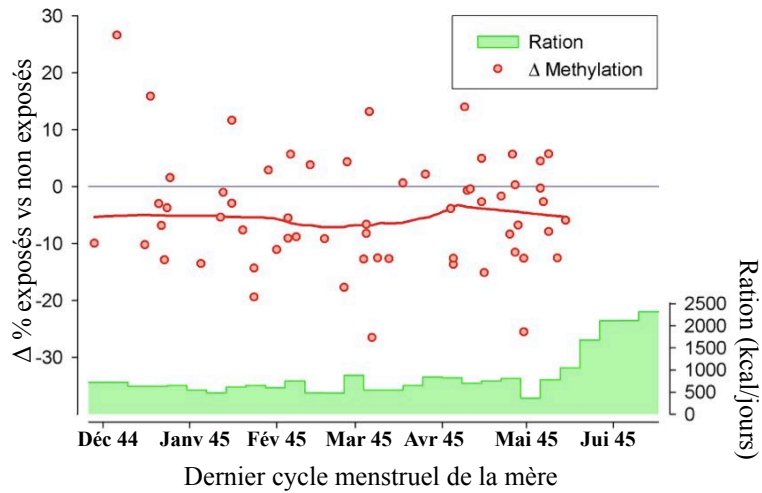
En général, les marques épigénétiques fonctionnent ensemble avec plusieurs combinaisons possibles changeant les effets sur l'ADN, sa compaction et son expression.

La plupart des gènes sont exprimés de façon bi-allélique, sauf les gènes dit « soumis à l'empreinte parentale » ou GSE. L'expression de ces gènes s'effectue soit à partir de l'allèle maternel soit à partir de l'allèle paternel. Le contrôle de l'expression mono-allélique est assuré par différentes marques épigénétiques : une méthylation allèle-spécifique, l'intervention d'ARN non codant exprimé à partir d'un seul allèle, des modifications post-traductionnelles des histones et/ou l'intervention des protéines polycomb (protéines impliquées dans la régulation de la structure chromatinienne et importantes dans le développement précoce de l'embryon). Ce sont souvent des gènes impliqués dans le développement embryonnaire et fœtal.

2-4) Influence de l'environnement sur l'épigénome

La méthylation de l'ADN et toutes autres marques épigénétiques peuvent être influencées par l'environnement (la pollution), par les habitudes nutritionnelles, par le style de vie (activité physique, consommation de drogue et/ou d'alcool et/ou de cigarettes), le stress.... Les exemples choisis sont liés à l'alimentation, beaucoup d'études bien connues ayant été menées sur ce sujet.

Un premier exemple très parlant est celui de l'abeille (*Apis mellifera*). L'abeille est connue pour être un insecte avec une forte activité sociale et une organisation en un système de castes dans les ruches (la reine, les femelles ouvrières stériles et les mâles reproducteurs, obtenus par parthénogénèse (œufs de la reine non fécondés). Après la fécondation des ovocytes provenant de la reine de la ruche par les spermatozoïdes des mâles, des œufs de même génotype sont obtenus, se développent en larves nourries à la gelée royale. Au 3^{ème} stade larvaire, certaines larves reçoivent du pollen et du miel et deviennent des ouvrières stériles. La poursuite du régime à base de gelée royale est réservée à un petit nombre de larves qui deviennent reines. Malgré un génotype identique, la différence d'alimentation au cours du développement larvaire affecte la morphologie et la fertilité de ces insectes. Cela est dû à une différence de méthylation de l'ADN observée entre une ouvrière et une reine ([Kucharski et al., 2008](#)). En effet l'injection de siRNA, diminuant le taux d'ARNm pour DNMT2 chez les larves, induit le développement d'individus au phénotype « reine ».



(Heijmans B. T. et al, 2008)

Figure 11 : Différence sur la DMR Igf2 entre individus exposés à la famine pendant la grossesse précoce et leurs frères et sœurs non exposés. Le graphique est basé sur le dernier cycle menstruel de la mère, pour que l'exposition à la sous-nutrition soit en période précoce de grossesse. Les individus exposés à la famine sont comparés à leurs frères ou sœurs non exposés.

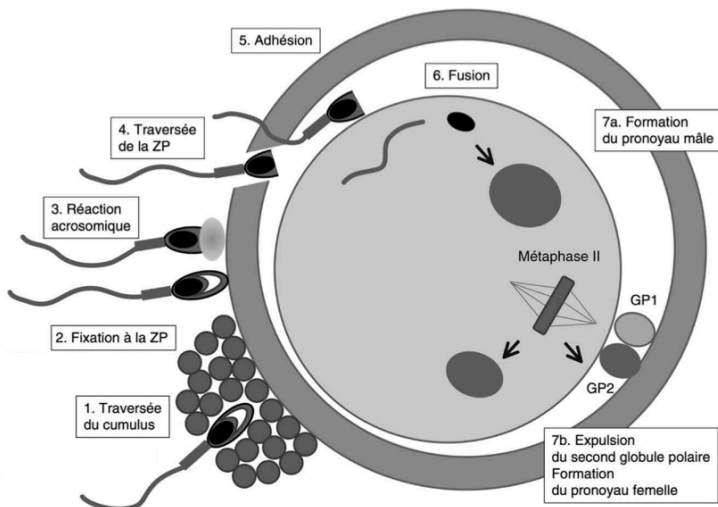


Figure 12 : les différentes étapes de la fécondation (La reproduction animale et humaine, 2014). ZP : zone pellucide. Pendant la fécondation, le spermatozoïde se fraie un chemin jusqu'à l'ovocyte en suivant différentes étapes énoncées dans le schéma. Le noyau haploïde mâle se retrouve dans le cytoplasme ovocytaire et déclenche une augmentation calcique. Le génome maternel termine sa méiose et expulse l'une des paires de chromatide dans le 2nd globule polaire hors du cytoplasme.

Un second exemple est fourni par une étude effectuée chez l'humain, pendant la grande famine ayant eu lieu en Hollande pendant l'hiver 1944-1945. Des informations complètes sur les conditions nutritionnelles ont pu être récupérées grâce au ticket de rationnement distribué à cette époque. Dans cette étude, les auteurs se sont intéressés aux femmes ayant subi la famine en période périconceptuelle et aux enfants nés de ces grossesses. Ils ont pris comme groupe contrôle les frères et sœurs de ces enfants, nés plus tard. L'étude a plus particulièrement porté sur le gène *Igf2*, facteur de croissance important lors du développement embryonnaire et fœtal et gène soumis à l'empreinte parentales. Le centre d'empreinte (ICR), région responsable de l'expression mono-allélique d'*Igf2* a été analysé (Heijmans et al., 2008). Les individus conçus pendant la famine présentent une hypométhylation sur l'ICR *Igf2* encore 60 ans après (figure 11). La méthylation a été modifiée par l'environnement nutritionnel maternel et en plus persiste pendant toute la durée de la vie de l'individu. La période péri-conceptionnelle est donc importante pour le devenir de l'enfant. Ces observations suggèrent que ces périodes sont sensibles à toutes modifications environnementales. Les processus épigénétiques jouent alors un rôle important dans la mémorisation de ces événements.

Au cours de notre étude, nous avons choisi comme perturbation en période pré-conceptionnelle, la reprogrammation nucléaire et l'obtention d'individus clonés. Les altérations épigénétiques auxquelles nous nous intéressons sont des modifications de méthylation de l'ADN.

Dans les chapitres suivants, nous allons décrire le développement fœto-placentaire après reproduction sexuée. Nous aborderons aussi la reprogrammation nucléaire mise en jeu lors du clonage et nous en présenterons les conséquences sur le développement fœto-placentaire.

3) La reproduction sexuée chez les mammifères

La première étape de la reproduction sexuée chez les mammifère est la rencontre de l'ovocyte avec un des spermatozoïdes arrivé jusqu'à lui : la fécondation

3-1) De la fécondation au stade blastocyste

La fécondation est une succession d'étapes incluant la traversée des cellules du cumulus (cellules entourant l'ovocyte dans le follicule), la fixation du spermatozoïde à la zone pellucide (composée d'une matrice extracellulaire glycoprotéique) entourant l'ovocyte pour le

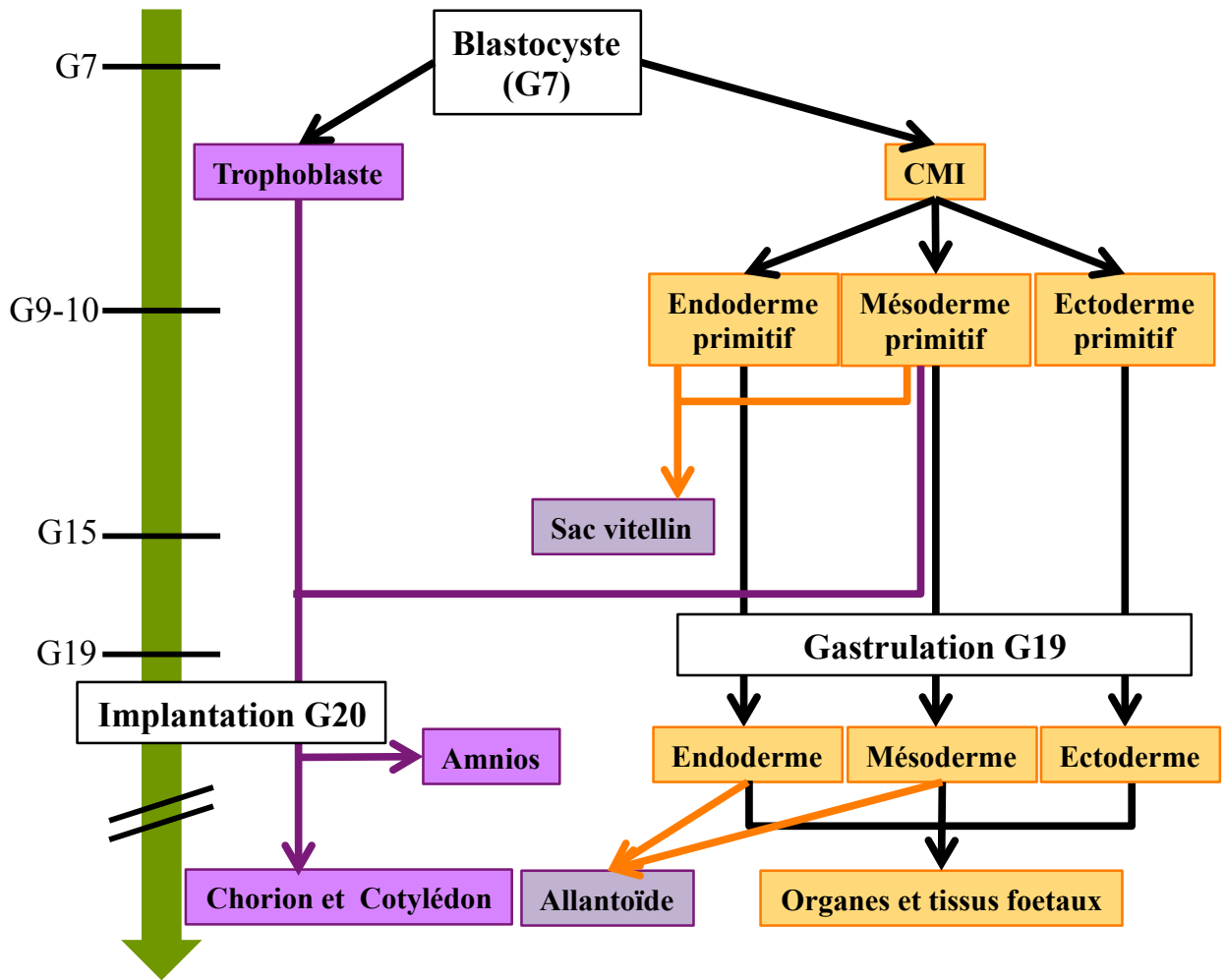
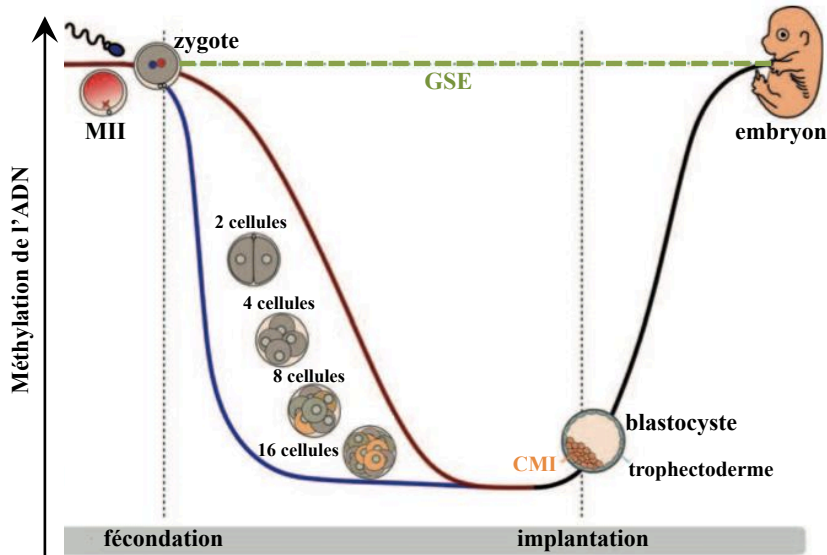


Figure 13 : Développement de l'embryon bovin, du stade blastocyste jusqu'à l'organogénèse. Le blastocyste se forme à 7 jours de gestation. Il possède un trophoblaste déjà en cours de différenciation et des cellules de la masse interne (CMI), cellules pluripotentes qui donneront les tissus embryonnaires (en orange). Les CMI se différencient en 3 feuilletts embryonnaires primitifs : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Des cellules du mésoderme primitif migrent et tapissent le trophoblaste. Le chorion est ainsi formé. L'amnios est un repliement du chorion au dessus de l'embryon (21 jours de gestation). Les cotylédons sont des bouquets villositaires chorioniques en forte interaction avec l'épithélium utérin de la mère. Le sac vitellin et l'allantoïde (en violet clair) sont les 2 tissus extra-embryonnaires issus exclusivement de tissus embryonnaires, primitif pour le sac vitellin et plus différencié pour l'allantoïde. Après la gastrulation, les 3 feuilletts sont totalement différenciés et amorcent la formation des tissus foetaux.

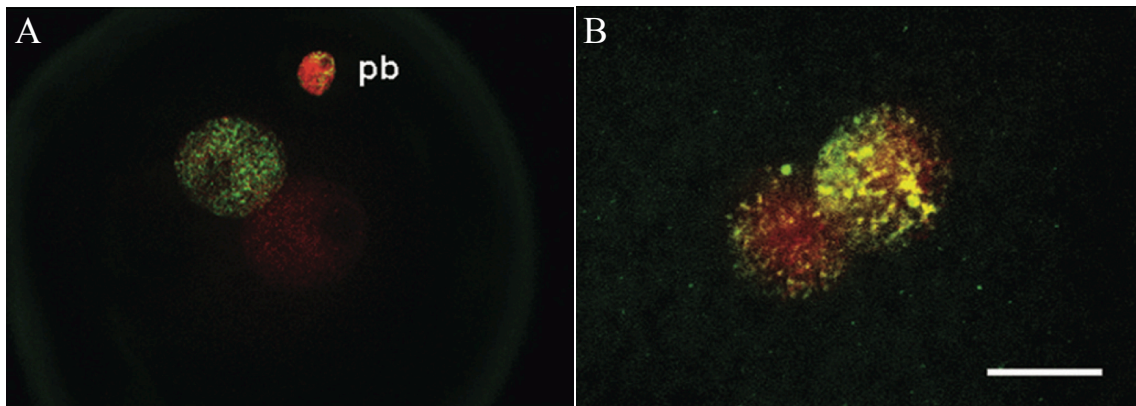
protéger (**figure 12**) ([*La reproduction animale et humaine, 2014*](#)). Le contact avec la zone pellucide induit la réaction acrosomique qui est la fusion la membrane plasmique et de la membrane de l'acrosome (organite du spermatozoïde qui enveloppe partiellement son noyau) du spermatozoïde. Le restant du spermatozoïde traverse la zone pellucide de l'ovocyte et la membrane plasmique du segment équatorial du spermatozoïde fusionne avec la membrane plasmique de l'ovocyte. L'entrée du noyau spermatique dans le noyau ovocytaire déclenche l'activation de l'ovocyte par une augmentation de calcium. Le noyau ovocytaire achève sa seconde division méiotique et expulse le second globule polaire. Au sein de l'ovocyte, le pronoyau mâle se forme puis pronoyau femelle. Les 2 pronoyaux migrent vers le centre de l'œuf, les enveloppes nucléaires disparaissent et la chromatine se condense pour le commencement de la division cellulaire. Des divisions cellulaires successives sont effectuées : stade 2 cellules, 4 cellules, 8 cellules,..., stade morula et stade blastocyste. Le passage de 1 à 2 cellules correspond à l'étape d'activité transcriptionnelle mineure du génome embryonnaire. Elle est suivie de l'activation majeure du génome embryonnaire avec une augmentation rapide de la synthèse de transcrits embryonnaires. Chez la souris, l'activation majeure a lieu au stade 2 cellules. Dans les autres espèces, elle prend place plus tardivement : stade 4 cellules chez l'humain et stade 8 cellules chez le bovin et le lapin. Cette activation permet le début de la transcription des gènes nécessaires au bon développement embryonnaire.

Différenciation du lignage trophoblastique : Au stade morula, les divisions cellulaires continuent, les cellules se compactent dans l'embryon pré-implantatoire, ce qui induit les premières différenciations cellulaires aboutissant à la formation du trophoctoderme (lignage trophoblastique) et des cellules de la masse interne (CMI) qui donnera l'embryon, formant ainsi le blastocyste. La polarisation des cellules au moment de leur compaction et leur position dans l'embryon pré-implantatoire décide de leur destin ([*Pfeffer et Pearton, 2012*](#)). En effet les cellules les plus à l'extérieur deviendront trophoblaste. Les autres sont les cellules compactées au sein du blastocyste (CMI) gardant les caractéristiques de pluripotence. Des facteurs de transcription sont impliqués à chaque étape de la différenciation trophoblastique. Chez la souris et le bovin, l'expression de *Tead4* active une cascade d'expression d'autres facteurs de transcription eux aussi impliqués dans l'engagement des cellules dans le lignage trophoblastique (par exemple *Cdx2*) et sont réprimés dans les CMI. Les facteurs responsables de la pluripotence (*Pou5f1=Oct4*, *Nanog* et *Sox2*) sont réprimés par *Tead4* et *Cdx2* dans le lignage trophoblastique. Une balance d'expression des différents facteurs de transcription est donc observée entre les CMI et les cellules trophoblastiques. Les facteurs spécifiques du



(Smallwood S. A. et Kelsey G., 2012)

Figure 14 : Variation de la méthylation de l'ADN pendant la reprogrammation épigénétique au cours du développement. Après la fécondation, les 2 noyaux haploïdes provenant de la lignée germinale très différenciée se déméthylent. Le pronoyau paternel se déméthyle de manière active et le pronoyau maternel de manière passive. La déméthylation est quasiment complète, sauf pour les gènes soumis à l'empreinte parentale, l'empreinte étant conservée malgré cette vague d'effacement. Puis un peu avant le stade blastocyste, l'embryon démarre sa reméthylation, différenciant petit à petit les cellules en fonction de leurs rôles futures.



(Beaujean N. et al, 2004)

Figure 15 : Organisation de la méthylation de l'ADN dans l'œuf, juste après la fécondation chez A) la souris et B) le bovin. La méthylation de l'ADN (en vert) est visible dans les pronucléus mâle et femelle par immunofluorescence avec un anticorps spécifique anti-5mC. L'ADN est marqué (en rouge) par de l'iodure de propidium. A) Marquage des pronucléus chez la souris, avec le pronucléus paternel à droite et le pronucléus maternel à gauche. B) Marquage des pronucléus chez le bovin, avec le pronucléus maternel à droite et le pronucléus paternel à gauche. Barre blanche = 20µm

lignage trophoblastique stimulent leur propre expression par l'intermédiaire de boucles de rétroaction positives. Leur rôle est ainsi maintenu dans le trophoblaste, ainsi que par l'expression d'autres facteurs de transcription. La différenciation trophoblastique varie d'une espèce à une autre, le développement ne se déroulant pas de la même manière (différence de gastrulation, d'implantation, de placentation). Les mécanismes sont bien décrits chez la souris et beaucoup moins chez le bovin. Un exemple de différence entre souris et bovin : l'expression de Pou5f1 n'est pas réprimée tout de suite au sein du lignage trophoblastique chez le bovin, alors que c'est un facteur de pluripotence. La raison de cette continuité d'expression n'est pas claire mais n'empêche pas la différenciation du trophoblaste.

Au stade blastocyste, on dénombre entre 32 et 64 cellules chez la souris et 120 cellules chez le bovin. Au sein des CMI, les feuilletts embryonnaires se mettent en place après le stade blastocyste, lors de la gastrulation (2nd phase de développement embryonnaire, période de ralentissement de la mitose) : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme (chez le bovin : **figure 13**). Ensuite l'organogénèse a lieu. L'ectoderme donne naissance à la peau, au système nerveux central, à la moelle épinière et à certains ganglions. Le mésoderme donne les os, les vaisseaux sanguins, les reins, les gonades et certains muscles. L'endoderme donne les voies respiratoires, les glandes digestives et une partie du tube digestif.

Pour passer de cellules haploïdes très différenciées que sont l'ovocyte et les spermatozoïdes, aux cellules totipotentes de l'embryon, une première vague de reprogrammation épigénétique est nécessaire. Il s'agit d'un effacement de la plupart des marques épigénétiques contrôlant l'expression des gènes. De nouvelles appositions de marques épigénétiques favoriseront la différenciation cellulaire nécessaire au développement embryonnaire.

3-2) Reprogrammation du génome embryonnaire

L'ovocyte et le spermatozoïde sont des cellules très différenciées et portent tout 2 des marques épigénétiques spécifiques. Les spermatozoïdes ont en particulier un haut niveau de compaction de la chromatine pour protéger le patrimoine génétique. Pour pouvoir donner un zygote totipotent, les marques épigénétiques portées par les cellules germinales doivent être effacées et notamment la méthylation de l'ADN (**figure 14**).

Le génome paternel et maternel ne se déméthylent pas de la même façon : le génome maternel se déméthyle passivement au cours des divisions cellulaires quel que soit l'espèce tandis que le génome paternel subit une déméthylation active. Cette déméthylation du génome paternel n'est pas totale chez toutes les espèces ([Beaujean et al., 2004](#)) (**figure 15**). En effet chez le bovin (**figure 15 B**), le pronoyau paternel n'est pas totalement déméthylé alors que celui de la

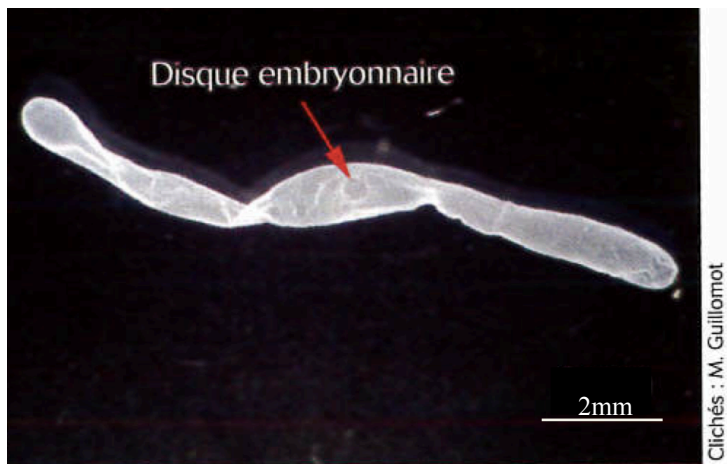


Figure 16 : Blastocyste de ruminant avant son implantation dans l'utérus. Le trophoblaste est très allongé, remplissant totalement les cornes utérines.

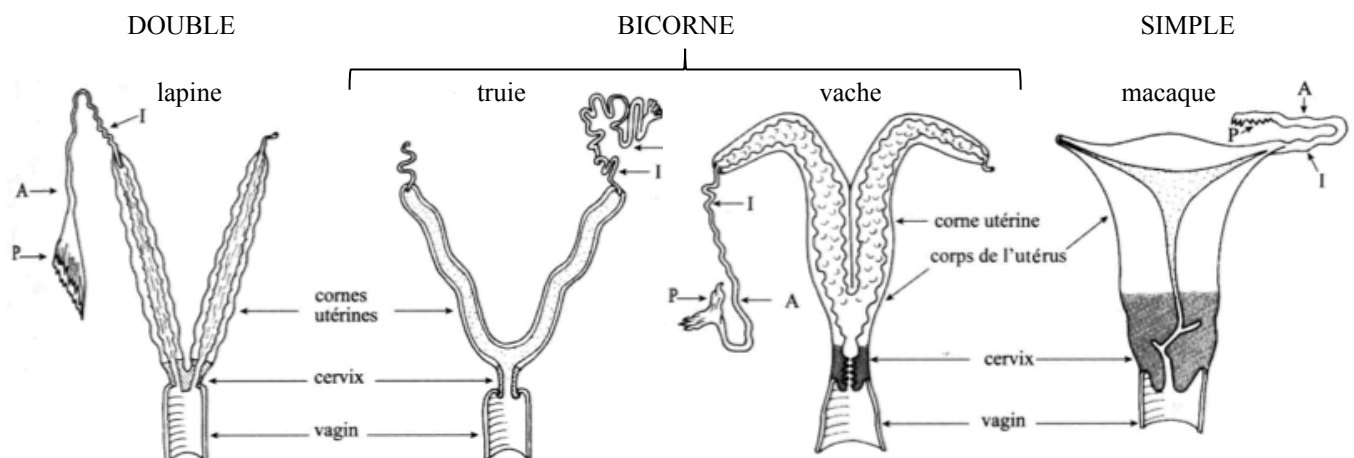


Figure 17 : Différents types d'utérus chez les mammifères ([La reproduction animale et humaine, 2014](#)). A : ampoule, I : isthme, P : pavillon

souris l'est complètement (**figure 15 A**). Cette vague d'effacement de la méthylation dure jusqu'au stade morula. Chez les mammifères, la première différenciation se met en place avec une méthylation *de novo* progressive par les enzymes DNMT3a et DNMT3b. Au stade blastocyste, une méthylation différentielle est observée entre le trophoctoderme et la masse cellulaire interne ([Santos et al., 2003](#)), plus ou moins marquée selon les espèces. L'hypothèse serait que cette hypométhylation du trophoblaste serait essentielle au développement et à la fonction des cellules trophoblastiques ([Tanaka et al., 2014](#)) et que l'hyperméthylation des CMI favorise leur pluripotence permettant l'expression des gènes de maintien de cette pluripotence en priorité. Ainsi, les cellules pluripotentes peuvent se différencier par la suite en n'importe quel tissu.

Dès que l'embryon est implanté dans l'utérus, la formation du placenta commence et il croît jusqu'à la parturition (chez le bovin).

4) Implantation et formation du placenta, un organe clé du développement embryonnaire

L'implantation est le moment où l'embryon s'ancre dans l'endomètre maternel. Suivant les espèces, la période péri-implantatoire est plus ou moins longue : 4,5 jours pour la souris, 7 jours pour l'homme et 20 jours pour le bovin. A cette période, chez les ruminants, et en particulier chez le bovin, le trophoctoderme subit une phase intense de multiplication cellulaire et d'élongation (**figure 16**).

Le placenta est présent chez les mammifères vivipares. C'est un organe transitoire indispensable au bon développement de l'embryon, puis du fœtus. Le placenta est une zone d'échanges entre la mère et son fœtus qui sert aussi de barrière immunologique. Ces différentes fonctions sont communes à toutes les espèces possédant un placenta, malgré des différences de temps de gestation, d'organisation morphologique, histologique et cellulaire placentaire ([Chavatte-Palmer et Tarrade, 2016](#)).

Le placenta est en forte interaction le compartiment utérin de la mère.

4-1) Anatomie utérine

L'anatomie de l'utérus varie d'une espèce de mammifère à une autre (**figure 17**).

Il existe 3 grands types d'utérus :

- L'utérus double : Il est retrouvé chez les rongeurs (souris) et les lagomorphes (lapin, lièvre). Il possède 2 cols utérins (ou cervix) ainsi que 2 cornes utérines distinctes.

- L'utérus bicorne : Il est retrouvé chez les carnivores, les suidés (porc), les ruminants (bovin, ovin, caprin) et les équidés (cheval, âne, zèbre). Il a un seul col et corps utérin avec 2 cornes utérines communicantes. Deux sous types d'utérus correspondent à cette description, celui avec de longues cornes et un petit corps utérin (carnivore et suidé) et celui avec de plus petites cornes et un long corps utérin (ruminants et équidés).
- L'utérus simple : Il est retrouvé chez les primates (homme, singe) et la chauve-souris. Il a un seul col et corps utérin large, sans corne.

L'utérus est formé de 2 couches tissulaires : le myomètre et l'endomètre étant 2 couches musculaires distinctes. Le myomètre est la couche musculaire externe de l'utérus et l'endomètre le tapisse du côté de la lumière utérine. L'endomètre permet à l'embryon de s'implanter et au placenta de se développer. Il est plus ou moins plissé, très vascularisé et recouvert de glandes utérines facilitant ainsi les échanges avec le placenta. Des particularités anatomiques sont parfois observées, notamment chez les ruminants. Au cours de la placentation, des épaissements localisés de l'endomètre forment les caroncules. Ces structures se développent tout le long de l'utérus, y compris dans les cornes utérines et leur nombre varie d'une espèce à l'autre.

4-2) Formation du placenta

Le trophoblaste ou trophoctoderme résulte de la première différenciation des cellules externe de la morula et se distingue du lignage embryonnaire constitué par les cellules de la masse cellulaire interne, au stade blastocyste. Il est en contact direct avec l'endomètre utérin. A l'implantation, le trophoblaste s'appose directement sur l'endomètre maternel. Le trophoblaste est constitué d'une monocouche cellulaire (type épithélium) qui se tapisse de cellules mésodermiques issues de l'embryon par migration et constitue le chorion. Le chorion entoure le fœtus et toutes ses annexes. La structure du trophoblaste varie en fonction des types d'implantation:

- Chez les suidés et les cétacés, le trophoblaste reste sous forme de monocouche de cytotrophoblastes, sans processus invasif au niveau de l'endomètre maternel.
- Chez la plupart des espèces de mammifères, le trophoblaste se dédouble en une monocouche de cytotrophoblastes et en syncytiotrophoblaste (fusion de cellules cytotrophoblastiques) qui va permettre les échanges mère-fœtus. Dans certains cas, il peut y avoir fusion avec les cellules épithéliales utérines par exemple chez la souris.
- Chez les ruminants et les équidés, une partie des cellules trophoblastiques mononuclées se différencie en cellules trophoblastiques binuclées. Ces cellules

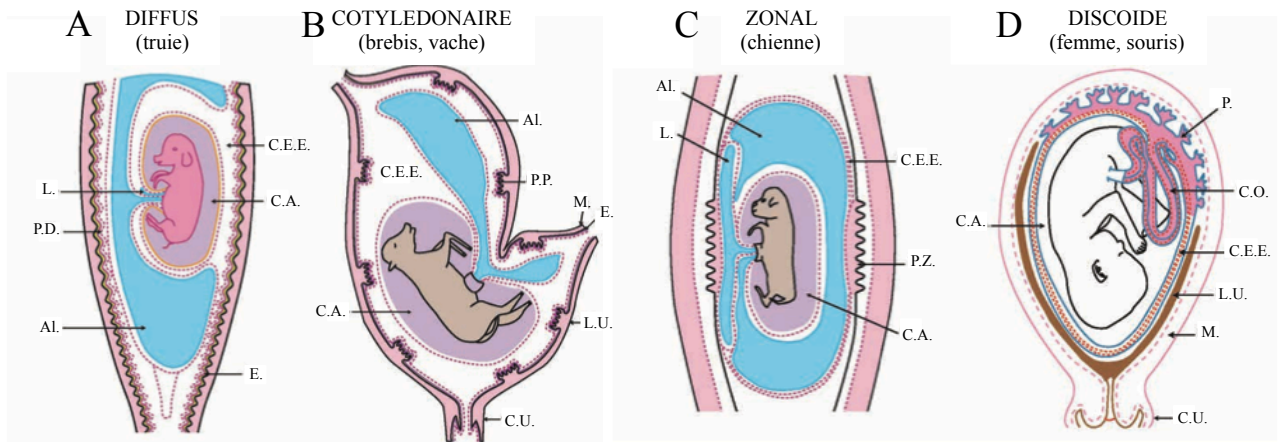


Figure 18 : Les différentes formes de placenta chez les mammifères ([La reproduction animale et humaine, 2014](#)). C.E.E. : coelome extra-embryonnaire, C.A. : cavité amniotique, Ch. : chorion, AL. : allantoïde, E. : endomètre, L. : lécihocèle, P. : Placenta, P.D. : placenta diffus, P.P. : placentome, P.Z. : placenta zonal, C.O. : cordon ombilical, L.U. : lumière utérine, M. : myomètre, C.U. : col utérin.

binucléées fusionnent avec les cellules utérines et forment ainsi des cellules plurinucléées appelées syncytium.

4-3) Classification des placentas

Les placentas sont classés de 2 manières différentes : par leurs morphologies et par leurs structures histologiques, avec l'organisation des lignées cellulaires séparant le sang maternel du sang fœtal.

4-3-1) Morphologie des placentas

Cette classification se fait selon la distribution des villosités placentaires retrouvées sur le sac formé par le chorion entourant le fœtus (**figure 18**) :

- Le placenta diffus (**figure 18 A**) : Il est retrouvé chez les suidés, les cétacés et les équidés. Le sac chorionique est entièrement recouvert de villosités ou replis directement en contact avec l'endomètre utérin. Il est retrouvé chez les suidés sous forme de plissement du sac chorionique, et chez les équidés sous forme de microvillosités.
- Le placenta cotylédonaire (**figure 18 B**) : Il est retrouvé chez les ruminants. Par endroit et tout le long du sac chorionique occupant le volume total des cornes utérines, des bouquets villositaires se développent, formant ce que l'on appelle les cotylédons. Le nombre de cotylédons dépend du nombre de caroncules s'étant développées le long de la paroi utérine. Les cotylédons s'enfoncent dans les caroncules utérines et forment ainsi des placentomes qui sont la principale surface d'échanges fœto-maternels.
- Le placenta zonal (**figure 18 C**) : Il est retrouvé chez les carnivores. Des villosités ceinturent le sac chorionique sur une bande équatoriale se liant de cette manière à l'utérus.
- Le placenta discoïde (**figure 18 D**) : il est retrouvé chez les rongeurs, les lagomorphes, les primates et les insectivores. Le sac chorionique possède 1 ou 2 disques villositaires. Dans ses disques, les villosités sont regroupées en amas formant des pseudo-cotylédons et interagissant avec la partie maternelle.

Les placentas peuvent être classés selon la façon dont le chorion est en contact avec le tissu maternel. Le placenta peut être plissé avec les replis du chorion tapissant la surface plissée de l'épithélium utérin (suidés). Il y a aussi le placenta vilieux avec formation de cotylédons ou pseudo-cotylédons (ruminants, primates, équidés), et le placenta labyrinthique (rongeurs, lagomorphes, carnivores, insectivore, chauve-souris) que forme un mélange de villosités chorioniques et de vaisseaux sanguins maternels.

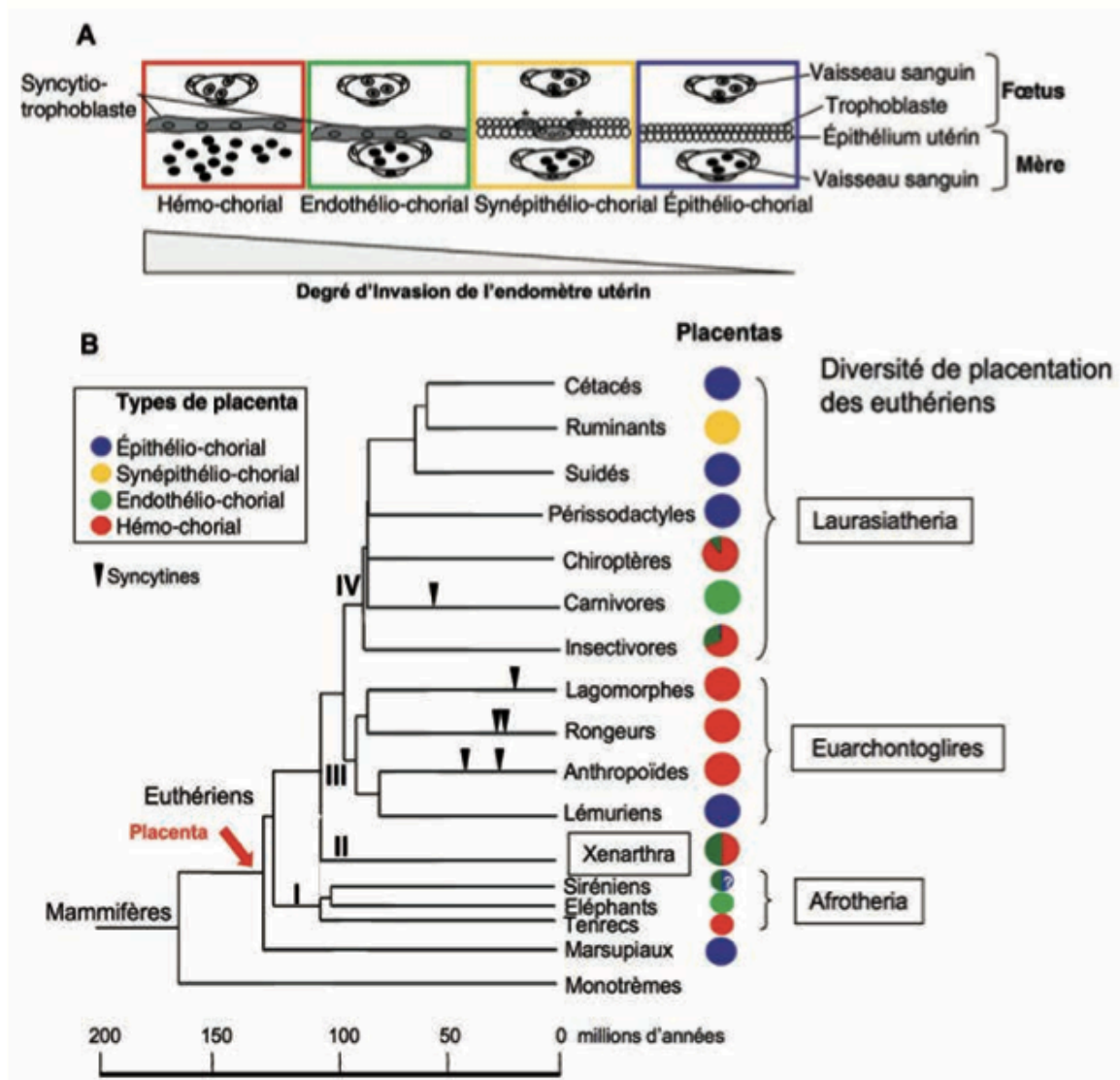


Figure 19 : Arbre phylogénétique et placentation des mammifères ([La reproduction animale et humaine, 2014](#)). A) Barrière materno-fœtale observée dans les différents types de placenta, illustrant le degré d'invasion de l'endomètre utérin par le trophoblaste et/ou syncytiotrophoblaste. Dans le placenta synépithélio-chorial, des cellules binucléées du trophoblaste (astérisques) fusionnent avec des cellules utérines pour former un syncytium au sein de l'épithélium utérin. B) Arbre phylogénétique des mammifères présentant les quatre groupes majeurs des euthériens (I, Afrotheria ; II, Xenarthra ; III, Euarchontoglires et IV, Laurasiatheria), les différents types de placentas observés et la date d'apparition des syncytines identifiées. Les cercles colorés indiquent la proportion des types placentaires rencontrés au sein d'un même groupe ou famille.

Après avoir regardé la structure morphologique et organisationnelle du placenta et de son contact avec la partie maternelle, la structure histologique est observée.

4-3-2) Histologie des placentas

Il s'agit maintenant de regarder le nombre de couches de tissus séparant le sang maternel du sang fœtal (**figure 19**) ainsi que leur nature et le degré d'invasion de l'endomètre par le chorion.

- Le placenta épithéliochorial résulte d'une apposition directe du trophoblaste sur l'épithélium utérin. La surface d'échange est augmentée par des replis ou villosités. Six couches de tissus séparent le sang maternel du sang fœtal : les parois des vaisseaux sanguins (1 paroi fœtale et 1 paroi maternelle), étant inclus dans du mésoderme fœtal d'un côté et dans le myomètre utérin de l'autre. Il est retrouvé chez les suidés, équidés, cétacés et lémuriens.
- Le placenta synépithéliochorial résulte de la présence d'un syncytium (masse de cellules plurinucléées) issus de la fusion de cellules trophoblastiques binucléées (cellules qui ont interrompu leurs cycles de divisions cellulaires et ainsi ont 2 noyaux) avec des cellules épithéliales utérines, en contact avec l'épithélium maternel. Six couches de tissus séparent aussi le sang maternel du sang fœtal. Il est retrouvé chez les ruminants.

Les placentas épithéliochoriaux et synépithéliochoriaux sont les moins invasifs.

- Le placenta endothéliochorial : Plus que 4 couches de tissus séparent le sang maternel du sang fœtal (1 maternelle et 3 fœtales). La paroi des vaisseaux sanguins fœtaux est toujours inclus dans le mésoderme fœtal. Par contre l'épithélium utérin est érodé par le syncytiotrophoblaste qui est directement apposé à la paroi des vaisseaux sanguins maternels. C'est une invasion partielle des tissus maternels. Il est retrouvé chez les carnivores et les éléphants.
- Le placenta hémochorial possède seulement 3 couches de tissus, toutes fœtales ce qui en fait la forme de placenta la plus invasive. Les vaisseaux sanguins fœtaux sont inclus dans le mésoderme fœtal et le syncytiotrophoblaste baigne directement dans le sang maternel (absence d'épithélium utérin et ouverture des artères spiralées maternelles). Il est retrouvé chez les rongeurs, lagomorphes, insectivores et primates.
Il existe 2 sous-types de placentas hémochoriaux : le placenta hémochorial, avec 1 couche de cytotrophoblastes et 1 couche de syncytiotrophoblastes (lagomorphes

insectivores, primates) et le placenta hémotrichorial avec 1 couche de cytotrophoblastes et 2 couches de syncytiotrophoblastes (rongeurs).

Tous les types de placentas ayant bien été définis, les fonctions placentaires déjà évoquées précédemment vont être développées en détail.

4-4) Fonctions placentaires

Comme déjà évoqué précédemment, le placenta a une fonction immune qui a pour but de protéger le fœtus et une fonction d'échanges entre la mère et le fœtus qui a pour but de participer au bon développement embryonnaire.

4-4-1) Fonction immune

L'œuf fécondé pourrait être considéré comme du « non-soi » par la mère, puisque celui-ci contient pour moitié du génome paternel. Pourtant il persiste et se développe dans l'utérus maternel, avec un placenta qui se forme. Le trophoblaste, à l'interface avec le compartiment maternel, met en place des mécanismes moléculaires déjouant la réponse immunitaire de la mère.

Le trophoblaste sécrète des molécules pouvant être reconnues par la mère comme du « soi » (molécule HLA (Human Leukocyte Antigen) du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) chez l'homme). Il y a aussi plusieurs facteurs immunosuppresseurs qui sont présents localement au niveau de la jonction fœto-maternelle. Chez les ruminants, la sécrétion d'interféron tau (INT) a un rôle important dans l'immunodépression maternelle. Il est sécrété très précocement au cours de la gestation (18 jours) mais ne peut pas servir de marqueur puisqu'il n'est pas détectable dans le sang.

Les cellules NK (Natural Killer) sont des lymphocytes trouvés dans le sang et sont importantes dans l'immunité innée. Elles reconnaissent les cellules du « non soi » et les éliminent. Ces cellules présentes dans l'utérus gravide sont appelées cellules NK déciduales ou dNK et sont activées par les cellules trophoblastiques. Elles permettraient, d'après des études récentes, un bon développement placentaire. De plus, la cytotoxicité des NK est régulée négativement dans les dNK évitant ainsi l'apoptose des cellules trophoblastiques et de l'embryon.

Les cellules T régulatrices sont aussi impliquées. Ce sont des lymphocytes maturés dans le thymus et pouvant inhiber la prolifération d'autres lymphocytes T effecteurs. Elles ont ainsi un effet suppresseur sur les réponses immunitaires spécifiques d'antigènes, permettant ainsi la tolérance du placenta et de son embryon dans l'utérus maternel.

La fonction immune placentaire est encore très étudiée dans le contexte des pathologies placentaires humaines.

4-4-2) Fonction d'échanges

Les principaux échanges sont des échanges gazeux (oxygène, dioxyde de carbone et azote), d'eau et de nutriments, essentiels à la survie et à la croissance de l'embryon. La croissance placentaire et l'augmentation des surfaces d'échanges avec le compartiment maternel permet un apport suffisant au développement du fœtus. Ainsi le rapport du poids du fœtus sur le poids du placenta est un paramètre de mesure de l'efficacité placentaire.

- Les échanges gazeux se font par diffusion passive à partir du sang à travers les membranes cellulaires. Chez certaines espèces, il existe une hémoglobine fœtale présentant une plus forte affinité pour l'oxygène que l'hémoglobine maternelle, ce qui facilite le transfert vers le fœtus.
- Le glucose est la source d'énergie principale pour le fœtus. Le transport est effectué par diffusion facilitée par des transporteurs. La glycémie du fœtus est directement liée à la glycémie de sa mère.
- Puisque le placenta ne laisse pas passer les protéines maternelles, des acides aminés sont transportés de manière active par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques, se trouvant pour la plupart dans le syncytiotrophoblaste. Le placenta est lui même capable de synthétiser ses propres acides aminés et de les transporter du fœtus vers la mère.
- Les acides gras sont obtenus par hydrolyse des triglycérides par la membrane apicale du syncytium puis sont transférés au fœtus à l'aide de transporteurs.
- Les immunoglobulines sont transportées par transcytose (transport vésiculaire non intercepté par les lysosomes et sans modification de la protéine transportée) de la mère au fœtus dans le cas des placentas épithéliochoριαux et synépithéliochoριαux. Dans les autres placentas, les immunoglobulines ne peuvent pas traverser et le transfert de l'immunité se fait à la naissance par l'intermédiaire du lait maternel.

Le placenta est donc une plateforme d'échange de molécules diverses et variées mais intervient aussi comme producteur d'hormones permettant le bon déroulement de la gestation et l'adaptation de la mère à l'état gravide.

4-4-3) Fonction hormonale

Les hormones jouent un rôle de messager chimique essentiel dans l'établissement et le

maintien de la gestation, jusqu'au déclenchement de la parturition. Les hormones sont sécrétées par le trophoblaste et plus particulièrement par le syncytiotrophoblaste ou le syncytium. La quantité d'hormones produite varie d'une espèce à une autre.

- Les hormones stéroïdes comme la progestérone et les oestrogènes sont des stéroïdes sexuels issus du cholestérol. Elles se couplent à des protéines réceptrices intracellulaires cibles et régulent le gène cible par fixation sur l'ADN. Elles agissent au niveau utérin par action sur l'endomètre et le myomètre.

Chez toutes les espèces, la progestérone est produite en quantité fixe moyenne par le corps jaune tout au long de la gestation. Les cellules trophoblastiques du placenta de certaines espèces (truie, chèvre, jument, vache, femme et cochon d'inde) produisent aussi de la progestérone en quantité importante. La progestérone est indispensable au bon déroulement de la gestation en agissant par rétroaction négative sur l'axe hypothalamo-hypophysaire bloquant la fonction ovarienne et inhibant la contractilité utérine.

Les oestrogènes sont produits en faibles quantités et augmentent juste avant la parturition.

- Les hormones polypeptidiques placentaires sont sécrétées par le trophoblaste ou le syncytiotrophoblaste. Il existe beaucoup d'hormones appartenant à cette catégorie et seulement les plus intéressantes surtout pour l'espèce bovine sont présentées ici.

L'hormone placentaire lactogène est trouvée dans le sang fœtal et en plus petite quantité dans le sang maternel. Chez la vache, elle est détectée dans les cellules binucléées. Son rôle n'est pas encore clair mais elle stimulerait la croissance fœtale et placentaire et préparerait la lactation par induction de la prolifération et de la différenciation des cellules de la glande mammaire.

Les glycoprotéines liées à la gestation ou PAG ont tout d'abord été identifiées chez la vache domestique et sauvage, puis chez la truie, la jument et la souris. Les PAG font partie de la famille des protéases aspartiques et beaucoup d'entre elles n'ont pas de site catalytique. Le rôle des PAG n'est pas encore très clair à ce jour, elles interviendraient dans la protection du placenta contre le système immunitaire de la mère et dans le maintien de la gestation. Chez la vache, les gènes exprimant les PAG sont une famille multigénique d'environ 100 gènes. Il existe des PAG « anciennes » exprimées par les cellules mononucléées du trophoblaste et les PAG « modernes » exprimées dans les cellules binucléées ([Touzard et al., 2013](#)). La séparation entre « moderne » et « ancienne » est phylogénétique. Le dosage des PAG pourrait

servir pour le diagnostic de viabilité d'un fœtus, en plus de l'échographie. Beaucoup de recherches sont menées pour trouver, dans la multitude de protéines PAG découvertes, un marqueur de gestation précoce

4-5) Formation des annexes embryonnaires

4-5-1) Le sac vitellin

Le sac vitellin est un vestige de l'évolution des vertébrés. C'est l'une des premières annexes extra-embryonnaires à être vascularisées. Il persiste ou non selon les espèces. Cette annexe se forme lors de la migration du mésoderme embryonnaire autour de l'endoderme issu lui aussi d'un des feuillets embryonnaires et développe le premier réseau vasculaire primitif. Dans le cas des ruminants, il régresse rapidement, vers 18-21 jours de gestation.

4-5-2) L'amnios

La poche amniotique est une cavité protégeant mécaniquement le fœtus et permettant son développement dans un milieu liquide à l'abri de la pression extérieure. Sa formation est différente selon les espèces. Soit une cavité se creuse au niveau de l'ectoderme au dessus de l'embryon et le recouvre. Soit le trophoblaste se plisse au dessus de l'embryon et fusionne ses 2 membranes formant ainsi une nouvelle poche protectrice. C'est cette dernière que l'on retrouve chez les ruminants. Ainsi l'amnios est un tissu principalement dérivé du trophoblaste et tapissé de mésoderme.

4-5-3) L'allantoïde

Le sac allantoïdien est formé à partir de l'intestin primaire de l'embryon (endoderme). Il est ensuite recouvert par le mésoderme embryonnaire en migration. Une poche allantoïdienne ainsi qu'un cordon ombilical est ainsi formé. Le devenir de cette annexe varie selon les espèces, soit elle régresse (rongeur, homme) soit elle se développe (ruminant, suidé, équidé), se lie très fortement au chorion (allanto-chorion) et est à l'origine de la vascularisation définitive du placenta. Ce sac sert au stockage et à la gestion des déchets générés par le fœtus, étant directement connecté à son appareil urinaire.

Les bovins possèdent un utérus bicorne, avec de longues cornes utérines. L'embryon s'y installe et le trophoblaste subit une très forte élongation, remplissant totalement l'espace. Ensuite un placenta de type cotylédonaire (et donc villos) et synépithéliochorial se développe et permet toutes sortes d'échanges développés précédemment ([Constant et Guillomot, 2006](#)).



Figure 20 : Photo de la première vache clonée en 1998, à l'INRA de Jouy-en-Josas : Marguerite

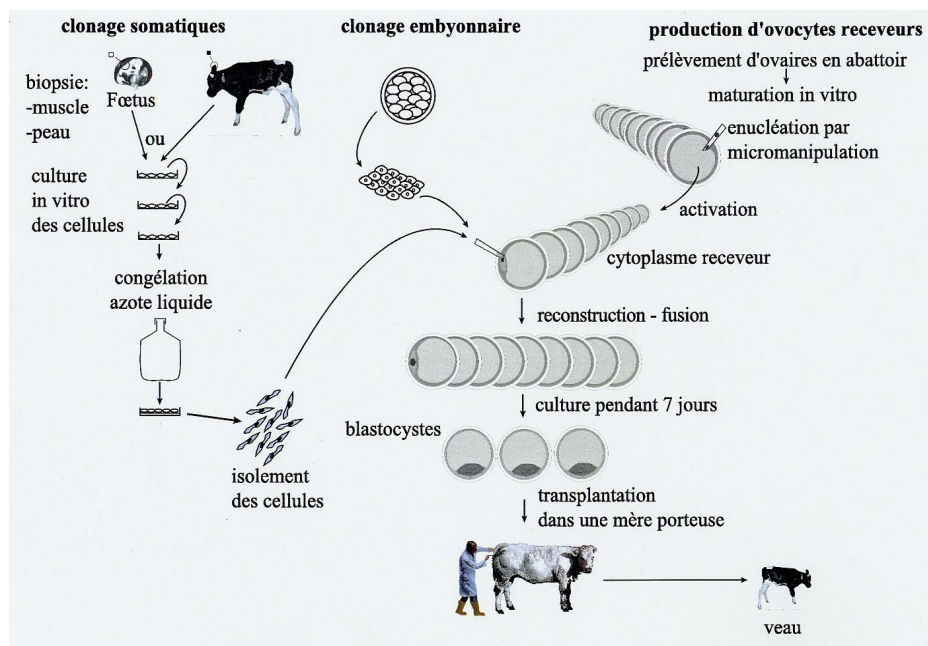


Figure 21 : Principe du clonage par transfert de noyau chez le bovin. Que le clonage se fasse à partir de noyau embryonnaire ou somatique, les cellules donneuses sont mises en culture. Les cellules sont isolées et l'une d'entre elles est injectée par micromanipulation dans la zone pellucide de ovocyte accepteur, préalablement énucléée. Le courant électrique appliqué permet aux membranes de fusionner (membrane de la cellule donneuse avec celle de l'ovocyte) et au noyau diploïde d'entrer dans le cytoplasme ovocytaire. A partir de ce moment, l'ovocyte est mis en culture jusqu'au stade blastocyste. Ces blastocystes sont transférés dans une vache porteuse préalablement synchronisée.

La principale question posée au cours de ce travail concerne le devenir du lignage trophoblastique au cours de la gestation en comparant des conceptus après IA et après clonage.

5) Le clonage, un modèle de perturbation de la reprogrammation épigénétique

Le développement des biotechnologies de la reproduction chez le bovin commence autour des années 1950 avec le développement de l'insémination artificielle. Dans les années 70, le développement du transfert d'embryon est effectué, suivi du développement et de la maîtrise de la fécondation *in vitro* (FIV) dans les années 80. Puis en 1996, le premier mammifère est cloné à partir d'un noyau de cellule somatique adulte par Keith Campbell et Ian Wilmut en Ecosse: la brebis Dolly ([Wilmut et al., 1997](#)). Elle est suivie de près par 2 vaches clonées en 1998, une aux Etats-Unis ([Cibelli et al., 1998](#)) et l'autre en France à l'INRA de Jouy-en-Josas ([Vignon et al., 1998](#)) Marguerite, photo **figure 20**).

Le clonage s'est ensuite beaucoup développé pour des espèces d'élevage tel que le mouton, la chèvre, le porc, le cheval, le lapin puis pour les animaux modèles tel que la souris et le rat.

Le clonage par transfert de noyau permet d'obtenir des individus génétiquement identiques qui peuvent servir dans de nombreuses applications, en particulier pour l'espèce bovine.

5-1) Clonage par transfert de noyau

5-1-1) Protocole couramment utilisé

Le clonage par transfert de noyau (**figure 21**) consiste en plusieurs étapes ([Heyman, 2005](#)). Tout d'abord des ovocytes sont collectés par ponction sur les ovaires provenant des abattoirs. Ces ovocytes prélevés sont ensuite maturés *in vitro* en milieu de culture jusqu'à la fin de la métaphase II de la méiose, étape idéale pour la micromanipulation, où l'ADN est condensé et bien visible. Plusieurs origines de cellules donneuses de noyaux sont possibles : soit des cellules issues d'embryon (cellule ES), soit des cellules issues de tissus fœtaux, soit des cellules issues d'individu adulte (fibroblastes, cellules du cumulus,...). La cellule « donneuse » est préalablement sauvegardée en culture. Par micromanipulation, une cellule isolée est insérée dans la zone pellucide de l'ovocyte « receveur » préalablement énucléée. Un courant électrique est ensuite appliqué, afin que la membrane de l'ovocyte énucléée et celle de la cellule donneuse fusionnent pour que l'ADN de la cellule entre dans l'ovocyte. Le courant électrique provoque une libération importante de calcium dans l'ovocyte, similaire à

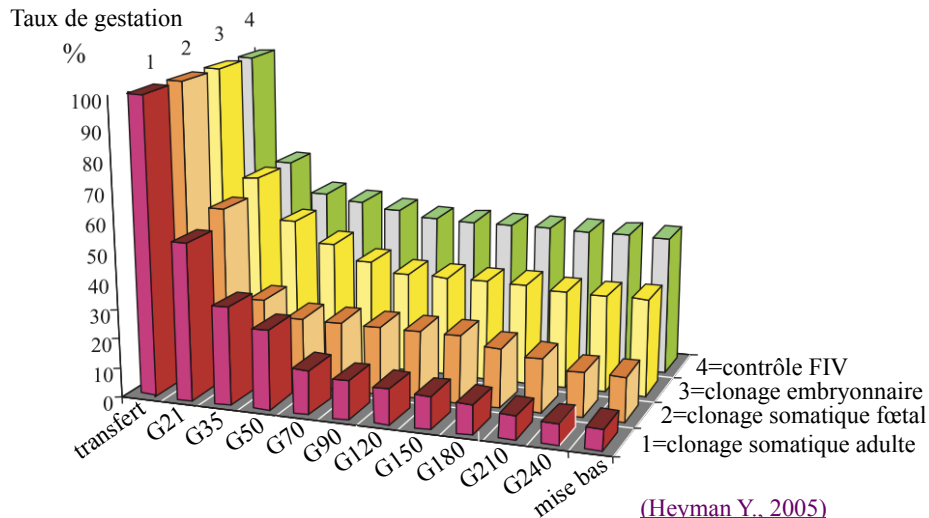


Figure 22 : Evolution de la gestation chez le bovin après transfert d'embryons clonés. Les pertes les plus importantes sont observées entre le transfert des embryons et juste avant l'implantation (entre 20 et 50%). Après 35 jours de gestation, les pertes se stabilisent pour la FIV, un peu moins pour le clonage par noyau embryonnaire et encore un peu moins pour le clonage par noyau somatique fœtal. Pour le clonage par noyau somatique adulte les pertes après l'implantation sont graduelles toute au long de la gestation, avec un taux de naissance très bas (moins de 10%) par rapport aux autres modalités (FIV ou autres clones).

celle induite par la pénétration du spermatozoïde, permettant l'initiation du processus d'activation du développement. L'œuf ainsi formé est cultivé dans un milieu spécifique pour les embryons, jusqu'au stade blastocyste. Celui-ci sera transféré dans une vache porteuse qui aura été hormonalement synchronisée, pour une bonne préparation de l'utérus.

5-1-2) Facteurs affectant le clonage ainsi que son efficacité

Les facteurs affectant le clonage sont nombreux. Il faut par exemple que l'ovocyte « récepteur » puisse être mûri correctement, ou encore que les conditions de culture embryonnaire soient optimales. Par exemple trop de sérum dans le milieu de culture a tendance à donner des fœtus développant le syndrome du gros veau (expliqué dans le chapitre 5-6).

La nature de la cellule « donneuse » peut aussi avoir un impact sur le clonage (**figure 22**). En effet, l'efficacité du clonage (nombre de clones viables / nombre total de micromanipulations effectués x 100) décroît ; étant le plus efficace avec une cellule « donneuse » embryonnaire et moins efficace avec une cellule « donneuse » somatique issue d'un individu adulte. La période de reprogrammation du noyau somatique est aussi une étape critique dans la technique du clonage. Pour donner un exemple concret, l'efficacité du clonage somatique bovin à terme varie entre 0,5 et 7%. Cinquante pourcent des embryons reconstitués vont jusqu'au stade blastocyste. La plus grosse période de perte embryonnaire est observée entre le transfert de l'embryon dans la mère porteuse et son implantation. En effet, ces pertes peuvent être interprétées comme la conséquence d'un dérèglement du système de reconnaissance du soi (CMH) qui voit le clone comme un intrus que la mère porteuse rejette. L'observation de pertes plus tardives est le plus souvent due au développement du syndrome du gros veau (expliqué dans le chapitre 5-6). La période entre la naissance et le sevrage des nouveau-nés est l'autre période critique pour les clones (entre 20 et 30% de mortalité), mourant de différentes infections, de problèmes cardiaques ou pulmonaire. Les nouveau-nés clonés naissent plus gros que les nouveau-nés obtenus par IA. Les clones survivants au sevrage retrouvent une courbe de poids normale avec une physiologie normale.

5-2) La « normalité » du clone

Les pertes pendant la micromanipulation et la culture embryonnaire, au cours de la gestation et de la naissance au sevrage nous montrent bien que la plupart des clones ne sont pas viables. Cependant, les survivants après sevrage ont une longévité comparable à la moyenne, sans observation de vieillissement prématuré avec une croissance normale de

l'animal. Ces vaches clonées ont une production laitière qui est dans la moyenne, aussi bien en quantité qu'en qualité (tests effectués aux Etats-Unis et au laboratoire). Au Japon, la qualité de la viande a été analysée selon une centaine de paramètres sans trouver de différence entre les clones et les témoins. Les clones n'ont pas de problème de stérilité ou autres problèmes liés à la reproduction et les descendants de clones ainsi que la mère clonée ont une gestation comparable aux témoins. Pour les taureaux clonés, leurs semences analysées ne portent pas d'anomalies et les animaux ont une libido normale ([Chavatte-Palmer and Heyman, 2006a](#)).

Après la période du sevrage, le clone peut être considéré à ce jour comme étant un individu sans anomalie.

Après avoir observé les inconvénients du modèle clone, quels avantages peut-on tirer de ces animaux ?

5-3) Applications du clonage chez le bovin

Grâce au clonage somatique, des groupes d'individus génétiquement identiques (mise à part le génome mitochondrial ovocytaire) peuvent ainsi être obtenus et utilisés dans plusieurs applications ([Chavatte-Palmer et Heyman, 2006b](#); [Heyman, 2005](#)).

5-3-1) Outil pour la sélection bovine

La sélection bovine s'effectue en observant des phénotypes intéressants chez plusieurs individus de même parenté (population de référence) en étudiant leur génome sur plusieurs générations. Il est possible de favoriser la reproduction d'animaux portant des caractéristiques génétiques intéressantes dans le cadre de l'élevage.

Au début de la sélection génomique, il a été constaté que le système provoquait la mise en place du système « Taureau-Star », taureau ayant un index améliorateur très important et très utilisé en reproduction. Pour ces individus (en petit nombre), il était primordial de sauvegarder leur patrimoine génétique (semence). Le clonage pouvait être une assurance pour la sauvegarde de ce patrimoine génétique en cas d'accident de l'animal.

Dans le cadre d'un élevage extensif, un taureau avec un patrimoine génétique très recherché peut être cloné. Les individus mâles ainsi obtenus peuvent alors servir de reproducteurs dans un élevage et ainsi avoir un rôle dans la dissémination du progrès génétique.

Mais un clone coûte cher à produire (entre 15000 et 20000 euros) avec une efficacité de réussite très faible et cette biotechnologie de la reproduction n'est pas bien perçue par le public (voir le chapitre législation et éthique).



Figure 23 : Photo de la vache bleue de bazougers clonée, Aurore et son fils, descendant de clone

5-3-2) Reproduction de phénotypes rares ou en voie de disparition

Certains animaux sont en voie de disparition ou menacés d'extinction. Par le clonage, on peut espérer sauvegarder certains génotypes de ces animaux. Par exemple le clonage de l'une des dernières vaches de race bleue de bazougers, la vache Aurore (photo **figure 23**) a été effectué par l'INRA pour démontrer la faisabilité de cette approche.

La même chose a été faite sur une race de vache en voie de disparition en Nouvelle-Zélande.

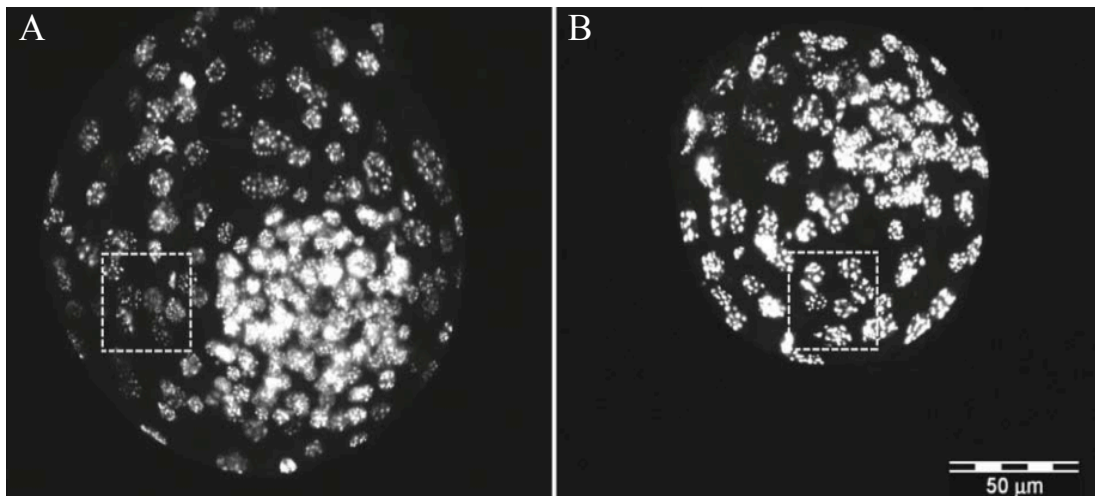
Le clonage peut aussi être utilisé sur des espèces sauvages. Le problème est d'avoir des ovocytes receveurs et des femelles porteuses ce qui est difficile, l'espèce étant menacée d'extinction. Des expériences ont été menées en prenant des ovocytes d'une espèce domestique (par exemple des ovocytes bovins) en introduisant le noyau somatique de fibroblaste d'une antilope des montagnes. Des blastocystes ont pu être obtenus mais encore faut-il trouver la mère porteuse idéale, pour que l'embryon ait une chance de se développer correctement et d'être viable après la naissance.

En mai 2013, après la découverte d'un mammouth congelé et parfaitement préservé par des russes sur une île en Sibérie, il était question d'essayer de cloner ce mammouth à partir de cellules prélevés sur son corps. Au delà du fait que l'ADN n'a pas forcément été totalement bien préservé, le clonage de cette espèce suggérerait la récupération d'ovocytes d'éléphantes (race la plus proche du mammouth), ainsi que la sélection d'éléphantes porteuses, sachant que même si ces espèces sont proches, la réussite du clonage n'est pas garantie, l'éléphant n'ayant jamais été cloné à ce jour. La taille de l'animal est aussi un frein puisque pour faire le transfert d'embryon, l'utérus est à 2m50 de l'orifice vaginal.

5-4) Ethique et législation

Le clonage n'est pas bien perçu par le grand public, notamment à cause de la souffrance fœtale que cette technique peut engendrer, ainsi que sa très faible efficacité de réussite. S'il y a une acceptation de la population à utiliser le clonage à des fins médicales et thérapeutiques (vaches transgéniques clonées fabriquant des vaccins), les consommateurs européens n'envisagent pas l'utilisation du clonage à des fins alimentaires (vaches transgéniques clonées avec une croissance accrue).

Pour reprendre l'exemple du mammouth congelé, cette découverte a suscité chez le grand public un regain d'intérêt pour le clonage, en oubliant toutes les conséquences éthiques. Tout le monde envisage la renaissance de la race du mammouth mais au-delà des incompatibilités évoquées précédemment, l'utilisation d'un grand nombre d'éléphantes afin d'obtenir un seul individu mammouth devrait nous faire réfléchir, l'éléphant étant une espèce rare voire en voie



(Santos F. et al, 2006)

Figure 24 : Organisation de la méthylation de l'ADN dans les blastocystes bovins obtenus par A) FIV ou B) clonage. Le marquage spécifique de la méthylation de l'ADN est obtenu par immunofluorescence avec un anticorps spécifique anti-5mC. A) Marquage des blastocystes obtenus par FIV (n=7). B) Marquage des blastocystes obtenus par clonage somatique (n=4/8).

de disparition, et de ce fait protégée. De plus quel serait l'intérêt de la naissance d'un tel animal, dans un environnement qui ne lui conviendrait peut-être pas et le seul représentant de son espèce, sans possibilité de reproduction.

Au niveau législation, le parlement Européen a adopté le 8 septembre 2015, une loi interdisant le clonage à but alimentaire, ainsi que l'importation de produits (viande, lait) issus de clones sur le territoire. Le clonage reste autorisé pour la recherche fondamentale et médicale.

En revanche, aux Etats-Unis, Canada, Argentine et Brésil la législation autorise la consommation de clones et de descendants de clones. Il est aussi possible dans ces pays d'utiliser la semence de clones et de la commercialiser à l'international. En absence de traçabilité, il est donc possible d'effectuer des IA en Europe avec de la semence de clones et par conséquent d'obtenir, de commercialiser et de consommer des produits de descendants de clones, malgré la nouvelle législation.

Il faut donc espérer que la consommation de viandes issues de descendants de clones n'ait aucun impact négatif sur la santé de l'homme.

5-5) Etude des perturbations de la reprogrammation du noyau somatique

L'intérêt pour le clonage peut aussi être axé sur la compréhension de certains systèmes comme la reprogrammation épigénétique ayant lieu lors de la fécondation et évoquée précédemment.

Lorsque le noyau somatique est introduit dans l'ovocyte énucléé, le courant électrique appliqué active l'ovocyte et donc la reprogrammation du génome. Au lieu d'avoir 2 génomes distincts (1 maternel et 1 paternel) hautement différenciés à reprogrammer, l'ovocyte doit reprogrammer un noyau somatique diploïde et différencié. Il est maintenant reconnu que la reprogrammation du noyau somatique ne se passe pas toujours très bien, entraînant une réorganisation épigénétique parfois anormale. Par exemple, il peut y avoir des différences de méthylation entre témoins et clones. Par immunofluorescence utilisant un anticorps dirigé contre la 5mC, les blastocystes témoins ont un marquage hétérogène avec une hypométhylation du trophoblaste par rapport aux CMI. Par contre certains blastocystes clonés ont un marquage homogène entre le trophoblaste et les CMI, avec une hyperméthylation du trophoblaste par rapport à un blastocyste témoin (**figure 24**, [Santos et al., 2003](#)).

Cela ne touche pas seulement la méthylation de l'ADN mais aussi des modifications post-traductionnelles des histones, et des protéines impliquées dans la condensation de la chromatine du stade 2 à 8 cellules ([Pichugin et al., 2010](#)). On dirait qu'après le transfert du noyau dans l'ovocyte énucléé, l'ADN garde une mémoire de la cellule « somatique ».

Ces perturbations de la reprogrammation peuvent avoir des conséquences sur la viabilité d'un embryon dès sa formation, pendant la gestation et jusqu'à la naissance. Les périodes les plus critiques sont les premières phases de développement (50% de perte des embryons), après le transfert de l'embryon dans la vache porteuse et l'implantation (perte à nouveau de 50% des embryons transférés), pendant la gestation (25% des embryons transférés), et de la naissance jusqu'au sevrage. Au vu des connaissances actuelles et du ciblage des mécanismes moléculaires altérés pendant cette reprogrammation, il est possible d'améliorer l'efficacité de la reprogrammation des noyaux somatiques. Par exemple l'utilisation de la Trichostatine A (TSA, inhibiteur des histones déacétylase) au niveau de la culture des cellules donneuses avant le transfert du noyau améliore le clonage chez le bovin ([Enright, 2003](#)).

5-6) Pathologie liée au clonage : le syndrome du gros veau

Comme déjà évoqué précédemment, les clones peuvent développer des pathologies placentaires. Dans le cas du clonage chez le bovin, dès 60 jours de gestation, il peut être observé un développement placentaire anormal avec des placentomes anormalement gros ([Constant, 2006](#)), une poche de l'amnios et/ou allantoïdienne anormalement gonflée et remplie de liquide (Hydramnios et/ou hydrallantoïs). Le fœtus, vivant, est gros, avec un ventre gonflé par l'accumulation de liquide dans la cavité abdominale. La langue est épaisse et volumineuse, les oreilles sont malformées et une hernie ombilicale est observée (**figure 25**). C'est ce que l'on appelle le syndrome du gros veau ([Chavatte-Palmer et al., 2012](#)).

Ces symptômes ne sont pas spécifiques du clonage et ont été aussi retrouvés chez des fœtus issus de FIV, surtout quand les embryons ont été maintenus en culture dans un milieu à fortes concentrations en sérum. Les pathologies placentaires se manifestent à différents stades de gestation et sont détectables par l'échographie. Toute gestation diagnostiquée positive pour la pathologie placentaire est arrêtée, puisqu'une thérapie ne peut améliorer la situation. Les souffrances fœtales et maternelles sont ainsi contrôlées.

Le syndrome du gros veau serait dû à une dérégulation de certains gènes soumis à l'empreinte tel que Igf2 (Insulin-like growth factor 2, facteur de croissance hormonal pendant la gestation).

Cette pathologie décrite chez le bovin, est comparable au syndrome de Beckwith-Weidemann (SBW) existant chez l'homme ([Chen et al., 2013](#)). Les bébés naissent gros avec des défauts de la paroi abdominale, une hernie ombilicale, une langue de grande taille et des oreilles déformées. SBW touche environ 1 nouveau-né sur 13700 naissances naturelles. Les veaux



Figure 26 : Photo des clones de la vache 5538. Ces vaches ont toutes le même génotype, mais pas forcément le même phénotype, les taches noires de leurs robes n'étant pas toujours retrouvées aux mêmes endroits.

clonés développant ce syndrome peuvent être un bon modèle de la maladie humaine, pour mieux connaître les perturbations épigénétiques mise en jeu.

Dans notre projet, (projet ANR EpigRAni), les clones ont été générés à partir de cellules de fibroblastes adultes d'une vache appelée 5538 dans le but étudier l'impact des perturbations de la reprogrammation, sur les tissus extra-embryonnaires, après le stade blastocyste sur des individus à génotypes constants. L'utilisation de cellules somatiques adultes entraîne plus de pertes embryonnaires et fœtales (**figure 22**) liées aux perturbations épigénétiques et donc plus de pathologies susceptibles d'être étudiées. Pour tous ces clones, le génotype est le même mais le phénotype varie d'un animal à un autre (**figure 26**).

Afin d'étudier ces marques épigénétiques, et plus particulièrement la méthylation, des techniques faisant appel à la biologie moléculaire, ainsi qu'à la biochimie ont été développées.

6) Méthodes d'étude de la méthylation de l'ADN

Il existe un grand nombre de techniques d'analyses de la méthylation de l'ADN. Elles ont toutes leurs avantages et leurs inconvénients. Différentes méthodes de préparation de l'ADN doivent être combinées pour donner naissance à des techniques permettant l'analyse de la méthylation de l'ADN ([Kurdyukov et Bullock, 2016](#)).

6-1) Méthodes de préparation de l'ADN

6-1-1) Utilisation d'endonucléases de restriction

Les endonucléases de restriction sont d'origine bactérienne. Les bactéries s'en servent comme système de défense contre les ADN exogènes (phage et virus). Le génome bactérien, protégé par sa méthylation n'est pas digéré par ses propres endonucléases, méthyl-sensibles. Par contre elles coupent en morceaux les ADN non méthylés exogènes. C'est ce que l'on appelle le système de restriction/modification. Ces propriétés sont utilisées pour les analyses de la méthylation sur les sites CpG. L'utilisation d'enzymes méthyl-sensibles est répandu dans les techniques d'étude de la méthylation : HpaII, HhaI, ClaI, NruI, SacII, ... Plusieurs enzymes sont aussi utilisées pour leur spécificité à couper uniquement l'ADN méthylé : BisI, BlnI, GluI, KfoI, MteI, PciI, PkrI et GlnI ([Tarasova et al., 2008](#)), utilisé dans les méthodes réalisant une amplification sélective des ADN méthylés. Il existe des endonucléases de restriction méthylation dépendantes qui génèrent des fragments de 32pb autour du site de méthylation : FspEI, MspJI et LpnPI. Une enzyme, McrBC, reconnaît 2 demi sites G/AC_m,

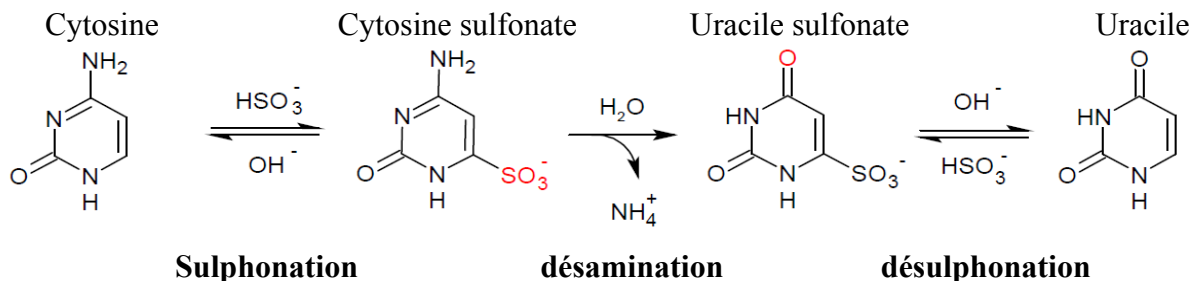


Figure 27 : Réaction de conversion au bisulfite de sodium. Lors du traitement au bisulfite de sodium, la cytosine non méthylée (et non hydroxyméthylée) subit une sulphonation, une désamination puis une désulphonation qui donne lieu au remplacement de NH_2 par O au niveau du carbone 6.

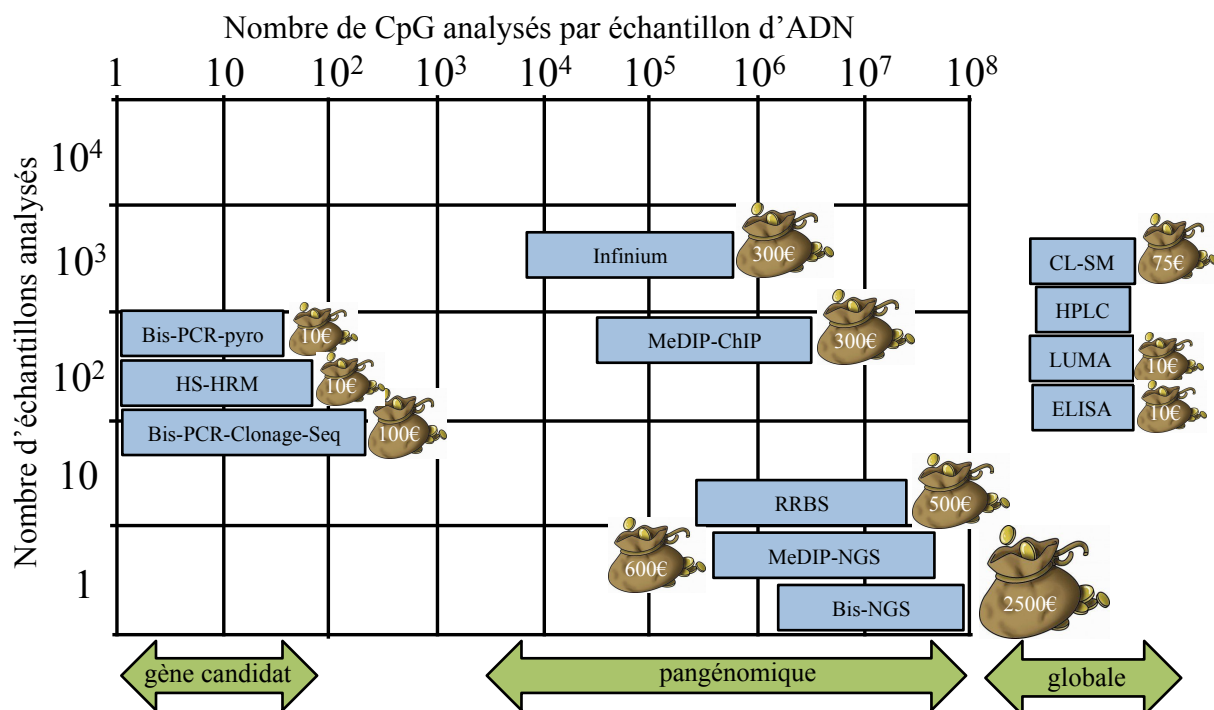


Figure 28 : Classement de différentes techniques d'analyse de la méthylation en fonction du nombre de CpG analysés par échantillon et le nombre d'échantillons totaux traités. A l'aide du classement des différentes techniques d'analyse de la méthylation de l'ADN, les méthodes gènes-candidats sont regroupées, ainsi que les méthodes pangénomiques et les méthodes globales. Le prix indiqué est valable pour le traitement d'un échantillon.

même si les 2 extrémités sont entre 40 et 3000pb de distance et permet l'analyse des îlots CpG présents dans cette zone. Cette méthode d'analyse demande 1 à 2µg d'ADN intègre. L'utilisation de ces enzymes dépend de ce que l'on veut observer et du matériel à disposition au laboratoire pour les analyses. L'utilisation de cette méthode ne permet pas de faire la différence entre méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN.

6-1-2) Conversion de l'ADN au bisulfite de sodium

Le principe est de traiter l'ADNg dénaturé au bisulfite de sodium, permettant de convertir les cytosines non méthylées en uraciles. Les cytosines méthylées sont très résistantes à ce traitement chimique du fait de la présence du groupement CH₃ (Frommer et al., 1992). Cette propriété est aussi valable pour les cytosines hydroxyméthylées. La conversion se fait en 3 étapes : une sulphonation, une désamination et une désulphonation (figure 27).

Ces réactions en chaîne produisent un polymorphisme C/U analysable par PCR et/ou séquençage. L'utilisation de cette méthode ne permet pas de faire la différence entre méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN.

6-1-3) Enrichissement de régions méthylées par affinité

L'ADN est coupé en morceau par sonication ou par une enzyme de restriction retrouvée régulièrement dans le génome étudié. Il est ensuite immunoprécipité par un anticorps dirigé contre la méthylation (MeDIP), ou encore par un anticorps dirigé contre une protéine à forte affinité avec la méthylation (MBD : methyl-binding domain) (Jin et al., 2010). La différence entre l'utilisation de l'anticorps anti-5mC et l'anticorps anti-MBD est que dans le premier cas, l'ADN est simple brin et dans le second, l'ADN reste double brin. Les régions enrichies sont donc un peu différentes selon la méthode utilisée : avec MBD, on enrichit mieux en îlot CpG alors qu'avec la 5mC, l'enrichissement vise plutôt les régions génomiques avec une densité faible en CpG. Ces anticorps sont souvent couplés à des billes pour une récupération plus facile des complexes. L'enrichissement ne demande pas un ADN de haute qualité. Les méthodes d'hybridation sur des puces ou encore directement le séquençage nouvelle génération (NGS) sont ensuite appliqués. L'utilisation de cette méthode permet de faire la différence entre méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN.

Les techniques décrites ci-dessous sont représentées dans un schéma (figure 28) avec comme critère le nombre d'échantillons et de CpG analysables ainsi que le coût d'une manipulation pour un échantillon.

6-2) Méthode d'analyse globale

Ces techniques permettent d'estimer la méthylation globale sur de l'ADNg, sans avoir connaissance des positions de méthylation sur le génome étudié ; par exemple pour étudier la variation de la méthylation d'un groupe expérimental à l'autre.

6-2-1) HPLC ou Chromatographie liquide haute performance

L'ADN est hydrolysé base à base et déposé sur la colonne de chromatographie liquide haute performance capable de séparer les C des 5mC. Les fractions passées dans la colonne sont mesurées par Ultra-violet, le ratio 5mC/C est calculé pour chaque échantillon testé et comparé à ceux des échantillons contrôles. Les avantages de cette technique sont une détection à la base près, utilisable pour n'importe quelle espèce animale et une différenciation de la 5mC avec la 5hmC. L'utilisation d'un ADN de mauvaise qualité est possible. Les inconvénients sont d'avoir un équipement très spécialisé et une consommation d'ADN importante (3-10µg).

6-2-2) Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

La technique de chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem est une approche très sensible qui demande peu d'ADN hydrolysé (50-100ng). Deux approches de séparation des nucléotides sont appliquées : celle en chromatographie en phase liquide, puis celle en spectrométrie de masse. Ceci permet de distinguer chacune des bases et même de faire la différence entre cytosine méthylée et cytosine non méthylée. C'est une méthode sensible puisqu'elle détecte une différence entre échantillons de 0,25%, le taux de cytosines méthylées totales étant d'environ 5%. La qualité de l'ADN n'affecte pas les résultats puisqu'il est hydrolysé. Il est possible de différencier la 5mC de la 5hmC. Cependant l'équipement nécessaire, la mise en place de la technique et l'exploitation des résultats ne sont pas très répandues.

6-2-3) ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

C'est une technique qui permet de détecter la méthylation de l'ADN par l'intermédiaire de l'anticorps spécifique anti-5mC. La réaction est le plus souvent révélée par un anticorps secondaire couplé à une enzyme qui catalyse une réaction colorée au contact de son substrat. A l'aide d'une gamme de calibration, la méthylation peut être dosée dans les échantillons. Cette méthode est surtout disponible sous forme de kit prêt à l'emploi. L'avantage est que l'anticorps est spécifique uniquement de la 5mC et ne reconnaît pas la

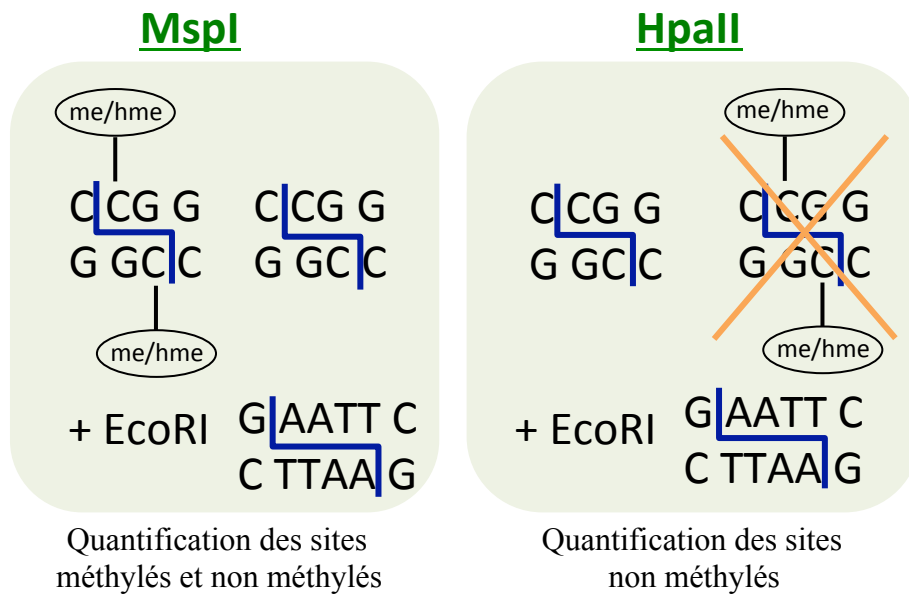


Figure 29 : LUMA (LUMinometric Methylation assay) Deux mélanges réactionnels sont préparés: un avec les enzymes MspI et EcoRI et un autre avec les enzymes HpaII et EcoRI. MspI et HpaII sont des enzymes isoschyzomères. MspI digère tous les sites de restriction alors que HpaII digère uniquement lorsque l'ADN au niveau du site de restriction n'est pas méthylé. Après 4 heures de digestion, les bouts cohésifs générés vont servir de matrice pour le pyroséquencage.

5hmC. C'est aussi une technique facile et rapide à mettre en œuvre sans matériel ou machine particulière avec une consommation d'ADN faible (50ng) et applicable pour toutes les espèces. L'inconvénient est qu'il y a une grande variabilité des valeurs biologiques mais aussi duplicats techniques. Elle sert donc uniquement à avoir une estimation de la quantité de méthylation de l'ADN.

6-2-4) LUMA (LUMinometric Methylation Assay)

Le LUMA est une technique qui utilise 2 enzymes isoschysomères (ayant le même site de restriction, site C/CGG), une méthyl-sensible (HpaII) et l'autre digérant les sites méthylés et non méthylés (MspI) (**figure 29**; [Karimi et al., 2006](#)). Après la génération des bouts cohésifs, ils servent de matrices pour le pyroséquençage. Le rapport des valeurs de pyroséquençage HpaII et MspI donne une valeur de non méthylation, et il est possible ainsi d'avoir la valeur de méthylation dans un échantillon. Cette technique utilise beaucoup d'ADN (1-2µg) de bonne qualité. Il faut avoir accès à un pyroséquenceur pour pouvoir effectuer cette technique. Cependant, le LUMA est une technique très reproductible, fiable et robuste.

6-3) Méthodes d'analyse pangénomique

Ces techniques permettent d'avoir la position de la méthylation sur le génome entier, et ainsi de repérer des régions plus ou moins méthylées selon le groupe expérimental étudié ([Laird, 2010](#); [Yong et al., 2016](#)).

6-3-1) RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing)

L'ADN est traité par une endonucléase de restriction MspI (site C/CGG), digérant tous ces sites de restriction, quelque soit l'état de méthylation. Des adaptateurs sont ligés de part et d'autres de chaque fragment. Les fragments sont ensuite sélectionnés en fonction de leur taille, afin d'enrichir en séquence riche en CpG, éliminant les séquences pauvres en CpG (grande taille de fragment) et les séquences répétées (petites tailles de fragments). Les fragments sélectionnés sont traités au bisulfite de sodium, amplifiés par PCR et séquencés par NGS ([Gu et al., 2011](#)). C'est une technique lourde à mettre en œuvre (réactifs de construction de la bibliothèque de séquence et NGS) avec un ADN qui doit être de bonne qualité et une analyse bioinformatique difficile. Par contre elle utilise une quantité raisonnable d'ADN (100-200ng), avec une bonne couverture des CpG d'intérêt.

6-3-2) Identification des régions immunoprécipitées

Après MeDIP, les régions immunoprécipitées peuvent être identifiées par différentes techniques. L'immuno-précipitat marqué par un fluorochrome (vert) mélangé à l'ADN soniqué, non enrichi (input), marqué avec un autre fluorochrome (rouge) peuvent être hybridés sur une puce recouverte de sondes ADN (micro-array) couvrant des régions d'intérêt. La couleur des spots permet de connaître le degré de méthylation sur une région d'ADN donnée. Pour certaines espèces comme l'homme et la souris, il existe des puces commerciales. Si l'on travaille sur une autre espèce, il faut une grande préparation avec le dessin des sondes sur des régions intéressantes au niveau de la méthylation de l'ADN. L'immunoprécipitat peut être directement séquencé par NGS et aligné sur le génome de référence. Beaucoup de kits commerciaux sont maintenant disponibles. L'analyse des données est conséquente et la précipitation n'est pas forcément effectuée lorsqu'il y a qu'un seul CpG dans une région donnée.

6-3-3) Bisulfite- Séquençage

Tout d'abord, l'ADN dénaturé subit un traitement au bisulfite de sodium qui remplace les C non méthylées en U. Puis le génome entier traité au bisulfite de sodium est séquencé par les techniques de séquençage nouvelle génération (NGS). En alignant les séquences lues sur un génome de référence traité au bisulfite de sodium *in silico*, il est possible de retrouver à la base près les cytosines méthylées et leur emplacement dans le génome avec une quantité d'ADN raisonnable (50 à 100ng). En revanche l'alignement avec le génome de référence est rendu plus difficile car après le traitement au bisulfite de sodium, les C sont très minoritaires et par conséquent le génome ne possède plus que 3 bases au lieu de 4. C'est une technique qui est difficile à analyser, avec une grande quantité de données.

6-3-4) Bisulfite-Infinium

L'ADN préalablement traité au bisulfite de sodium et amplifié par PCR est déposé sur une puce. Cette puce, développée par la société Illumina, contient des sondes permettant de faire la distinction entre CpG méthylée et CpG non méthylée. La puce couvre près de 450 000 CpG individuels, ce qui représente une très bonne couverture des CpG totaux du génome humain. Cette méthode utilise entre 500ng et 1µg d'ADN, est difficile à analyser, avec une grande quantité de données et est utilisable uniquement chez l'homme.

6-4) Méthode d'analyse gène candidat

Ces techniques permettent d'étudier la méthylation de l'ADN sur un gène candidat spécifique. Souvent le gène choisi est sélectionné par l'utilisation d'une ou plusieurs techniques évoquées précédemment.

6-4-1) Bisulfite/Pyroséquencage

L'ADN est préalablement traité au bisulfite de sodium. Sur une région d'intérêt, une amorce est dessinée pour démarrer de séquençage. Chaque nucléotide est injecté dans un ordre précis, l'incorporation en face de la matrice génère de la lumière quantifiable. Il est donc possible de quantifier des cytosines méthylées avec une sensibilité de 5% de méthylation, sur une séquence précise. C'est une technologie adaptée aux faibles rendements avec un séquençage d'environ 100pb, qui ne fait pas la différence entre méthylation et hydroxyméthylation. Il faut aussi avoir accès à un pyroséquenceur. Par contre la lecture de ces séquences est facile à faire, avec une analyse quantitative au CpG près.

6-4-2) Bisulfite puis PCR et clonage/séquencage

L'ADN est préalablement traité au bisulfite de sodium puis amplifié par PCR sur une région d'intérêt. Les amplicons sont clonés dans des plasmides et amplifiés dans des bactéries. Chaque clone peut être séquencé. Cette méthode était très populaire car plus facile d'accès. Très utilisé avant l'utilisation du NGS, elle tend à disparaître. Elle est utilisée sur des régions qui ne fonctionnent pas avec le pyroséquenceur (par exemple des séquences répétées). C'est une méthode précise avec beaucoup de CpG analysés sur une seule lecture mais lourde en terme de nombre de clones bactériens à analyser pour un résultat valide.

6-4-3) PCR classique ou quantitative

Les 3 méthodes de traitement de l'ADN évoquées en début de chapitre : utilisation d'endonucléase de restriction (Epimark kit, New England Biolabs), traitement au bisulfite de sodium (suivi, après PCR, d'un NGS ou Sanger) et enrichissement des régions méthylées peuvent être suivies d'une PCR classique ou quantitative. Une séquence d'ADN est donc ciblée par le dessin d'amorces spécifiques et le traitement préalable de l'ADNg permet de déterminer la méthylation de l'ADN dans l'encadrement des amorces : soit directement dans la région d'intérêt à amplifier, soit au niveau des amorces spécifiques et/ou au niveau d'une sonde taqman sur l'amplicon ([Hernández et al., 2013](#)). Le MS-HRM ou Methylation-Sensitive High Resolution Melting est une technique utilisant le traitement de l'ADN au bisulfite

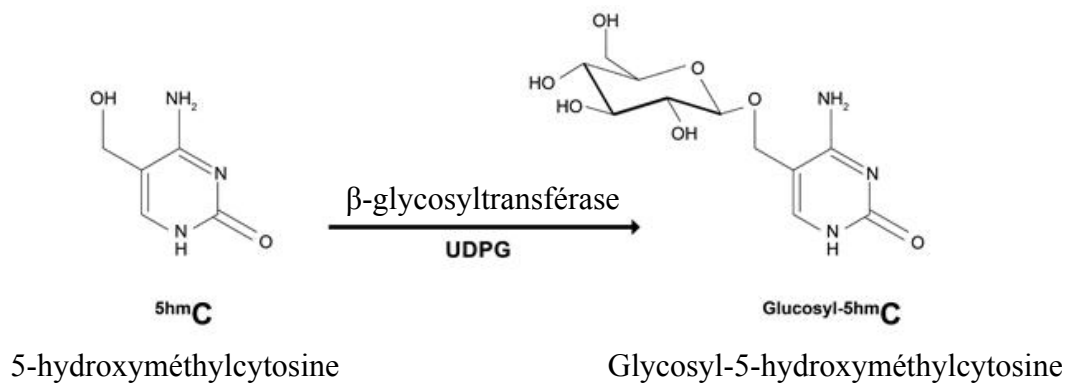


Figure 30 : Réaction spécifique de glycosylation de la 5-hydroxyméthylcytosine de l'ADN. La β -glycosyltransférase transfère le groupement glucide apporté par l'uridine diphosphate glucose (UDPG) sur le groupement hydroxy de la 5-hydroxyméthylcytosine.

sodium. La proportion de bases modifiées va faire varier la courbe de dissociation des amplicons et sera un reflet de la proportion de la méthylation initiale. Il est nécessaire de mettre en place une gamme étalon obtenue par un mélange de séquences plus ou moins méthylées connu. Par cette méthode le niveau moyen de méthylation de la région analysée est déterminé sans avoir une analyse au CpG près. La méthode utilisant la PCR/PCRq est facile et rapide à mettre en œuvre.

Toutes ces techniques évoquées ont leurs avantages et leurs inconvénients et conviennent ou pas selon la problématique posée au départ par le projet de recherche.

6-5) Analyse de l'hydroxyméthylation de l'ADN : quelles possibilités ?

Certaines techniques utilisées pour l'étude de la méthylation sont bien spécifiques de cette marque et peuvent être utilisées pour l'étude de l'hydroxyméthylation de l'ADN.

6-5-1) Méthodes développées pour l'analyse de la méthylation

La technique de chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse permet de faire la différence entre les 5mC et les 5hmC.

La méthode ELISA peut être utilisée en prenant comme anticorps primaire un anticorps anti-5hmC. Les avantages et les inconvénients sont les mêmes que pour l'utilisation de l'anticorps anti-5mC.

Comme la technique d'ELISA le MeDIP peut être adapté en utilisant comme anticorps immunoprécipiteur, un anticorps anti-5hmC.

Les autres techniques ne différenciant pas ces 2 marques, des méthodes ont été développées pour que cela soit possible.

6-5-2) Glycosylation de l'ADN

L'ADN est glycosylé au niveau des 5hmC en présence d'uridine diphosphate glucose (UDPG) et d'une β -glycosyltransférase par transfert d'un glucide au niveau du groupement hydroxy de la cytosine (**figure 30**). L'utilisation d'endonucléase de restriction après ce traitement est appliquée : Elles ont leurs sites sur un CpG et sont non méthyl-sensibles : par exemple MspI (site C/CGG), elles sont glycosyl-sensibles. La PCR classique ou quantitative peut-être utilisée comme méthode gène candidat ([Kinney et al., 2011](#)). On peut aussi faire du NGS, ou imaginer un LUMA adapté pour la détection de la 5hmC.

6-5-3) Oxydation de l'ADN

L'ADN dénaturé est traité avec du perruthénate de potassium (KRuO_4). Les 5hmC s'oxydent et deviennent des 5fC (5-formylcytosine). Ce traitement peut être suivi d'un traitement au bisulfite de sodium, les 5fC étant insensible à ce traitement ([Booth et al., 2012](#)). Il est possible alors de séquencer par NGS (analyse pangénomique) ou par pyroséquençage (gène candidat). L'ADN subit 2 traitements chimiques lourds qui impactent sa qualité pour le séquençage.

L'étude de la méthylation de l'ADN recouvre un large éventail de techniques qui apportent des renseignements plus ou moins quantitatifs, de manière globale ou au CpG près, avec une sélection des séquences d'intérêt à l'aide de différents critères ou sans aucune sélection. Le choix de la méthode est décidé par la question posée, le nombre d'échantillons à traiter et les moyens financiers pour effectuer les analyses.

7) Objectifs du projet

Comme nous l'avons vu, le trophoblaste est issu de la première différenciation cellulaire. Après le stade blastocyste, le trophoblaste se tapisse progressivement de mésoderme primitif et subit une élongation spécifique des ruminants. Après l'implantation, le trophoblaste évolue en chorion, en villosités chorioniques ou cotylédons et en amnios. Tous ces tissus issus du même lignage évoluent-ils de la même manière en terme de méthylation de l'ADN ?

Nous avons aussi évoqué que le clonage par transfert de noyau somatique pouvait être un modèle de perturbations (plus ou moins importantes) de la reprogrammation épigénétique. De plus l'efficacité du clonage semble affectée par des altérations de l'unité placentaire conduisant au syndrome du gros veau. Il est donc important d'étudier l'évolution épigénétique du lignage trophoblastique et ses potentielles perturbations induites par la reprogrammation initiale du noyau somatique.

Au cours de ce travail, nous tenterons de répondre à 2 questions fondamentales :

- Quel est le devenir épigénétique du lignage trophoblastique au cours de la gestation chez le bovin ?
- Quel est l'effet de la reprogrammation épigénétique et plus particulièrement l'effet de la reprogrammation de la méthylation de l'ADN sur les tissus extra-embryonnaires des clones bovins ?

Pour répondre à ces questions, nous avons choisi d'analyser la méthylation de l'ADN comme marque épigénétique majeure. Nous avons disposé d'une collection d'échantillons de différents tissus extra-embryonnaires (trophoblaste, chorion, cotylédon, amnios et allantoïde) et fœtaux (foie, cœur, muscle, cerveau) bovins prélevés à différents stades de la gestation (18, 40, 60 jours de gestation), obtenue après IA (contrôle) ou après clonage.

Afin d'évaluer la méthylation globale de l'ADN pour environ 400 échantillons, nous avons mis en place la technique du LUMA (LUMinometric Methylation Assay), bien que celle-ci ne discrimine pas méthylation et hydroxyméthylation. Nous avons aussi recherché la proportion entre la méthylation et l'hydroxyméthylation de l'ADN en utilisant la technique ELISA.

Enfin nous avons complété notre étude par l'analyse de l'expression des gènes codant pour les protéines responsables de la mise en place, du maintien et de l'effacement de la méthylation à savoir les gènes *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Tet1*, *Tet2*, et *Tet3*.

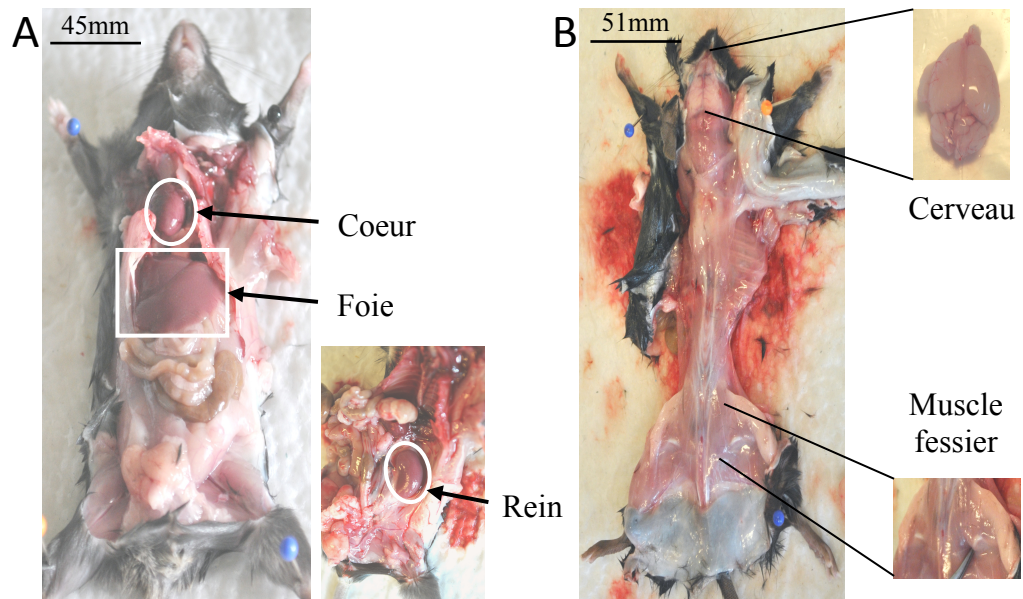


Figure 31 : Dissection d'une souris C57B6, A) de face B) de dos. Localisation de tous les organes collectés pour les analyses : cœur, foie, reins, cerveau et muscle fessier.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1) Animaux et collection de tissus

1-1) Cohortes analysées

1-1-1) Cohorte souris

Elle est composée de souris mâles ayant seulement servis à la reproduction dans un projet de l'équipe et devant être euthanasiées : 8 souris mâles entre 17,5 et 19 semaines et 5 à 29 semaines. Le foie, le cœur, les muscles, les reins, le cerveau et le cervelet ont été systématiquement prélevés (**figure 31**) afin de tester les nouveaux protocoles de dosage de la méthylation et l'hydroxyméthylation de l'ADN mis au point laboratoire et de comparer les données avec celles de la bibliographie ([Globisch D. et al, 2010](#)).

1-1-2) Cohorte bovine

Elle est issue du projet EpigRAni (Projet ANR = épigénétique des animaux de rente). Ce projet vise à caractériser les différences phénotypiques reliées à des variations épigénétiques chez la vache, issues du clonage et donc génétiquement identique.

La saisine n° 12/160/21/12/2012 a ainsi été rédigée et validée par le COMETHEA (comité d'éthique appliqué à l'expérimentation animale).

Les 235 vaches porteuses de ce protocole sont de race Holstein. Les fœtus sont obtenus soit par insémination artificielle (IA) (le taureau « Royaume » a été utilisé pour toutes les IA, les fœtus sont donc tous demi-frères et demi-sœurs, réduisant ainsi la variabilité génétique), soit par clivage embryonnaire au stade morula (jumeaux monozygotes), soit par clonage après transfert d'un noyau de cellule somatique (fibroblaste) de la vache 5538 dans un ovocyte énucléé. Les embryons et leur placenta sont collectés à différents stades de gestation : G18, G40 et G60. L'utilisation d'autant de vaches porteuses s'explique par l'efficacité relativement basse du clonage (15% avec les fibroblastes issus de la vache 5538) et de la gestation gémellaire aux stades étudiés (20%).

Les femelles gravides ont été élevées en groupe, surveillées (état général de l'animal, alimentation et rumination, posture et comportement social avec les autres animaux et les animaliers) et suivies par échographie durant toute la gestation, surtout pour les mères portant des clones qui sont susceptibles de développer des pathologies placentaires (vérification de la taille des placentomes et de la présence d'oedèmes). Lorsqu'une souffrance fœtale et/ou maternelle a été détectée (douleur classée modérée), l'animal gravide a été euthanasié, aucun

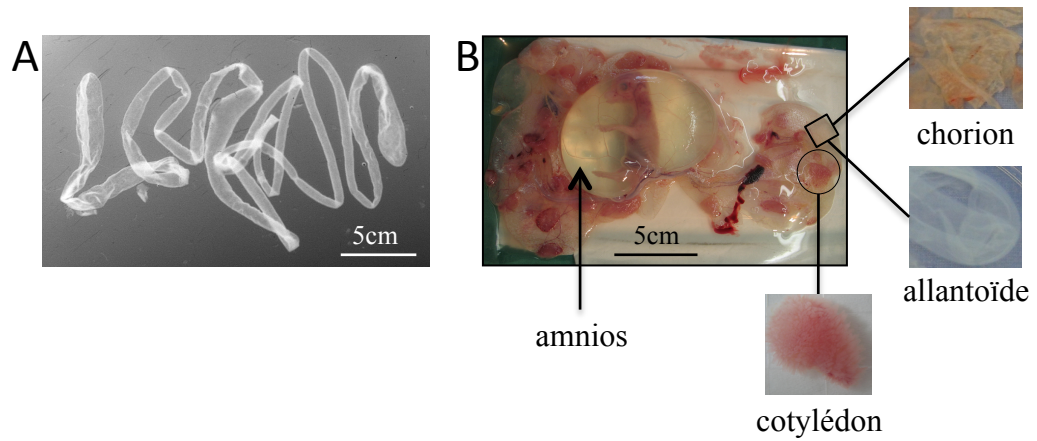


Figure 32 : Embryon de ruminant A) à 18 jours de gestation B) à 60 jours de gestation.
 A 18 jours de gestation, une élévation du trophoblaste est observée, remplissant la corne utérine. A 60 jours de gestation, toutes les annexes embryonnaires telles que l'amnios, l'allantoïde, le chorion lisse et les cotylédons sont mis en place et facilement différenciables.

traitement ne pouvant être administré pour améliorer la santé de la vache porteuse et de son fœtus (point limite).

Pour les prélèvements aux stades de gestation désirés (**figure 32**):

- A G18, les conceptus sont collectés par flushing utérin sans euthanasie de la mère (figure A) et avec réutilisation de celle-ci pour d'autres gestations (réduction du nombre d'animaux utilisés) car l'implantation de l'embryon (G20) n'est pas encore accomplie.
A G21, les femelles subissent un dosage à la progestérone pour vérifier qu'il y a bien une gestation en cours, sinon elles sont réutilisées pour une autre gestation.
- A G40 et G60, les tissus fœtaux, placentaires (figure B) et maternels sont collectés après euthanasie des femelles gravides vérifiées par échographie dans un établissement agréé suivant les règles du bien être animal (étourdissement au moyen d'un matador suivi rapidement d'une exsanguination à l'abattoir de Nouzilly, INRA).

Les règles des 3 R (Réduction du nombre d'animaux dans les protocoles expérimentaux, Raffinement, atteinte du point limite et contrôle de la souffrance animale et Remplacement des modèles expérimentaux par des méthodes alternatives) ont été respectées au maximum dans ce protocole de recherche. Il n'est pas possible dans le cas de notre étude de passer par une méthode alternative de culture cellulaire. Cela n'est réalisable que si l'on étudie les premiers stades de développement, possible en milieu de culture adapté, jusqu'au stade blastocyste.

Les tissus collectés sont soit fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% pour des analyses histologiques soit immédiatement congelés en azote liquide après dissection pour des analyses des acides nucléiques.

2) Extraction de l'ADN génomique et quantification

2-1) Extraction de l'ADN génomique

La méthode classique de l'extraction de l'ADN génomique est basée sur une lyse cellulaire en milieu chaotropique, une dénaturation, dégradation et élimination des protéines et lipides et une élimination des ARN totaux.

Les tissus congelés en azote et conservés à -80°C sont pesés et broyés dans l'azote liquide mécaniquement avec un pilon et un mortier. La poudre fine ainsi formée est solubilisée dans un tampon SLB (Tris HCl 10mM, pH 7,4, SDS 0,2%, NaCl 50mM et EDTA 10mM), à raison de 1mL de tampon pour 100mg de tissus en présence de protéinase K 20µg/µL. Le détergent

(Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)) du tampon SLB permet la dissolution et la solubilisation des lipides des membranes cellulaires et la protéinase K coupe les liaisons peptidiques des protéines. Les tubes sont placés sous agitation toute la nuit à 55°C. Toutes ces étapes permettent une désorganisation du tissu, de la cellule et de son noyau, libérant ainsi l'ADN. La RNase A (10µg/µL) est ajoutée pour couper les ARN et faciliter leur élimination pendant une incubation d'une heure dans un bain marie à 37°C. Un second traitement à la protéinase K (20µg/µL) est effectué 1h 30 min à 42°C. La RNase A est ainsi inactivée et les protéines liées à l'ADN (histones) sont dénaturées.

L'ADNg est ensuite purifié par la méthode au phénol, phénol/chloroforme. Rapidement, 2 phases se forment : la phase supérieure aqueuse, qui contient l'ADNg et la phase inférieure organique qui contient des lipides et des protéines. Une phase intermédiaire est parfois observée et forme un « gâteau protéique ». En fin d'incubation en présence de protéinase K, le phénol est ajouté au tube (vol:vol). Après une agitation douce pendant 1 min et une incubation 15 min dans la glace, les tubes sont centrifugés 5 min à 7500g à 4°C. La phase aqueuse collectée est additionnée d'un volume de phénol/chloroforme (1:1). Le chloroforme permet une meilleure séparation de phase, évitant toute contamination par le phénol de la phase aqueuse. Cette étape est cruciale pour éviter toute inhibition des réactions ultérieures. Après une agitation douce pendant 1 minute, les tubes sont centrifugés 5 min à 10000g à 4°C. La phase aqueuse est de nouveau récupérée.

L'ajout de NaCl 0,8M et d'1 vol d'éthanol 100% permet de précipiter l'ADNg. L'association des sels, stabilisant la structure en double hélice de l'ADN et de l'éthanol, provoque la précipitation de celui-ci sous forme de filaments appelés « méduse ». La « méduse » peut être prélevée à la pipette pasteur, lavée à l'éthanol 70%, séchée puis resuspendue en TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH8). Si la « méduse » est absente de l'échantillon, cela indique une faible concentration en ADNg ou une dégradation : dans ce cas, une nouvelle précipitation est nécessaire en présence de NaCl et d'éthanol (-20°C, toute la nuit). Le culot obtenu après centrifugation est lavé en éthanol 70% séché et resuspendu en TE.

L'intégrité des ADNg est vérifiée par migration électrophorétique de 500ng sur gel d'agarose 0,7% TBE (Tris-Borate EDTA, pH 8,4).

Des contrôles quantité et qualité complémentaires sont effectués par lecture aux spectromètres : Nanodrop et Qubit.

2-2) Quantification de l'ADN

2-2-1) Quantification par l'absorbance

Le Nanodrop2000[®], Thermo Scientific est un spectromètre permettant de quantifier différentes molécules selon leur spectre d'absorbance (de l'ultra-violet jusqu'au visible) avec seulement 1µL d'échantillon. Il permet notamment de doser l'ADN, l'ARN et les protéines.

Les acides nucléiques ont un spectre d'absorbance avec un maximum à 260nm. Cette longueur d'onde est utilisée pour calculer la concentration en acides nucléiques (ADN ou ARN) des échantillons.

La pureté des échantillons est mesurée par une lecture simultanée de l'absorbance à 280nm (correspondant à une absorbance maximale des protéines) et 230nm (à celle des composés phénoliques et glucidiques, guanidine, glycogène, sels, ...). L'évaluation de la pureté se fait en calculant différents ratios : A_{260nm}/A_{280nm} et A_{260nm}/A_{230nm} . Le premier permet de mesurer la contamination protéique et le second la contamination par le phénol, la guanidine, le glycogène, les sels, ... Pour un échantillon pur, le ratio A_{260nm}/A_{280nm} doit être compris entre 1,8 et 2, et le ratio A_{260nm}/A_{230nm} d'environ 2,2. Pour des valeurs de ratio inférieures à 1,8, nous considérons que l'échantillon est contaminé et une nouvelle extraction est préconisée.

Le Nanodrop ne fait pas la distinction entre des nucléotides libres et les nucléotides liés. Afin de ne pas tenir compte dans nos mesures de l'ADN dégradé (sous forme de nucléotides libres), nous effectuons aussi des mesures par la technologie du Qubit[®].

2-2-2) Quantification par la fluorescence

L'utilisation du Qubit[®] 2.0, Life Technologies et du kit « Qubit[®] ds BR Assay » permet de mesurer précisément la quantité d'ADN de notre échantillon en utilisant un intercalant fluorescent spécifique du double brin d'ADN (ne dose donc que les molécules d'ADN intègres). La fluorescence est mesurée au fluorimètre Qubit[®], et la quantité d'ADN déterminée de par l'utilisation de 2 standards fournis par le kit.

Les échantillons sont dilués en eau dans 10µL de volume total en respectant les bornes de quantité imposées par le kit (entre 2 et 1000ng) soit environ 100ng dans des tubes adaptés pour la lecture au Qubit[®] 2.0. Les 2 standards sont aussi préparés (10µL) dans ces tubes spéciaux. En parallèle, une solution de travail est réalisée extemporanément : le « Qubit[™] Reagent » contenant le marqueur fluorescent est dilué au 200^{ème} dans un « Qubit[™] Buffer ». La solution de travail (190µL) est distribuée dans les tubes contenant l'ADN (échantillons ou standards) dans un volume final de 200µL. Les tubes sont vortexés 3 secondes et incubés 2

Tableau 1 : Amorces utilisées pour le sexage des embryons bovins à 18 jours de gestation par amplification PCR (F= Forward : amorce Sens; R=Reverse: amorce Antisens)

Gène	numéro d'accession	chromosome	séquence (5'→3')	Amplicon (pb)	intron/exon	référence
<i>Sry</i>	ENSBTAG00000047779	Chr Y	F : TGCCAGGACGTATTGAGGGG	329	int1-ex1	
			R : CTGGCTGCTCTCCCTAACAT			
<i>Décorine</i>	ENSBTAG00000003505	Chr 5	F : TGCAAGTTCATCTCTACTGAACC	538	int2-ex2-int3	
			R : AGGTGGCACTGTCTCTCACA			

min à température ambiante. La calibration est obtenue par lecture des 2 standards. A chaque lecture d'échantillon, la concentration en ADN double brin est directement calculée.

Pour toutes nos manipulations ultérieures de l'ADN, c'est la concentration mesurée au Qubit qui est utilisée.

3) Sexage des fœtus par amplification Polymerase Chain Reaction (PCR) du gène *SRY*

Le sexe des fœtus à G18 ne peut pas être déterminé à partir du phénotype, les gonades n'étant pas encore différenciées (G35). Le sexage est alors réalisé par la recherche d'un gène situé sur le chromosome Y, le gène *SRY*, spécifique des mâles par amplification par PCR à partir d'ADNg. Le gène codant pour la Décorine, situé sur un chromosome autosomal est utilisé comme contrôle de la matrice d'ADNg.

Le mélange réactionnel contient de l'ADNg (200ng), de la Taq Platinum® (Life Technologies) 2U, du MgCl₂ 1mM, des dNTP 0,3mM, des amorces sens et antisens *SRY* 0,4μM et des amorces sens et antisens *Décorine* 0,4μM (**Tableau 1**) dans un volume final de 50μL. Le programme utilisé est le suivant :

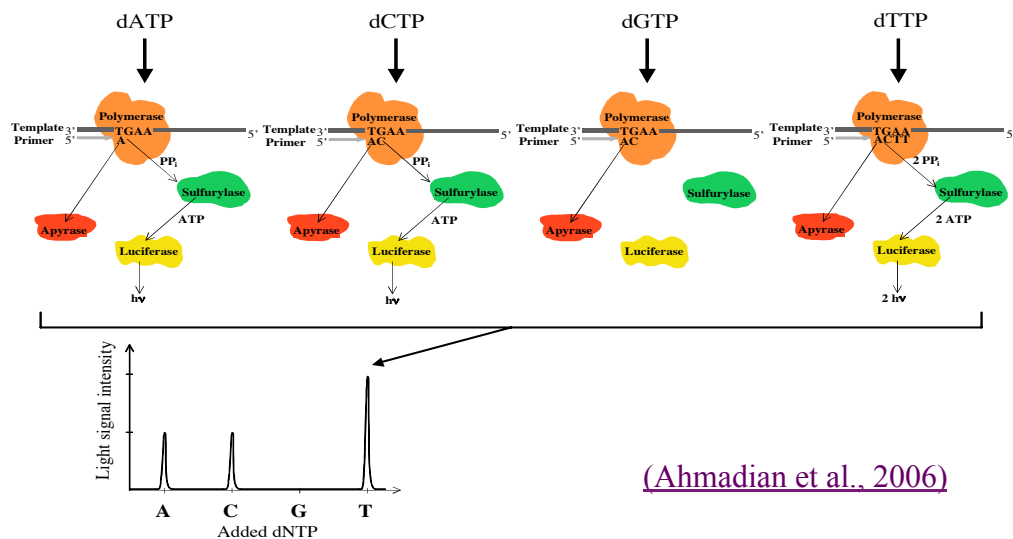
- une dénaturation de l'ADN, 5 min à 95°C
- 40 cycles en 3 étapes i) de dénaturation 30s à 94°C ii) d'hybridation des amorces 30s à 56°C et iii) d'élongation, 30s à 72°C
- une élongation terminale, 10 min à 72°C.

Les amplicons ainsi générés sont analysés par migration électrophorétique sur un gel d'agarose 1% en TBE (Tris borate EDTA). Les ADNg mâles et femelles sont différenciés par le nombre et la taille de bandes générées. Dans ces produits PCR issus des ADNg de mâles, 2 bandes sont attendues, une à 538pb correspondant au gène *SRY* et une à 329pb correspondant au gène *Décorine*, et sans ceux issus de l'ADNg des femelles une seule bande à 329pb correspondant au gène *Décorine* doit être présente.

4) Analyse de la méthylation de l'ADN par LUMA

Le LUMA (LUMinometric Methylation Assay) est une technique quantitative d'analyse de la méthylation globale de l'ADNg d'un échantillon, en s'intéressant plus particulièrement aux sites CCGG. Elle s'effectue en deux étapes :

La première est basée sur la digestion enzymatique de l'ADNg par deux enzymes isoschizomères : MspI coupe sur le site CCGG en générant un bout cohésif quelque soit l'état



(Ahmadian et al., 2006)

Figure 33 : Représentation du système enzymatique du pyroséquençage. A chaque incorporation d'un nucléotide, un pyrophosphate est libéré et transformé en ATP par la sulfurylase. La luciférase utilise cet ATP pour le transformer en lumière quantifiable par le pyroséquençeur. A chaque fin de cycle d'injection, l'apyrase dégrade les nucléotides non incorporés.

de méthylation de l'ADNg alors que HpaII coupe sur le même site mais est inhibée par la méthylation de l'ADN (incluant la 5mC et la 5hmC ; **Figure 28**). Le LUMA quantifie la méthylation sur les sites CCGG (souvent contenus dans des régions riches en CG, régions répétées ou îlots CpG). Une digestion par EcoRI sert de témoin interne pour chaque échantillon digéré ([Attig et al., 2013](#); [Karimi et al., 2006](#)).

La seconde étape est une quantification des sites générés en utilisant un pyroséquenceur. Ceci consiste en une néosynthèse par incorporation séquentielle et mesurée de dNTPs, en utilisant les bouts cohésifs générés par clivage enzymatique comme matrice. Cette technique peut être mise en œuvre en routine avec un pyroséquenceur de paillasse.

4-1) Digestion enzymatique

Cinq cent nanogrammes d'ADN sont digérés avec, dans un tube, HpaII+EcoRI (7,5U chacun, New England Biolabs) et dans un autre tube MspI+EcoRI (7,5U chacun, New England Biolabs) dans un volume final de 30 µL, dans un tampon CutSmart® (New England Biolabs). Les tubes sont incubés 4h à 37°C et conservés à -20°C. Chaque digestion est effectuée en duplicat : 4 tubes par échantillon.

Des tests ont été effectués, afin d'optimiser et de valider ce protocole de digestion, en faisant varier la quantité d'ADNg digéré (50, 100, 250 et 500ng) en adaptant la quantité d'enzymes de restriction à la quantité d'ADN à digérer et le temps d'incubation à 37°C (5, 10, 15, 30, 60, 120, 240, 480, et 960 min). La mise au point technique et les données de ces tests sont présentées dans le chapitre « Résultats ».

4-2) Pyroséquençage

Le principe est d'injecter un à un les nucléotides dans un ordre prédéfini (correspondant à la séquence attendue). L'incorporation d'un nucléotide triphosphate (dNTP) libère un pyrophosphate (PPi). Ce pyrophosphate permet de former de l'ATP en présence d'ATP sulfurylase. Cet ATP fournit de l'énergie à la luciférase qui libère de la lumière mesurée par la caméra du pyroséquenceur (Pyromark Q24®, Qiagen) (**figure 33**) ([Ahmadian et al., 2006](#)). L'intensité lumineuse est convertie en valeur numérique et est directement proportionnelle à la quantité de dNTP incorporée. L'excès de dNTP injecté non incorporé est dégradé par l'apyrase. Ce cycle est répété pour chaque nucléotide injecté.

Les extrémités à bout cohésif sont utilisées comme matrice pour une néosynthèse par pyroséquençage. Un **ADNg Contrôle digéré** est utilisé à chaque essai, permettant un suivi inter-essais.

La plaque de pyroséquençage est préparée avec 20µL de tampon « annealing » (Qiagen) et 20µL de produit digéré. Elle est ensuite insérée dans le pyroséquenceur. Le programme contient la séquence « ACTCGAT ». La séquence de nucléotides à injecter est en fait : A, C (qui contient un mélange équimolaire de C et de G), T, de nouveau [C+G], G (qui ne contient que de l'eau), A et T. Cette injection séquentielle permet l'incorporation de A et de T pour les sites générés par le clivage EcoRI, et celle de [C+G] pour les sites générés par le clivage MspI ou HpaII. [C+G] sont injectés en même temps pour combler l'équivalent de deux positions comme dans le cas du site EcoRI avec l'incorporation de AA et TT. Les nucléotides sont injectés de manière séquentielle par 2 fois afin d'assurer une néosynthèse complète sur tous les sites. Les nucléotides issus de la seconde injection sont appelés respectivement A', T' et [C+G]'.

4-3) Mesures, calculs et analyses

Site EcoRI : les valeurs d'incorporation de A, A', T et T' servent de témoin interne pour chaque échantillon (valeurs dépendantes du nombre de sites EcoRI dans le génome considéré). **Le rapport $(A+A')/(T+T')$** mesure l'efficacité de la néosynthèse. Ce rapport doit être un peu supérieur à 1 et correspond à une incorporation équivalente de A et de T, A étant légèrement autofluorescent. **La moyenne $(A+A'+T+T')/4$** signe la quantité de sites EcoRI dans l'ADNg considéré. Cette mesure est appelé ECORI et est normalisatrice pour chaque échantillon.

Sites MspI et HpaII : la moyenne $(CG+(CG)')/2$ signe la quantité totale de sites CCGG coupés par MspI ou par HpaII en fonction de l'état de méthylation d'un échantillon donné. Ces mesures sont appelées MSPI ou HPAII.

Les rapports MspI/EcoRI et HpaII/EcoRI normalisent les valeurs de clivage en fonction de la quantité d'ADNg présente dans chaque tube et sont appelés respectivement MspIn et HpaIIIn.

Le rapport HpaIIIn/MspIn correspond à la proportion d'ADN non méthylé (V_{ADNgmM}).

Le pourcentage de méthylation globale pour un échantillon correspond alors à la valeur :

$$\boxed{1 - V_{ADNgmM} \times 100}$$

5) Méthode de mesure différentielle de la méthylation et de l'hydroxyméthylation de l'ADN

D'après la littérature, l'hydroxyméthylation est surtout présente dans le cerveau

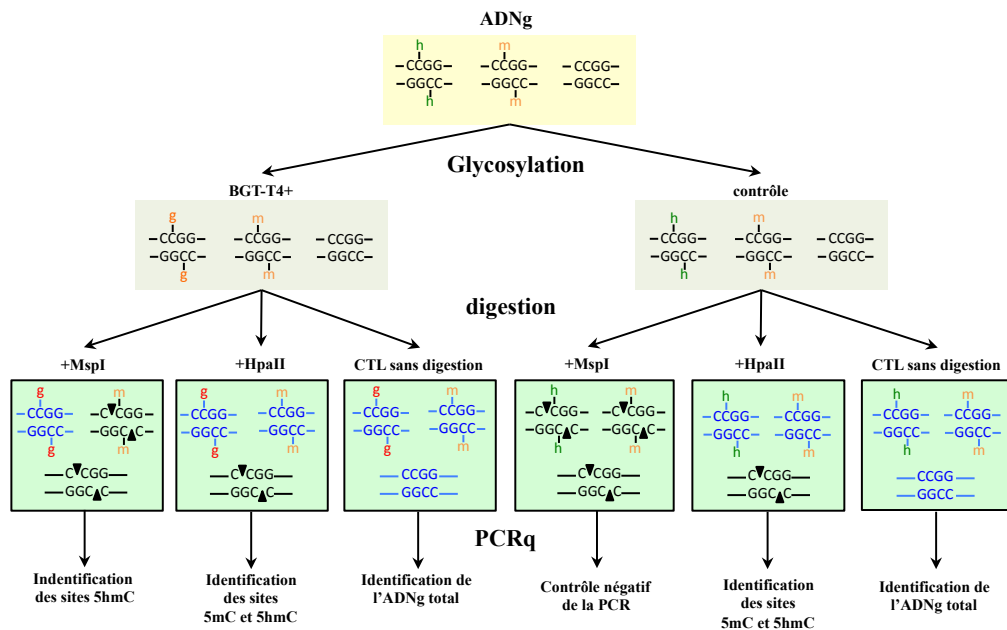


Figure 34 : Mesure de l'hydroxyméthylation de l'ADN par glycosylation, digestion enzymatique et PCR. L'ADNg est glycosylé et seul les C hydroxyméthylées deviennent des C glycosylées. Ensuite l'ADNg est digéré par MspI ou HpaII, MspI étant glycosyl sensible et HpaII glycosyl et méthyl sensible. Avec les différents contrôles : sans glycosylation de l'ADNg et digestion et avec glycosylation sans digestion, une PCR quantitative est effectuée sur une région d'intérêt avec une identification des sites 5mC et 5hmC. L'analyse des données permet comme pour le LUMA de déterminer la méthylation mais aussi l'hydroxyméthylation de l'ADN.

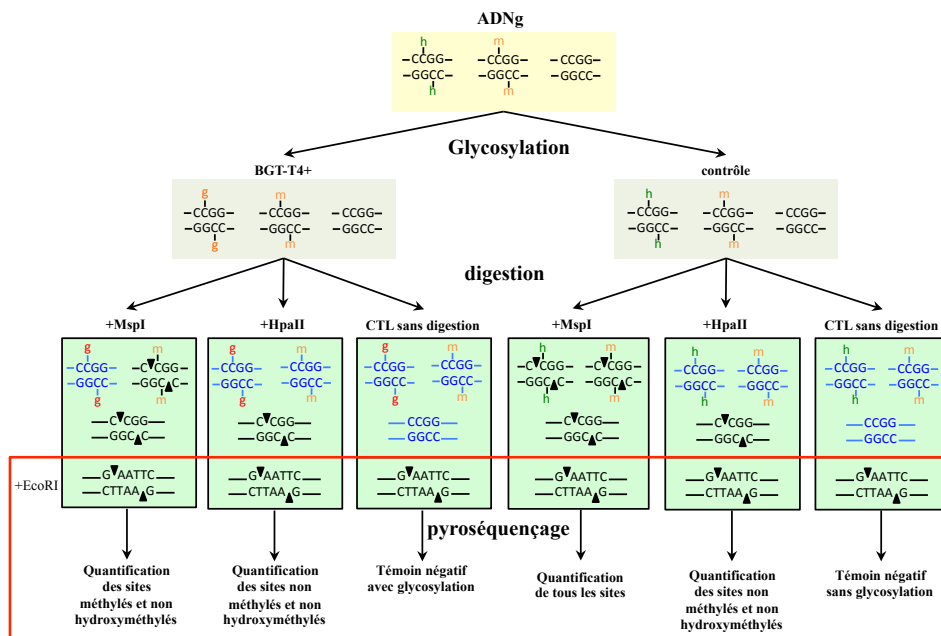


Figure 35 : Mesure de l'hydroxyméthylation de l'ADN par glycosylation, digestion enzymatique et pyroséquence. L'étape de glycosylation ainsi que les différents contrôles sont les mêmes que pour la figure 34. L'étape de digestion est la même avec l'ajout dans chacun des tubes de la digestion EcoRI, servant de normalisateur pour l'étape suivante de pyroséquence.

(Globisch et al., 2010; Kriaucionis et Heintz, 2009) et dans les cellules souches embryonnaires (Tahiliani et al., 2009). Mais dans quelle proportion est-elle présente dans le placenta bovin ? Pour répondre à cette question, nous avons tenté de trouver une méthode en routine pour détecter cette marque épigénétique.

5-1) Principe de la mesure de l'hydroxyméthylation par glycosylation de l'ADN

Cette technique permet de différencier la méthylation et l'hydroxyméthylation de l'ADN (Kinney et al., 2011) selon une propriété chimique particulière. En effet, seul les groupes hydroxyméthylés peuvent être glycosylés en présence de la β -glycosyltransférase du phage T4 (**figure 34**). Après glycosylation, les ADN_g sont digérés par les mêmes enzymes utilisées pour le LUMA : MspI et HpaII. MspI coupe sur le site CCGG en générant un bout cohésif, que la cytosine soit méthylée ou non. Par contre, MspI ne coupe pas si les sites sont glycosylés. HpaII coupe sur le même site mais est inhibée par la méthylation et la glycosylation de l'ADN.

Notre hypothèse de travail était d'utiliser le kit EpimarkTM 5hmC and 5mC analysis (New England Biolabs) afin de générer différentes matrices en fonction des traitements enzymatiques et de les quantifier par pyroséquençage (LUMA adapté).

5-2) Adaptation de la mesure de l'hydroxyméthylation par glycosylation de l'ADN

Le changement intervient tout d'abord par l'ajout d'une digestion par EcoRI (témoin interne) dans chacun des tubes, glycosylés ou non, avec MspI ou HpaII. Les échantillons sont ensuite analysés par pyroséquençage : les bouts cohésifs générés par les différentes digestions servent de matrice au pyroséquenceur (**figure 35**).

Dix microgrammes d'ADN sont glycosylés avec un tampon « NEBuffer 4 » 1X et de l'Uridine DiPhosphate Glucose 80 μ M dans un volume final de 310 μ L. Le mélange est divisé dans 2 tubes de 155 μ L chacun et 30U de β -glycosyltransférase du phage T4 (BGT-T4) est ajouté dans l'un (BGT-T4+) et remplacé par de l'eau dans l'autre (contrôle). Les 2 tubes sont incubés à 37°C pendant 15 à 18h. Le lendemain, Chacun des tubes est divisé en 3 tubes PCR (47,5 μ L de chacun des mix) pour les différentes digestions : MspI+EcoRI et HpaII+EcoRI (100U pour chacune des enzymes, New England Biolabs), dans un volume final de 50 μ L. Les tubes sont incubés 4h à 37°C et conservés à -20°C. Les échantillons sont passés au pyroséquençage comme pour le protocole du LUMA.

Un problème a tout de suite été rencontré : aucune incorporation de nucléotide n'a été enregistrée par le pyroséquenceur, que cela soit pour les matrices générées par EcoRI ou celles générées par MspII/HpaII. Ne sachant pas quelle étape posait problème : la digestion ou le pyroséquençage, nous avons fait différents contrôles. Une migration de différents échantillons d'ADNg test glycosylés et digérés (cerveau, muscle et foie bovin) a été effectuée. De cette façon, nous avons observé que la digestion de chacun des échantillons était réalisée. Il n'y a donc pas d'inhibition massive de la digestion par l'étape de glycosylation. Cependant celle ci peut inhiber la réaction de pyroséquençage. Différents tests de purification des ADN glycosylés avant l'étape de digestion ont donc été effectués :

- précipitation NaCl/éthanol,
- purification par extraction phénol/chloroforme dans un système « phase lock gel light »,
- utilisation de 2 kits de purification commerciaux : « DNeasy Blood and tissue », Qiagen et « Wizard DNA clean up », Proméga.

Après purification, les digestions ont été observées par migration électrophorétique sur gel. L'utilisation du kit Qiagen ne permet pas l'obtention d'ADN digéré. Une très forte perte d'ADN est mise en évidence pour les protocoles de précipitation NaCl/éthanol et de purification au phénol/chloroforme. La purification avec le kit proméga paraît convenable.

Un essai au pyroséquençage est donc effectué. La digestion enzymatique fonctionne pour les 3 enzymes mais les résultats de pourcentage de méthylation globale sans glycosylation ne correspondent pas aux résultats trouvés en LUMA. Ceci suggère un impact important de l'étape de purification sur les résultats de méthylation et d'hydroxyméthylation de l'ADN, ce qui rend cette technique peu fiable et probablement non reproductible.

5-3) Quantification de la méthylation et de l'hydroxyméthylation de l'ADN par la méthode ELISA

La quantification de la méthylation et l'hydroxyméthylation s'effectue grâce à 2 kits (Epigentek) distincts basés sur le même principe de reconnaissance de la 5mC ou de la 5hmC par un anticorps spécifique. En présence d'ADN, l'anticorps se fixe sur la marque (5mC ou 5hmC). Un anticorps secondaire couplé à une enzyme peroxydase permet une lecture colorimétrique et donc une quantification de chacune des 2 marques.

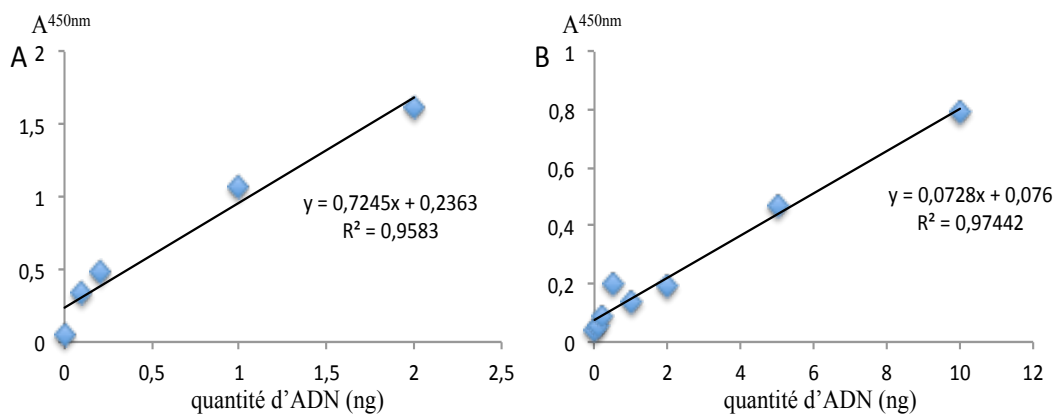


Figure 36 : Partie linéaire de la gamme A) 5mC et B) 5hmC du kit ELISA. Tous les échantillons ont une absorbance dans la partie linéaire de cette gamme. On peut ainsi grâce à la valeur de la pente et l'absorbance à 450nm de chacun des échantillons déterminer leur pourcentage de méthylation ou d'hydroxyméthylation

5-3-1) Méthode

Tout d'abord, les ADNg sont préparés à 10ng/μL en eau ou en TE. Quatre vingt microlitres de solution de fixation sont distribués dans les plaques issues des kits MethylflashTM Methylated/Hydroxymethylated Quantification. L'ADNg est ensuite déposé en duplicat : 25 ou 50ng pour la détection de la méthylation et 80ng pour celle de l'hydroxyméthylation. Pour chaque test une gamme est ajoutée (0,1 - 0,2 - 0,5 - 1 - 2 - 5 et 10ng dilué en eau ou en TE), ainsi que 3 témoins négatifs : un avec de l'eau ou du TE, un avec des polynucléotides non méthylés et non hydroxyméthylés et un avec des polynucléotides à 10ng hydroxyméthylé pour le kit méthylation ou méthylé pour le kit hydroxyméthylation. La plaque est incubée 1h 30 min à 37°C afin que l'ADNg soit dénaturé et fixé au fond des puits. La solution de fixation est éliminée de la plaque et les puits sont lavés 3 fois avec 150μL de tampon de lavage 1X fourni par le kit. Cinquante microlitres d'anticorps de capture (anti-5mC ou anti-5hmC selon le kit utilisé, 1ng/μL dilué en tampon de lavage 1X) sont distribués et incubés 1h à température ambiante. L'anticorps de capture est éliminé de la plaque et les puits sont lavés 3 fois avec 150μL de tampon de lavage 1X. Cinquante microlitres d'anticorps de détection (200ng/mL pour le kit méthylation, 400ng/mL pour le kit hydroxyméthylation, dilués en tampon de lavage 1X) sont distribués et incubés 30 min à température ambiante et à l'obscurité. L'anticorps de détection est éliminé de la plaque et les puits sont lavés 4 fois avec 150μL de tampon de lavage 1X. Cinquante microlitres solution « Enhancer » 1/5000 dilués en tampon de lavage 1X sont distribués et incubés 30 min à température ambiante et à l'obscurité. L'« Enhancer » est éliminé de la plaque et les puits sont lavés 5 fois avec 150μL de tampon de lavage 1X. Cent microlitres de solution « Développeur » sont distribués et incubés entre 6 et 10 min pour le kit méthylation et 10 min pour le kit hydroxyméthylation, à température ambiante et à l'obscurité : les puits deviennent bleu. Cent microlitres de « Stop solution » sont distribués et incubés 2 min à température ambiante et à l'obscurité : les puits deviennent jaunes. L'absorbance est détectée à 450nm avec un spectromètre EnSpire® de PerkinElmer.

5-3-2) Mesures, calculs et analyses

Toutes les mesures sont récupérées et la moyenne des absorbances est calculée. La gamme est tracée : absorbance à 450 nm en fonction de la quantité d'ADN déposé dans la plaque (**figure 36**).

Seule la partie linéaire de la courbe est exploitée sachant que les échantillons se situent bien à cet endroit de la courbe uniquement. La pente de cette droite est déterminée pour chacune des

plaques effectuées et est utilisée pour le calcul du pourcentage de méthylation et d'hydroxyméthylation. La quantité absolue de 5mC pour chacun des échantillons peut ainsi être calculée :

$$Qté_{5mC \text{ (ou } 5hmC)} \text{ (ng)} = \frac{A^{450}_{éch} - A^{450}_{CN}}{\text{pente} \times 2^* \text{ (ou } 5^*)}$$

$A^{450}_{éch}$ = Absorbance détectée à 450nm de l'échantillon

A^{450}_{CN} = Absorbance détectée à 450nm du contrôle négatif

* = facteur de normalisation rendant compte du polynucléotide utilisé pour la gamme : le polynucléotide méthylé contient 50% de cytosines méthylées (x2) pour le dosage de la méthylation et le polynucléotide hydroxyméthylé contient 20% de cytosines hydroxyméthylées (x5) pour le dosage de l'hydroxyméthylation.

Le pourcentage de méthylation ou d'hydroxyméthylation est calculé :

$$\%5mC \text{ (ou } \%5hmC) = \frac{Qté_{5mC \text{ (ou } 5hmC)}}{Qté_{ADN}} \times 100$$

$Qté_{ADN}$ = Quantité d'ADN (ng) déposée sur la plaque, 25 ou 50ng pour le dosage de la méthylation et 80ng pour le dosage de l'hydroxyméthylation.

Pour compléter l'étude des marques épigénétiques dans nos tissus d'intérêts, nous avons mené une analyse de l'expression des gènes codant les protéines responsables de l'apposition et du maintien de la méthylation (DNMT) et celles responsables de l'oxydation de la méthylation en hydroxyméthylation (TET).

6) Quantification de l'expression des gènes codant les protéines responsables de la méthylation et l'hydroxyméthylation de l'ADN

6-1) Extraction des ARN totaux

L'ARN total est extrait selon la méthode de Chomczynski et Sacchi ([Chomczynski et Sacchi, 1987](#)) basée sur une lyse cellulaire, une dénaturation, une dégradation et une élimination des protéines, des lipides et de l'ADN en phénol acide.

Un millilitre de TRIzol® (Life Technologies) contenant du thiocyanate de guanidinium (dénaturant protéique) et du phénol, à pH 5 est déposé sur les tissus congelés en azote et conservés à -80°C. Avec un système de billes et d'agitateur, les tissus sont broyés mécaniquement, 2min à 20Hz, 2 fois, ou plus si nécessaire. Une centrifugation de 2 min à 1000g est effectuée afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et incubé

5 min à température ambiante permettant une complète dissociation des complexes nucléoprotéiques. Deux cent microlitres de chloroforme sont déposés dans le surnageant et chaque tube est vortexé 15s. Après une incubation de 2 min à température ambiante, les tubes sont centrifugés 15 min à 12000g, à 4°C. La phase aqueuse supérieure est récupérée et mélangée à 500µL d'isopropanol 100%. Après une agitation douce des tubes et une incubation de 10 min à température ambiante, ils sont centrifugés 10 min à 12000g à 4°C. Le surnageant est éliminé (contenant l'ADN) pour ne garder que le culot d'ARN. Celui ci est lavé dans 1mL d'éthanol 75% froid, puis les tubes sont centrifugés 5 min à 7500g à 4°C. Le surnageant est à nouveau éliminé et le culot est séché et resuspendu en eau nucléase free. L'ajout d'une étape de congélation, décongélation à -80°C permet une meilleure resuspension de l'ARN. Des contrôles quantité et qualité sont effectués par lecture au Nanodrop et l'intégrité des ARN est vérifiée par migration de 250-300ng sur un gel d'agarose 0,7% TBE (Tris Borate EDTA).

Afin d'éliminer d'éventuelles contaminations d'ADN et de phénol pouvant interférer dans les manipulations ultérieures, les ARN sont traités à la DNase et purifiés sur une colonne de silice.

6-2) Traitement à la Dnase et purification des ARN totaux

Les ARN totaux sont purifiés par chromatographie d'adsorption sur colonne de silice par le kit_ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System, Proméga. En effet, les acides nucléiques ont de l'affinité pour la silice dans un environnement liquide à force ionique élevée (agent chaotrope). Les acides nucléiques piégés par la silice, sont traités à la DNase qui dégrade l'ADN, éliminé par un lavage. Les ARN totaux purs sont élués en eau.

L'ARN (10µg) est mélangé au tampon « LBA+TG » (thiocyanate de guanidinium 4M, 1-thioglycérol 2% et Tris 0,01M pH 7,5), dans 250µL de volume total. Après une homogénéisation douce, 85µL d'isopropanol sont ajoutés, suivi d'une nouvelle homogénéisation. Les 335µL du mélange sont déposés sur une colonne de silice et centrifugés 1min à 14000g. La phase liquide est ainsi éliminée de la colonne. Cinq cent microlitres de tampon «RNA Wash Solution» (acétate de potassium 60mM, éthanol 60% et Tris-HCl 10mM pH 7,5) sont déposés sur la colonne puis centrifugés 30s à 14000g. Le liquide passé dans la colonne est éliminé. Trente microlitres de solution de DNase (24µL de tampon « Yellow Core » (NaCl 1,125M, yellow dye 0,0025% et Tris 22,5mM pH 7,5), 3µL de MnCl₂ 90mM et 3µL de DNase I) sont déposés sur la colonne, dégradant ainsi d'éventuels ADN contaminants. Le tout est incubé 15 min entre 25 et 30°C. Deux cent microlitres de tampon « Column Wash

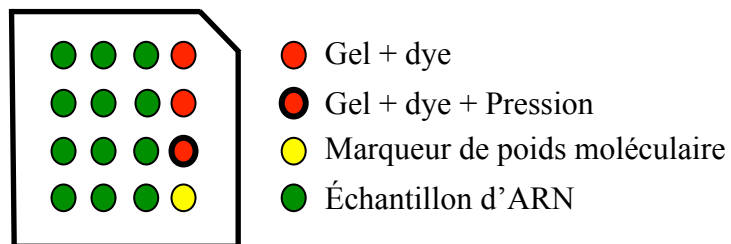


Figure 37 : Distribution des réactifs dans la puce ARN Nano, Agilent. Le puit du gel + dye suivie de la pression par la seringue en rouge gras, les puits du gel + dye en rouge, le puit du marqueur de poids moléculaire en jaune et les puits des 12 échantillons d'ARN en vert.

Solution » (contient de l'éthanol 56%) sont déposés sur la colonne puis centrifugés 30s à 14000g. Le tube collecteur et le liquide passé dans la colonne sont éliminés. Cinq cent microlitres de tampon « Column Wash Solution » sont déposés sur la colonne puis centrifugés 30s à 14000g. Le tube collecteur et le liquide passé dans la colonne sont éliminés. Afin d'éliminer toutes traces d'éthanol, les colonnes ouvertes sont centrifugées 2 min à 14000g. Les colonnes sont transférées dans des tubes 1,5mL et 50µL d'eau y sont ajoutés pour éluer l'ARN, après incubation 5 min à température ambiante et centrifugation 1 min à 8000g. Des ARN totaux purs sont ainsi obtenus.

L'intégrité et la quantité des ARN sont vérifiées, tout d'abord avec le Nanodrop, puis sur gel d'agarose 1,5% en TBE, et enfin en utilisant la technologie des puces du Bioanalyseur 2100, Agilent technologies.

6-3) Contrôle qualité des ARN totaux purifiés sur le Bioanalyseur 2100

Les ARN dénaturés sont migrés sur un gel miniaturisé (puce « nano », agilent) en présence d'un intercalant d'acides nucléiques fluorescents (dye). Les ARN migrent en fonction de leur taille et leur fluorescence est détectée par le laser du Bioanalyseur 2100 qui excite les molécules fluorescentes par un rayonnement UV. Un profil de migration électrophorétique est reconstitué en fonction de leur temps de rétention sur le gel. Par comparaison avec la migration de marqueurs de poids moléculaire standardisés inclus dans le kit, il est possible de vérifier l'intégrité des ARN. Leur quantité est mesurée en fonction de l'intensité de fluorescence détectée.

La centrifugation du gel (550µL) est effectuée pendant 10 min à 1500g. Un microlitre de dye est ajouté à 65µL de gel filtré. Le mélange est vortexé et centrifugé 10 min à 13000g. Les ARN sont incubés 2 min à 70°C, puis conservés dans la glace afin de les garder dénaturés. La puce « ARN Nano » est préparée (**figure 37**) dans la station d'amorçage.

Du gel + dye (9µL) est déposé dans le puits rouge gras, la station d'amorçage est fermée et une pression est appliquée à l'aide d'une seringue. La station d'amorçage est ouverte et 9µL de gel + dye sont déposés dans les 2 autres puits rouges. Un marqueur interne (5µL) est distribué dans les 13 autres puits (puits verts et puits jaune), 1µL de marqueur de poids moléculaire dans le puits jaune et 1µL de chacun des échantillons d'ARN dénaturés dans les puits verts. La puce est vortexée 1 min à 2400 tour/min pour une bonne homogénéisation des produits et une élimination des bulles d'air. Elle est ensuite placée dans le Bioanalyseur 2100 et la migration est lancée avec le type d'analyse désiré (ARN total, eucaryote en puce nano).

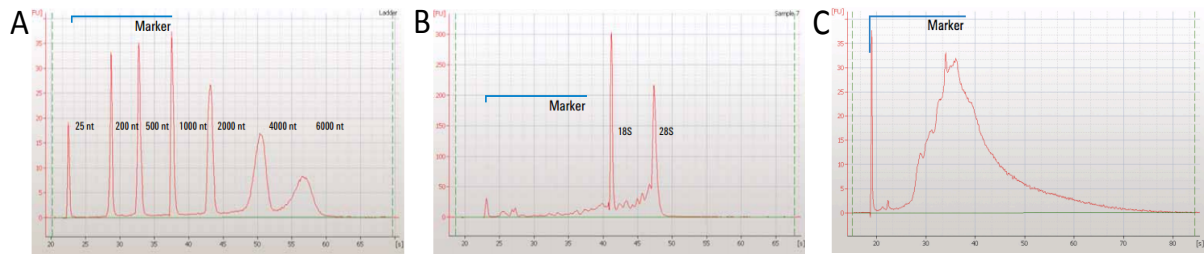


Figure 38 : Electrophorégrammes A) du marqueur de poids moléculaire, B) d'un ARN intègre et C) d'un ARN dégradé. Le marqueur de poids moléculaire permet de repérer les pics correspondant aux sous unités des ARN ribosomiques 5S, 18S et 28S. Le ratio entre sous unités 18S et 28S ainsi que l'absence de trace en comète (smear) permet de qualifier l'ARN : ARN intègre ou dégradé.

Les électrophorégrammes apparaissent au fur et à mesure de la migration de chacun des échantillons (**figure 38**).

Les électrophorégrammes correspondent à l'intensité de fluorescence mesurée au cours du temps, c'est à dire en fonction de la taille des fragments nucléotidiques, du plus petit au plus grand.

Le profil du marqueur de poids moléculaire (**figure 38 A**) est important car c'est lui qui détermine la taille des fragments nucléotidiques de chaque échantillon et c'est aussi le témoin fonctionnel de la puce. Le marqueur interne, présent dans tous les échantillons y compris dans le marqueur de poids moléculaire et donnant un pic à 25nt, permet d'aligner les échantillons au marqueur de poids moléculaire et ainsi de déterminer la taille des différents fragments nucléotidiques. Sur un profil classique d'ARN (**figure 38 B**), 2 pics se distinguent et correspondent aux ARN ribosomiques 18S et 28S. Le bioanalyseur permet d'obtenir la concentration en ARN dans chacun des échantillons. Le logiciel de l'appareil calcule automatiquement un critère de qualité appelé « RNA Integrity Number ». Ce RIN prend en compte le ratio 28S/18S (doit être autour de 2) mais aussi d'autres éléments comme le petit pic de l'ARN ribosomique 5S et les différentes régions de l'électrophorégramme. La valeur de RIN est comprise entre 1 et 10 : 1 correspondant à un ARN totalement dégradé (**figure 38 C**) et 10 à un ARN d'une qualité parfaite. Nous considérons que les ARN avec un $RIN \geq 7$ présentent l'intégrité requise pour l'obtention de résultats fiables d'expression.

6-4) RT-PCR quantitative

Chaque étape de cette technique est bien connue, décrite ([Peynot et al., 2015](#)) et régie par des règles qu'il faut respecter pour une bonne exploitation des résultats de l'expression des gènes d'intérêt ([\(Bustin et al., 2009\)](#) MIQE). Une reverse transcriptase transcrit l'ARNm en ADNc à l'aide d'oligo dT, et l'ADNc sert de matrice pour une PCR quantitative en Sybr green.

6-4-1) Reverse transcription (RT)

La RT permet de transcrire l'ARN en ADNc. Avec l'utilisation d'oligo dT comme amorce de transcription, seuls les ARN messagers possédant une queue polyA pourront être rétro transcrits. On obtient ainsi en fin de réaction un double brin ARNm/ADN.

Un premier mélange réactionnel est effectué avec 1µg d'ARN (bioanalyseur), des oligo dT (500ng) et des dNTP 10mM dans un volume final de 13µL. Après vortex et micro-centrifugation, le mélange est incubé 5 min à 65°C pour dénaturer l'ARN et directement

Tableau 2 : Amorces utilisées pour la PCR quantitative (F= Forward : amorce Sens; R=Reverse: amorce Antisens)

Gène	numéro d'accension	chromosome	séquence (5'→3')	Amplicon (pb)	exon	référence
<i>Sdha</i>	NM_174178	Chr 20	F : GCAGAACCTGATGCTTTGTG R : CGTAGGAGAGCGTGTGCTT	185	14-15	Guillomot and al., 2014
<i>Rpl19</i>	NM_001040516.1	Chr 19	F : CCCCAATGAGACCAATGAAATC R : CAGCCCATCTTTGATCAGCTT	73	1-2	Guillomot and al., 2014
<i>Hprt1</i>	ENSBTAT00000019547	Chr X	F : TGCTGAGGATTTGGAGAAGG R : CAACAGGTCGGCAAAGAAGT	154	2-3	
<i>Eif2b2</i>	ENSBTAT00000011424	Chr 10	F : CAAGCTTTCCCCACAGTTTCCCAA R : GGGACGTAGTCAAACACGGGGC	135	6-7-8	
<i>Dnmt1</i>	ENSBTAT00000003549	Chr 7	F : TGACTCCACCTACGAAGACC R : TCTCTACTTGCTCCACCACG	128	19-20	Golding and al, 2011
<i>Dnmt3a</i>	ENSBTAT00000032936	Chr 11	F : CAACGGAGAAGCCTAAGGTCAA R : TTGAGGCTCCACAAAGAGATG	121	12-13-14	Golding and al, 2011
<i>Dnmt3b</i>	ENSBTAT00000005094	Chr 13	F : AGTATCAGGATGGGAAGGAGTTTG R : CCAGGAGAAACCTTGATCTTTC	68	5-6	Golding and al, 2011
<i>Dnmt3l</i>	XM_010801670.1	Chr 1	F : TCGATTCTGGAGACTGACC R : TCCTGAGCCAGTAGGGAGAG	150	12-13-14	
<i>Dnmt3l</i>	XM_010801670.1	Chr 1	F : ACTGACCCGGTGACCATC R : CTCTTCACAGCGGGGATGTT	86	13	
<i>Dnmt3l</i>	XM_010801670.1	Chr 1	F : CACGTGTGGAGCAACATCC R : GGACACCAGAGCCGAGTG	54	13-14	
<i>Tet1</i>	ENSBTAT00000010614	Chr 28	F : TGCGCAACCTGAAATAAAAA R : ACGGGGTTGGTGAGTAGCTT	86	11	
<i>Tet2</i>	ENSBTAT00000023517	Chr 6	F : TGGCACCAACGTACAAGAAA R : GCACTCTGGTGCTCTGTGT	77	9-10	
<i>Tet3</i>	ENSBTAT00000047352	Chr 11	F : TCACCTCTTAAGTACCTGGACACA R : GGCCAGATCCCAGATGAGTATAA	148	1-2	

transféré à 0°C pour garder l'état dénaturé et permettre aux enzymes et aux oligo dT d'accéder aux ARNm. Un second mélange réactionnel contenant une reverse transcriptase 8U/μL (Superscript II, life technologies), de la Rnase Out 1,6U/μL, du DTT 10mM, du MgCl₂ 2mM et un tampon 1X (Tris HCl 50mM, KCl 75mM, MgCl₂ 3mM, pH 8,3) est distribué dans la plaque, (conservée dans la glace) avec dans chaque puits un volume final de 25μL. La reverse transcriptase synthétise le brin complémentaire des ARNm grâce à l'incubation de 50 min à 42°C. Afin d'inactiver les différentes enzymes du milieu réactionnel, une incubation de 15 min à 70°C est effectuée. Ces 2 incubations sont faites successivement sur un thermocycleur. Un double brin ARNm/ADN est synthétisé et prêt à être utilisé comme matrice. Pour chaque échantillons :

- 2 réactions de rétro-transcription indépendantes sont réalisées et mélangées pour les analyses de PCR quantitative.
- un contrôle en absence de reverse transcriptase (RT-) est effectué afin de s'assurer de l'absence d'ADNg contaminant, par amplification PCR.

6-4-2) Dessin des amorces

Les amorces sont dessinées à partir de la séquence nucléotidique du gène à quantifier. Ces séquences sont recherchées dans différentes bases de données nucléotidiques (NCBI et Ensembl). Le choix des amorces est fait par l'intermédiaire du logiciel « Primer3 ». Nous appliquons les règles suivantes : choix de la zone à amplifier dans la partie 3' du gène, taille comprise entre 50 et 200pb, positionnée en général à cheval entre 2 exons, une taille d'amorces d'environ 20 bases et une température de fusion de 60°C (**tableau 2**).

Toutes ces consignes de choix des amorces permettent d'amplifier correctement le gène à quantifier, sans interférence avec l'ADNg résiduel, la technique de PCR quantitative étant très sensible ([Peynot et al., 2015](#)). Toutes les amorces sont préalablement testées soit sur un mélange d'ADNc (*Dnmt*), soit sur une matrice spécialement générée (*Tet*).

6-4-3) Mise en place d'un test d'efficacité des amorces pour les gènes *Tet*

Dans la littérature, l'hydroxyméthylation de l'ADN est considérée comme une marque en faible proportion, sauf dans le cerveau ([Globisch et al., 2010](#); [Kriaucionis et Heintz, 2009](#)) et dans les cellules souches embryonnaires([Tahiliani et al., 2009](#)). Il est donc logique de penser que l'expression des *Tet* est en faible proportion dans nos tissus étudiés. Il a donc été

Tableau 3 : Amorces utilisées pour la fabrication de matrices par PCR (F= Forward : amorce Sens; R=Reverse: amorce Antisens)

Gène	numéro d'accession	chromosome	séquence (5'→3')	Amplicon (pb)	exon	Taq utilisée	MgCl2	enhancer	Tm
<i>Tet1</i>	ENSBTAT00000010614	Chr 28	F : GCTGCTGTCAGGGAAATCAT R : CTTCCCAGAACGAGGAACAG	912	4-10				
<i>Tet1</i>	ENSBTAT00000010614	Chr 28	F : GAAGATGCACGCTCAATGAA R : AGTGGGGATTGCTTCCTCTT	975	6-11				
<i>Tet1</i>	ENSBTAT00000010614	Chr 28	F : TGCGCAACCTGAAATAAAAA R : ACGGGGTTGGTGAGTAGCTT	86	11	Taq platinum	1,5mM		58°C
<i>Tet2</i>	ENSBTAT00000023517	Chr 6	F : TGGTTGTTCATGGAGCATGT R : ATTGGTGGATCCAGACGAAG	889	8-12	Taq platinum	1,5mM		57°C
<i>Tet3</i>	ENSBTAT00000047352	Chr 11	F : CTCAGTGGCTTCCTGGAGTC R : GTGCACCCGTTGTAGAGGTT	881	1-7	Taq BioAmp tampon B1	1,5mM	2X	55°C
<i>Tet3</i>	ENSBTAT00000047352	Chr 11	F : CTCGGAGACACCCTCTACCA R : CACTGTGTTGCCGCTGTACT	894	4-9	Taq BioAmp tampon B1	1,5mM	2X	57°C

décidé de générer différentes matrices *Tet* afin de vérifier l'efficacité des amorces dans de bonnes conditions, indépendantes du taux d'expression.

Des matrices d'environ 1kb ont été amplifiées pour chacune des *Tets* (**tableau 3**). Pour avoir les bonnes matrices en quantité suffisante, les conditions de PCR sont testées : concentration en $MgCl_2$, température d'hybridation des amorces sur la matrice (T_m) et différentes Taq polymérases.

Les amplifications sont tout d'abord testées avec la Taq Platinum[®] (Life Technologies) 10U, dans du tampon 1X avec des dNTP 200 μ M, du $MgCl_2$ 1,5 – 2 ou 2,5mM, des amorces sens et antisens 800nM et 1 μ L d'ADNc de foie bovin adulte dilué 1/5 dans un volume final de 25 ou 50 μ L. La PCR est réalisée avec le programme suivant :

- une dénaturation de l'ADN 2 min à 95°C
- 35 cycles en 3 étapes i) de dénaturation 45s à 94°C ii) d'hybridation des amorces 30s à T_m (55, 56, 57°C) et iii) d'élongation 1min à 72°C
- une élongation terminale 10 min à 72°C.

Une autre ADN polymérase est testée pour les matrices de *Tet1* et *Tet3* : la HOT BIOAmp[®] (BIOlidal) 1,25U dans du tampon 1X A1(Tris-HCl, KCl) ou B1 (Tris-HCl, $(NH_4)_2SO_4$) avec des dNTP 200 μ M, du $MgCl_2$ 1,5 – 2 ou 2,5mM, des amorces sens et antisens 300nM, avec ou sans enhancer 1 ou 2X (additif qui facilite l'amplification si elle est difficile à réaliser) et 1 μ L d'un mélange d'ADNc de foie bovin adulte dans un volume final de 25 ou 50 μ L. La PCR est réalisée avec le programme suivant :

- une dénaturation de l'ADN 15 min à 95°C
- 35 cycles en 3 étapes i) de dénaturation 1min à 95°C ii) d'hybridation des amorces 1min à T_m (55, 56, 57°C) et iii) d'élongation 1min à 72°C
- une élongation terminale 10 min à 72°C.

La synthèse des matrices pour *Tet1* n'ayant pas aboutie, un autre couple d'amorces est utilisé : l'amplicon étant plus petit, il devrait être plus facile à amplifier. La PCR est effectuée avec la Taq platinum, du $MgCl_2$ à 1,5mM et de l'ADNg de foie bovin à 200ng. La PCR est réalisée avec le programme suivant :

- une dénaturation de l'ADN 1 min à 95°C
- 35 cycles en 3 étapes i) de dénaturation 30s à 95°C ii) d'hybridation des amorces 45s à T_m (55, 56, 57, 58, 59 et 60°C) et iii) d'élongation 30s à 72°C
- une élongation terminale 10 min à 72°C.

Une première vérification des amplifications est faite par migration électrophorétique sur un gel d'agarose 1,5% en TBE.

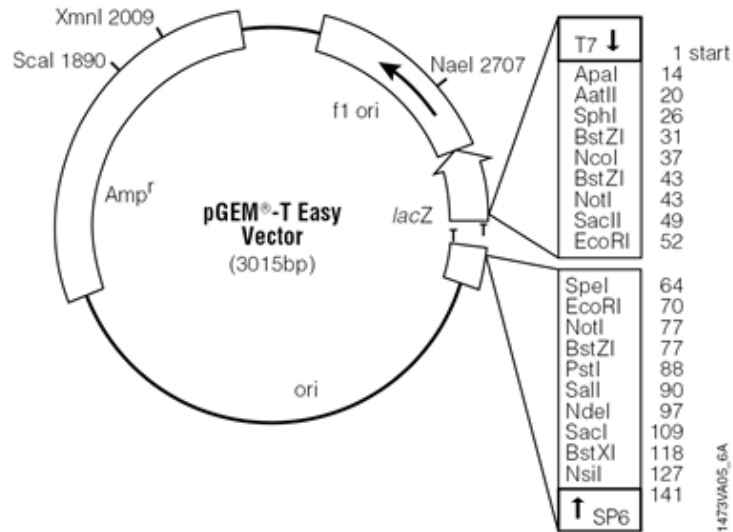


Figure 39 : Représentation du plasmide pGEM®-T-Easy. Ce vecteur contient un site de clonage multiple, avec différents sites de restriction unique et un site de TA cloning, dans le gène *lacZ*, un gène de résistance à l'ampicilline, une origine de réplication bactérienne (*ori*) et eucaryote (*f1 ori*).

Les amplicons sont purifiés avec le kit « Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System » (Proméga). Le principe est de retenir les ADN sur la colonne par chromatographie d'adsorption sur colonne de silice, comme pour la purification des ARN totaux.

Une fois les séquences vérifiées, elles sont intégrées dans un plasmide pGEM®-T-Easy (Proméga) au niveau du site de clonage multiple (MCS) du plasmide (**figure 39**). Les différents amplicons sont insérés dans le vecteur en se servant de la technologie TA cloning à l'aide d'une T4 ligase (Proméga).

Chaque plasmide est ensuite transformé dans des bactéries *Escherichia Coli* DH5α™ compétentes (Life Technologies). Les bactéries correctement transformées possèdent le gène de résistance à l'ampicilline (voir schéma du plasmide) et donc poussent en présence de cet antibiotique. Afin de vérifier que les clones ayant poussés ont bien le plasmide et l'insert d'intérêt, des PCR sur colonies sont réalisées pour rechercher l'insert (15 clones pour chaque matrice), en respectant les conditions de PCR définies pour chaque couple d'amorces (**tableau 2**), dans 50µL de volume final. Une migration sur gel d'agarose 1% en TBE a permis de sélectionner 2 clones pour chacune des matrices. Ils sont ensuite été mis en culture dans 10mL de milieu liquide LB + Ampicilline 100ng/µL à 37°C avec une agitation de 210 tours par min pendant 1 nuit.

Afin de purifier les différents ADN plasmidiques, le kit « SV Miniprep wizard » (Proméga) est utilisé pour lyser modérément les bactéries (le plasmide seul sort de la bactérie) et purifier les plasmides par chromatographie d'adsorption sur colonne de silice.

Pour vérifier l'intégration de nos inserts d'intérêt dans les pGEM-T-easy, ces plasmides sont digérés par EcoRI (**figure 39**) avec contrôle préalable *in silico* de la non présence de ce site de restriction dans les différentes matrices clonées (sur NEBcutter V2.0, New England Biolabs). La taille des inserts sortis du plasmide est vérifiée sur gel d'agarose 1% en TBE. Après avoir validé cette étape, la séquence des plasmides est vérifiée par séquençage de Sanger. Les plasmides pourront servir de matrice pour constituer les gammes afin de valider les couples d'amorces dessinées.

6-4-4) PCR quantitative

L'expression des gènes est mesurée par l'amplification du double brin ARNm/ADN synthétisé par la RT, suivie à chaque cycle par un marqueur fluorescent : le Sybr green. Il se fixe au petit sillon de l'ADN lorsque celui ci est double brin et ne fluoresce que lorsqu'il est lié à l'ADN.

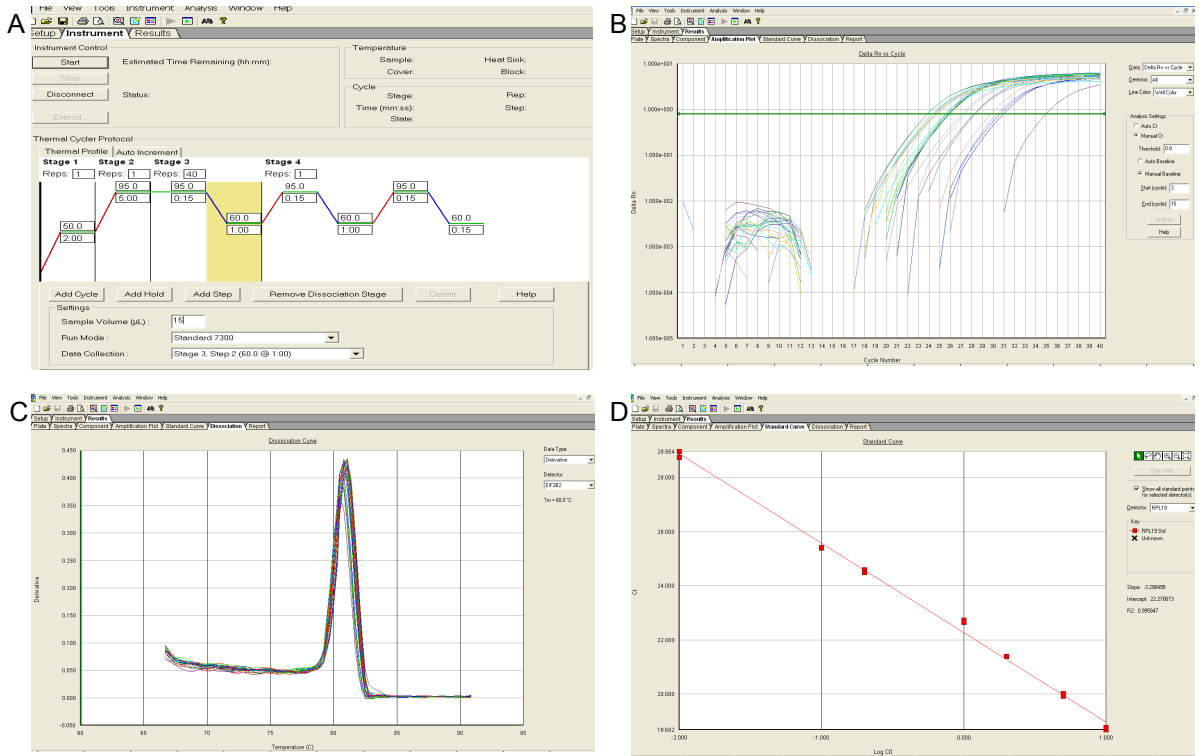


Figure 40 : PCR quantitative : A) programme du thermocycleur, B) courbes d'amplification en temps réel, C) courbes de dissociation d'un amplicon, et D) gamme étalon. La PCRq est lancée sur le thermocycleur 7300 Real-Time PCR System avec le programme A). A la fin des 40 cycles, les courbes d'amplification sont analysées et un seuil de détection est choisi. Les courbes de dissociation sont analysées. L'utilisation d'une gamme étalon permet la détermination de la quantité relative de chaque échantillon.

L'amplification est effectuée dans du « MESA Blue qPCR MasterMix Plus for SYBR[®] assay » 1X (Eurogentec) (dNTP, MgCl₂ 4mM, SYBR[®] Green I, marqueur fluorescent de référence ROX et stabilisateurs), avec des amorces sens et antisens 300nM et 5 µL de RT préalablement dilués dans un volume final de 15µL. La PCRq est réalisée en plaque 96 puits adaptée au thermocycleur utilisé : 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) (**figure 40 A**).

6-4-5) Analyse des résultats bruts

A la fin de la PCRq, les courbes d'amplification sont observées. Elles correspondent à la mesure de la fluorescence émise par le Sybr green, après l'étape d'élongation, en fin de chaque cycle d'amplification. Une sigmoïde est représentée pour chacun des échantillons avec pour commencer une phase « bruit de fond » suivie par une phase exponentielle et se terminant par une phase plateau (**figure 40 A**)

La phase linéaire d'amplification exponentielle est exploitée (**figure 40 B**). On détermine un seuil au centre de cette droite pour lequel il est possible de déterminer la valeur du cycle quantifiable (C_q, appelé aussi C_t pour threshold Cycle ou encore C_p pour Crossing Point) pour l'ensemble des échantillons.

Il est aussi important d'analyser les courbes de dissociation. Elles correspondent à la mesure de la fluorescence au cours d'une augmentation graduelle de la température à la fin de la PCR. La fluorescence diminue progressivement, jusqu'à une température où elle chute brusquement ([Kubista et al., 2006](#)). Cette brusque diminution correspond à la température de fusion de l'amplicon : sous l'action de la chaleur, les 2 brins sont dénaturés et séparés, l'agent intercalant libéré ne fluoresce plus. La dérivée première de l'évolution de la fluorescence en fonction de la température donne ainsi un graphique avec un pic au niveau de la température de fusion de l'amplicon (**figure 40 C**).

Comme cette température de fusion dépend de la nature de l'amplicon (composition en CG, taille), elle est unique pour chaque amplicon. Cette courbe de dissociation fait partie du contrôle qualité de la PCRq car il est possible de détecter les dimères d'amorces, l'évaporation dans certains puits, les problèmes de pipetages et les contaminants. Si la courbe de dissociation n'est pas valide, le point est éliminé de l'analyse.

L'efficacité de la PCR est mesurée grâce à une gamme étalon constituée de 7 points après dilution série : 10 – 5 – 2 – 1 – 0,2 – 0,1 – 0,01 (10 correspond à l'utilisation du mélange d'ADNc dilué au 10^{ème}). Nous utilisons la même gamme dans toutes les plaques quel que soit le gène dosé. La droite standard va représenter les valeurs de C_q obtenues expérimentalement

en fonction du logarithme des quantités relatives issues de la série de dilution. La valeur de Cq est inversement proportionnelle au logarithme de la quantité relative (**figure 40 D**). Le coefficient de détermination r^2 , ou carré du coefficient de corrélation, permet de vérifier la qualité de la régression linéaire formée par les points de gamme. Plus il se rapproche de 1, plus la régression linéaire est bonne. L'équation de la gamme étant : $N_{Cq} = N_0 (1+Ef)^{Cq}$

N_{Cq} : Quantité à Cq cycle N_0 : Quantité initiale Ef : Efficacité de la PCR
Cq : nombre de cycles à la valeur seuil déterminée.

La transformation logarithmique de la gamme donnant la droite étalon s'écrit :

$$\text{Log } N_{Cq} = \text{log } N_0 + Cq \times \text{log } E \quad \text{ou } E = 1+Ef$$

L'équation est arrangée sous la forme $y = ax+b$ de façon à calculer la quantité de matrice en fonction du Cq (y), déterminé expérimentalement :

$$Cq = -\frac{1}{\text{log } E} \text{log } N_0 + \frac{\text{log}(N_{Cq})}{\text{log } E}$$

La pente (p) de la droite calculée s'écrit donc :

$$p = -\frac{1}{\text{log } E}$$

Elle nous permet de calculer l'efficacité de la PCR (Ef) avec le calcul suivant :

$$Ef = (10^{-1/p} - 1) \times 100$$

Les amorces sont considérées comme « efficaces » lorsque la valeur de E est comprise entre 90 et 110%. Pour chaque échantillon, les duplicats techniques sont vérifiés : ils sont refaits si ils ont plus de 0,5 Cq de différence. Grâce à la régression linéaire de la gamme, les quantités relatives des échantillons sont calculées pour chaque gène.

Afin de comparer l'expression d'un gène entre échantillons ou entre groupe d'échantillons il est nécessaire de normaliser la mesure en utilisant des valeurs d'expression de gènes dits de référence.

6-4-6) Sélection des gènes de référence et Normalisation des données

Les gènes de référence sont en général choisis parmi des gènes dits de « ménage ». Ces gènes codent pour les protéines exprimées de manière ubiquitaires et dont l'expression est théoriquement stable quelque soit les conditions d'analyse des échantillons (stades physiologiques, nature du tissu analysé). Pour sélectionner les meilleurs candidats, le logiciel geNorm ([Vandesompele et al., 2002](#)) est utilisé en intégrant les quantités relatives obtenues par dosage de l'expression des gènes de ménage candidats. Il permet de calculer un contrôle

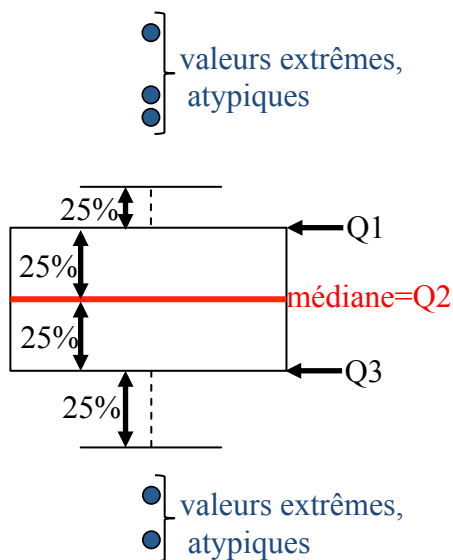


Figure 41 : Paramètres d'une boîte de dispersion. La distribution de l'ensemble des valeurs au sein d'un groupe d'échantillons est divisée en 4 parties égales (25% des valeurs dans chacune des parties). Le corps principal de la boîte contient 50% des échantillons et est délimité par les valeurs de quartiles (Q1 et Q3), Q1 étant la valeur séparant 25% des échantillons en haut et 75% des échantillons en bas et Q3 étant la valeur séparant 75% des échantillons en haut et 25% des échantillons en bas. La médiane (Q2) est un autre quartile qui sépare 50% des échantillons de part et d'autre. Les valeurs adjacentes de la boîte dispersion, appelées les « moustaches » contiennent 25% des échantillons et sont représentées sous la forme d'un trait relié au corps principal de la boîte par des pointillés. Les valeurs extrêmes sortent de la boîte de dispersion et sont qualifiées d'atypiques.

interne de la stabilité du gène, appelé M. Plus M est faible et plus le gène est stable. Si la valeur de M est supérieure à 1,5 alors le gène de ménage n'est pas assez stable pour faire un bon gène de référence. Dans notre étude, 5 gènes de « ménage » ont été testés. Les gènes sélectionnés en fonction de leur coefficient M sont : *Sdha* (complexe succinate déhydrogénase sous unité A, impliqué dans la chaîne respiratoire mitochondriale), *Rplp0* (protéine Ribosomale P0 de la grande sous unité), *Eif2b2* (Facteur d'initiation 2B Eucaryote) et *Hprt1* (hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1, joue un rôle central dans la fabrication de purine). Nous avons pris la précaution de ne pas choisir de gènes en cluster pouvant être corégulés (comme *Rplp0* et *Rpl19*).

Un coefficient de normalisation est calculé pour chacun des échantillons en se servant des 4 gènes de référence sélectionnés. Il correspond à la moyenne géométrique des quantités des 4 gènes de référence par échantillon. Pour un échantillon et un gène précis la quantité relative est calculée en fonction de la gamme, puis divisée par le coefficient de normalisation, ce qui permet d'obtenir la quantité relative normalisée. Les calculs sont effectués sur tous les échantillons et tous les gènes étudiés. Les tests statistiques sont réalisés sur des valeurs de quantité relative normalisée.

7) Statistiques

Les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel R (<http://cran.univ-lyon1.fr>) en utilisant des tests non paramétriques adaptés aux petits nombres d'échantillons. Les comparaisons entre groupes (différents tissus, différents stades et différentes modalités de production des embryons) ont été réalisées avec des tests de permutation pour série indépendante avec tirage de type « Monte Carlo » (100 000 tirages). Tous les résultats sont représentés sous forme de boîte de dispersion (quand $n > 10$ individus dans chaque groupe comparé dans un graphique avec une exception pour la **figure 45**) ou en individualisant les points expérimentaux (quand $n < 10$ individus dans un des groupes comparés dans un graphique) afin de mieux appréhender la variabilité. La médiane est à chaque fois représentée. L'organisation d'une boîte de dispersion est la suivante (**figure 41**).

En effet, elle est découpée en 4 parties égales, avec 25% des échantillons dans chacune de ses parties. Les valeurs délimitant le corps principal de la boîte sont appelées quartiles (Q1, Q2 et Q3). L'écart interquartile (Q1-Q3) correspond l'écart entre les valeurs qui contiennent 50% de la distribution des échantillons. C'est l'un des paramètres qui permet de calculer la longueur des « moustaches » de la boîte de dispersion. Il sert aussi à mesurer la dispersion des échantillons dans un groupe.

Tableau 4 : Utilisation de différentes enzymes de normalisation pour le LUMA

tissus	Normalisateur (norm)	Valeur de norm	moyenne de norm	efficacité (%) (MfeI / EcoRI ou EcoRI HF / EcoRI)	MspI ou HpaII	(MspI ou HpaII) / norm	Hpa/norm / Msp/norm	% méthylation
foie souris	EcoRI	14,40			15,96	2,22		
		14,57	14,49		5,21	0,72	0,32	67,74
	MfeI	11,49			15,98	2,78		
		11,64	11,57	80	4,41	0,76	0,27	72,76
	EcoRI HF	13,19			15,65	2,37		
		15,11	14,15	98	5,61	0,74	0,31	68,71
placenta souris	EcoRI	17,58			19,17	2,18		
		18,24	17,91		10,52	1,15	0,53	47,11
	MfeI	14,33			17,27	2,41		
		13,67	14,00	78	8,25	1,21	0,50	49,92
	EcoRI HF	17,51			18,11	2,07		
		16,13	16,82	94	8,53	1,06	0,51	48,87
foie bovin adulte	EcoRI	15,69			27,11	3,46		
		15,52	15,61		8,07	1,04	0,30	69,91
	MfeI	9,44			25,82	5,47		
		9,98	9,71	62	7,37	1,48	0,27	73,00
	EcoRI HF	14,34			26,53	3,70		
		15,30	14,82	95	8,14	1,06	0,29	71,24
chorion bovin G60 IA	EcoRI	20,37			37,43	3,68		
		18,97	19,67		20,89	2,20	0,60	40,07
	MfeI	10,70			33,43	6,25		
		10,87	10,79	55	20,09	3,70	0,59	40,84
	EcoRI HF	19,05			35,99	3,78		
		20,42	19,74	100	23,73	2,32	0,62	38,49

MspI
HpaII

RÉSULTATS

1) Optimisation de la technique de LUMA : quelques résultats

Au laboratoire, le LUMA était basé sur le protocole développé par Mohsen Karimi en 2006, ([Attig et al., 2013](#); [Karimi et al., 2006](#)) avec comme normalisateur EcoRI. Or d'après la notice de New England Biolabs, EcoRI a une activité diminuée de 50% dans le tampon utilisé (tampon CutSmart, NEB), avec une digestion non spécifique lorsque l'enzyme reste trop longtemps en présence de l'ADNg. De plus, EcoRI est méthyl-sensible ([Lisanti et al., 2013](#)). Ces observations m'ont amené à mettre en place différents tests : validation de EcoRI comme normalisateur, vérification de l'efficacité de digestion de MspI, mesure de la sensibilité et impact de la qualité de l'ADN sur la technique, ainsi qu'une mesure de la variation inter-essai au niveau de l'étape de pyroséquençage.

1-1) Validation du normalisateur EcoRI

L'enzyme EcoRI haute fidélité (HF) a été testée. Elle a une activité de 100% dans le tampon CutSmart et peut être incubée à 37°C toute la nuit sans couper l'ADN non spécifiquement. Nous avons utilisé 4 échantillons d'ADNg différents à 500ng pour ce test : un foie et un placenta de souris ainsi qu'un foie de bovin adulte et un chorion bovin à 60 jours de gestation (**tableau 4**). Le niveau de clivage est mesuré par l'incorporation des différents nucléotides générant de la lumière détectable par la caméra du pyroséquenceur et retranscrit en valeur numérique exploitable. En comparant les valeurs d'incorporation de EcoRI HF avec celles de EcoRI, une différence de 0 à 6% a été observée (colonne efficacité en rouge). Le pourcentage de méthylation calculé varie de 1 à 2% entre l'utilisation de EcoRI et celle de EcoRI HF que ce soit dans les tissus souris ou bovins. Ces faibles différences peuvent être considérées comme négligeables. Nous pouvons en conclure que dans les conditions de digestion effectuées (4h à 37°C), l'enzyme EcoRI est plus efficace que EcoRI HF.

Afin de vérifier que l'utilisation de EcoRI n'introduit pas de biais dans les résultats de méthylation globale, une autre enzyme avec un site similaire à EcoRI (site GAATTC) a été testé : MfeI (site CAATTG), non sensible à la méthylation (**tableau 4**), toujours avec 500ng des 4 échantillons utilisés précédemment. En comparant les valeurs d'incorporation pour les clivages avec MfeI et EcoRI, une différence d'environ 20% a été observée (colonne efficacité en bleu) chez la souris et une différence de 38 à 45% chez le bovin. Le taux de méthylation varie de 3 à 5% chez la souris et de 0 à 3% chez le bovin. Une analyse bioinformatique

Tableau 5 : Comptage des motifs d'intérêt pour la technique du LUMA dans le génome murin et bovin

	Motif	Souris	Bovin
îlots CpG	CG	21 987 274	27 540 367
EcoRI	GAATTC	772 067	895 305
EcoRI potentiellement méthylable	GAATTCG	21 527	21 099
MspI ou HpaII	CCGG	1 639 805	1 987 520
MfeI	CAATTG	522 576	441 307

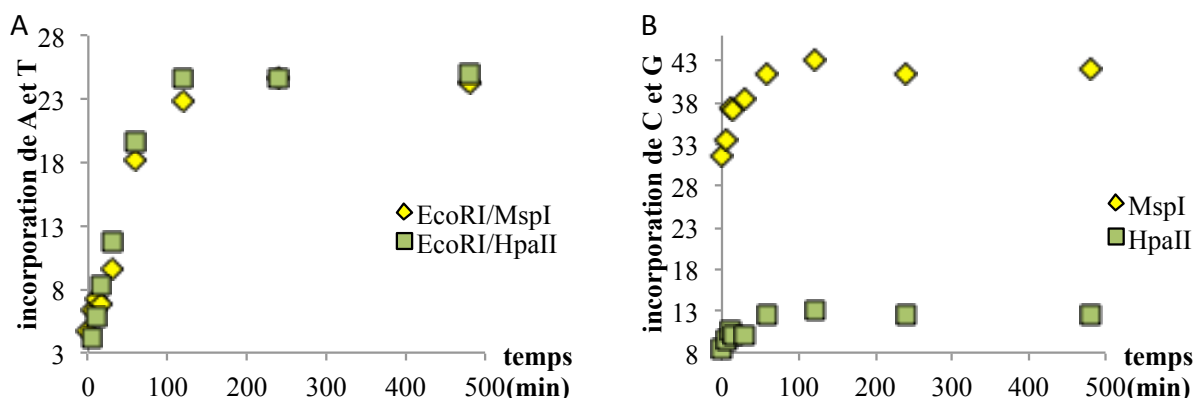


Figure 42 : Cinétique d'incorporation de A et T pour l'enzyme de restriction EcoRI dans le mélange réactionnel MspI (en jaune) ou HpaII (en vert) (A) et de C et G pour les enzymes de restriction MspI (en jaune) et HpaII (en vert) (B). Les cinétiques ont été réalisées en utilisant de l'ADNg de foie bovin adulte. Les 4 courbes sont composées de 2 phases, la phase d'activité maximale de l'enzyme correspondant à la phase linéaire de la cinétique et la phase plateau qui correspond à l'arrêt de l'activité enzymatique, souvent par manque de substrat. A) L'incorporation de A et T au niveau de sites à bouts cohésifs générés par EcoRI varie de 3 à 25 au cours du temps d'incubation à 37°C. La phase plateau est atteinte à 2h d'incubation aussi bien pour EcoRI/MspI que pour EcoRI/HpaII. B) L'incorporation de G et C au niveau des sites à bouts cohésifs générés par MspI ou HpaII varie au cours du temps d'incubation à 37°C de 8 à 13 pour HpaII et de 31 à 43 pour MspI. Les phases plateaux sont atteintes à 1h d'incubation pour HpaII et 2h d'incubation pour MspI.

(Maxime Gasselin, étudiant en thèse) sur les génomes de référence murin (Mus_musculus.GRCm38) et bovin (BTau UMD 3.1) a été effectuée pour connaître le nombre de séquences reconnu par les enzymes de restriction utilisées pour le LUMA dans chacun de ces génomes (**tableau 5**). Ces analyses ont montré que chez la souris il y a 1/3 de moins de sites MfeI (522 576 sites) que de sites EcoRI (772 067 sites) et que chez le bovin il y a environ 2 fois moins de sites MfeI (441 307 sites) que de sites EcoRI (895 305 sites). La diminution du nombre de sites quantifiables par LUMA est donc moins importante chez la souris que chez le bovin. EcoRI est donc plus facilement remplaçable dans le modèle murin que dans le modèle bovin. Chez le bovin, cette diminution induit une perte de sensibilité de la technique. De plus, le pourcentage de sites EcoRI potentiellement méthylable (sites GAATTCG) est de 3% chez la souris (21 527 sites) et de 2,4% chez le bovin (21 099 sites). Dans le cas des analyses de l'ADNg bovins par LUMA, nous avons donc considéré qu'EcoRI pouvait être conservé comme enzyme de normalisation, ayant plus de sites à digérer qu'avec MfeI, un pourcentage méthylation potentiel négligeable et une activité enzymatique à 100% dans nos conditions expérimentales, sans digestion non spécifique.

1-2) Résistance de la digestion par MspI lorsque l'ADN est hydroxyméthylé

D'après un article publié dans le journal « Epigenetics » ([Ichiyanagi, 2012](#)), la digestion par MspI est inhibée lorsque le CpG du site de restriction est hydroxyméthylé. Dans cette publication, des tests de digestion MspI ont été effectués sur un ADN synthétique dont on connaît la composition en C, C méthylée, hémi-méthylée, hydroxyméthylée, hémi-hydroxyméthylée. Il est montré par migration électrophorétique sur gel d'agarose qu'en présence d'ADN hydroxyméthylé, la digestion enzymatique est ralentie, MspI étant en excès dans le milieu réactionnel : elle ne commence qu'à partir d'1h d'incubation (pour tous les autres ADN utilisés porteurs des différentes marques, la digestion démarre immédiatement). Dans le cas des ADNg que nous avons utilisé, la proportion d'ADN hydroxyméthylé devrait être assez faible. Néanmoins, en réalisant des cinétiques de digestion, nous avons voulu vérifier l'efficacité de clivage des enzymes utilisées. Les cinétiques de digestion sont effectuées dans les mêmes conditions au niveau du mélange réactionnel et avec une incubation variable à 37°C : 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min et 480 min (**figure 42**). Le niveau de clivage est mesuré par l'incorporation des différents nucléotides générant de la lumière détectable par la caméra du pyroséquenceur et retranscrit en valeur numérique exploitable.

Tableau 6 : Variation de la concentration d'ADNg avant ou après la digestion par les 3 enzymes de restriction.

	[ADNg]	EcoRI	MspI ou HpaII	(MspI ou HpaII) / EcoRI	HpaII/EcoRI / MspI/EcoRI	% méthylation
test digestion	50ng	0,68	1,25	3,68		
		1,3	0,71	1,09	0,30	70,29
	100ng	3,56	6,14	3,45		
		3,00	1,46	0,97	0,28	71,78
	250ng	8,95	14,43	3,22		
		9	4,24	0,94	0,29	70,78
	500ng	16,05	25,98	3,24		
		15,55	7,49	0,96	0,30	70,24
	50ng	3,59	5,22	2,91		
		3,95	1,57	0,79	0,27	72,66
test pyroséquençage	100ng	7,34	11,84	3,23		
		7,43	3,27	0,88	0,27	72,72
	250ng	11,82	18,82	3,18		
		12,27	5,74	0,94	0,29	70,62
	500ng	16,09	25,47	3,17		
		18,26	8,48	0,93	0,29	70,66

MspI
HpaII

La phase linéaire de digestion démarre dès les 5 premières minutes d'incubation pour toutes les enzymes. La phase plateau est atteinte quand l'enzyme de restriction (en large excès) n'a plus de substrat. Dans notre cas, le substrat est l'ADNg et plus particulièrement les sites de restriction spécifiques à chaque enzyme. Pour EcoRI, (**figure 42 A**), la phase plateau est atteinte entre 2 et 4h de digestion. Que EcoRI soit mise en présence de MspI ou HpaII dans le milieu réactionnel, son activité de digestion reste la même : les 2 cinétiques sont superposées. Pour MspI et HpaII, (**figure 42 B**) la phase plateau est atteinte entre 1h et 2h de digestion. Elle n'évoque donc pas d'inhibition de la digestion de MspI par l'hydroxyméthylation. Dans notre protocole, nous avons choisi un temps de digestion de 4h à 37°C afin d'avoir atteint la phase plateau pour les 3 enzymes et d'obtenir une digestion complète de tous les sites de restriction, quel que soit l'enzyme.

Nous avons toutefois été étonnés de constater l'efficacité de clivage de ces enzymes dès le contact avec l'ADNg et à basse température (l'arrêt des réactions de clivage a nécessité une congélation immédiate dans l'azote liquide après l'étape d'incubation à 37°C). De plus la valeur d'incorporation très élevée de MspI à 0 min nous a intrigué. Le seul paramètre divergent entre les différents milieux réactionnels est que MspI est conservée dans un tampon contenant du KCl 50mM et HpaII, du NaCl 50mM. Aucune explication n'a été trouvée pour traduire ce phénomène, cet effet n'étant pas visible au niveau de l'activité enzymatique d'EcoRI.

Pour l'instant, tous les tests d'optimisation ont été effectués à 500ng d'ADN, quantité importante pour une technique de mesure de la méthylation de l'ADN. Ce paramètre a donc été testé.

1-3) Mesure de la sensibilité du LUMA

Afin d'optimiser la technique du LUMA développée au laboratoire, nous avons mis en place plusieurs tests : un test de sensibilité de la digestion par les enzymes de restriction et un autre de sensibilité du pyroséquençage. Différentes quantités d'ADNg (50, 100, 250 et 500ng) ont été testées, soit en la faisant varier avant la digestion (sensibilité de la digestion), soit après la digestion (sensibilité du pyroséquençage) toujours avec le même ADNg de foie bovin adulte (**tableau 6**).

Pour le test de variation de la quantité d'ADNg avant la digestion, les valeurs d'incorporation du site de EcoRI sont trop faibles pour donner des résultats reproductibles à 50 et 100ng d'ADNg digérés. En revanche à 250 et 500ng d'ADNg, les résultats attendus sont obtenus. Pour chacune des enzymes, l'incorporation des nucléotides au pyroséquençage est validée.

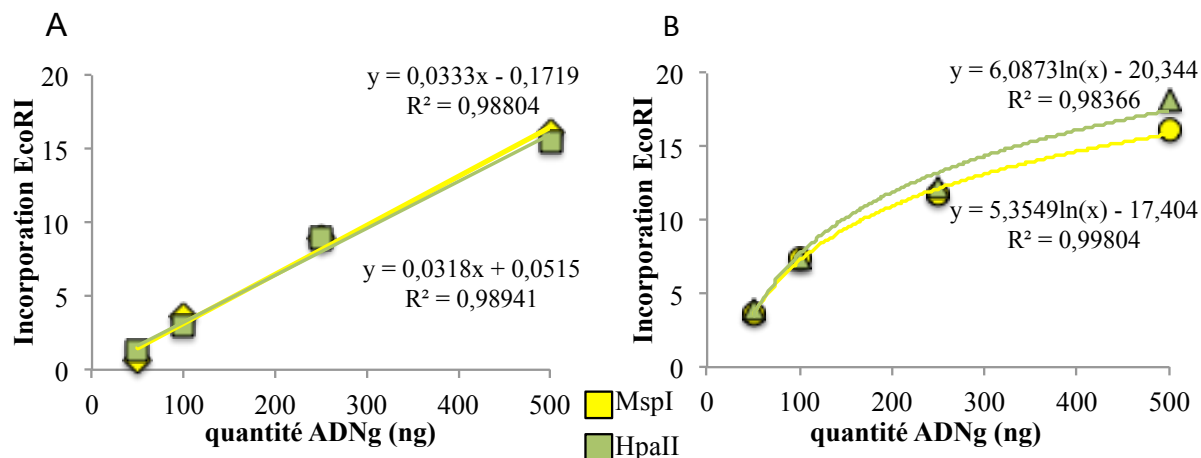


Figure 43 : Mesure de l'incorporation des nucléotides spécifiques du site EcoRI (A et T) en fonction de la variation de la quantité d'ADNg utilisée, avant la digestion enzymatique (A) ou avant le pyroséquençage (B). A) Avant la digestion par les enzymes de restriction, l'ADNg est dilué de façon à obtenir des quantités croissantes (50, 100, 250 et 500ng) et donnent une incorporation linéaire des nucléotides EcoRI similaire, que ce soit avec MspI ou avec HpaII. B) 500ng l'ADNg sont digérés puis après seulement sont dilués pour obtenir des quantités croissantes d'ADNg (50, 100, 250 et 500ng), avant le passage au pyroséquençage. L'incorporation des nucléotides EcoRI est logarithmique et similaire que ce soit avec MspI ou HpaII.

Pour le test de variation de la quantité d'ADNg après la digestion et avant le pyroséquençage, quelque soit la quantité d'ADN, les valeurs d'incorporation du site EcoRI sont bonnes, quoi que légèrement faibles pour les 50ng d'ADNg. La sensibilité du pyroséquençage n'est donc pas limitante pour la technique du LUMA. Une représentation graphique des valeurs d'incorporation du site de restriction EcoRI en fonction de la variation de la quantité d'ADNg avant et après digestion enzymatique est effectuée (**figure 43**).

En fonction de la quantité d'ADNg digérée, les valeurs d'incorporation de EcoRI sont linéaires avec MspI ou avec HpaII (**figure 43 A**). Quelle que soit la quantité d'ADNg utilisée pour les manipulations, elle sera théoriquement exploitable, (sans tenir compte du seuil de sensibilité de la manipulation et de la reproductibilité). Cela nous confirme la fiabilité du LUMA, ainsi que sa robustesse malgré le changement de quantité d'ADNg utilisée. En revanche, lorsque l'ADNg est digéré à 500ng et que la quantité d'ADNg est variable au niveau du pyroséquençage, les courbes obtenues ne sont pas linéaires mais logarithmiques (coefficient de corrélation R^2 proche de 1) (**figure 43 B**) que ce soit avec MspI ou avec HpaII. Cet effet pourrait s'expliquer par la présence d'un facteur limitant la réaction de pyroséquençage. En effet, ce test a été effectué en augmentant la quantité d'ADN digéré. Nous n'avons pas pris la précaution de maintenir toujours le même ratio entre milieu de la réaction enzymatique et milieu du pyroséquençage. Plus la quantité d'ADN est basse et plus le milieu réactionnel du clivage enzymatique a été dilué pour le pyroséquençage expliquant la forme de la courbe.

C'est avec la digestion à 500ng que les résultats sont les plus reproductibles. De plus cette quantité d'ADNg est utilisée au laboratoire en routine chez la souris ([Attig et al., 2013](#)). Tous nos LUMA ont donc été effectués avec 500ng d'ADNg. Néanmoins nous montrons qu'il n'est pas envisageable d'utiliser des quantités d'ADNg plus faibles.

1-4) Qualité de l'ADN génomique

Dans la littérature, il a été montré que la qualité de l'ADNg dans l'utilisation de la technique du LUMA est primordiale afin d'obtenir des résultats fiables et reproductibles. En effet des tests de dégradation d'ADNg suivis de la technique du LUMA ont été effectués dans le but d'utiliser cette méthode sur des prélèvements d'espèces protégées pas forcément idéalement conservés ([Head et al., 2014](#)). Pour cela les auteurs ont laissé des morceaux d'environ 20mg de foie et de cerveau d'embryon de poulet à 19 jours de gestation à température ambiante pendant 0,5, 2, 6, 12, 24, 48 et 72h, provoquant ainsi une cinétique de dégradation de l'ADNg extrait. L'intégrité des ADNg est vérifiée par migration

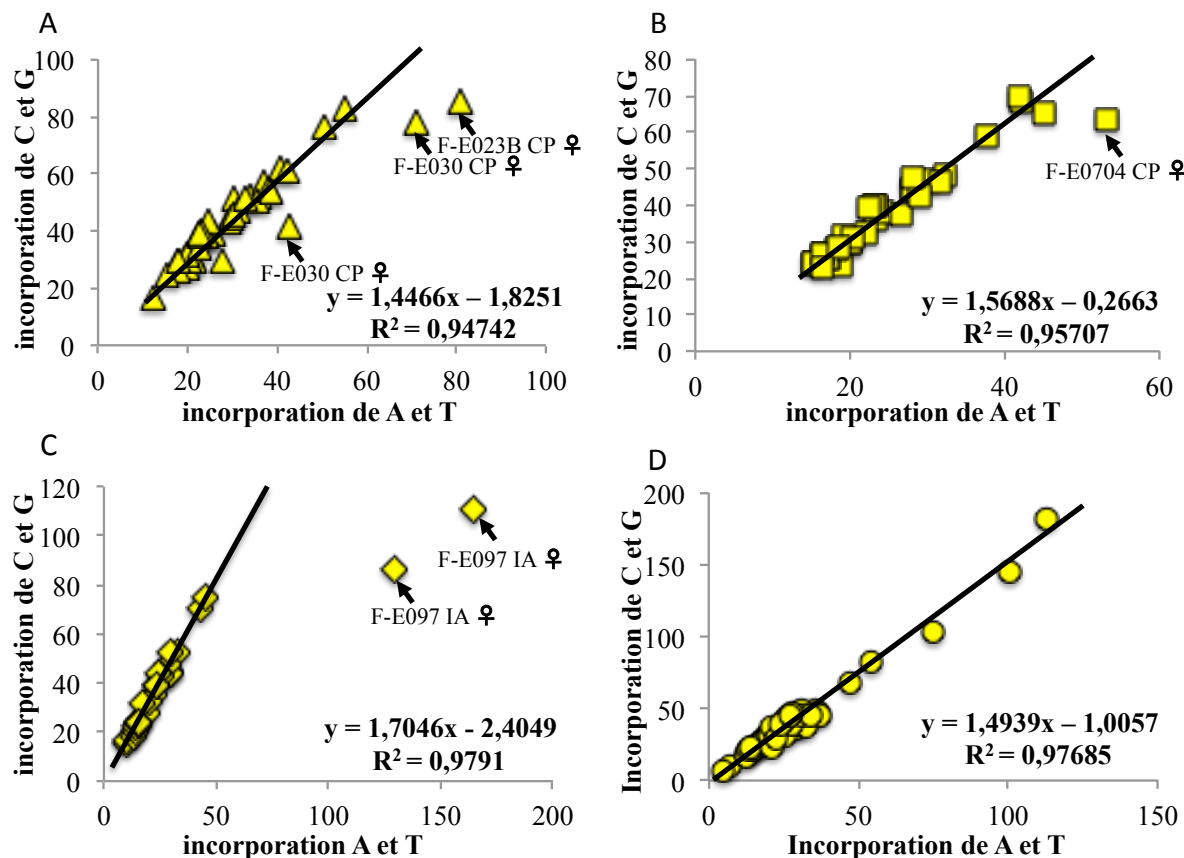


Figure 44 : Mesure de l'incorporation des nucléotides spécifiques du site MspI (C et G) en fonction de l'incorporation des nucléotides spécifiques du site EcoRI (A et T) dans l'amnios (A), l'allantoïde (B), le chorion (C) et les cotylédons (D) chez le bovin Holstein x Holstein à 60 jours de gestation. L'incorporation « MspI » est corrélée à celle « EcoRI » dans les 4 tissus extra-embryonnaires. Les échantillons sortant de la droite de corrélation sont montrés par des flèches.

électrophorétique sur un gel d'agarose. Les tissus commencent à montrer des signes de dégradation après 24h à température ambiante. Chacun de ces ADN_g a été utilisé en LUMA pour mesurer l'impact de cette dégradation sur les résultats du pourcentage de méthylation globale de l'ADN : le taux de méthylation globale baisse de façon significative à partir de 12h d'incubation du tissu à température ambiante dans le foie d'embryon de poulet et à partir de 48h d'incubation dans le cerveau d'embryon de poulet.

Une autre étude du même type a été menée sur du tissu placentaire humain ([Vilahur et al., 2013](#)). Les tissus sont laissés à température ambiante pendant 0,5, 1, 2, 6 et 24h, l'ADN_g est extrait et passé au LUMA. Comme dans le papier précédent, une forte diminution du pourcentage de méthylation est observée à 24h d'incubation.

L'intégrité de nos ADN_g a été vérifiée par migration électrophorétique sur gel d'agarose. Après cette étape validée, des représentations graphiques de l'incorporation des nucléotides C et G (correspondant à MspI) en fonction de l'incorporation de nucléotides A et T (correspondant à EcoRI) ont été effectuées pour chaque tissu extra-embryonnaire (**figure 44**). Les échantillons sortant de la droite de corrélation sont considérés comme « anormaux » avec soit un problème de digestion enzymatique, soit un problème de dégradation ou de compaction de leur ADN. Basé sur cette observation, de tels échantillons sont exclus des analyses finales.

Entre les différents tissus extra-embryonnaires, les pentes de chacune des droites sont très proches (de 1,4 à 1,7) révélant une efficacité d'incorporation identique entre tissus. En revanche il est étonnant de voir la variation des valeurs d'incorporation, que ce soit A et T (axe des abscisses) ou C et G (axe des ordonnées). Nous n'expliquons pas ces différences de valeurs entre échantillons, puisque en théorie, nous utilisons toujours 500ng d'ADN dosé par Qubit.

Enfin, afin de vérifier la variation du taux de méthylation entre plaque de pyroséquençage, un témoin a été ajouté pour chacune des séries.

1-5) Variation inter-essai

Un même ADN_g de foie adulte bovin a été utilisé dans une centaine de plaques de pyroséquençage comme témoin inter-essai. Il permet de mesurer la variation du pourcentage de méthylation d'une plaque de pyroséquençage à l'autre. Trois pools de digestion (MspI+EcoRI et HpaII+EcoRI) ont dû être effectués afin d'avoir assez de ce témoin pour qu'il soit présent dans toutes les plaques. Les coefficients de variation (écart type / moyenne) de chacun des pools digérés à des moments différents ont été calculés séparément. Les valeurs

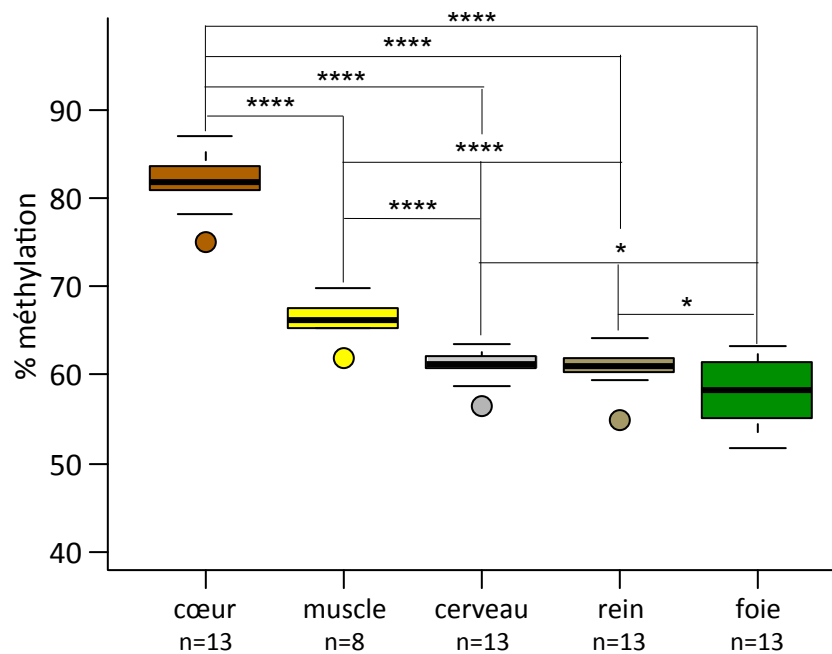


Figure 45 : Méthylation globale de l'ADNg dans des tissus de souris mâles adultes. Le pourcentage de méthylation est d'environ 82% pour le cœur, 67% pour le muscle, 60% pour le cerveau et les reins et 58% pour le foie. Les différences de pourcentage de méthylation globale entre les tissus embryonnaires sont significatives sauf entre le cerveau et les reins. pvalue : **** = 1 à $9,99 \times 10^{-5}$; * = 1 à 5×10^{-2}

sont 0,97%, 1,55% et 1,85%. Ces coefficients de variation ne sont pas très différents les uns des autres. Un coefficient de variation globale a été calculé sur toutes les plaques de pyroséquençage et a une valeur de 1,72%. Une différence de 1,72% entre 2 groupes à comparer est donc considérée comme une variation technique et non biologique.

Nous avons donc montré par cette mise au point du LUMA que l'utilisation de EcoRI comme normalisateur est un bon choix pour le bovin, avec une digestion quasi-complète des sites de restriction, sans digestion non spécifique et un impact négligeable de la méthylation. Dans nos conditions expérimentales, nous avons démontré que la digestion des sites de restriction MspI CCGG n'est pas inhibée par l'hydroxyméthylation et que la quantité d'ADNg optimale à utiliser est de 500ng. Un des inconvénients de cette technique est la nécessité d'utiliser une quantité d'ADNg importante et de bonne qualité. Néanmoins, avec les contrôles appropriés (migration électrophorétique des ADNg, contrôle systématique de la valeur de MspI/EcoRI pour chaque tissu et témoin de pyroséquençage présent dans toutes les plaques) les résultats obtenus par la technique du LUMA sont fiables, robustes et reproductibles, avec peu de variation inter-essai. Le LUMA a tout d'abord été effectué sur des tissus de souris adulte.

1-6) Mesure de la méthylation globale chez la souris adulte

Nous avons voulu dans un premier temps, comparer les données de méthylation globale obtenues par LUMA avec celles de la littérature obtenue par des techniques globales telle que la spectrométrie de masse ([Globisch et al., 2010](#)), ces données de méthylation ayant été obtenues chez la souris. Les premiers échantillons à être utilisés pour le LUMA sont des ADNg de cœur, muscle, cerveau, rein et foie de souris mâles de 17,5-19 semaines et de 29 semaines (pas de différences significatives entre les 2 groupes d'âge) (**figure 45**).

Comparé aux résultats obtenus par le laboratoire chez la souris ([Attig et al., 2013](#)), tous les points de contrôle ont été validés. Une différence de méthylation entre tissus est observée, allant d'environ 50 à 85% de méthylation globale. Le cœur est fortement méthylé (environ 80-85%), puis de manière décroissante le muscle est à 65-70%, le cerveau et les reins à 60% et le foie à 55-60%. En considérant les écarts interquartiles, nous notons que la variation intra-groupe est très faible pour le cœur, le muscle, le cerveau et les reins suggérant un contrôle très important de la méthylation dans ces tissus. Cependant pour le foie, l'écart interquartile est plus important (6%, contre 2,5% pour celui du cœur qui a l'écart le plus important parmi les

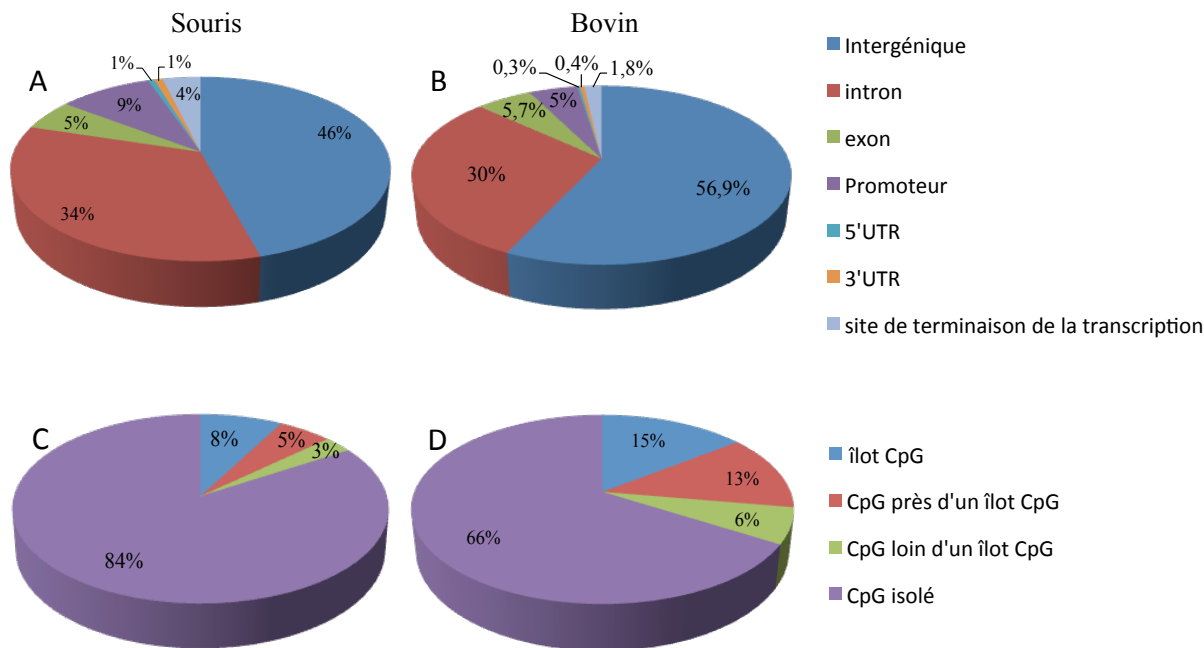


Figure 46 : Analyse bioinformatique de la distribution des sites CCGG dans le génome murin (A et C) et bovin (B et D). A) et B) Les sites CCGG sont principalement retrouvés dans les régions intergéniques (46% chez la souris et 56,9% chez le bovin), dans les introns (34% chez la souris et 30% chez le bovin), dans les promoteurs et les exons (5 à 9%) et dans les séquences régulatrices en 5' et 3' UTR (0,3 à 4%).

C) et D) Les sites CCGG sont principalement retrouvés dans les régions à CpG isolés (à plus de 4kb d'un îlot CpG) pour les deux génomes analysés (84% chez la souris et 66% chez le bovin). Ces sites sont ensuite les plus représentés dans les îlots CpG (8% chez la souris et 15% chez le bovin), puis vient la catégorie des CpG près d'un îlot CpG, entre 0 et 2 kb de cet îlot (5% chez la souris et 13% chez le bovin). Enfin, les sites CCGG loin d'un îlot CpG, entre 2 et 4kb de cet îlot sont les moins représentés (3% chez la souris et 6% chez le bovin).

autres tissus analysés). Cette dispersion dans le foie pourrait être expliquée par une variabilité plus forte du métabolisme entre les souris au moment du prélèvement.

Par spectrométrie de masse, aucune différence entre tissus n'avait été observée en 5mC ([Globisch et al., 2010](#)). Les variations de méthylation entre tissus obtenues par LUMA soulignent en fait les différences de sensibilité et de spécificité des 2 techniques. En effet la spectrométrie de masse a l'avantage de détecter et de quantifier toutes les C méthylées en faisant la différence entre les C méthylées et les C hydroxyméthylées. Le LUMA ne détecte les C méthylées que sur les sites CCGG et ne fait pas la distinction entre méthylation et hydroxyméthylation.

Une nouvelle analyse bioinformatique (Maxime Gasselin, étudiant en thèse) toujours sur les génomes de référence murin (Mus_musculus.GRCm38) et bovin (BTau UMD 3.1) a été effectuée (**figure 46**) dans le but d'observer la répartition des sites CCGG et donc d'analyser la pertinence de l'utilisation du LUMA. Les sites CCGG sont le plus souvent retrouvés dans les régions intergéniques et les introns. Puis viennent les régions promotrices et les exons. Et pour finir ils sont faiblement retrouvés dans les sites de terminaison de la transcription ainsi que dans les régions 5' et 3'UTR (**figure 46 A**). Les sites CCGG sont donc retrouvés principalement dans les régions régulatrices, décrite comme étant la cible de la méthylation de l'ADN. Ce sont les CpG isolés que l'on retrouve le plus sur les sites CCGG, que ce soit dans le génome murin (84%) ou dans le génome bovin (66%). Puis viennent les îlots CpG, régions du génome dans lesquelles les CpG méthylables sont présents en haute densité, faisant entre plusieurs centaines et plusieurs milliers de paire de base. Ils s'associent à des éléments régulateurs et sont principalement retrouvés dans les promoteurs des gènes ([Smallwood et Kelsey, 2012](#)). Enfin les sites CCGG les moins représentés sont ceux situés entre 0 et 4kb des îlots CpG.

Le LUMA cible plutôt les régions riches en CpG : des régions régulatrices de l'expression des gènes, des promoteurs, des séquences répétées, des îlots CpG, qui sont plutôt décrite comme des cytosines fonctionnelles. Ainsi les variations de la méthylation que nous observons en LUMA concerne plus particulièrement des régions impliquées dans la régulation de l'expression des gènes ce qui est cohérent avec la tissu-spécificité de la méthylation mesurée même si la majorité des sites CCGG analysés sont des CpG isolés.

Ces différents tests nous ont permis de déterminer les conditions optimales du LUMA et de considérer cette technique comme étant robuste. Nous avons donc décidé de la mettre en œuvre pour une analyse de l'ensemble des échantillons bovins de notre cohorte. Aucune

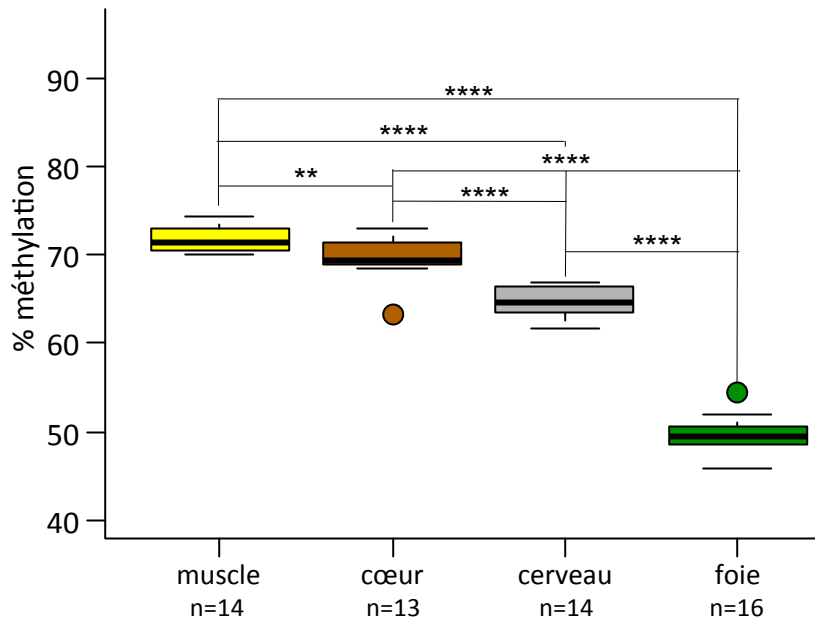


Figure 47 : Méthylation globale de l'ADN des tissus embryonnaires Holstein x Holstein obtenus par IA à 60 jours de gestation. Le pourcentage de méthylation est d'environ 72% pour le muscle, 69% pour le cœur, 63% pour le cerveau et 50% pour le foie. Les différences de pourcentage de méthylation globale entre les tissus embryonnaires sont significatives. pvalue : **** = 1 à $9,99 \times 10^{-5}$; *** = 1 à $9,99 \times 10^{-4}$; ** = 1 à $9,99 \times 10^{-3}$; * = 1 à 5×10^{-2}

bibliographie n'a été publiée à ce jour sur la méthylation globale de l'ADN en comparant différents tissus bovins, seule la détection de la méthylation par électrophorèse capillaire dans les leucocytes de clones bovins Holstein et Simmental adultes a été effectuée ([De Montera et al., 2010](#)).

1-7) Mesure de la méthylation globale de tissus embryonnaires IA chez le bovin à 60 jours de gestation

Dans un premier temps le LUMA a été appliqué aux tissus embryonnaires obtenus par IA à 60 jours de gestation, les organes étant mis en place à ce stade. Tous les prélèvements ont été réalisés pour des gestations issues de croisement entre femelles Holstein x mâles Holstein (**figure 47**).

La méthylation globale des tissus embryonnaires varie de 50 à 72% entre le muscle, le cœur, le cerveau et le foie, formant un gradient de méthylation, du plus méthylé au moins méthylé. L'ordre décroissant de la méthylation globale est conservé entre la souris et le bovin, sauf au niveau du cœur et du muscle où il est inversé. L'effet « tissu-spécifique » de la méthylation est retrouvé, avec en plus un écart interquartile très faible dans les différents organes embryonnaires mesurés.

Notre étude portant sur l'impact des modalités de reproduction (insémination artificielle ou clonage par transfert nucléaire) sur la méthylation des annexes extra-embryonnaires chez l'espèce bovine, ces tissus ont été analysés en LUMA.

2) Méthylation globale de l'ADN dans des tissus extra-embryonnaires bovins

D'après la littérature, une différence de méthylation entre blastocystes (G7) obtenus par Fécondation In Vitro (FIV) et ceux obtenus par clonage par transfert nucléaire est décrite chez le bovin mesurée par immunofluorescence ([Santos et al., 2003](#)). Les blastocystes issus de FIV présentent une hyperméthylation de la masse cellulaire interne (premières cellules qui donneront par la suite un embryon) par rapport au trophoctoderme (lignée trophoblastique donnant le placenta). Cette différence de méthylation est estompée dans les blastocystes obtenus par clonage, accompagnée d'une hyperméthylation du trophoctoderme.

Mais que devient le trophoctoderme chez les clones après le stade blastocyste ? Conserve-t-il son hyperméthylation à des stades plus tardifs de la gestation ? Pour répondre à ces questions, nous avons mesuré la méthylation globale de l'ADNg dans les tissus issus du lignage trophoblastique (trophoblaste, chorion et cotylédons) entre 18 et 60 jours de gestation.

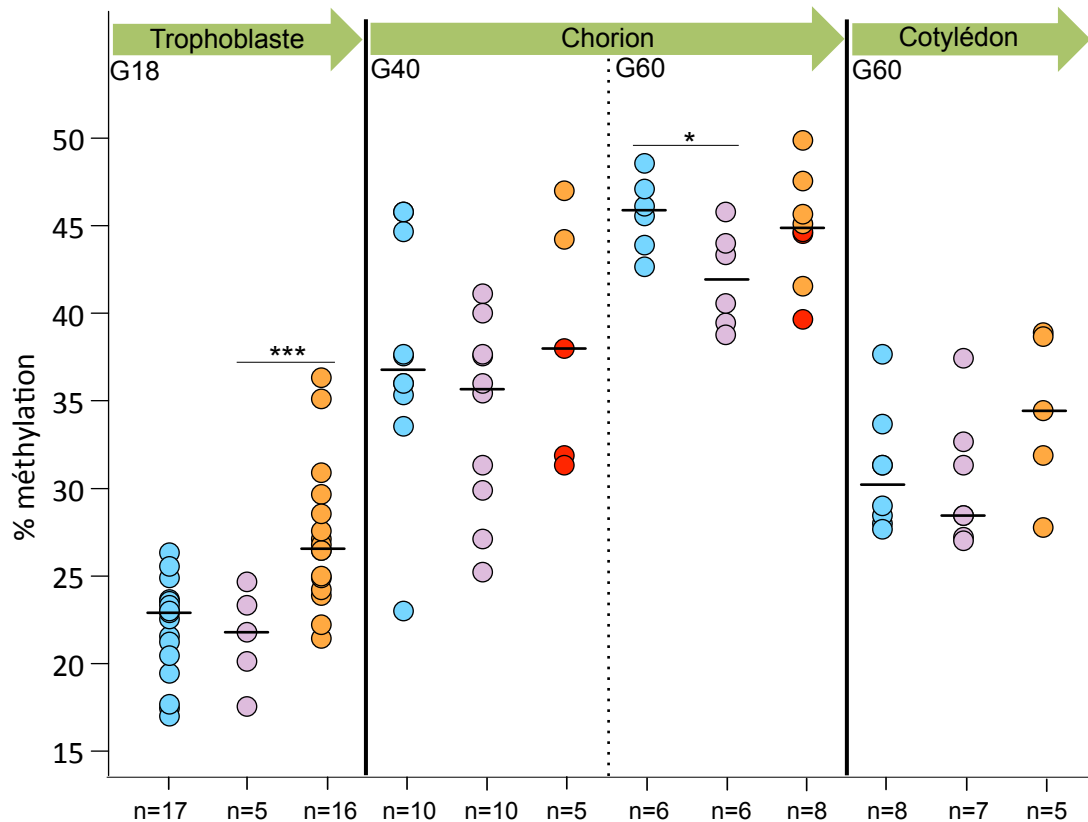


Figure 48 : Taux de méthylation de l'ADN du lignage trophoblastique au cours de la gestation. Une augmentation de la méthylation au cours de la gestation est observée avec environ 25% pour le trophoblaste G18, 35% pour le chorion G40 et 45% pour le chorion G60. En revanche la méthylation diminue pour les cotylédons, environ 30%. Une hyperméthylation significative des clones (en orange pour les non pathologiques et en rouge pour les pathologiques) est observée dans le trophoblaste G18 et un dimorphisme sexuel (bleu pour les mâles IA et rose pour les femelles IA) dans le chorion G60.

pvalue : *** = 1 à $9,99 \times 10^{-4}$; ** = 1 à $9,99 \times 10^{-3}$; * = 1 à 5×10^{-2}

2-1) Cinétique de la méthylation du lignage trophoblastique au cours de la gestation

Le trophoblaste à 18 jours de gestation, se différencie au cours du développement en chorion, puis sur le chorion apparaît des bouquets villositaires (cotylédons fœtaux) en face des caroncules (endomètre maternel). Les cotylédons s'enfoncent dans les caroncules et forment des placentomes correspondant à l'unité principale d'échanges fœto-maternels. La méthylation globale des tissus issus du trophoctoderme a été déterminée en utilisant des ADNg issus de prélèvements suivie d'une analyse par LUMA (**figure 48**).

Dans le trophoblaste à 18 jours de gestation puis dans le chorion à 40 et 60 jours de gestation, le taux de méthylation de l'ADNg augmente de 25 à 45% environ. A 60 jours de gestation le chorion et les cotylédons n'ont pas le même taux de méthylation. En effet, celui du chorion est autour de 40% et celui des cotylédons autour de 30%. Cette différence est assez étonnante puisque les 2 tissus sont composés d'une monocouche de cellules trophoblastiques accompagnée du mésoderme embryonnaire. Les hypothèses sur cette différence de méthylation entre ces 2 tissus provenant du même lignage avec une structure tissulaire identique seront analysées dans le chapitre suivant.

Une augmentation significative de la méthylation des clones est observée dans le trophoblaste à 18 jours de gestation. Ce résultat tend à confirmer que l'hyperméthylation du trophoctoderme au stade blastocyste ([Santos et al., 2003](#)) est conservée à 18 jours de gestation, avant l'implantation de l'embryon dans l'utérus de la mère porteuse. Cette augmentation de la méthylation des clones n'est pas retrouvée après l'implantation dans le chorion et les cotylédons. Il est à noter que le groupe « clone » comporte des fœtus normaux et pathologiques au moment du prélèvement. Une tendance à l'hypométhylation des clones pathologiques est constatée par rapport aux non pathologiques dans le chorion à 40 et 60 jours de gestation. Comme déjà observé précédemment, la méthylation augmente entre 18 et 60 jours de gestation entre trophoblaste et chorion. Les clones pathologiques sont des fœtus ayant arrêté leur développement, ce qui fait penser que le taux de méthylation correspondrait plutôt à un stade plus précoce. Cette hypothèse ne peut pas être vérifiée dans le trophoblaste et dans les cotylédons, car dans le premier, tous les embryons collectés présentait un développement normal à 18 jours de gestation et dans le second, seuls les clones non pathologiques à 60 jours de gestation développent des cotylédons.

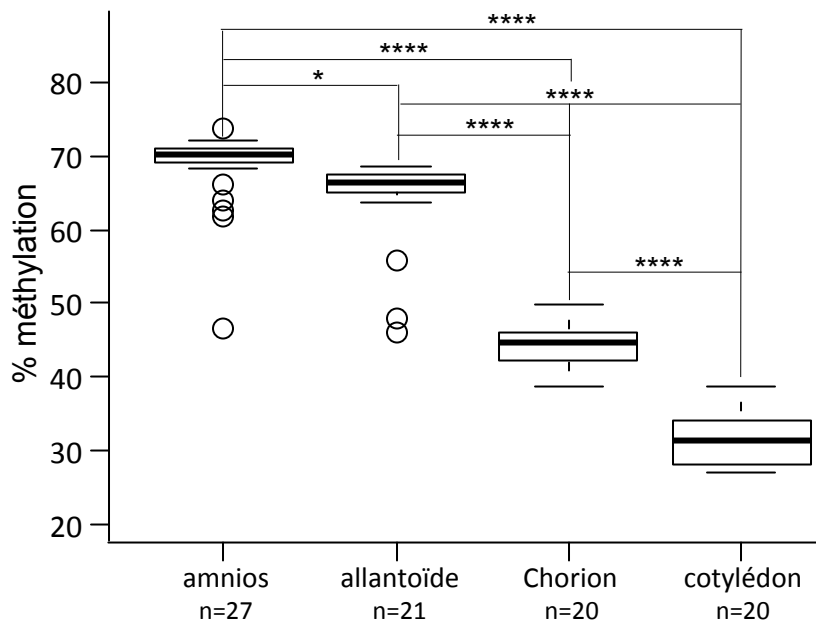


Figure 49 : Méthylation globale de l'ADN des tissus extra-embryonnaires Holstein x Holstein à 60 jours de gestation. Le pourcentage de méthylation est d'environ 70% pour l'amnios, 65% pour l'allantoïde, 45% pour le chorion et 30% pour les cotylédons. Les différences de pourcentage de méthylation globale entre les tissus extra-embryonnaires sont significatives.

pvalue : **** = 1 à $9,99 \times 10^{-5}$; *** = 1 à $9,99 \times 10^{-4}$; ** = 1 à $9,99 \times 10^{-3}$; * = 1 à 5×10^{-2}

Quelle méthylation globale observe-t-on sur les autres annexes extra-embryonnaires telles que l'amnios et l'allantoïde ?

2-2) Comparaison du taux de méthylation entre les différentes les annexes embryonnaires à 60 jours de gestation

A 60 jours de gestation, tous les tissus extra-embryonnaires, amnios, allantoïde, chorion, peuvent être disséqués et prélevés. Il en est de même pour les cotylédons : il est aisé de le désengrèner de la caroncule. Ce stade est donc caractérisé par la mise en place fonctionnelle de l'ensemble des organes et tissus extra-embryonnaires. Tous les prélèvements ont été réalisés pour des gestations issues de croisement entre femelles Holstein x mâles Holstein (**figure 49**). La méthylation globale des tissus extra-embryonnaires varie de 30 à 70%, avec l'amnios et l'allantoïde (entre 65 et 70%) hyperméthylés par rapport au chorion et au cotylédon (entre 30 et 45%). Une différence de 15% de méthylation est observée entre le chorion et le cotylédon, provenant pourtant du même lignage cellulaire.

Pour l'amnios, 7 individus sur les 27 analysés présentent une méthylation globale atypique, car sortant de la boîte de dispersion. Les 3 individus les moins méthylés (de 46,71%, 61,91% et 62,61%) sont des clones pathologiques. Deux autres individus à 63,87 et 66,27% ainsi que l'individu avec une forte méthylation (73,87%) sont des IA et aucun problème notable de développement n'a été relevé au cours des prélèvements. C'est simplement de la variabilité biologique individuelle et nous devons en tenir compte dans nos analyses.

Pour l'allantoïde, 2 individus IA mâles possèdent un taux de méthylation très bas (46,14% et 47,92%). Le développement fœtaux-placentaire de ces fœtus était normal (en prenant en considération la taille, le poids et la morphologie du fœtus et le développement des cotylédons) et ne peut expliquer ces valeurs. Au moment du prélèvement, l'allantoïde et le chorion sont fortement associés. Une mauvaise dissection a pu être commise entraînant une contamination de l'allantoïde par du chorion. Ces 2 points sont enlevés des analyses suivantes. Un 3^{ème} individu possède un taux de méthylation très bas (55,84%). Il fait partie du groupe des clones pathologiques. Comme nous ne pouvons pas déterminer si ce taux de méthylation est dû à la pathologie du clone ou à un problème de dissection allanto-chorionique, le point n'est pas conservé dans l'analyse.

Dans chacun des tissus extra-embryonnaires analysés, les individus ont été mélangés sans tenir compte de leur modalité de production.

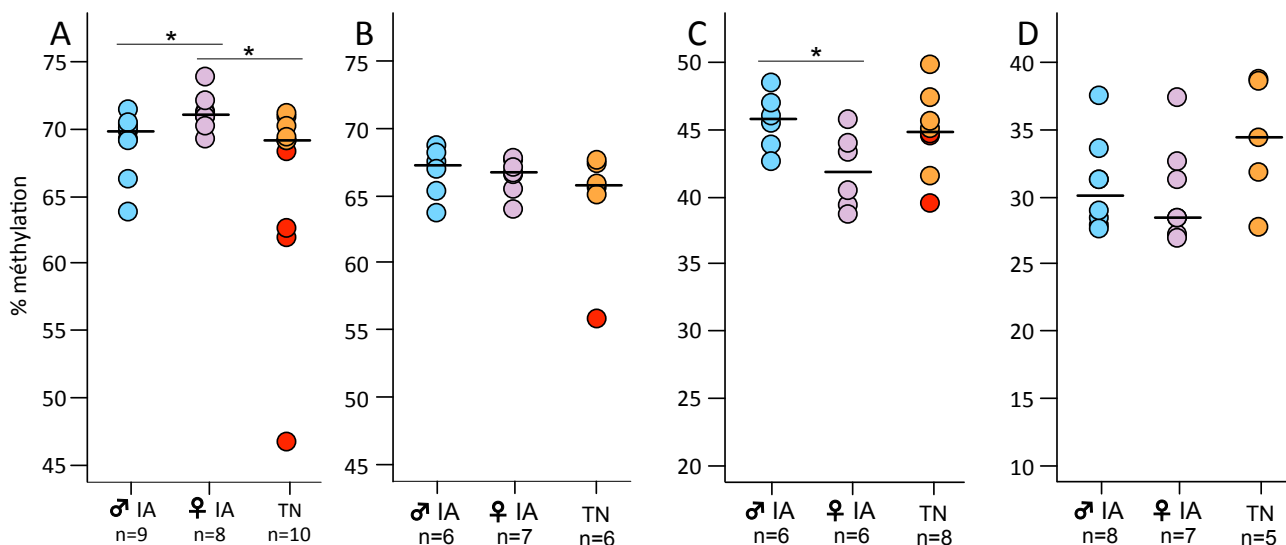


Figure 50 : Taux de méthylation de l'ADN dans l'amnios (A), l'allantoïde (B), le chorion (C) et les cotylédons (D). Aucune différence n'est observée entre IA mâles (bleu) et femelles (rose) et entre IA femelles et clones (orange pour les non pathologiques et rouge pour les pathologiques) pour l'allantoïde et les cotylédons. Dans l'amnios une différence significative du taux de méthylation est observée, IA femelles > IA mâles et IA femelles > TN. Dans le chorion, seul un dimorphisme sexuel apparaît. pvalue : * = 1 à 5 x 10⁻²

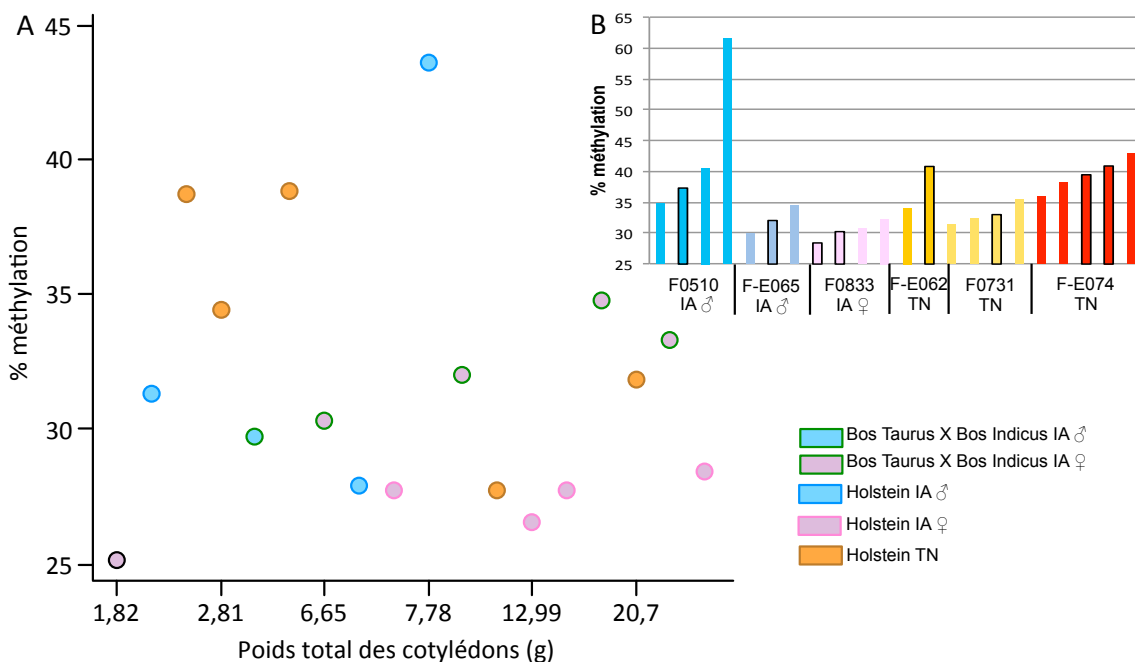


Figure 51 : Taux de méthylation de l'ADN dans les cotylédons en fonction de leurs poids totaux dans le placenta (A) et leurs poids individuels (B). A) Aucune corrélation n'est observée entre le pourcentage de méthylation et le poids total des cotylédons sur un placenta. B) Pour un individu donné, le pourcentage de méthylation ne varie pas en fonction du poids du cotylédon (cotylédons entre 500 et 1000mg en encadré noir et les cotylédons entre 30 et 60mg en non encadré).

2-3) Méthylation des tissus extra-embryonnaires et placentaires en fonction de la modalité de production des embryons

Les embryons générés sont obtenus soit par insémination artificielle (IA), soit par clivage embryonnaire au stade morula après IA, soit par clonage après transfert d'un noyau somatique (TN). Les résultats du taux de méthylation des annexes extra-embryonnaires ont été analysés en séparant IA mâles, IA femelles (les IA comprenant les IA classiques et les embryons clivés au stade morula) afin de les comparer avec les clones qui sont toutes des femelles (**figure 50**). Aucune différence entre les groupes n'est observée dans l'allantoïde et les cotylédons. Néanmoins une tendance à l'augmentation de la méthylation est observée dans les cotylédons des clones (tous normaux), les clones pathologiques ne présentant quasiment jamais de cotylédons, leur développement s'étant arrêté avant la mise en place de cette structure. Une autre tendance à l'augmentation de la méthylation est observée dans le chorion entre clones et IA femelles. Une augmentation significative de la méthylation est aussi constatée entre IA mâles et IA femelles. En revanche dans l'amnios, les IA mâles et les clones sont hypométhylés par rapport aux IA femelles. Une tendance à l'hypométhylation des clones pathologiques est observée pour l'amnios, l'allantoïde et le chorion

Une dispersion intragroupe est plus forte pour les cotylédons que pour les autres tissus extra-embryonnaires. L'écart interquartile dans les cotylédons (6%) est plus élevé que dans le chorion (4%), l'allantoïde (2,5%) et l'amnios (2%). Deux hypothèses peuvent l'expliquer. La première est que la proportion de mésoderme et de trophoblaste dans les cotylédons peut varier ; la seconde est que la taille des cotylédons prélevés n'est pas constante. Dans les 2 cas, le développement du cotylédon peut être incriminé. Pour chaque placenta, le nombre de cotylédons varie (entre 80 et 100 cotylédons identifiable à 60 jours de gestation ;([Constant, 2006](#))) et plus ils sont près du point d'insertion du cordon ombilical du fœtus, plus ils sont gros. Afin de savoir si le taux de méthylation pouvait varier en fonction de la taille du cotylédon, et donc de son développement, nous avons utilisé des prélèvements pour lesquels les cotylédons ont été collectés individuellement avec un relevé de leur poids. Nous avons aussi mesuré le taux de méthylation cotylédonaire en fonction du poids total de cotylédons prélevé sur un placenta (**figure 51**). Une variation du taux de méthylation de l'ADN des différents cotylédons est constatée pour chaque individu (**figure 51 B**), mais n'est pas liée aux poids cotylédonaire. Par exemple, le pourcentage de méthylation d'un des cotylédons entre 30 et 60mg de l'individu F0510 (environ 62%) est très différent du pourcentage de méthylation des 3 autres (entre 35 et 40%). Cette grande variation n'est pas due à un

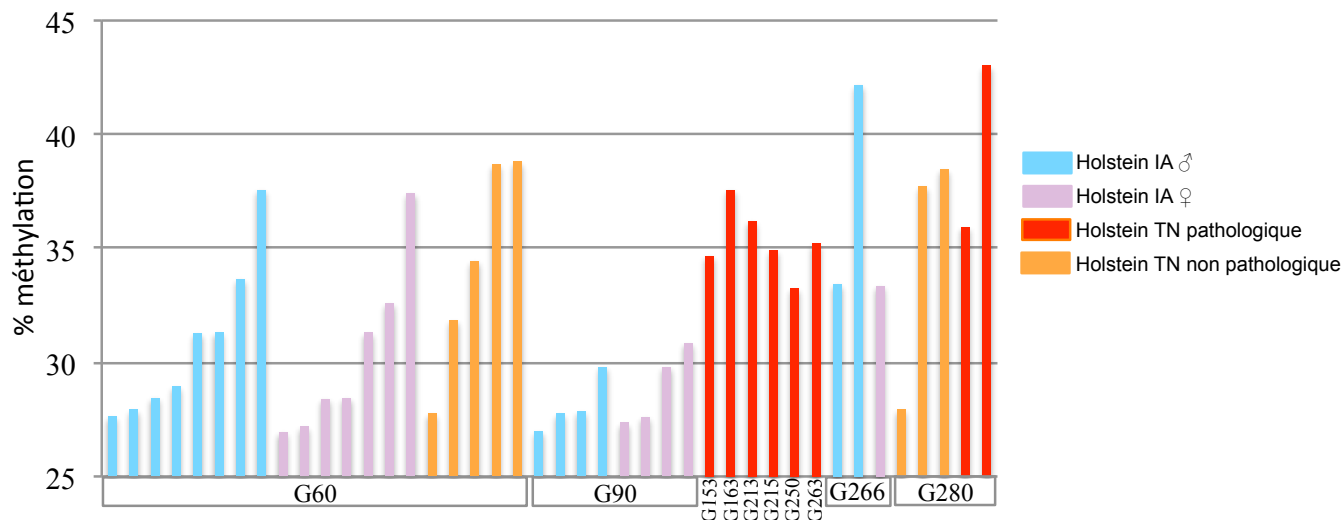


Figure 52 : Taux de méthylation de l'ADN dans les cotylédons de 60 à 280 jours de gestation. Chaque barre d'histogramme correspond au taux de méthylation cotylédonaire pour un fœtus. Les résultats sont présentés par groupe (Holstein IA mâles, IA femelles, clones non pathologiques, clones pathologiques), par stade (60, 90 et de 153 à 280 jours de gestation) et classés par ordre croissant en terme de taux de méthylation. Le taux de méthylation est d'environ 30% à 60 jours de gestation avec une grande variation inter-individuelle. A G90 le taux est d'environ 27% et plus homogène pour les 8 fœtus analysés sans distinction entre sexe. Aux stades plus tardifs, le taux de méthylation est de l'ordre de 35%.

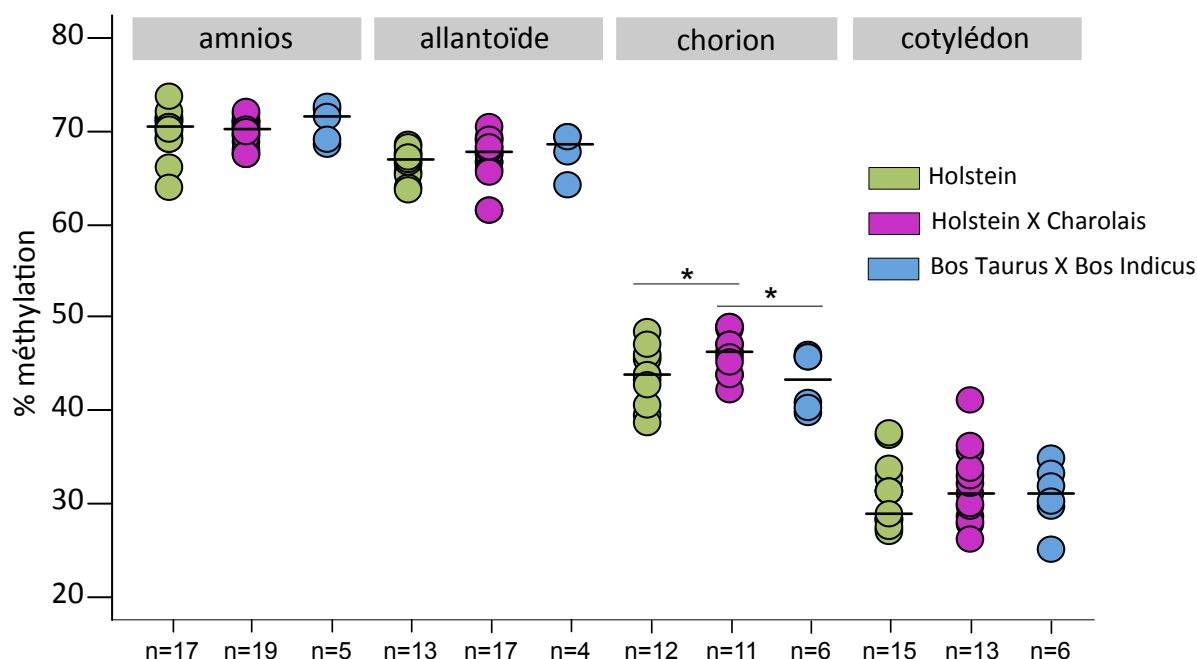


Figure 53 : Méthylation globale de l'ADN des annexes extra-embryonnaires bovines à 60 jours de gestation après croisements Holstein x Holstein (en vert), Holstein x Charolais (en violet) et *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* (en bleu). Il n'y a pas de variation importante du pourcentage de méthylation quel que soit le tissu analysé (amnios, allantoïde, chorion et cotylédon) pour les trois types de croisements réalisés. pvalue : * = 1 à 5 x 10⁻²

problème de manipulation au niveau du LUMA ou de qualité de l'ADNg. Il est probable que cet échantillon possède plus de mésoderme que les autres. Le mésoderme ayant été montré comme fortement positif à la 5mC par immunohistologie (chapitre discussion et perspectives), une forte proportion de mésoderme pourrait expliquer cette hyperméthylation. Cette explication s'applique aussi à la variation inter-individu du pourcentage de méthylation des cotylédons. Aucune corrélation n'est observée entre taux de méthylation et poids total au sein d'un placenta (**figure 51 A**).

Des cotylédons collectés à des stades de gestation plus tardifs ont été testés. Les effectifs à un stade donné sont trop réduits pour être statistiquement analysés (**figure 52**). En effet, les gestations des clones sont arrêtées en fonction de l'état pathologique et non à un stade précis puisque l'ensemble des échantillons de cette étude ont été prélevés au cours d'un programme visant à la naissance des clones. Très peu de gestations par IA ont été collectées. Néanmoins l'analyse de ces données permet d'avoir une évaluation de l'évolution de la méthylation dans cette annexe extra-embryonnaire au cours de la gestation.

En moyenne, le taux de méthylation de l'ADN dans les cotylédons atteint une phase plateau à 60 jours de gestation. Une légère baisse est observée à 90 jours de gestation (entre 25 et 30%), puis augmente à des stades plus tardifs (entre 35 et 40%).

Notre étude porte principalement sur la race Holstein mais il est intéressant d'évaluer l'effet des croisements inter-races sur la méthylation globale des annexes extra-embryonnaires.

2-4) Comparaison du taux de méthylation entre les différentes races bovines IA sur leurs annexes extra-embryonnaires à 60 jours de gestation

Le taux de méthylation a été mesuré pour des croisements entre femelles Holstein x mâles Charolais et entre femelles *Bos taurus taurus* (Holstein) x mâles *Bos taurus indicus*. Toutes les gestations ont été obtenues par insémination artificielle (**figure 53**). Le taux de méthylation respectif de chaque annexe extra-embryonnaire est conservé quel que soit le croisement réalisé : Holstein x Holstein, Holstein x Charolais ou *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* à quelques exceptions près. En effet, une augmentation significative de la méthylation (pvalue de 0,01 à 0,05) est observée dans les chorions Holstein x Charolais comparé aux chorions Holstein x Holstein et *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*. Néanmoins, dans cette étude, nous avons eu accès à un nombre restreint de fœtus issus du croisement *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* et les différences de méthylation restent

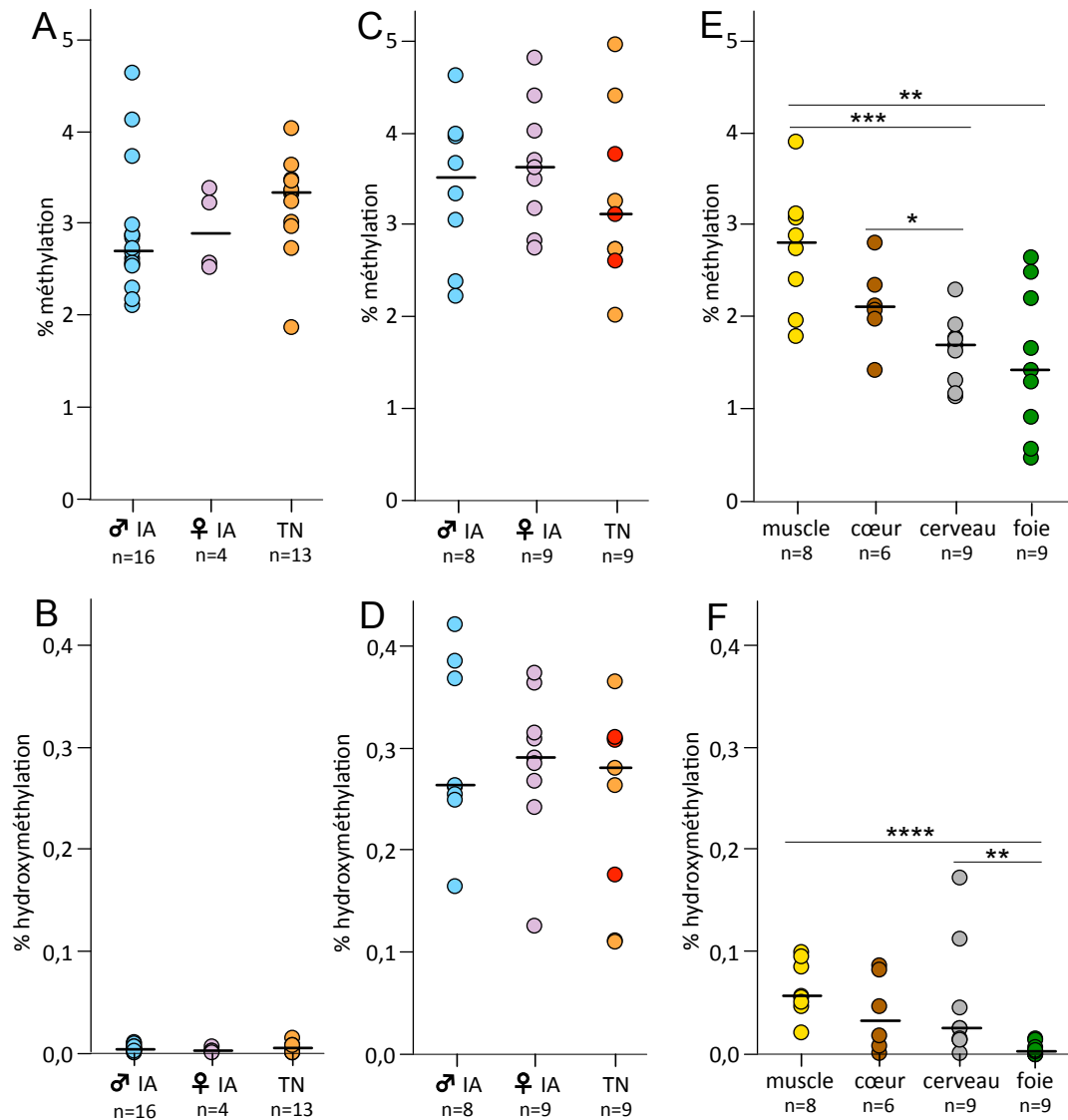


Figure 54 : Méthylation (A, C et E) et hydroxyméthylation (B, D et F) de l'ADN dans le trophoblaste à 18 jours (A et B), dans l'amnios (C et D) et dans les tissus embryonnaires (E et F) à 60 jours de gestation. Aucune différence significative n'est remarquée dans le trophoblaste à G18 (entre 2 et 4% de méthylation et entre 0 et 0,02% d'hydroxyméthylation) et dans l'amnios à G60 (entre 2 à 5% de méthylation et entre 0,1 et 0,4% d'hydroxyméthylation), que ce soit entre IA mâles (en bleu) et IA femelles (en rose) ou entre IA femelles et clones (non pathologique en orange et pathologiques en rouge). Pour les tissus embryonnaires, le muscle est à environ 3% de méthylation, le cœur à environ 2% et le cerveau de le foie autour de 1,5%. Pour les taux d'hydroxyméthylation, le muscle est à environ 0,05%, le cœur et le cerveau à 0,2% et le foie est proche de 0%.
pvalue : **** = 1 à $9,99 \times 10^{-5}$; *** = 1 à $9,99 \times 10^{-4}$; ** = 1 à $9,99 \times 10^{-3}$; * = 1 à 5×10^{-2}

faibles (environ 3%).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le LUMA ne permet pas de distinguer la méthylation et l'hydroxyméthylation de l'ADN. Au vu des variations observées (entre annexes extra-embryonnaires, entre stades de gestation et entre individus (IA mâles versus IA femelles, IA femelles versus clones), nous avons souhaité explorer la proportion d'ADN méthylé et hydroxyméthylé. Comme indiqué dans le chapitre dédié dans le matériel et méthode, la technique de l'hydroxyméthylation par glycosylation de l'ADNg, digestion par des enzymes de restriction (MspI, HpaII et EcoRI) suivi d'un pyroséquençage n'a pas fonctionné. Nous avons donc opté pour une technique basée sur l'utilisation d'anticorps spécifiques de chacune de ces 2 marques.

3) Proportion de méthylation et de d'hydroxyméthylation dans les tissus présentant un différentiel de méthylation globale

La technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ou dosage immuno-enzymatique utilise un anticorps spécifique soit de la 5mC soit de la 5hmC. Les échantillons utilisés sont les tissus embryonnaires à 60 jours de gestation (muscle, cœur, cerveau et foie) et les tissus extra-embryonnaires présentant des différences significatives entre IA femelles et clones en LUMA : le trophoblaste à 18 jours de gestation et l'amnios à 60 jours de gestation (**figure 54**). L'objectif est de voir si l'hydroxyméthylation pourrait être responsable des différences significatives observées précédemment (**figure 47**, **figure 48** et **figure 50 A**).

Le trophoblaste à 18 jours de gestation n'est quasiment pas hydroxyméthylé (**figure 54 B**), avec un pourcentage proche de 0. Par contre il est méthylé entre 2 et 4% avec aucune différence significative entre les groupes IA mâles, IA femelles et clones (**figure 54 A**).

L'amnios à 60 jours de gestation est à environ 0,3% d'hydroxyméthylation pour chacun des groupes, sans différence significative (**figure 54 D**). La méthylation est entre 2 et 5% sans différence significative entre les groupes IA mâles, IA femelles et clones (**figure 54 C**).

Les tissus embryonnaires à 60 jours de gestation analysés sont uniquement des IA. Ils ont un taux d'hydroxyméthylation entre 0 et 0,1% (**figure 54 F**) avec une hyper-hydroxyméthylation significative du muscle et du cerveau par rapport au foie. La méthylation est comprise entre 0,5 et 4%, avec du plus méthylé au moins méthylé, le muscle, le cœur, le cerveau et le foie

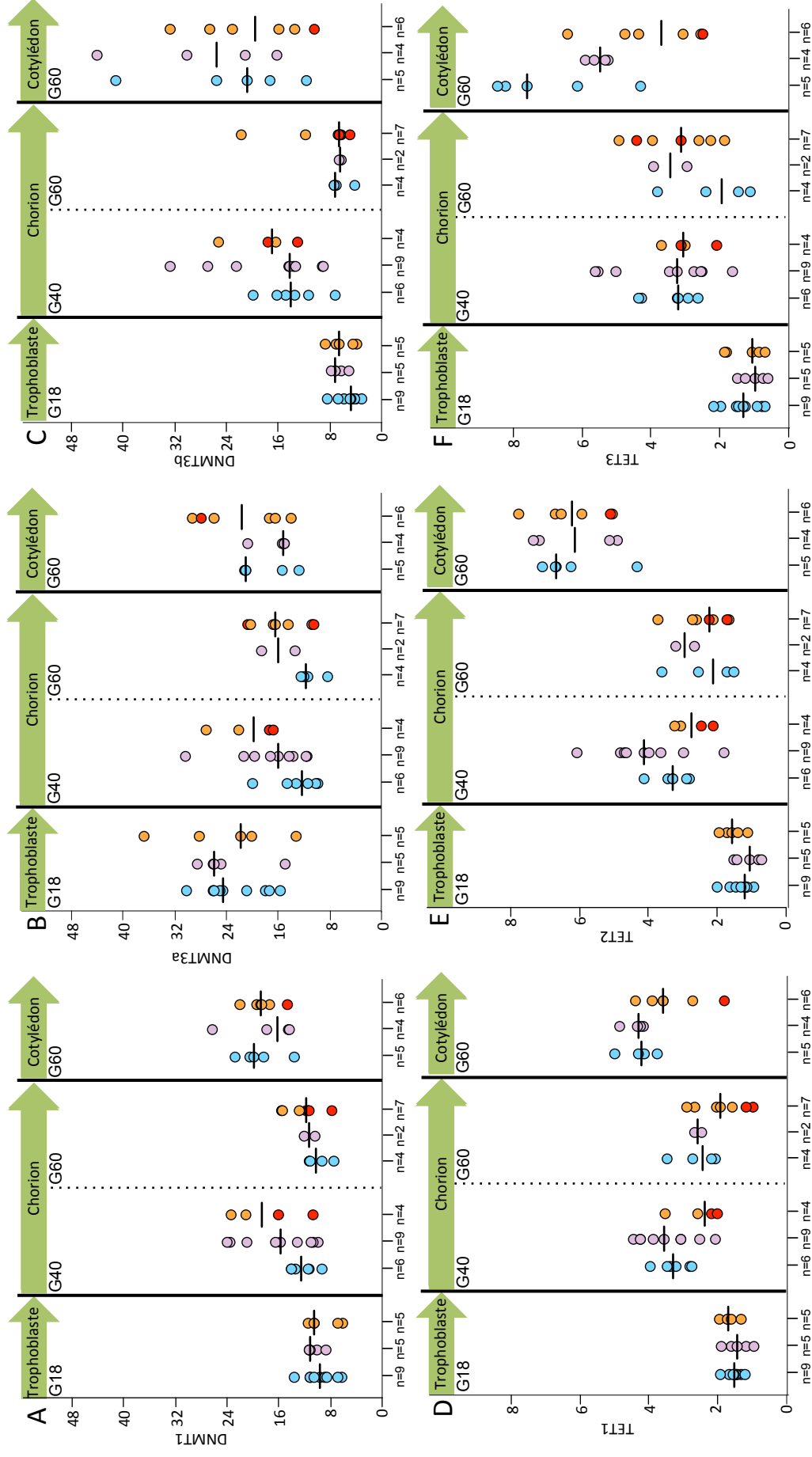


Figure 55 : Expression des gènes *Dnmt* et *Tet* dans les tissus issus du lignage trophoblastique de 18 à 60 jours de gestation en séparant les IA mâles (en bleu), les IA femelles (en orange) et les clones (non pathologique (en rose)) : niveau d'expression de *Dnmt1* (A), *Dnmt3a* (B), *Dnmt3b* (C), *Tet1* (D), *Tet2* (E) et de *Tet3* (F). Dans les 6 graphiques, pas de différences significatives entre IA mâles et IA femelles et entre IA femelles et clones. La dispersion des points dans chacun des groupes est importante. Il apparaît que les clones pathologiques (en rouge) semblent sous-exprimés par rapport aux clones non pathologiques et aux IA femelles, sauf pour *Dnmt3a* dans les cotylédons à G60 et pour *Tet3* dans le chorion à G60.

(figure 55 E). Le muscle est significativement hyperméthylé par rapport au cerveau et au foie et le cœur est hyperméthylé par rapport au cerveau.

Mise à part l'hydroxyméthylation du trophoblaste pratiquement inexistante, celles de l'amnios et des tissus embryonnaires ont le même profil que la méthylation respective. Le signal de méthylation est 300 fois plus important que celui de l'hydroxyméthylation dans le trophoblaste, 10 fois plus important dans l'amnios et 60 fois plus important dans les tissus embryonnaires. L'hydroxyméthylation détectée avec un anticorps spécifique est en quantité négligeable dans tous les tissus étudiés.

Les profils de méthylation obtenus avec la technique ELISA sont similaires aux profils obtenus avec le LUMA. Une perte de significativité par dosage anticorps spécifique est remarquée, probablement dû à la variabilité intra-groupe assez forte dans tous les tissus étudiés. Ces résultats sont en accord avec la bibliographie, puisque la technique ELISA est décrite comme donnant une estimation sommaire des marques mesurées, due à la haute variabilité des résultats (Kurdyukov et Bullock, 2016).

Au vu des évolutions de la méthylation et de l'hydroxyméthylation, nous avons complété notre étude en analysant l'expression des gènes codant les protéines d'apposition et le maintien de la méthylation (*Dnmt*) ainsi que celle d'apposition de l'hydroxyméthylation (*Tet*), et voir si une corrélation est observée entre ses 2 analyses.

4) Expression des gènes responsables de l'apposition/maintien de la méthylation et de l'hydroxyméthylation de l'ADN

L'expression des gènes *Dnmt* et des *Tet* a été étudiée sur des tissus placentaires: le trophoblaste à 18 jours de gestation, le chorion à 40 et 60 jours de gestation et les cotylédons à 60 jours de gestation.

4-1) Cinétique de l'expression des gènes *Dnmt* et *Tet* dans les tissus placentaires au cours de la gestation

Un suivi de l'expression des gènes *Dnmt* et *Tet* a été effectué au cours du développement du lignage trophoblastique de 18 à 60 jours de gestation (figure 55).

Chaque graphique représente le niveau d'expression des gènes *Dnmt* (*Dnmt1*, *Dnmt3a* et

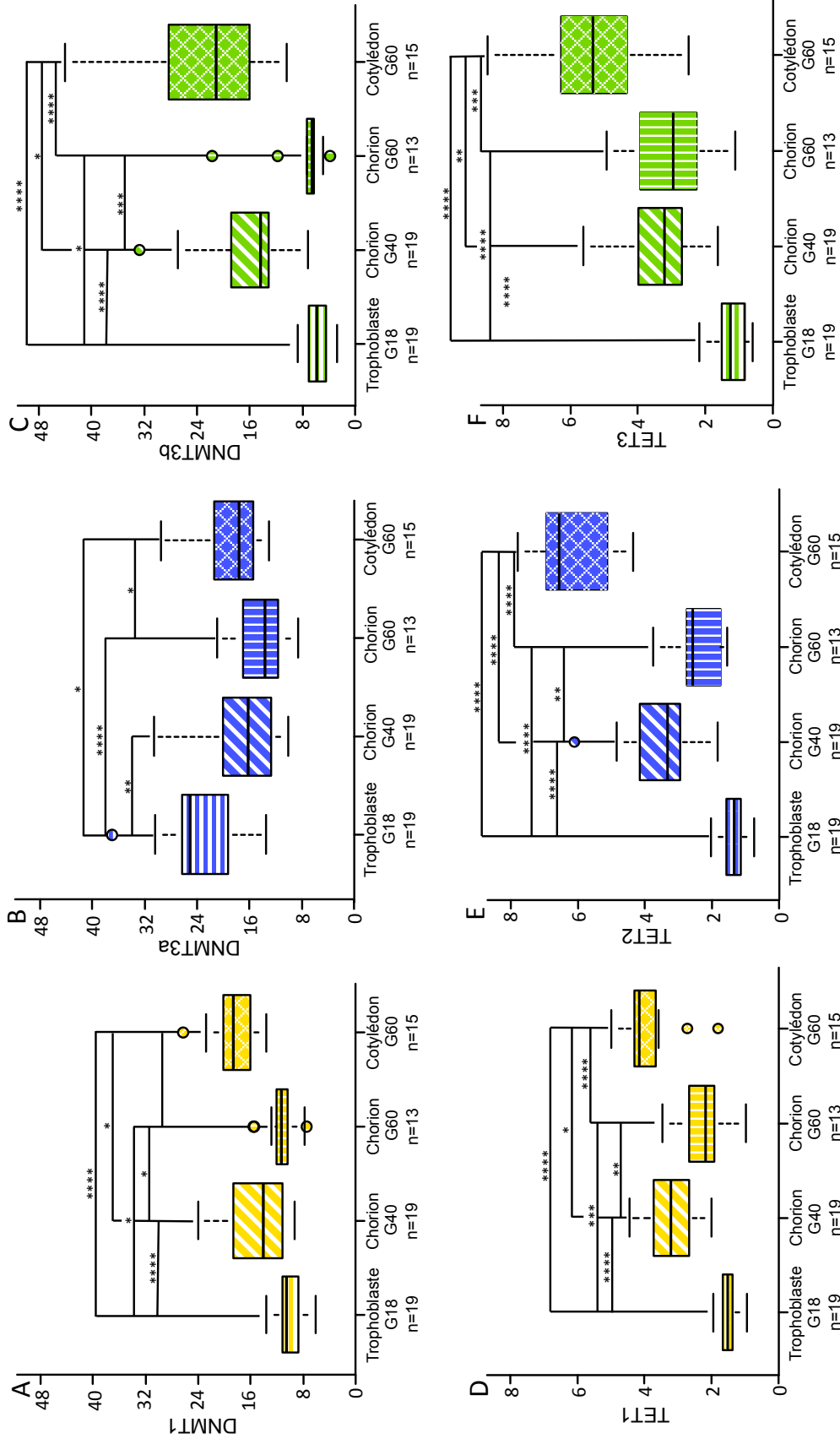


Figure 56 : Expression des gènes *Dnmt* et *Tet* dans les tissus issus du lignage trophoblastique de 18 à 60 jours de gestation : niveau d'expression de *Dnmt1* (A), *Dnmt3a* (B), *Dnmt3b* (C), *Tet1* (D), *Tet2* (E) et de *Tet3* (F). Les *Dnmt* (entre 4 et 44) sont environ 5 fois plus exprimés que les *Tet* (entre 1 et 8) dans tous les tissus du lignage trophoblastique. Pour chacun des graphiques, les différences entre tous les tissus sont significatives sauf entre le chorion G40 et G60 pour *Dnmt3a* et *Tet3*. Pour *Dnmt1* (A), *Dnmt3b* (C), *Tet1* (D) et *Tet2* (E), la variation de l'expression est la suivante : une faible expression dans le trophoblaste G18, une forte expression dans le chorion à G40 qui diminue à G60 et des cotylédons à G60 avec une très forte expression. L'expression de *Tet3* (F) est différente au niveau du chorion qui, au lieu de diminuer à G60, reste au même niveau qu'à G40. L'expression de *Dnmt3a* (B) est forte dans le trophoblaste G18, 2 fois plus faible dans le chorion à G40 et G60, puis forte dans les cotylédons G60.

Dnmt3b) et des gènes *Tet* (*Tet1*, *Tet2* et *Tet3*) dans le trophoblaste à 18 jours de gestation, dans le chorion à 40 et 60 jours de gestation et dans les cotylédons à 60 jours de gestation. Aucune différence significative de l'expression des *Dnmt* et des *Tet* n'a été observée entre IA mâles et IA femelles et entre IA femelles et clones, que ce soit dans le trophoblaste, le chorion ou les cotylédons. Une grande dispersion des échantillons est observée dans tous les groupes. Toutefois on remarque que les gènes *Tet* et *Dnmt* ont une tendance à être sous exprimés chez les clones pathologiques par rapport aux autres femelles (IA ou clones non pathologiques) dans tous les tissus, à l'exception du gène *Dnmt3a* dans les cotylédons à 60 jours de gestation et du gène *Tet3* dans le chorion à 60 jours de gestation.

4-2) Niveau d'expression des gènes *Dnmt* et *Tet* dans les tissus placentaires au cours de la gestation

Comme aucune différence significative entre IA mâles, IA femelles et clones n'a été observée, les échantillons ont été regroupés pour mener une analyse pour un tissu et un stade de gestation donné (**figure 56**). Ces graphiques nous montrent les différents profils d'expression des gènes *Dnmt* et *Tet* dans le lignage trophoblastique de 18 à 60 jours de gestation. En premier lieu, l'efficacité d'amplification des couples d'amorces utilisés pour la RT-PCR quantitative étant du même ordre (de 91 à 111% pour l'expression des gènes *Dnmt* et de 94 à 107% pour l'expression des gènes *Tet*), il nous est possible de conclure que les gènes *Dnmt* sont plus fortement exprimés que les gènes *Tet* : les gènes *Dnmt* sont de 4 à 6 fois plus exprimés quelque soit le tissu ou le stade considéré. Ensuite, bien que n'ayant pas les mêmes valeurs d'expression, un profil se dessine pour les gènes *Dnmt1*, *Dnmt3b* et les gènes *Tet1* et *Tet2* : avec une faible expression dans le trophoblaste à 18 jours de gestation, qui augmente dans le chorion à 40 jours de gestation (environ 2 fois) puis diminue dans le chorion à 60 jours de gestation. Les cotylédons à 60 jours de gestation présentent une expression 2 à 4 fois plus forte que dans le trophoblaste. Ce profil d'expression ne s'applique pas aux gènes *Dnmt3a* et *Tet3*. L'expression de *Dnmt3a* a un profil d'expression spécifique avec une expression forte dans le trophoblaste puis une diminution observable à 40 et 60 jours de gestation dans le chorion (2 fois moins d'expression que dans le trophoblaste à 18 jours de gestation). L'expression de *Dnmt3a* est aussi 1,5 fois plus forte dans les cotylédons à 60 jours de gestation que dans le chorion. Enfin le profil d'expression de *Tet3* est aussi particulier avec une faible expression dans le trophoblaste, puis une expression 3 fois plus forte dans le chorion à 40 et 60 jours de gestation puis 2 fois plus d'expression dans les cotylédons G60 que dans le chorion.

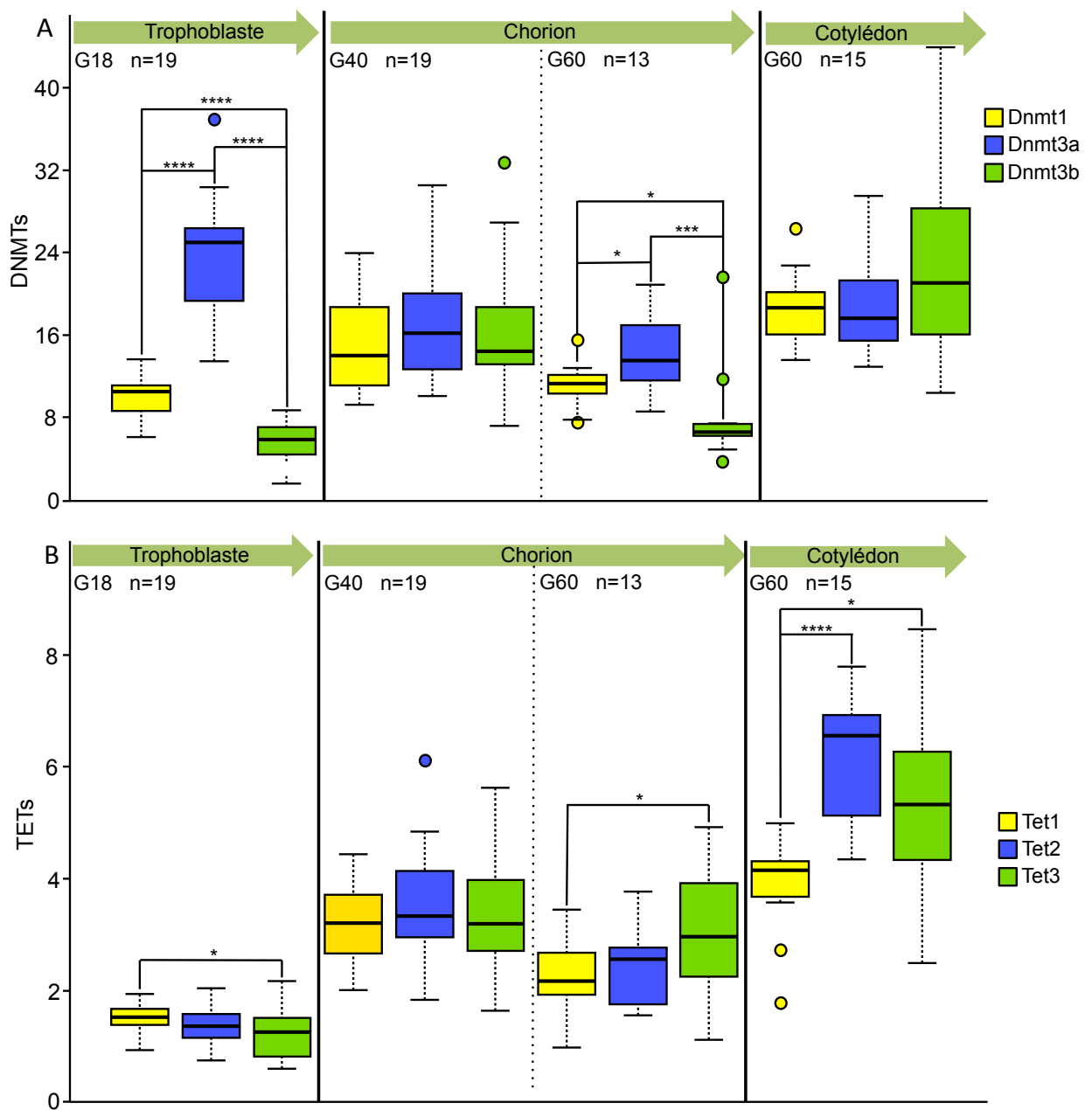


Figure 57 : Expression des gènes *Dnmt* (A) et *Tet* (B) chacun regroupés dans un des tissus issus du lignage trophoblastique de 18 à 60 jours de gestation. A) Aucune différence d'expression des *Dnmt* n'est observée dans le chorion à G40, avec un niveau d'expression autour de 16 et dans les cotylédons à G60, avec un niveau d'expression autour de 20. Dans le trophoblaste à G18 et dans le chorion à G60, les différences d'expression entre *Dnmt1*, *Dnmt3a* et *Dnmt3b* sont significatives, avec un niveau d'expression $Dnmt3b < Dnmt1 < Dnmt3a$. B) Dans le trophoblaste, l'ordre d'expression est $Tet3 < Tet2 < Tet1$ avec une différence significative entre *Tet1* et *Tet3* et un niveau d'expression entre 0,5 et 2,5. Aucune différence d'expression des *Tet* n'est observée dans le chorion à G40 avec un niveau d'expression entre 2 et 5. Dans le chorion à G60, l'ordre d'expression est $Tet1 < Tet2 < Tet3$ avec une différence significative entre *Tet1* et *Tet3* et un niveau d'expression entre 1 et 5. Dans les cotylédons à G60, l'ordre d'expression est $Tet1 < Tet3 < Tet2$ avec une différence significative entre *Tet1* et *Tet2* et entre *Tet1* et *Tet3* et un niveau d'expression entre 2,5 et 8,5. pvalue : **** = 1 à $9,99 \times 10^{-5}$; * = 1 à 5×10^{-2}

Nous avons représenté les données en comparant pour un tissu donné à un stade de gestation donné l'expression des différents gènes (**figure 57**). Chacune des familles de gènes analysées est regroupée afin d'observer l'expression relative de chacun des gènes au sein d'un même tissu à un stade donné. Dans le trophoblaste à 18 jours de gestation, une expression dans l'ordre croissant des gènes *Dnmt3b*, *Dnmt1* et *Dnmt3a* est remarquée de manière significative. En ce qui concerne les gènes *Tet*, seul *Tet1* est significativement surexprimé par rapport à *Tet3*, avec *Tet2* entre les 2. Dans le chorion à 40 jours de gestation, aucune différence n'est relevée, ni pour les gènes *Dnmt*, ni pour les gènes *Tet*. Par contre dans le chorion à 60 jours de gestation, une expression dans l'ordre croissant des gènes *Dnmt3b*, *Dnmt1* et *Dnmt3a* est remarquée de manière significative, tout comme à 18 jours de gestation. Le gène *Tet1* est significativement sous-exprimé par rapport au gène *Tet3*, avec le gène *Tet2* entre les 2. Enfin, dans les cotylédons à 60 jours de gestation, aucune différence d'expression n'est relevée pour les gènes *Dnmt*. En revanche, le gène *Tet1* est significativement sous exprimé par rapport au gène *Tet3* et encore plus par rapport au gène *Tet2*.

La protéine DNMT1 étant une enzyme de maintien de la méthylation de l'ADN pendant la réplication dans toutes les cellules d'un organisme, il est logique de la retrouver dans tous les tissus étudiés à un niveau d'expression plutôt stable si on la compare à nos autres gènes exprimés. En revanche les différences d'expression des gènes *Dnmt3a* et *Dnmt3b* sont plus surprenantes sachant que leur rôle à toutes les 2 est l'apposition de la méthylation de novo. Cependant il a été montré, par l'intermédiaire de souris transgénique KO pour DNMT3a ou DNMT3b ou les 2, que DNMT3a s'occupe plus des séquences critiques pour le développement tardif de l'embryon et que DNMT3B cible plus de gènes importants lors du développement précoce de l'embryon, ainsi que les séquences dites « satellites » (type de séquences répétées) au niveau des centromères (rôle au niveau de la stabilité du chromosome) ([Okano et al., 1999](#)). Cela pourrait être une des raisons des différences importantes observées entre l'expression de ses 2 gènes dans certains tissus.

Comme remarqué précédemment, les cotylédons expriment fortement les *Dnmt* et les *Tet*. Le cotylédon est la partie fœtale très fortement liée à une caroncule, structure endométriale maternelle, le tout formant un placentome. Tous les prélèvements étant effectués par dissection mécanique des 2 compartiments (fœtal et maternel), nous avons voulu vérifier que le profil d'expression des gènes *Dnmt* et *Tet* détecté dans les cotylédons n'est pas du à une contamination par du tissu caronculaire.

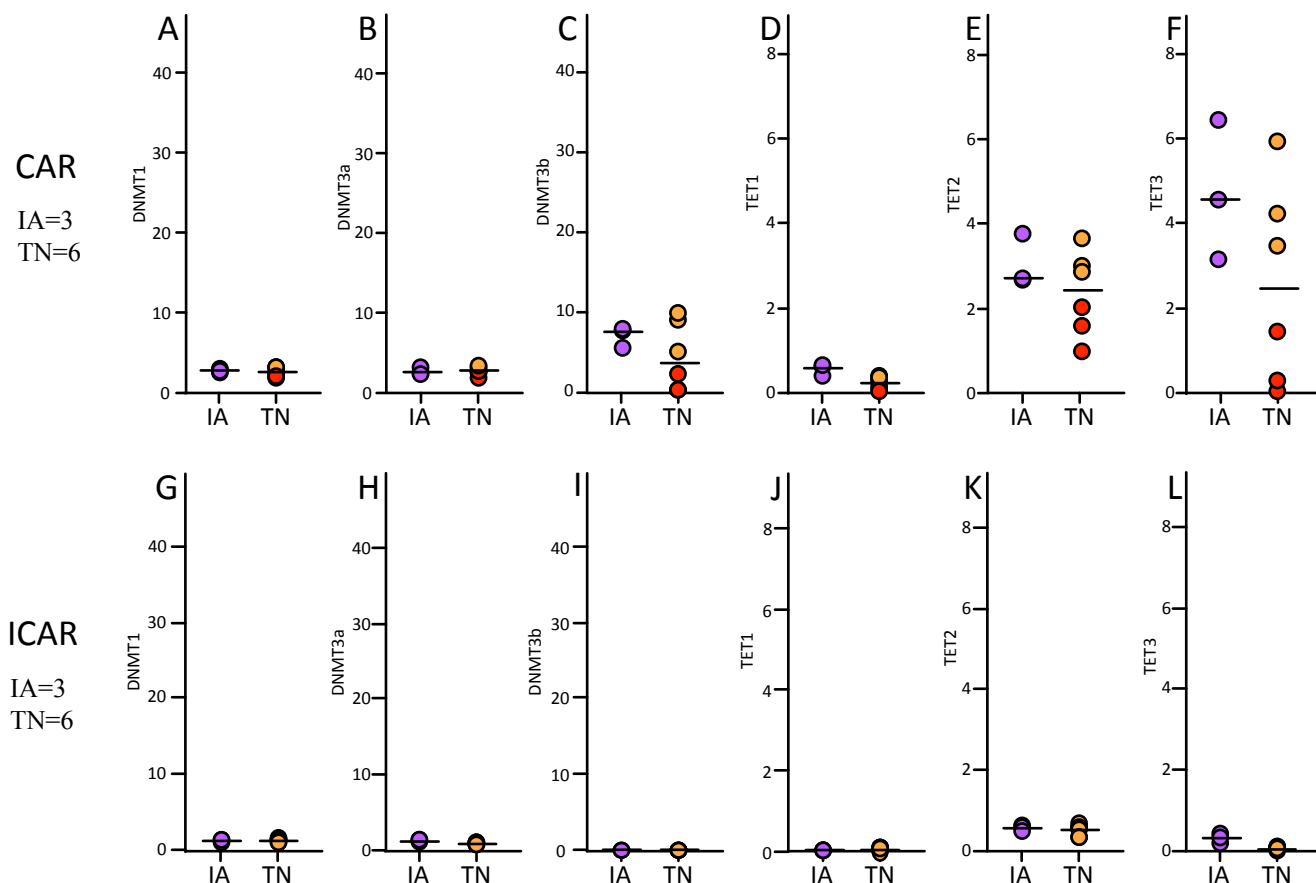


Figure 58 : Expression des gènes *Dnmt* (A, B, C, G, H, I) et *Tet* (D, E, F, J, K et L) dans les caroncules (A à E) et l'intercaroncule (G à L) à 60 jours de gestation. Aucune différence significative de l'expression des gènes *Dnmt* et *Tet* n'a été observée dans les caroncules et l'intercaroncule entre les IA et les clones. Dans les caroncules, *Dnmt1* et *3a* (A et B) sont exprimés à un niveau d'expression d'environ 4. *Dnmt3b* (C) est plus exprimé, avec un niveau entre 0 et 11. *Tet1* (D) a un niveau d'expression d'environ 1, *Tet2* (E) entre 1 et 4 et *Tet3* (F) entre 0 et 6,5. Dans les 6 graphiques des caroncules (A à F), les clones pathologiques ont tendance à être sous exprimés par rapport aux clones non pathologiques et aux IA. Dans l'intercaroncule (G à L) l'expression des *Dnmt* et des *Tet* est égale ou proche de 0. Les clones non pathologiques et pathologiques sont confondus dans le groupe clone (TN) des différents graphiques, ils n'apparaissent donc pas de façon visible.

4-3) Expression des gènes *Dnmt* et *Tet* dans les tissus maternels à 60 jours de gestation

Le niveau d'expression des *Dnmt* et *Tet* dans les caroncules, ainsi que dans le tissu maternel intercaronculaire a été testé sur un petit nombre d'échantillons disponibles issus de gestation après IA et clonage (**figure 58**).

Dans le tissu maternel caronculaire étroitement lié au tissu cotylédonaire fœtal, les gènes *Dnmt* (**figure 58 A à C**) sont très peu exprimés (de 2 à 4 fois moins que dans les cotylédons). Quant aux gènes *Tet*, *Tet1* (**figure 58 D**) est environ 4 fois moins exprimé, *Tet2* (**Figure 58 E**) 2 fois moins exprimé et *Tet3* (**figure 58 F**) a le même niveau d'expression, si l'on compare avec l'expression des gènes dans les cotylédons.

L'expression des *Dnmt* et des *Tet* est proche ou égale à 0 dans le tissu maternel intercaronculaire (**figure 58 G à L**) en contact avec le chorion du placenta.

Dans les caroncules, une tendance à la sous-expression des gènes d'apposition de la 5mC et de la 5hmC est remarquée chez les clones pathologiques par rapport aux clones non pathologiques et aux IA.

Ces données démontrent que les profils d'expression des gènes *Dnmt* et *Tet* observés dans les cotylédons sont bien spécifiques de ce tissu et ne sont pas dus à une contamination par du tissu caronculaire maternel.

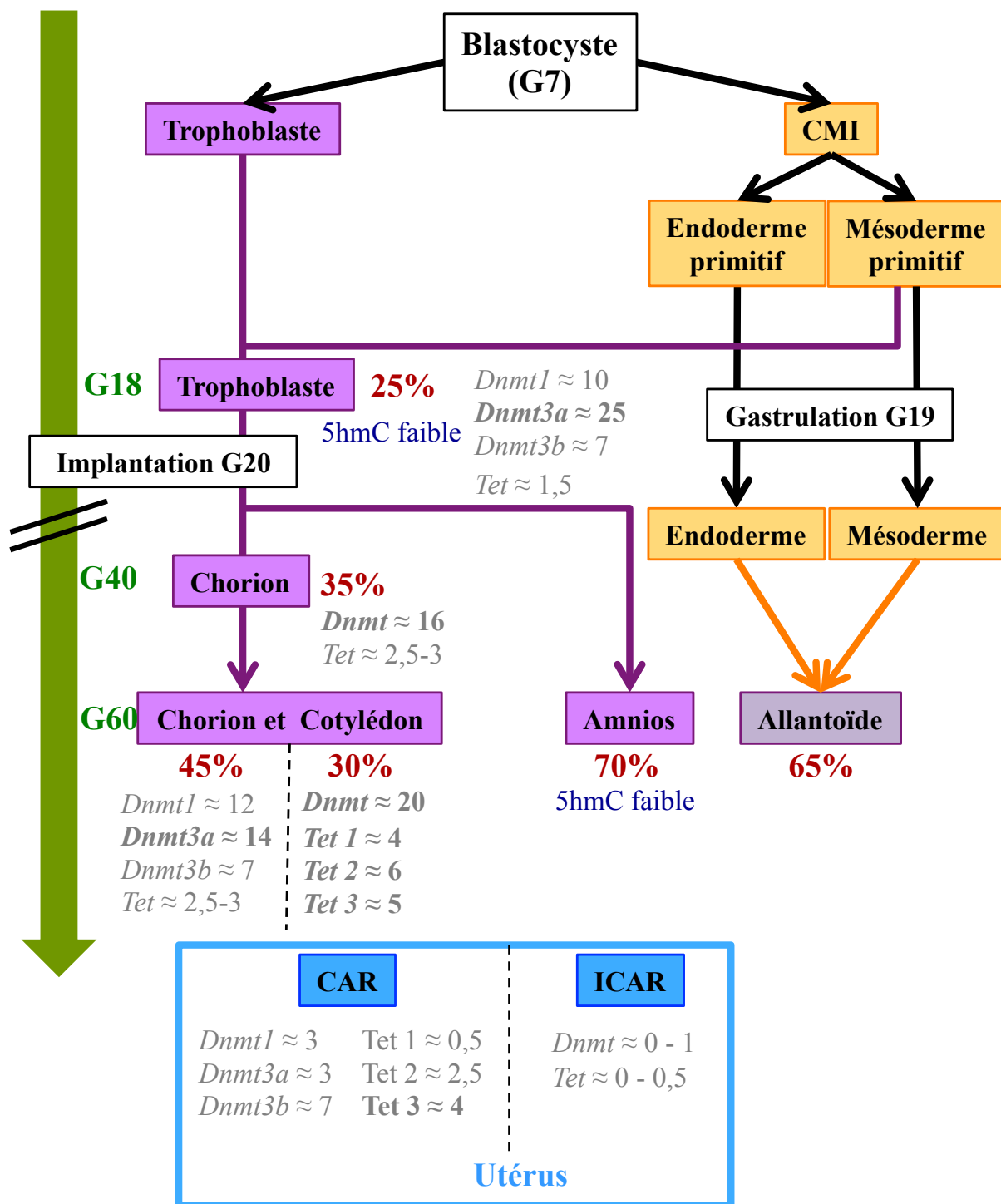


Figure 59 : Représentation des résultats du devenir de la méthylation et de l'hydroxyméthylation de l'ADN dans le lignage trophoblastique. Reprise de la figure 13 afin de regrouper tous les résultats. Il est donc plus simple de les visualiser pour les exploiter.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La première question posée dans ce travail est **le devenir épigénétique du lignage trophoblastique au cours de la gestation chez le bovin.**

Au cours du développement embryonnaire, le **trophoblaste** est le premier tissu à se différencier. Au stade blastocyste, les cellules trophoblastiques entourent les cellules de la masse interne (CMI), pluripotentes. Chez la souris et le bovin, le trophoblaste est décrit comme hypométhylé par rapport aux CMI (pour le bovin, [Santos et al., 2003](#)) au stade blastocyste. L'hypométhylation du trophoblaste serait garante de la possibilité d'une expression d'une large gamme de gènes au cours de la gestation. En effet, les fonctions placentaires sont multiples et nécessitent l'expression de gènes intervenant dans de nombreux processus : fonctions d'échanges placentaires, de sécrétion d'hormones et de barrière immunologique. Au contraire dans les CMI, l'hyperméthylation d'un grand nombre de gènes permettrait une inhibition de leur expression tout en favorisant celles des gènes hypométhylés, impliqués dans la pluripotence (*Nanog*, *Pou5f1* (*Oct4*), *Sox2*) ([Pfeffer and Pearton, 2012](#)).

A partir de 7 jours de gestation, le conceptus bovin subit une élongation associée à une croissance du trophoblaste qui se tapisse de mésoderme primitif embryonnaire jusqu'à l'implantation. A 20-21 jours, un repliement du trophoblaste permet la formation de l'amnios. Au-delà de ce stade, le trophoblaste devient chorion. Les différents stades analysés (18, 40 et 60 jours de gestation) permettent un suivi de la mise en place de ces tissus extra-embryonnaires.

Au cours de ce travail, nous avons étudié la méthylation globale de ces différents tissus par la technique du LUMA. A 18 jours de gestation, le trophoblaste présente un taux de méthylation d'environ 25% (**figure 59**). Par immunohistofluorescence en utilisant un anticorps anti-5mC (étude effectuée au laboratoire par Michel Guillomot), aucune cellule n'est marquée à ce stade. La sensibilité de l'anticorps anti-5mC ne permet probablement pas la détection de la faible quantité de méthylation observée dans ce tissu. A ce stade, le gène *Dnmt3a* est fortement exprimé par rapport aux gènes *Dnmt1* et *Dnmt3b*. La faible méthylation observée pourrait être due à l'action de DNMT3a. La balance d'expression des gènes *Dnmt3a* et *Dnmt3b* semble spécifique non seulement de l'espèce bovine mais aussi du trophoblaste. En effet, chez la souris, les gènes *Dnmt3a* et *Dnmt3b* sont faiblement exprimés jusqu'à l'implantation ([Watanabe et al., 2002](#)). Par ailleurs, Golding et al démontrent une balance d'expression inversée dans le blastocyste bovin ($Dnmt3a < Dnmt3b$) ([Golding et Westhusin, 2003](#)).

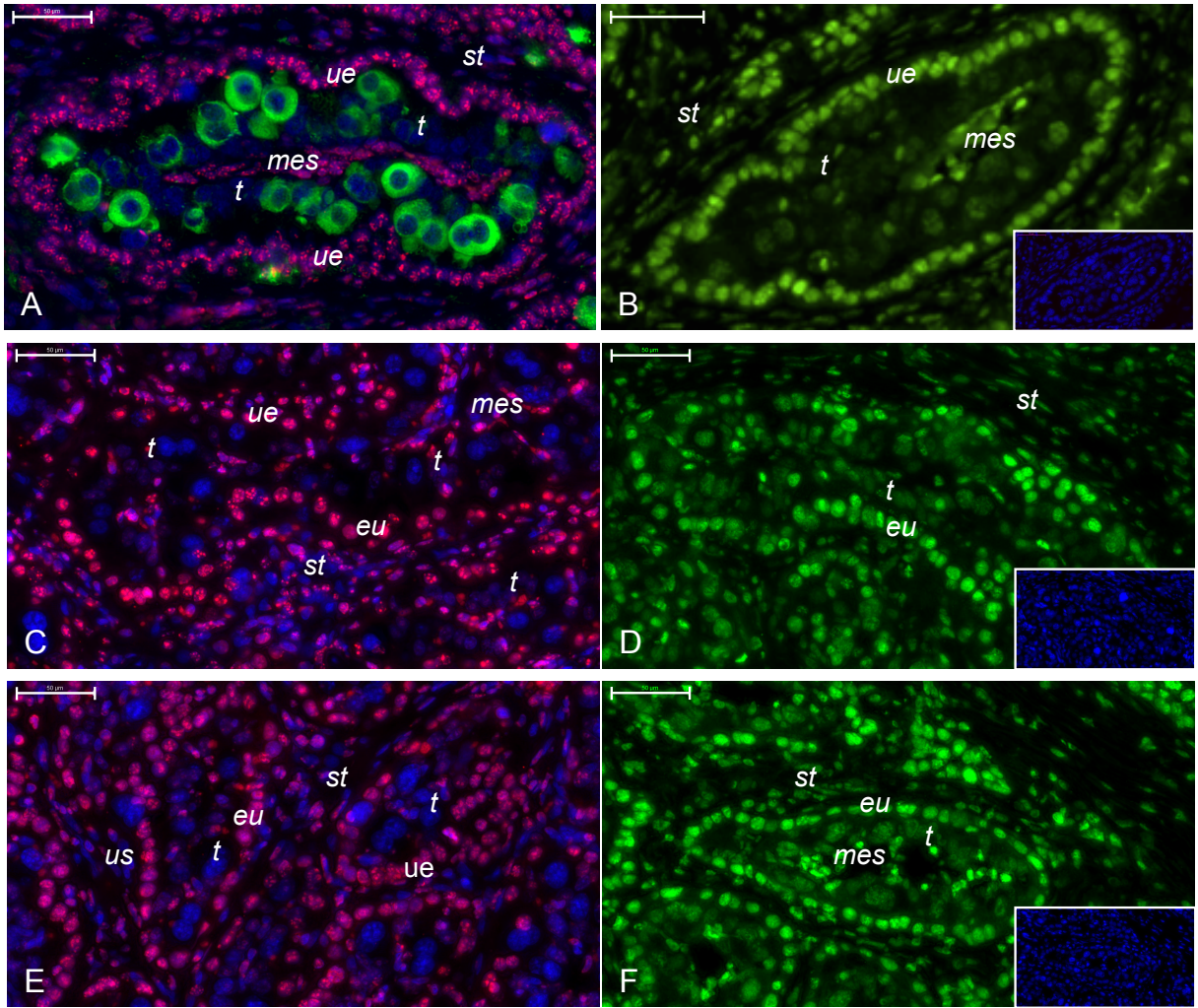


Figure 60 : Immunohistofluorescence de la méthylation (A, C et E) et de l'hydroxyméthylation (B, D et F) de l'ADN dans les placentomes bovins obtenus par IA à 60 jours de gestation (A et B) et à terme (C et D) ou obtenus par clonage par transfert de cellules somatiques adultes à terme (E et F). A), C) et E) Les images combinent le marquage de l'ADN par du DAPI (en bleu) avec le marquage de la 5mC (en rouge) accompagné d'un marquage des cellules binucléées (en vert) pour le placentome IA à 62 jours de gestation (A). La 5mC est marquée dans les cellules du mésoderme villositaire (mes), dans l'épithélium des cryptes utérines (eu) et dans le stroma (st). Par contre, une absence de marquage 5mC est observée dans le trophoblaste (t) et dans les cellules binucléées. Le marquage ne change pas d'un stade à l'autre et d'une modalité à l'autre. B), D) et F) La 5hmC est marquée du côté utérin et chorionique. Le marquage ne change pas d'un stade à l'autre et d'une modalité à l'autre. Barre d'échelle = 50μm .

L'hydroxyméthylation, mesurée par la méthode ELISA ou par immunohistofluorescence (utilisation d'un anticorps anti-5hmC) est quasiment nulle. Par ailleurs, l'expression des gènes *Tet* est très faible. Cette marque est donc très peu représentée dans le trophoblaste à ce stade.

Au sein du **lignage trophoblastique**, la méthylation globale de l'ADN augmente entre 18 et 60 jours de gestation: de 25% dans le trophoblaste à 18 jours, elle passe à 35% dans le chorion à 40 jours, 45 % dans le chorion et 70% dans l'amnios à 60 jours (**figure 59**). Il est généralement admis que plus un tissu est différencié, plus il est méthylé. L'amnios est très méthylé, peut-être parce que ce tissu a un rôle bien défini alors que le chorion a des rôles multiples bien distincts (évoqués précédemment). L'hydroxyméthylation est présente en petite quantité dans l'amnios, 10 fois moins que la méthylation (ELISA).

Dans **le chorion**, l'expression des *Tet* reste faible, que ce soit à 40 ou à 60 jours de gestation. En revanche, l'expression des gènes *Dnmt* est plutôt forte à 40 jours de gestation puis diminue légèrement à 60 jours de gestation, selon le gène analysé (**figure 59**). Alors que l'expression des gènes *Dnmt* est forte, peu de méthylation est détectée dans le chorion. Cette apparente incohérence pourrait s'expliquer soit par des régulations de la traduction des ARNm en protéine, soit par la stabilité des protéines ou soit par de leur localisation nucléaire.

Les cotylédons sont formés par le repliement du chorion en bouquets villositaires, face aux caroncules de la paroi utérine, entre 40 et 60 jours de gestation. L'association d'un cotylédon et d'une caroncule forme un placentome. Le taux de méthylation des cotylédons à 60 jours de gestation est d'environ de 30%. Une différence significative du taux de méthylation globale entre le chorion et les cotylédons est observée malgré leur appartenance au même lignage. Ce différentiel de méthylation peut être relié aux rôles respectifs de ces deux structures, les cotylédons étant plus sollicités que le chorion pour les échanges gazeux et nutritionnels fœto-maternel et la sécrétion d'hormones. Au laboratoire, Michel Guillomot a déterminé la distribution des 2 marques, 5mC et 5hmC, sur les coupes de placentomes bovins (gestation après IA ou clonage) à différents stades de gestation (**figure 60**). Pour chacune des marques étudiées, le marquage est nucléaire. Le stade de gestation ainsi que la modalité (IA ou clonage) ne changent ni la localisation nucléaire ni l'intensité intra-tissulaire du marquage. La méthylation (en rouge, **figure 60 A, C et E**) est présente dans l'épithélium utérin des cryptes caronculaires, ainsi que dans le mésoderme du chorion. En revanche, aucun marquage n'est détecté dans les cellules trophoblastiques du chorion, qu'elles soient mononucléées ou binucléées (en vert, **figure 60 A**). Dans les cellules marquées, le signal nucléaire est sous

forme granulaire avec une localisation précise et compacte. Ces résultats de distribution cellulaire de la méthylation nous amène à penser que le taux de méthylation détecté dans le chorion et les cotylédons par LUMA est majoritairement localisé dans les noyaux des cellules mésodermiques associées à ces tissus. L'hydroxyméthylation (en vert, **figure 60 B, D et F**) est présente dans tous les tissus du placentome, avec une intensité plus ou moins forte. Le marquage est plus fort dans l'épithélium utérin et le mésoderme chorionique et moins fort dans le trophoblaste chorionique. Dans les cellules marquées, le signal nucléaire est plutôt diffus. Un marquage aussi net en hydroxyméthylation est plutôt étonnant, sachant que c'est une marque décrite comme faiblement représentée dans les différents tissus autres que le cerveau et les cellules souches embryonnaires. Nous observons que la 5hmC est 10 fois plus faible par ELISA que la 5mC dans nos échantillons. Selon Calabrese et al, l'anticorps anti-5hmC utilisé est particulièrement affiné pour la 5hmC et le signal obtenu est toujours très fort même en présence d'une faible quantité de 5hmC ([Calabrese et al., 2014](#)). La spécificité de cet anticorps a aussi parfois été remise en question (communication orale de S. Kriaucionis et [\(Kriaucionis and Heintz, 2009\)](#)).

Dans les cotylédons, une forte dispersion intra-groupe du taux de méthylation globale a été spécifiquement observée. A 60 jours de gestation, il est aussi observé que les cotylédons peuvent être plus ou moins développés en fonction de leur position par rapport au cordon ombilical, et posséder plus ou moins de mésoderme : le marquage 5mC dans les cotylédons étant fort dans le mésoderme et quasiment inexistant dans le trophoblaste (**figure 60 A**). Une étude du taux de méthylation en fonction de la taille et aussi du nombre de cotylédons au sein d'un placenta a été effectuée. Le taux de méthylation n'est corrélé ni à la taille, ni au nombre total de cotylédons sur un placenta. La proportion de mésoderme dans les cotylédons pourrait varier et expliquer cette variation de méthylation. La méthylation globale des cotylédons aux stades tardifs de la gestation a aussi été analysée. La méthylation atteint une phase plateau à 60 jours de gestation, diminue légèrement à 90 jours de gestation et augmente à nouveau aux stades les plus tardifs. La diminution à 90 jours de gestation ne s'explique pas et nous n'avons pas assez d'échantillons pour être sûrs de nos résultats. C'est aussi valable pour les stades les plus tardifs. La méthylation semble augmentée avec le développement des cotylédons. Nous observons que les niveaux d'expression des gènes *Dnmt* et *Tet* sont élevés dans les cotylédons en comparaison avec les autres tissus (**figure 59**). En analysant l'expression des gènes *Dnmt* et *Tet* dans les caroncules, nous montrons que l'expression des gènes la machinerie épigénétique y est relativement faible et ne peut en aucun cas expliquer les taux observés dans les cotylédons par une simple contamination.

Au vu de l'expression des *Tet* et des images d'immunohistofluorescence, il serait judicieux de doser la 5hmC dans les cotylédons et dans le chorion. La méthode ELISA que nous avons utilisée présente des inconvénients nous amenant à chercher une nouvelle technique d'analyse de l'hydroxyméthylation globale. A court terme, il serait possible d'utiliser un autre kit ELISA (Global 5-hmC Quantification, Active Motif). Ce kit préconise la préparation des ADNg avant le dépôt sur plaque (dénaturation 10 min à 98°C) absente du kit ELISA utilisé dans nos analyses. Une autre possibilité serait de poursuivre la mise au point d'une analyse associant glycosylation, digestion enzymatique et pyroséquençage.

L'allantoïde est issue de l'endoderme et du mésoderme embryonnaire. Le taux de méthylation globale est d'environ 65%. Cette hyperméthylation peut être expliquée comme pour l'amnios, par une différenciation très spécifique du tissu qui a pour seule fonction le stock et la gestion des déchets du fœtus.

Enfin nous soulignerons que le taux de méthylation observé dans chacun des 4 tissus extra-embryonnaires est très conservé, même après croisement de différentes races de vaches. Une telle conservation du taux de méthylation des différents tissus extra-embryonnaires suggère un rôle majeur et spécifique de cette marque épigénétique dans le contrôle du fonctionnement du génome dans les tissus.

L'expression des gènes *Tet* et *Dnmt* n'est pas toujours cohérente avec les taux de 5mC ou de 5hmC détectés par LUMA et ELISA. Par exemple dans le chorion, le taux de méthylation est faible avec une expression forte des gènes *Dnmt*, alors que dans les caroncules, le taux de méthylation est fort avec une faible expression des gènes *Dnmt*. Il est possible d'imaginer que les ARNm *Dnmt* ne sont pas traduits en protéines, mais stockés dans le chorion. Le faible taux de protéines actives pourrait être alors corrélé au faible taux de méthylation. A l'inverse, dans l'épithélium utérin, les ARNm *Dnmt* seraient immédiatement traduits en protéines actives, ce qui expliquerait le taux de méthylation. Dans la littérature, peu de données concernent la relation entre l'expression génique et protéique pour ces gènes. Une étude de l'expression des gènes *Dnmt3a* et *Dnmt3b* a été effectuée en regard de la production des enzymes DNMT3A et DNMT3b dans l'utérus bovin avant et pendant l'implantation ([O'Doherty et al., 2016](#)). Dans ce tissu, il est aussi montré que l'expression de ces gènes n'est pas corrélée positivement avec les quantités d'enzymes retrouvées dans le même tissu.

Il serait donc important de doser les taux de protéines DNMT et TET dans les tissus extra-embryonnaires. Pour cela il est possible de mettre en œuvre des analyses soit par immunohistofluorescence soit par Western blot. Il existe des anticorps anti-DNMT et anti-

TET. Développés contre les protéines humaines ou murines, ils ne présentent pas forcément des caractéristiques permettant une utilisation chez le bovin. Nous en avons testés plusieurs qui à ce jour ne donnent pas de résultats satisfaisants. Il est tout de même important de poursuivre nos efforts de recherche d'anticorps utilisables (voir ceux utilisés par [O'Doherty et al., 2016](#)).

Nous montrons aussi une différence du taux de méthylation entre les IA mâles et les IA femelles qui n'est vraiment significative que dans l'amnios et le chorion à 60 jours de gestation. Ces différences entre placentas de fœtus mâles et de fœtus femelles sont aussi décrites chez d'autres espèces ([Gabory et al., 2013](#)). Les premières divisions cellulaires sont plus rapides dans un embryon femelle que dans un embryon mâle chez la souris et le bovin. Une étude chez le bovin montre que 1/3 de l'expression génique au stade blastocyste est différente chez les mâles et les femelles ([Bermejo-Alvarez et al., 2010](#)). De plus, au stade blastocyste après FIV, l'expression de *Dnmt3a* et *Dnmt3b* (méthyl-transférase *de novo*) est plus forte chez les mâles que chez les femelles ([Bermejo-Alvarez et al., 2007](#)). Mais aux stades plus tardifs que nous avons analysés, l'expression des gènes *Dnmt* n'est pas significativement différente entre mâles et femelles.

Pour étudier le dimorphisme sexuel dans le chorion et l'amnios, il serait intéressant d'analyser les régions différentiellement méthylées et d'identifier les gènes associés. Des analyses complémentaires d'expression génique et de méthylation par une méthode gène candidat (bisulfite-PCR-pyroséquençage) pourraient être proposées.

La seconde question posée au cours de ce travail est **l'effet de la reprogrammation épigénétique nécessaire à l'obtention des clones sur les tissus extra-embryonnaires.**

Afin d'analyser l'effet de la reprogrammation, les tissus extra-embryonnaires des clones femelles obtenus par transfert du noyau somatique de la vache 5538 dans un ovocyte énucléé sont comparés à ceux des individus obtenus par IA à 18, 40 et 60 jours de gestation. Notre hypothèse est que des erreurs de reprogrammation épigénétique du noyau somatique, en terme de méthylation, pourraient entraîner au cours de la gestation le développement de pathologies placentaires associées au syndrome du gros veau. De telles perturbations pourraient être d'amplitude variable ou atteindre des régions différentes ce qui pourrait contribuer à la grande variabilité de développement observée entre fœtus clonés.

Dans l'ensemble des analyses que nous avons conduites, nous n'avons observé un différentiel de méthylation que dans le trophoblaste à 18 jours de gestation et dans l'amnios à 60 jours de gestation, qui se traduit par une hyperméthylation importante du trophoblaste et une

hypométhylation de l'amnios, chez les clones. Systématiquement pour tous les clones pathologiques, nous trouvons une hypométhylation par rapport aux clones non pathologiques (allantoïde, amnios et chorion à 60 jours de gestation). L'expression des gènes *Dnmt* et *Tet* est plus faible dans les clones pathologiques que dans les clones non pathologiques. Par contre en terme de quantité de 5hmC (ELISA), d'expression des gènes *Dnmt* et *Tet* (RT-PCRq), et de localisation de la 5mC et de la 5hmC (immunofluorescence), aucune différence n'a été observée entre IA et clone.

Pour tous les clones pathologiques analysés une hypométhylation a été observée dans différents tissus, associée à une diminution de l'expression des gènes *Dnmt* et *Tet*. Dans ce cas, les fœtus présentaient tous un arrêt du développement à un stade antérieur au stade de prélèvement. Il est néanmoins difficile de déterminer si l'hypométhylation est une cause ou une conséquence de cet arrêt de développement.

L'hyperméthylation des trophoblastes à 18 jours de gestation des clones pourrait être une perturbation résiduelle de la reprogrammation épigénétique du noyau somatique, comme constaté par (Santos et al., 2003) au stade blastocyste. De plus, les embryons clonés sont hyperméthylés par rapport aux embryons obtenus par FIV, de manière globale (immunofluorescence) et de manière séquence spécifique (séquence satellite) (Zhang et al., 2016). Par contre, les auteurs démontrent une absence totale de 5hmC chez les clones en immunofluorescence. Nous avons aussi observé une grande variabilité de méthylation (de 22 à 37%) entre conceptus cloné qui pourrait être un reflet de la variabilité de compétence du développement. En effet, la période d'implantation est critique pour les conceptus issus du clonage avec plus de 45% de perte (figure 22 et Heyman, 2005).

Aux stades plus tardifs, la plupart des études sont menées sur des gènes candidats, en particulier sur des gènes soumis à l'empreinte parentale. Ces gènes jouent un rôle critique dans le développement placentaire, plus précisément dans la régulation de la croissance du fœtus à travers les échanges nutritionnels fœto-maternels. Le syndrome du gros veau est associé à la dérégulation de la méthylation d'une région du contrôle de l'empreinte parentale (*KcDMR1*) (Chen et al., 2013). Néanmoins, les données rapportent soit une hypométhylation (DMR de *SNRPN*, *IGF2R* (Smith et al., 2012)) soit une hyperméthylation (Dindot et al., 2004) soit un état mosaïque de l'ADN (Kang et al., 2002). Ces données soulignent les effets stochastiques de la reprogrammation nucléaire. Une étude pangénomique de la méthylation de l'ADN tente de mettre en évidence des altérations de cette méthylation par la méthode de MedIP-Seq (Su et al., 2014). Les auteurs démontrent une hypométhylation dans les placentomes de clones dans les régions géniques, sans modification de l'expression des gènes

analysée par (ARN-Seq). Cependant, les auteurs utilisent des prélèvements de placentomes à terme et ne précisent pas si une séparation des compartiments fœto-maternels a été effectuée. L'hétérogénéité du prélèvement pourrait nuire à l'interprétation des résultats.

Des trophoblastes à 18 jours de gestation et du chorion à 40 et 60 jours de gestation ont été analysés en MedIP-Seq au laboratoire. L'analyse des données brutes est en cours, afin de détecter les séquences différentiellement méthylées entre IA et clones et ensuite valider ces analyses par pyroséquençage sur des gènes candidats.

D'autres marques épigénétiques peuvent être impliquées dans la perturbation de la reprogrammation par le clonage, notamment les miARN ([Hossain et al., 2014](#)). C'est la première étude qui fournit un aperçu pangénomique de l'expression des miARN dans le placenta bovin. Les expressions de 377 miARN ont été analysées à 60 jours de gestation en comparant un mélange d'allanto-chorion et de cotylédons issus d'IA (n=3), de FIV (n=3) et de clones (n=3). Chez les clones, il est trouvé une augmentation de 4 miARN et une diminution de 204 miARN par rapport aux deux autres modes de production d'embryons. Les cibles potentielles de ces miARN n'ont pas été déterminées.

Nous avons pris le soin de séparer les différents tissus extra-embryonnaires au cours des prélèvements et nous montrons des différences significatives du taux de méthylation. Nos données et celles de la littérature soulignent la nécessité d'étendre nos analyses au niveau des modifications des histones et des miARN, puisque ces marques épigénétiques peuvent être aussi perturbées lors de la reprogrammation.

Les modifications post-traductionnelles des histones étant très impliquées dans la différenciation des tissus, une étude par immunofluorescence pourrait être intéressante afin de voir dans quels tissus et dans quelles cellules les marques répressives et permissives se positionnent et si il y a une cohérence entre l'ensemble des modifications : la méthylation, l'hydroxyméthylation, l'expression des gènes *Dnmt* et *Tet* et la présence des protéines issues de l'expression.

ANNEXE : Liste des échantillons de la cohorte bovine et utilisations

stade	tissu	sexe	modalité	numéro bovin Holstein x Holstein		
				LUMA	RT-PCRq	ELISA
G18	Trophoblaste	Mâle	IA	F-E123A	F-E123	F-E123A
				F-E123B		F-E123B
				F-E123D	F-E123D	F-E123D
				F-E109A	F-E109	F-E109A
				F-E109B		F-E109B
				F-E109D		F-E109D
				F-E109E		F-E109E
				F-E129D	F-E129D	F-E129D
				F-E129E		F-E129E
				TEE 1 stade 4		TEE 1 stade 4
				TEE 2 stade 4		TEE 2 stade 4
				TEE 4 stade 4		TEE 4 stade 4
				TEE 5 stade 4		TEE 5 stade 4
				F0413	F0413	F0413
				F1099	F1099	F1099
				F-E137	F-E137	F-E137
				F-E124		
				F-E128	F-E128A	
				F-E128B	F-E128B	
				F-E123C		F-E123C
				F-E058		
				TEE stade 4		TEE stade 4
					F1093	
				F1094	F1094	F1094
				F-E125		F-E125
				F-E059A		
					F-E059B	
				F-E118A	F-E118A	
				F-E118B	F-E118B	
		Femelle	TN	F-E141A	F-E141A	F-E141A
				F-E116B		F-E116B
				F-E119		
				F-E115A		F-E115A
				F1104	F1104	F1104
				F1107	F1107	F1107
				F-E083A		F-E083A
				F-E088		F-E088
				F-E110		F-E110
				F-E121A		F-E121A
				F-E142	F-E142	F-E142
				F-E146		F-E146
				F-E148	F-E148	F-E148
				TEE 784 stade 4		TEE 784 stade 4

stade	tissu	sexe	modalité	numéro bovin Holstein x Holstein			
				LUMA	RT-PCRq	ELISA	
G40	Chorion	Mâle	IA	F0318	F0318		
				F0436	F0436		
				F0540	F0540		
				F0524	F0524		
				F0742	F0742		
				F0705	F0705		
				F0730	F0730		
				F0655			
				F0744			
				F0811			
		Femelle		F0209	F0209		
				F0701	F0701		
				F0642	F0642		
				F0636	F0636		
				F0530	F0530		
				F0635			
				F0700			
				F-E080	F-E080		
				F-E107	F-E107		
				F-E139	F-E139		
				TN	F-E069	F-E069	
					F-E087	F-E087	
					F0235		
					F0534	F0534	
					F0142	F0142	
G60	Chorion	Mâle	IA	F-E065	F-E065		
				F0510	F0510		
				F0422	F0422		
				F0612			
				F0721	F0721		
				F0840			
				F0833	F0833		
				F0615	F0615		
				F097			
				F0419			
		F0640					
		F0835					
		F0838					
		Femelle		TN	F0731	F0731	
					F0734	F0734	
			F-E062		F-E062		
			F-E034A		F-E034A		
			F0704		F0704		
			F-E023				
			F-E030		F-E030		
			F-E074		F-E074		

stade	tissu	sexe	modalité	numéro bovin Holstein x Holstein			
				LUMA	RT-PCRq	ELISA	
G60	cotyledon	Mâle	IA	F-E098	F-E098		
				F-E100	F-E100		
				F-E101	F-E101		
				F0510	F0510		
				F-E065	F-E065		
				F0422			
				F0612			
				F0721			
		Femelle		F-E097	F-E097		
				F0551	F0551		
				F0615	F0615		
				F0833	F0833		
				F0419			
				F0640			
				F0835			
				TN	F-E034	F-E034	
		F0731			F0731		
		F0734			F0734		
F-E062	F-E062						
F-E074	F-E074						
plus de cotyl	F-E023						
D60	Allantoïde	Mâle	IA	F-E101			
				F-E100			
				F0510			
				F-E098			
				F-E065			
				F0612			
				F0721			
				F0422			
				Femelle	F-E097		
					F0551		
					F0833		
					F615		
		F0419					
		F0640					
		F0835					
		TN			F0731		
					F0734		
					F-E034		
			F-E062				
			F0704				
			F-E074				

stade	tissu	sexe	modalité	numéro bovin Holstein x Holstein		
				LUMA	RT-PCRq	ELISA
G60	Amnios	Mâle	IA	F-E098		F-E098
				F-E100		F-E100
				F-E065		F-E065
				F0510		F0510
				F-E101		F-E101
				F0422		F0422
				F0840		F0840
				F0721		F0721
				F0612		F0612
				F0615		F0615
				F0833		F0833
				F-E097		F-E097
				F0551		F0551
				F0640		F0640
				F0419		F0419
				F0835		F0835
				F0838		F0838
				Femelle	TN	F0734
		F0731				F0731
		F-E034A				F-E034A
		F-E062				F-E062
		F0704				F0704
		F-E023A				F-E023A
		F-E023B				F-E023B
		F-E030				
		F-E074A				F-E074A
		F-E074B				F-E074B
G60	Muscle	Mâle	AI	F0510		F0510
				F098		F098
				F100		F100
				F101		F101
				F-E065		F-E065
				F0612		
				F0840		
				F0721		
		Femelle		F0551		F0551
				F0615		F0615
				F0833		F0833
				F0419		
				F0835		
				F0838		

stade	tissu	sexe	modalité	numéro bovin Holstein x Holstein		
				LUMA	RT-PCRq	ELISA
G60	Cœur	Mâle	IA	F0510		F0510
				F098		F098
				F-E065		F-E065
				F0840		
				F0721		
				F0422		
				F0612		
		Femelle		F0551		F0551
				F0615		F0615
				F0833		F0833
				F0640		
				F0838		
				F0835		
	Cerveau	Mâle		F0510		F0510
				F098		F098
				F100		F100
				F101		F101
				F-E065		F-E065
				F0612		
				F0840		
		Femelle		F0721		
				F0551		F0551
				F0615		F0615
				F0833		F0833
				F097		F097
				F0835		
	F0838					
	Foie	Mâle		F0510		F0510
				F098		F098
				F100		F100
				F101		F101
				F-E065		F-E065
				F0422		
				F0612		
		Femelle		F0840		
				F0551		F0551
F0615				F0615		
F0833				F0833		
F097				F097		
F0419						
F0640						
F0835						
F0838						

stade	tissu	sexe	race	modalité	LUMA
G60	Chorion	Mâle	Holstein X Charolais	IA	F6160
					F0529
					F0531
					F0532
					F4167
					F0538
		F0536			
		F0535			
		F0430			
		F2362			
		F0428			
		F002			
	F0449				
	F0578				
	F0622				
	F2033				
	F0430				
	F2362				
	F0229				
	F0428				
	F0460				
	F0461				
	F0625				
	F0629				
	F6160				
	F002				
	F0529				
	F0531				
	F0532				
	F0578				
	F2033				
	F4167				
	F0622				
	F0536				
	F0461				
	F0625				
	F0629				
	F2362				
	F0430				
	F0428				
	F0460				
Allantoïde	Mâle	F6160			
		F002			
		F0529			
		F0531			
		F0532			
		F0578			
		F2033			
		F4167			
		F0622			
		F0536			
		F0461			
		F0625			
	F0629				
	F2362				
	F0430				
	F0428				
	F0460				
	Femelle	F6160			
		F002			
F0529					
F0531					
F0532					
F0578					
F2033					

stade	tissu	sexe	race	modalité	LUMA
G60	amnios	Mâle	Holstein X Charolais	IA	F6160
					F002
					F0302
					F0529
					F0531
					F0532
					F0578
					F0622
		F4167			
		F0538			
		F0536			
		F0430			
		F0229			
		F0426			
		F0460			
		F0461			
	F0629				
	F0535				
	F2362				
	Chorion	Mâle	Bos Taurus X Bos Indicus		F-E063
		Femelle			F-E152
					F-E116
					F-E057
	cotylédon	Mâle			F-E060
		Femelle			F-E151
					F-E063
					F-E152
	allantoïde	Femelle			F-E116
					F-E057
					F-E060
		Amnios			Mâle
	Femelle				F-E116
					F-E057
					F-E060
	F-E063				
	F-E152				
	F-E116				
	F-E057				
	F-E151				

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmadian, A., Ehn, M., Hober, S., 2006. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clin. Chim. Acta* 363, 83–94. doi:10.1016/j.cccn.2005.04.038
- Attig, L., Vigé, A., Gabory, A., Karimi, M., Beauger, A., Gross, M.-S., Athias, A., Gallou-Kabani, C., Gambert, P., Ekstrom, T.J., Jais, J.-P., Junien, C., 2013. Dietary Alleviation of Maternal Obesity and Diabetes: Increased Resistance to Diet-Induced Obesity Transcriptional and Epigenetic Signatures. *PLoS ONE* 8, e66816. doi:10.1371/journal.pone.0066816
- Beaujean, N., Hartshorne, G., Cavilla, J., Taylor, J., Gardner, J., Wilmut, I., Meehan, R., Young, L., 2004. Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Curr. Biol. CB* 14, R266–267. doi:10.1016/j.cub.2004.03.019
- Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D., Rath, D., Lonergan, P., Gutierrez-Adan, A., 2010. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 3394–3399. doi:10.1073/pnas.0913843107
- Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D., Rath, D., Lonergan, P., Gutierrez-Adan, A., 2007. Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced in vitro. *Physiol. Genomics* 32, 264–272. doi:10.1152/physiolgenomics.00234.2007
- Bestor, T.H., 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2395–2402.
- Booth, M.J., Branco, M.R., Ficuz, G., Oxley, D., Krueger, F., Reik, W., Balasubramanian, S., 2012. Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution. *Science* 336, 934–937. doi:10.1126/science.1220671
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Calabrese, R., Valentini, E., Ciccarone, F., Guastafierro, T., Bacalini, M.G., Ricigliano, V. a. G., Zampieri, M., Annibali, V., Mechelli, R., Franceschi, C., Salvetti, M., Caiafa, P., 2014. TET2 gene expression and 5-hydroxymethylcytosine level in multiple sclerosis peripheral blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 1130–1136. doi:10.1016/j.bbdis.2014.04.010
- Chavatte-Palmer, P., Camous, S., Jammes, H., Le Cleac'h, N., Guillomot, M., Lee, R.S.F., 2012. Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. *Placenta* 33, S99–S104. doi:10.1016/j.placenta.2011.09.012
- Chavatte-Palmer, P., Heyman, Y., 2006a. Les bovins clonés sont-ils normaux? *Point Vét., Reproduction des ruminants : gestation, néonatalogie et post-partum* 40–44.
- Chavatte-Palmer, P., Heyman, Y., 2006b. Les bovins clonés : applications et risques. *Point Vét., Reproduction des ruminants : gestation, néonatalogie et post-partum* 46–49.
- Chavatte-Palmer, P., Tarrade, A., 2016. Placentation in different mammalian species. *Ann. Endocrinol.* 77, 67–74. doi:10.1016/j.ando.2016.04.006
- Chen, Z., Robbins, K.M., Wells, K.D., Rivera, R.M., 2013. Large offspring syndrome: A bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. *Epigenetics* 8, 591–601. doi:10.4161/epi.24655

- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de León, F.A., Robl, J.M., 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280, 1256–1258.
- Constant, F., 2006. Large Offspring or Large Placenta Syndrome? Morphometric Analysis of Late Gestation Bovine Placentomes from Somatic Nuclear Transfer Pregnancies Complicated by Hydrallantois. *Biol. Reprod.* 75, 122–130. doi:10.1095/biolreprod.106.051581
- Constant, F., Guillomot, M., 2006. Formation et fonctionnement du placenta des bovidés. *Point Vét., Reproduction des ruminants : gestation, néonatalogie et post-partum* 6–11.
- De Montera, B., El Zeihery, D., Müller, S., Jammes, H., Brem, G., Reichenbach, H.-D., Scheipl, F., Chavatte-Palmer, P., Zakhartchenko, V., Schmitz, O.J., others, 2010. Quantification of leukocyte genomic 5-methylcytosine levels reveals epigenetic plasticity in healthy adult cloned cattle. *Cell. Reprogramming Former. Cloning Stem Cells* 12, 175–181.
- Dindot, S.V., Farin, P.W., Farin, C.E., Romano, J., Walker, S., Long, C., Piedrahita, J.A., 2004. Epigenetic and genomic imprinting analysis in nuclear transfer derived *Bos gaurus*/*Bos taurus* hybrid fetuses. *Biol. Reprod.* 71, 470–478. doi:10.1095/biolreprod.103.025775
- Enright, B.P., 2003. Epigenetic Characteristics and Development of Embryos Cloned from Donor Cells Treated by Trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.* 69, 896–901. doi:10.1095/biolreprod.103.017954
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., Paul, C.L., 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 1827–1831.
- Gabory, A., Roseboom, T.J., Moore, T., Moore, L.G., Junien, C., 2013. Placental contribution to the origins of sexual dimorphism in health and diseases: sex chromosomes and epigenetics. *Biol. Sex Differ.* 4, 1.
- Globisch, D., Münzel, M., Müller, M., Michalakakis, S., Wagner, M., Koch, S., Brückl, T., Biel, M., Carell, T., 2010. Tissue Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine and Search for Active Demethylation Intermediates. *PLoS ONE* 5, e15367. doi:10.1371/journal.pone.0015367
- Golding, M.C., Westhusin, M.E., 2003. Analysis of DNA (cytosine 5) methyltransferase mRNA sequence and expression in bovine preimplantation embryos, fetal and adult tissues. *Gene Expr. Patterns* 3, 551–558.
- Gräff, J., Mansuy, I.M., 2008. Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav. Brain Res.* 192, 70–87. doi:10.1016/j.bbr.2008.01.021
- Gu, H., Smith, Z.D., Bock, C., Boyle, P., Gnirke, A., Meissner, A., 2011. Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nat. Protoc.* 6, 468–481. doi:10.1038/nprot.2010.190
- Head, J.A., Mittal, K., Basu, N., 2014. Application of the Luminometric Methylation Assay to ecological species: tissue quality requirements and a survey of DNA methylation levels in animals. *Mol. Ecol. Resour.* n/a–n/a. doi:10.1111/1755-0998.12244

Heijmans, B.T., Tobi, E.W., Stein, A.D., Putter, H., Blauw, G.J., Susser, E.S., Slagboom, P.E., Lumey, L.H., 2008. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 17046–17049.

Hernández, H.G., Tse, M.Y., Pang, S.C., Arboleda, H., Forero, D.A., 2013. Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. *BioTechniques* 55. doi:10.2144/000114087

Heyman, Y., 2005. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 353–361. doi:10.1051/rnd:2005026

Hossain, M.M., Tesfaye, D., Salilew-Wondim, D., Held, E., Pröll, M.J., Rings, F., Kirfel, G., Looft, C., Tholen, E., Uddin, J., Schellander, K., Hoelker, M., 2014. Massive deregulation of miRNAs from nuclear reprogramming errors during trophoblast differentiation for placentogenesis in cloned pregnancy. *BMC Genomics* 15, 43. doi:10.1186/1471-2164-15-43

Ichihanagi, K., 2012. Inhibition of *Msp* I cleavage activity by hydroxymethylation of the CpG site: A concern for DNA modification studies using restriction endonucleases. *Epigenetics* 7, 131–136. doi:10.4161/epi.7.2.18909

Jammes, H., Junien, C., Chavatte-Palmer, P., 2011. Epigenetic control of development and expression of quantitative traits. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 64. doi:10.1071/RD10259

Jeltsch, A., Ehrenhofer-Murray, A., Jurkowski, T.P., Lyko, F., Reuter, G., Ankri, S., Nellen, W., Schaefer, M., Helm, M., 2016. Mechanism and biological role of Dnmt2 in Nucleic Acid Methylation. *RNA Biol.* 1–16. doi:10.1080/15476286.2016.1191737

Jin, S.-G., Kadam, S., Pfeifer, G.P., 2010. Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nucleic Acids Res.* 38, e125–e125. doi:10.1093/nar/gkq223

Kang, Y.-K., Park, J.S., Koo, D.-B., Choi, Y.-H., Kim, S.-U., Lee, K.-K., Han, Y.-M., 2002. Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *EMBO J.* 21, 1092–1100. doi:10.1093/emboj/21.5.1092

Karimi, M., Johansson, S., Stach, D., Corcoran, M., Grandér, D., Schalling, M., Bakalkin, G., Lyko, F., Larsson, C., Ekström, T.J., 2006. LUMA (LUMinometric Methylation Assay)—A high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Exp. Cell Res.* 312, 1989–1995. doi:10.1016/j.yexcr.2006.03.006

Kinde, B., Gabel, H.W., Gilbert, C.S., Griffith, E.C., Greenberg, M.E., 2015. Reading the unique DNA methylation landscape of the brain: Non-CpG methylation, hydroxymethylation, and MeCP2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 6800–6806. doi:10.1073/pnas.1411269112

Kinney, S.M., Chin, H.G., Vaisvila, R., Bitinaite, J., Zheng, Y., Esteve, P.-O., Feng, S., Stroud, H., Jacobsen, S.E., Pradhan, S., 2011. Tissue-specific Distribution and Dynamic Changes of 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian Genomes. *J. Biol. Chem.* 286, 24685–24693. doi:10.1074/jbc.M110.217083

Kriaucionis, S., Heintz, N., 2009. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324, 929–930. doi:10.1126/science.1169786

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27, 95–125. doi:10.1016/j.mam.2005.12.007

Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R., 2008. Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation. *Science* 319, 1827–1830. doi:10.1126/science.1153069

Kurdyukov, S., Bullock, M., 2016. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology* 5, 3. doi:10.3390/biology5010003

La reproduction animale et humaine, 2014th ed, n.d. Quae.

Laird, P.W., 2010. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nat. Rev. Genet.* 11, 191. doi:10.1038/nrg2732

Lisanti, S., Omar, W.A.W., Tomaszewski, B., De Prins, S., Jacobs, G., Koppen, G., Mathers, J.C., Langie, S.A.S., 2013. Comparison of Methods for Quantification of Global DNA Methylation in Human Cells and Tissues. *PLoS ONE* 8, e79044. doi:10.1371/journal.pone.0079044

Morgan, H.D., Sutherland, H.G., Martin, D.I., Whitelaw, E., 1999. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat. Genet.* 23, 314–318.

O'Doherty, A.M., O'Shea, L.C., Sandra, O., Lonergan, P., Fair, T., Forde, N., 2016. Imprinted and DNA methyltransferase gene expression in the endometrium during the pre- and peri-implantation period in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* doi:10.1071/RD16238

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.

Peynot, N., Duranthon, V., Khan, D.R., 2015. Gene Expression Analysis in Early Embryos Through Reverse Transcription Quantitative PCR (RT-qPCR), in: Beaujean, N., Jammes, H., Jouneau, A. (Eds.), *Nuclear Reprogramming*. Springer New York, New York, NY, pp. 181–196.

Pfeffer, P.L., Pearton, D.J., 2012. Trophoblast development. *Reproduction* 143, 231–246. doi:10.1530/REP-11-0374

Pichugin, A., Le Bourhis, D., Adenot, P., Lehmann, G., Audouard, C., Renard, J.-P., Vignon, X., Beaujean, N., 2010. Dynamics of constitutive heterochromatin: two contrasted kinetics of genome restructuring in early cloned bovine embryos. *Reproduction* 139, 129–137. doi:10.1530/REP-08-0435
Qiu, J., 2006. Epigenetics: unfinished symphony. *Nature* 441, 143–145.

Saitou, M., Kagiwada, S., Kurimoto, K., 2012. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development* 139, 15–31. doi:10.1242/dev.050849

Santos, F., Zakhartchenko, V., Stojkovic, M., Peters, A., Jenuwein, T., Wolf, E., Reik, W., Dean, W., 2003. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr. Biol.* 13, 1116–1121.

Smallwood, S.A., Kelsey, G., 2012. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends Genet.* 28, 33–42. doi:10.1016/j.tig.2011.09.004

Smith, L.C., Suzuki, J., Goff, A.K., Filion, F., Therrien, J., Murphy, B.D., Kohan-Ghadr, H.R., Lefebvre, R., Brisville, A.C., Buczinski, S., Fecteau, G., Perecin, F., Meirelles, F.V., 2012. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. *Reprod. Domest. Anim. Zuchtthg.* 47 Suppl 4, 107–114. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02063.x

Strahl, B.D., Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45.

- Su, J., Wang, Y., Xing, X., Liu, J., Zhang, Y., 2014. Genome-wide analysis of DNA methylation in bovine placentas. *BMC Genomics* 15, 12. doi:10.1186/1471-2164-15-12
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., Rao, A., 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930–935. doi:10.1126/science.1170116
- Tanaka, S., Nakanishi, M.O., Shiota, K., 2014. DNA methylation and its role in the trophoblast cell lineage. *Int. J. Dev. Biol.* 58, 231–238. doi:10.1387/ijdb.140053st
- Tarasova, G.V., Nayakshina, T.N., Degtyarev, S.K., 2008. Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease Glal. *BMC Mol. Biol.* 9, 7. doi:10.1186/1471-2199-9-7
- Tessarz, P., Kouzarides, T., 2014. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 703–708. doi:10.1038/nrm3890
- Touzard, E., Reinaud, P., Dubois, O., Guyader-Joly, C., Humblot, P., Ponsart, C., Charpigny, G., 2013. Specific expression patterns and cell distribution of ancient and modern PAG in bovine placenta during pregnancy. *Reproduction* 146, 347–362. doi:10.1530/REP-13-0143
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 1.
- Vignon, X., Chesné, P., Le Bourhis, D., Fléchon, J.E., Heyman, Y., Renard, J.P., 1998. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *Comptes Rendus Académie Sci. Série III Sci. Vie* 321, 735–745.
- Vilahur, N., Baccarelli, A.A., Bustamante, M., Agramunt, S., Byun, H.-M., Fernandez, M.F., Sunyer, J., Estivill, X., 2013. Storage conditions and stability of global DNA methylation in placental tissue. *Epigenomics* 5, 341–348. doi:10.2217/epi.13.29
- Wang, J., Zhang, K., Xu, L., Wang, E., 2011. Quantifying the Waddington landscape and biological paths for development and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 8257–8262.
- Watanabe, D., Suetake, I., Tada, T., Tajima, S., 2002. Stage-and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. *Mech. Dev.* 118, 187–190.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813. doi:10.1038/385810a0
- Yong, W.-S., Hsu, F.-M., Chen, P.-Y., 2016. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin* 9. doi:10.1186/s13072-016-0075-3
- Zhang, S., Chen, X., Wang, F., An, X., Tang, B., Zhang, X., Sun, L., Li, Z., 2016. Aberrant DNA methylation reprogramming in bovine SCNT preimplantation embryos. *Sci. Rep.* 6, 30345. doi:10.1038/srep30345

Clonage chez le bovin, modèle de reprogrammation nucléaire : Effets épigénétiques dans les tissus extra-embryonnaires

RÉSUMÉ

Introduction : La méthylation de l'ADN, apposée directement sur les cytosines suivies d'une guanine (CpG), est une des marques épigénétiques qui modulent l'expression des gènes sans changement de la séquence nucléotidique et qui est transmissible au cours de la mitose et de la méiose. Après la fécondation, les pronucléus paternel et maternel subissent une reprogrammation avec un effacement des marques épigénétiques. Le noyau embryonnaire est alors le siège d'une apposition de nouvelles marques indispensables au programme de développement à réaliser. Le clonage par transfert d'un noyau somatique adulte dans un ovocyte énucléé, nécessite une reprogrammation épigénétique conduite par la machinerie ovocytaire. Ce processus est souvent l'objet d'erreurs plus ou moins importantes. L'efficacité du clonage dépend de l'intensité de ces erreurs, qui dans certains cas conduisent à des pathologies placentaires graves telles que le syndrome du gros veau. Ainsi le clonage peut être considéré comme modèle de perturbations épigénétiques dans un contexte génétique identique.

Objectifs : 1) Déterminer le devenir du lignage trophoblastique en terme de méthylation de l'ADN par un suivi des différents tissus extra-embryonnaires (trophoblaste, chorion, cotylédon, amnios, allantoïde) à 18, 40 et 60 jours de gestation. 2) Etudier les perturbations de la méthylation induite par la reprogrammation nucléaire dans ces tissus en comparant des fœtus obtenus par insémination artificielle (IA) et des fœtus issus du clonage aux mêmes stades de gestation.

Méthodes : Par « Luminometric Methylation Assay », nous avons déterminé la méthylation globale de l'ADN génomique dans les différents tissus. Le différentiel entre la 5mC et la 5hmC a été analysé par un test ELISA. L'étude de l'expression des gènes *Dnmt* et *Tet* a été réalisée par RT-PCR quantitative.

Résultats : Une augmentation graduelle du taux de méthylation au cours de l'évolution du lignage trophoblastique est observée, associée à des variations de l'expression des gènes *Dnmt*. Des différences de taux de méthylation entre tissus dérivés du trophoblaste sont significatives et conservées lors de croisement inter-races, suggérant une corrélation forte entre le méthylome et les fonctions de ces tissus. La 5mC et la 5hmC de ces 2 tissus ont été mesurées par la méthode ELISA. La 5hmC est peu abondante. Le profil de la 5mC mesuré par LUMA est similaire à celui retrouvé par ELISA.

Un différentiel de méthylation n'est observé entre IA femelles et clones que dans le trophoblaste à 18 jours de gestation (hyperméthylation des clones) et dans l'amnios à 60 jours de gestation (hypométhylation des clones). Systématiquement, les clones pathologiques sont hypométhylés par rapport aux clones non pathologiques.

Conclusions : Les tissus issus du lignage trophoblastique, ainsi que l'amnios et l'allantoïde à 60 jours sont de plus en plus méthylés pendant la gestation. L'hypothèse admise est que plus le tissu est méthylé et plus il est différencié afin de répondre à son rôle. Les cotylédons restent hypométhylés ayant de nombreuses fonctions à assurer. Les différences du taux de méthylation observées entre IA femelles et clones sont subtiles. Puisque l'embryon a réussi à survivre jusqu'au stade du prélèvement, cela suppose l'absence de perturbation majeure de la méthylation. Les pathologies placentaires sont certainement dues à des changements subtils qu'une quantification globale ne peut détecter. Cibler les régions spécifiques d'une dérégulation pourrait être possible en mettant en œuvre d'autres techniques d'analyse pangénomique (Medip-Séquençage).

Mots clés : Epigénétique, Reprogrammation, Tissus extra-embryonnaires, Méthylation et Hydroxyméthylation de l'ADN, Gènes *Dnmt* et *Tet*, LUMA, ELISA, RT-PCRq.