

Analyse de la méthylation de l'ADN spermatique chez des verrats à qualité de semence dégradée

Hervé ACLOQUE (1), Alain PINTON (1), Stéphane FERCHAUD (2), Martine YERLE (1)

(1) INRA, Laboratoire de Génétique Cellulaire UMR444 ENVT INRA Castanet Tolosan

(2) INRA, UE88 UEICP, F-86480 Rouillé

herve.acloque@toulouse.inra.fr

Avec la collaboration de l'IFIP-Institut du porc, BIOPORC et les CIAs

DNA methylation analysis in sperm from boar with bad sperm quality

Infertility problems are an increasing health challenge in human and animal populations. They can be explained by genetic or hormonal causes but also by aging or life-style causes. In farm animals high inbreeding levels, exposure to atmosphere, food and water contaminants, also lead to a significant decrease of animal fertility and are beginning to be a real problem. For example, nearly 50% of boars selected on agronomical criteria (like growth or alimentary efficiency, muscle fat content...) are culled for bad sperm quality (including concentration, morphology and motility).

In the present work we decided to focus our study on DNA methylation levels in sperm from boars with bad semen quality. DNA methylation is a direct modification of cytosine residues that can affect gene expression and chromatin organization. In infertile patients, sperm DNA methylation is affected at some particular loci especially those submitted to parental imprinting. Using the genomic and bioinformatics facilities available in our laboratory, we started to perform genome-wide methylome maps from sperm DNA of fertile animals. At the same time, we looked at the methylation status of imprinted loci in sperm from animals with bad sperm quality using immunoprecipitation and real time PCR analysis of methylated DNA. Methylation of blood genomic DNA will also be analyzed at these loci to test for the presence of a positive correlation between DNA methylation defects in somatic and germinal cells. We hope to develop an easy diagnostic method to detect, in immature animals, future reproductive limitations.

INTRODUCTION

Les reproducteurs réformés pour des problèmes de mauvaise qualité de semence représentent près de 50% des animaux entrants en CIA. Si les critères d'évaluation de la qualité de semence sont anciens et pourraient être réévalués, il n'en demeure pas moins que de plus en plus d'animaux présentent des problèmes de fertilité (Ioannou and Griffin 2010).

Afin de comprendre ce phénomène en expansion aussi bien dans les populations animales qu'humaine (Shah *et al.* 2003), nous avons décidé de réaliser une étude à grande échelle pour caractériser les verrats présentant une qualité de semence dégradée en analysant notamment la méthylation de l'ADN spermatique.

MATERIEL ET METHODES

1.1. Détection des animaux et prélèvements

En collaboration avec les Centres d'Insémination Artificielle et les Organismes de Sélection Porcine, nous analysons des prélèvements de semence et de sang d'animaux présentant des problèmes de qualité de semence : azospermique (absence de spermatozoïde), oligospermique (faible concentration en spermatozoïdes), tératospermique

(morphologie anormale des spermatozoïdes) et asthénospermique (mobilité anormale).

A partir de ces prélèvements, nous réalisons le caryotype des animaux, afin de déterminer la prévalence des anomalies chromosomiques dans cette population particulière.

D'autre part, l'ADN génomique est extrait à partir de la semence et des cellules sanguines prélevées en vue de l'analyse de la méthylation.

1.2. Analyse de la méthylation de l'ADN

1.2.1. Purification de l'ADN méthylé

L'ADN génomique est fragmenté par sonication (Bioruptor, Diagenode) et incubé en présence d'un anticorps dirigé contre les cytosines méthylées (clone 33D3, Diagenode).

Le complexe ADN-anticorps est alors purifié par affinité, grâce à des billes magnétiques couplées à la protéine A.

L'ADN ainsi immunoprécipité est purifié et analysé par PCR et PCR quantitative en temps réel.

1.2.2. Analyse des niveaux de méthylation par PCR

Les différents locus étudiés sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 1 - Locus étudiés en PCR

Nom du locus	Localisation-Empreinte P/M
COPG2	Chrom.1 M
IGF2R	Chrom.1 M
UBE3A	Chrom.1 P
IGF2 DMR1	Chrom.2 P
IGF2 DMR2	Chrom.2 P
IGF2 DMR3	Chrom.2 P
IGF2-H19 CTCF3	Chrom.2 M
H19	Chrom.2 M
PHLDAL2	Chrom.2 M
PLAGL1	Chrom.4 P
DIRAS3	Chrom.6 P
DLK1	Chrom.7 P
PRIM2	Chrom.7 M
RASGRF1	Chrom.7 P
NAP1L5	Chrom.8 P
GRB10	Chrom.9 M
PEG10	Chrom.9 P
SGCE	Chrom.9 P
SNORD107	Chrom.9 P
TFPI2/DLX5	Chrom. 9 M
NNAT	Chrom. 17 P
MEST/PEG1	Chrom.18 P
OSBPL1A	Chrom.18 M
XIST	Chrom X random
LINE1	
VASA	Chrom.16
NANOG	Chrom.1
OCT4	Chrom.7
DAZL	Chrom.13
Beta-actin	Chrom. 3

Les gènes soumis à empreinte parentale sont identifiés par un (M) pour les maternels et un (P) pour les paternels

Les îlots CpG ont été identifiés à partir des séquences génomiques porcines par le logiciel CpG Plot (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>).

Les oligonucléotides nécessaires à l'amplification ont été dessinés à l'aide du logiciel Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Les couples d'amorces ont ensuite été testés par PCR puis par PCR en temps réel. Les PCR en temps réels ont été réalisées sur un Light Cycler 480 (Roche) en triplicatas.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Validation des couples d'amorces par PCR conventionnelle

Au total, 30 locus ont été sélectionnés pour être analysés dans cette étude, dont 23 soumis à empreinte parentale (9 maternels et 14 paternels). Actuellement nous avons validé 20 couples d'amorces correspondant à 13 locus soumis à empreinte et 7 conventionnels.

2.2. Analyse des niveaux de méthylation dans l'ADN spermatique d'animaux normaux

La méthylation des différents locus a été évaluée par PCR chez des animaux LW fertiles. Le promoteur de l'actine beta n'est pas méthylé (contrôle négatif) alors que les séquences répétées de type LINE1 le sont (contrôle positif).

Nous avons observé la présence d'ADN méthylé sur les locus suivants : IGF2, IGFR2, MEG1, DLK1, MEST, UBEA3, DLX5, PRIM2 et RASGRF1.

2.3. Analyse des niveaux de méthylation dans l'ADN spermatique d'animaux à qualité de semence dégradée

Nous avons initié notre étude en comparant 5 animaux :

- Un animal LW normal
- Un animal tératospermique LW
- Un animal asthenospermique LW
- Un animal oligospermique (80.10^6 spz/ml)
- Un animal homozygote pour une translocation réciproque 3/4 mais avec des paramètres de semence normaux

En PCR conventionnelle, nous n'avons pas vu de différences significatives entre les différents animaux et les différents locus analysés. L'analyse quantitative est en cours et les résultats seront présentés aux JRP. D'autre part, nous intégrons actuellement davantage d'animaux à cette étude, de nouveaux cas nous ayant été signalés par les CIAs (une dizaine d'animaux seront intégrés à l'étude fin 2011).

CONCLUSION

Les données humaines montrent une corrélation forte entre infertilité et méthylation anormale des gènes soumis à empreinte parentale (Marques et al. 2008).

Nos données ne confirment pas encore cette observation mais notre panel d'animaux est encore extrêmement faible et nos données pas suffisamment quantitatives pour nous permettre de tirer des conclusions significatives. L'intégration de nouveaux animaux présentant une qualité de semence dégradée et l'analyse de la méthylation de leur ADN par PCR quantitative nous permettront donc de confirmer ou d'infirmer les données décrites chez l'homme.

Elles nous permettront également de réévaluer notre hypothèse sur l'existence d'une signature moléculaire épigénétique liée aux problèmes de fertilité et plus spécifiquement au cours de la spermatogénèse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Shah, K., Sivapalan, G., Gibbons, N., Tempest, H., and Griffin, D.K. (2003). The genetic basis of infertility. *Reproduction*, 126, 13-25.
- Ioannou, D., and Griffin, D.K. Male fertility, chromosome abnormalities, and nuclear organization. *Cytogenet. Genome Res.*, 133, 269-279.
- Marques, C.J., Costa, P., Vaz, B., Carvalho, F., Fernandes, S., Barros, A., and Sousa, M. (2008). Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol. Hum. Reprod.*, 14, 67-74.