

Université de Montréal

**Identification de dérèglements épigénétiques  
embryonnaires associés à une exposition prénatale à  
l'alcool pendant la période préimplantatoire.**

par Lisa-Marie Legault

Département de biochimie et médecine moléculaire  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en biochimie

Octobre, 2017

© Lisa-Marie Legault, 2017

## Résumé

Il est connu qu'une exposition prénatale à l'alcool (EPA) peut entraîner des dérégulations épigénétiques dans les cellules du cerveau en développement et être responsable de certains phénotypes du Trouble du Spectre de l'Alcoolémie Fœtale (TSAF) comme les troubles neurodéveloppementaux (TND). Les conséquences d'une EPA très tôt dans le développement sur le paysage épigénétique embryonnaire et extra-embryonnaire sont toutefois peu connues. Notre hypothèse est qu'une EPA durant la période préimplantatoire va initier des dérèglements des profils de méthylation d'ADN qui seront amplifiés et perpétués au cours du développement. Ces dérèglements seront visibles dans le cerveau et le placenta des embryons plus tard dans la gestation. Nous avons développé un modèle murin d'EPA en injectant avec de l'éthanol (EtOH) ou de la saline (Ctrl) des femelles souris gestantes au jour embryonnaire 2.5 (E2.5) soit au stade 8-cellules. Des embryons et placentas furent récoltés aux jours E10.5 et E18.5. Un système d'évaluation morphologique a permis de montrer une augmentation significative des anomalies visibles des embryons EtOH. Les profils de méthylation d'ADN ont par la suite été établis par *Reduced Representation Bisulfite Sequencing* sur 8 échantillons contrôles et 12 échantillons EtOH de cerveaux antérieurs et de placentas au stade E10.5. Des analyses bio-informatiques ont démontré 686 et 2942 régions différentiellement méthylées (DMTs) respectivement dans le cerveau antérieur et le placenta. Nous avons aussi trouvé 21 DMTs communément affectés dans chacun des tissus. Étonnamment, nous avons aussi observé des différences spécifiques aux sexes dans la dérégulation de profils de méthylation en réponse à l'EPA. Notre étude montre, pour la première fois, qu'une EPA très tôt dans le développement embryonnaire entraîne des dérégulations de la méthylation d'ADN perceptibles plus tard dans le développement. Ces résultats nous en apprennent davantage sur comment les perturbations épigénétiques peuvent altérer le fonctionnement normal du cerveau et mener à des TNDs chez les enfants atteints du TSAF.

**Mots-clés :** Épigénétique, méthylation d'ADN, Trouble du Spectre de l'Alcoolémie Fœtale, exposition prénatale à l'alcool, troubles neurodéveloppementaux, développement embryonnaire, cerveau, placenta, reprogrammation épigénétique, environnement maternel.

## **Abstract**

Prenatal alcohol exposure (PAE) is known to altered epigenetic profiles in cells during brain development and be part of the molecular basis underpinning Fetal Alcohol Spectrum Disorders (FASD) etiology. However, the consequences of a PAE during very early embryonic life on the future epigenetic landscape of embryonic and extraembryonic tissues remain unknown. Our research hypothesis is that a PAE during preimplantation will initiate DNA methylation dysregulation that will later be observable in the developing conceptus. We believe that these original epigenetic alterations will be perpetuated and amplified in the developing brain as well as in the placental tissue. To test this, we instigated FASD in mouse 8-cell embryos by injecting ethanol at 2.5 days of pregnancy (E2.5). We collected FASD (ethanol) and control (saline) E10.5 and E18.5 embryos and placentas. Dissection scoring showed an increase in morphological abnormalities in EtOH embryos of both stages. We then established genome-wide quantitative DNA methylation profiles of forebrains and placentas of E10.5 embryos by Reduced Representation Bisulfite Sequencing. Bioinformatic analyses of FASD samples (n=12) vs controls samples (n=8) revealed 686 and 2942 differentially methylated tiles (DMTs) in forebrain and placenta samples respectively. Unexpectedly, we highlighted sex-specific DNA methylation perturbations and gene expression pattern in response to ethanol exposure. Interestingly, we also uncovered 21 specific regions abnormally methylated in both FASD forebrain and placenta samples. Our study establishes for the first time that early embryonic PAE can cause epigenetic dysregulations that leads to permanent alteration in the future epigenetic program of brain and placenta cells and that some of these dysregulations are sex-specific. Altogether, our results allow us to have a better understanding of how epigenetic perturbations can alter the normal function of the brain and lead to neurodevelopmental disorders present in children with FASD.

**Keywords** : Epigenetic, DNA methylation, Fetal Alcohol Spectrum Disorder, prenatal alcohol exposure, neurodevelopmental disorders, embryonic development, brain, placenta, epigenetic reprogramming, maternal environment.

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>ii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>iv</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des sigles et des abréviations</b> .....	<b>x</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>13</b>
1.1 L'épigénétique .....	14
1.1.1 La méthylation de l'ADN .....	15
1.1.2 Les modifications d'histones .....	20
1.1.3 Les micro-ARNs .....	21
1.2 La période préimplantatoire et le remodelage épigénétique .....	23
1.2.1 Développement embryonnaire préimplantatoire.....	24
1.2.2 Déméthylation des génomes parentaux .....	24
1.2.3 Maintenance de la méthylation .....	26
1.2.4 Méthylation du génome embryonnaire .....	27
1.2.5 Vulnérabilité de la période préimplantatoire .....	28
1.2.6 Le placenta, aussi vulnérable à l'environnement? .....	30
1.3 Exposition prénatale à l'alcool et Trouble du Spectre de l'Alcoolémie Fœtale .....	31
1.3.1 Le Trouble du Spectre de l'Alcoolémie Fœtale (TSAF) .....	32
1.3.2 Diagnostic du TSAF .....	35
1.3.3 L'alcool et l'épigénétique .....	37
1.3.4 Modèles d'exposition à l'alcool.....	40
1.4 Problématique : alcool et préimplantation .....	51
<b>2. Hypothèse</b> .....	<b>53</b>
<b>3. Objectifs</b> .....	<b>53</b>
3.1 Caractérisation des anomalies morphologiques.....	54
3.2 Analyse préliminaire des profils d'expression génique .....	54

3.3 Établissement des profils de méthylation .....	54
<b>4. Matériel et méthode .....</b>	<b>55</b>
4.1 Modèle murin TSAF et analyses visuelles lors des dissections.....	55
4.2 Sexage des embryons .....	58
4.3 Expression génique par PCR quantitative.....	58
4.4 Analyse des profils de méthylation par RRBS .....	59
4.5 Analyses complémentaires des régions différentiellement méthylées.....	62
<b>5. Résultats.....</b>	<b>64</b>
5.1 Anomalies morphologiques à mi-gestation suite à une exposition à l'alcool pendant la période préimplantatoire .....	64
5.2 Anomalies morphologiques chez les embryons et placentas à E18.5 exposés à l'alcool pendant la préimplantation.....	69
5.3 Expression génique modifiée chez les cerveaux antérieurs à mi-gestation exposés à l'alcool pendant la préimplantation .....	73
5.4 Profils de méthylation altérés chez les cerveaux antérieurs à mi-gestation exposés à l'alcool pendant la préimplantation .....	76
5.4.1 Analyse des DMTs du cerveau antérieur dans les régions riches en CpGs .....	77
5.4.2 Analyse des DMTs du cerveau antérieur dans les éléments répétés.....	77
5.4.3 Analyse des DMTs du cerveau antérieur dans les régions du contrôle de l'empreinte génomique.....	79
5.4.4 Annotation génomique des DMTs du cerveau antérieur et implication fonctionnelle. ....	79
5.5 Profils de méthylation altérés chez les placentas à mi-gestation exposés à l'alcool pendant la préimplantation .....	81
5.5.1 Analyse des DMTs du placenta dans les régions riches en CpGs .....	82
5.5.2 Analyse des DMTs du placenta dans les éléments répétés .....	83
5.5.3 Analyse des DMTs du placenta dans les régions du contrôle de l'empreinte génomique.....	84
5.5.4 Annotation génomique des DMTs du placenta et implication fonctionnelle. ....	84
5.6 Régions communes affectées chez le placenta et le cerveau antérieur .....	86

5.7 Différence spécifique au sexe dans les profils de méthylation de cerveaux antérieurs et placentas exposés à l'alcool .....	88
<b>6. Discussion.....</b>	<b>91</b>
6.1 Évolution des anomalies morphologiques entre E10.5 et E18.5 .....	92
6.2 Impacts de l'exposition prénatale précoce sur l'expression génique.....	94
6.3 Caractérisation des régions atteintes et impact possible de ces changements sur le développement du système nerveux .....	95
6.4 Le placenta comme indicateur du facteur de risque de développement d'un TND relié à une exposition prénatale à l'alcool .....	98
6.5 Altérations spécifiques au sexe des profils de méthylation d'ADN .....	99
6.6 Limitations de l'étude .....	101
6.7 Perspectives.....	103
<b>Conclusion .....</b>	<b>105</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>i</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b> Modèle <i>in vitro</i> d'exposition à l'alcool pendant la préimplantation..	43
<b>Tableau II.</b> Modèle <i>in vivo</i> d'exposition chronique à l'alcool débutant pendant la préimplantation.	47
<b>Tableau III.</b> Modèle <i>in vivo</i> d'exposition maternelle à l'alcool visant spécifiquement la préimplantation.	50
<b>Tableau IV.</b> Séquences des amorces utilisées pour le sexage des embryons.	58
<b>Tableau V.</b> Embryons et placentas présentant une anomalie à E10.5.....	67
<b>Tableau VI.</b> Mesures associées à des anomalies de croissance à E10.5.....	68
<b>Tableau VII.</b> Pourcentage d'embryons et de placentas présentant une anomalie à E18.5. ....	71
<b>Tableau VIII.</b> Mesures associées à des anomalies de croissance à E18.5.....	73
<b>Tableau IX.</b> Exemple de gènes particulièrement affectés dans le cerveau antérieur par l'exposition prénatale à l'alcool et résumé de leurs fonctions.....	81
<b>Tableau X.</b> Exemples de gènes particulièrement affectés dans le placenta par l'exposition prénatale à l'alcool et résumé de leurs fonctions.....	86
<b>Tableau XI.</b> Liste des régions géniques communes affectées dans le cerveau antérieur et le placenta et résumé de leurs fonctions. ....	87
<b>Tableau XII.</b> Régions géniques affectées dans le cerveau antérieur et le placenta des embryons mâles.....	90
<b>Tableau XIII.</b> Régions géniques affectées dans le cerveau antérieur et le placenta des embryons femelles.....	90

## Liste des figures

Figure 1. Organisation de l'ADN chromosomique et principales modifications épigénétiques. ....	15
Figure 2. Méthylation des cytosines de l'ADN par les enzymes <i>Dnmt</i> et déméthylation des 5-méthylcytosines en 5-hydroxyméthylcytosine par les enzymes <i>Tet</i> . ....	20
Figure 3. Principales modifications des queues d'histones. ....	21
Figure 4. Quantité relative de micro-ARNs pendant le développement. ....	23
Figure 5. Profils de méthylation dans les gamètes et au cours du développement embryonnaire. ....	26
Figure 6. Schéma des différents types cellulaires composant le placenta murin à maturation. ....	31
Figure 7. Différents termes des désordres reliés à une exposition prénatale à l'alcool regroupé sous le terme du Trouble du Spectre de l'Alcoolémie Fœtale (TSAF). ....	33
Figure 8. Exemple de défauts faciaux caractéristiques observés chez les enfants atteints d'une forme sévère de TSAF. ....	34
Figure 9. Schéma d'imagerie par résonance magnétique des conséquences d'une altération du cerveau antérieur sur la formation du visage dans un modèle murin. ....	35
Figure 10. Métabolisme du carbone ( $^{13}\text{C}$ metabolism) et alcool. ....	39
Figure 11. Schéma des profils de méthylation au cours du développement embryonnaire et les tissus affectés par une exposition prénatale à l'alcool au stade 8-cellules. ....	53
Figure 12. Mesures prises lors de la dissection des embryons au jour E10.5. ....	57
Figure 13. Schéma des différentes étapes du Reduced Representation Bisulfite Sequencing. ....	61
Figure 14. Représentation visuelle des îlots CpG et des régions adjacentes à ceux-ci. ....	63
Figure 15. Nombre d'embryons pour chacune des conditions aux stades E10.5 et E18.5. ....	65
Figure 16. Les embryons et placentas à mi-gestation exposés à l'alcool présentent plus d'anomalies morphologiques. ....	66

<b>Figure 17. Distribution des principales mesures associées à des anomalies de croissance à E10,5.....</b>	<b>68</b>
<b>Figure 18. Les embryons et placentas à E18.5 exposés à l'alcool présentent plus d'anomalies morphologiques. ....</b>	<b>70</b>
<b>Figure 19. Distribution des principales mesures associées à des anomalies de croissance à E18,5.....</b>	<b>72</b>
<b>Figure 20. Expression génique altérée par qPCR dans certains gènes liés à la mise en place et au maintien de modifications épigénétiques dans les cerveaux antérieurs d'embryons E10.5 exposés à l'alcool pendant la préimplantation. ....</b>	<b>74</b>
<b>Figure 21. Expression génique altérée par qPCR dans certains gènes liés au développement et au fonctionnement du système nerveux dans les cerveaux antérieurs d'embryons E10.5 exposés à l'alcool pendant la préimplantation. ....</b>	<b>75</b>
<b>Figure 22. Expression génique altérée par qPCR dans certains gènes liés au développement embryonnaire dans les cerveaux antérieurs d'embryons E10.5 exposés à l'alcool pendant la préimplantation. ....</b>	<b>75</b>
<b>Figure 23. Les régions différentiellement méthylées du cerveau antérieur sont principalement éloignées des îlots CpGs et ont une distribution normale dans les éléments répétés.....</b>	<b>78</b>
<b>Figure 24. 686 régions différentiellement méthylées (DMTs) chez les cerveaux antérieurs d'embryons E10.5 exposés à l'alcool pendant la préimplantation. ....</b>	<b>80</b>
<b>Figure 25. Les régions différentiellement méthylées du placenta sont principalement éloignées des îlots CpGs et ont une distribution normale dans les éléments répétés.....</b>	<b>83</b>
<b>Figure 26. 2942 régions différentiellement méthylées (DMTs) chez les placentas exposés à l'alcool pendant la préimplantation. ....</b>	<b>85</b>
<b>Figure 27. Différences dans les profils de méthylation entre les mâles et les femelles embryons exposés à l'alcool pendant la préimplantation.. ....</b>	<b>89</b>

## Liste des sigles et des abréviations

5mC : 5-méthylcytosine

5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BPA : bisphénol A

CCPA : Conseil canadien de protection des animaux

CIBPAR : Comité institutionnel des bonnes pratiques animales en recherche

CpG : dinucléotide cytosine-phosphate-guanine

DMT : Tuile différenciellement méthylé (differentially methylated tile)

DNMT : ADN méthyltransférase

DOHaD : Developmental Origine of Health and Disease

EPA : Exposition prénatale à l'alcool

EtOH : éthanol

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

ICG : Ilot CpG

ICM : Masse de la cellule interne (*inner cell mass*)

LINE : Long Interspersed Nuclear Elements

LTR : Long Terminal repeats

miARN : Micro-ARN

pb : paire de base

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

qPCR : PCR quantitative

RRBS : Reduced representation bisulfite sequencing

SAF : Syndrome de l'Alcoolisation Fœtale

SAM : S-adénosylméthionine

SINE : Short Interspersed Nuclear Elements

Tab-Seq : Tet-Assisted Bisulfite Sequencing

TE : Trophectoderme

TET : Ten Eleven Translocation

TND : Troubles neurodéveloppementaux

TSAF : Trouble du Spectre de l'Alcoolémie Fœtale

UCSC : University of California, Santa Cruz

w/v : poids par volume

WGBS : Whole Genome Bisulfite Sequencing

# Remerciements

Je voudrais d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Serge McGraw, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire comme stagiaire puis comme étudiante à la maîtrise et de m'avoir guidé et encouragé tout le long de mon cheminement. J'ai énormément appris depuis mon arrivée au labo grâce à ton support et ton aide.

Je voudrais aussi remercier mes collègues présentes et passées au laboratoire : Virginie (meilleure collègue *ever*), Mélanie (qPCR master), Alba, Anne-Frédérique, Christine et Roxane pour leur aide inestimable et leur bonne humeur dans le labo. Vous avez rendu les matins de dissections beaucoup plus entraînants!

Un merci spécial au labo du Dr Sylvie Girard, principalement Marie-Ève et Cyntia, pour leur support moral irréprochable et de toujours prendre le temps de répondre à mes nombreuses questions sur le placenta. Vous êtes des collègues et amies fantastiques!

Un gros merci à ma famille. Mes parents qui sont mes plus grands supporteurs et qui s'intéressent toujours à l'avancement de mes recherches et ma sœur qui est devenue une excellente scientifique grâce au temps fou qu'elle prend pour bien corriger mes travaux. Vous êtes une famille en or!

Finalement, un énorme merci à Laue. Merci de m'avoir supportée, encouragée et comprise quand je manquais de temps et que je devais aller au labo. Tu es la meilleure des supportrices que je pourrais avoir!

# 1. Introduction

Le développement embryonnaire est constitué d'une série de mécanismes et d'étapes adroitement régulés afin que l'embryon soit mené à terme sans anomalie. Entre le moment de la fertilisation et celui de l'accouchement, une perturbation dans ces processus développementaux peut avoir des conséquences très graves sur l'enfant à naître. La gestation, particulièrement la période préimplantatoire, constitue une phase extrêmement dynamique où les modifications épigénétiques sont sujettes à de grands changements nécessaires pour la bonne mise en place du programme épigénétique embryonnaire et pour le développement du jeune embryon. C'est une période extrêmement sensible aux influences externes provenant de l'environnement maternel.

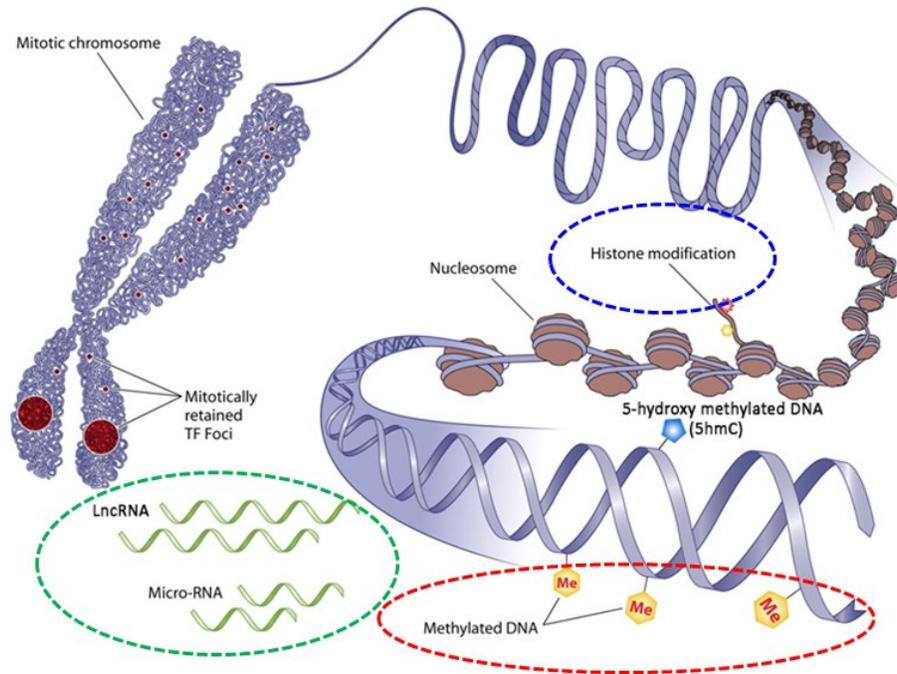
Alors qu'il a longtemps été pensé que les facteurs externes ne pouvaient influencer le devenir de la progéniture pendant la préimplantation, il devient de plus en plus évident que l'environnement maternel peut avoir un impact de façon négative sur l'embryon bien avant qu'il soit relié au système maternel par le placenta. Plusieurs perturbateurs environnementaux comme les bisphénols A (BPA), les produits chimiques, une mauvaise nutrition et la prise de drogue ou d'alcool sont connus pour affecter les modifications épigénétiques (1-4). Bien que plusieurs études montrent que certains processus et modifications épigénétiques peuvent être perturbés lors d'une exposition prénatale à l'alcool, les mécanismes impliqués demeurent toutefois peu connus. Nous savons qu'une exposition à l'alcool pendant la grossesse peut entraîner des conséquences très graves chez l'enfant. Cependant, les conséquences d'une exposition à l'alcool pendant la période préimplantatoire, soit le tout début de la grossesse, sont, à ce jour, très peu connues.

## 1.1 L'épigénétique

L'expression génique est un processus finement régulé et qui se doit d'être très dynamique au cours du développement. Les modifications épigénétiques sont les mécanismes majeurs de régulation de l'expression génique dans les cellules. Celles-ci sont des modifications chimiques apportées sur le génome qui, ultimement, activent ou répriment l'expression d'un gène (5). Ces modifications comprennent la méthylation de l'ADN, les modifications d'histone (e.g., méthylation, acétylation), les ARNs non-codants et les micro-ARNs (Figure 1). Chez les mammifères, même si certaines divergences existent, les patrons de ces modifications sont hautement conservés à travers les espèces (6). Pour ces raisons, il est possible de comprendre la mise en place du programme épigénétique embryonnaire chez l'humain grâce aux études et modèles murins *in vivo*, en plus des nombreuses études cellulaires.

Contrairement à une mutation qui affecte directement la séquence génomique, les modifications épigénétiques affectent plutôt la structure de l'ADN et l'accessibilité de celui-ci sans affecter la séquence (5). La présence de ces modifications permet, entre autres, de réguler le niveau de compaction de la chromatine et donc l'accès aux gènes pour leur transcription. Étant donné que certains gènes doivent être transcrits ou réprimés à des périodes spécifiques au cours du développement, ces modifications sont donc dynamiques et, surtout, leur répartition est propre à chaque tissu (5).

Ce rôle de régulation de la transcription est très important au cours de la vie, surtout, au cours du développement embryonnaire, alors que de nombreux mécanismes moléculaires sont activés. Étant donné le rôle crucial de ces modifications pour l'établissement des diverses lignées cellulaires et le développement normal, celles-ci doivent être finement établies et un dérèglement à leur bonne mise en place peut avoir des conséquences critiques sur l'embryon ou l'enfant à naître.



**Figure 1. Organisation de l'ADN chromosomique et principales modifications épigénétiques** : les modifications d'histones (en bleu), la méthylation de l'ADN (en rouge), les longs ARNs non-codants et les micro-ARNs (en vert). Adapté de Zaidi et *al.*, 2010 (7).

### 1.1.1 La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est au premier plan lorsqu'on parle de régulation de l'expression des gènes. Chez les mammifères, la méthylation constitue en l'ajout d'un groupe méthyle sur le carbone en position 5' d'une cytosine d'un dinucléotide cytosine-guanine (CpG) (5, 8). Cette modification covalente est très stable, mais peut être réversible dans certaines conditions (5). Il est aussi important de noter que bien que les niveaux de méthylation soient variables d'une cellule à l'autre selon sa fonction, la méthylation de l'ADN est une modification héritée, c'est-à-dire qu'elle est transmise aux cellules filles pendant le processus de division cellulaire (5). Le génome humain est constitué d'environ 30 millions de CpGs pour un niveau de méthylation d'environ 60 à 80% dans les cellules somatiques (9).

Les dinucléotides CpG sont les cibles principales des enzymes responsables de la méthylation de l'ADN, les ADN méthyltransférases, communément appelés les DNMTs (10-12). Quelques études démontrent que la méthylation est aussi possible sur des cytosines autres que les CpGs (13). Cependant, les niveaux de ces modifications sont très faibles et leurs fonctions sont encore peu connues. Ainsi, pour plus de concision et puisque la méthylation des CpGs est la principale et la plus importante modification de l'ADN, nous nous concentrerons sur celle-ci.

### 1.1.1.1 Rôle de la méthylation

La méthylation de l'ADN est surtout associée à une structure de chromatine fermée (hétérochromatine) et donc principalement à la répression génique. De façon générale, on dit que lorsque les cytosines d'un promoteur riche en CpGs sont méthylées, la transcription est réprimée puisque l'ajout du groupement méthyle bloque le recrutement de divers activateurs de la transcription (5, 14). L'absence de méthylation d'ADN aux promoteurs riches en CpGs est donc, au contraire, associée à un état de chromatine ouverte (euchromatine) et ainsi à un état permettant l'expression génique (15, 16). La méthylation d'ADN ailleurs qu'au promoteur, comme aux régions du corps du gène (*gene body* ; e.g., exon, intron), a des fonctions moins bien définies au niveau de la transcription. De façon traditionnelle, il était dit que la présence de méthylation, peu importe la localisation dans le génome, était strictement associée à la répression génique. Cependant, de nouvelles études tendent désormais à démontrer que la méthylation dans certains contextes et localisations, par exemple au niveau du corps du gène, peut être associée à une transcription génique active (17-19).

Outre son rôle général associé avec la répression génique, la méthylation de l'ADN a aussi quelques fonctions beaucoup plus spécifiques. Elle est, entre autres, responsable du silençage des rétrotransposons et, chez les femelles, de l'inactivation du chromosome X (5). Les rétrotransposons sont situés dans des régions intergéniques du génome qui sont particulièrement importantes pour la stabilité du génome et le silençage des gènes avoisinants. Une sous-famille de rétrotransposons, les *Long Terminal Repeats* (LTR), constitue aussi un type d'éléments

répétés qui, avec les *Long Interspersed Nuclear Elements* (LINE) et les *Short Interspersed Nuclear Elements* (SINE), composent 50 à 70% du génome (20, 21). Le maintien de l'état passif des rétrotransposons est crucial pour la stabilité des chromosomes en régulant la ségrégation chromosomique et prévenant la transposition ou la recombinaison pendant la ségrégation (22). D'importantes anomalies chromosomiques peuvent donc résulter d'une perturbation des rétrotransposons ou de régions répétées.

Pendant le développement embryonnaire, la méthylation de l'ADN a aussi des fonctions critiques dans l'embryogenèse, la différenciation des cellules souches et la régulation du développement neuronal (23, 24). Certains endroits du génome sont particulièrement riches en dinucléotides CpG. Ces régions, surtout situées dans ou très près des promoteurs des gènes, sont appelées les îlots CpG (ICG) et agissent comme des régions régulatrices. Les ICG sont des séquences de longueur variant généralement entre 200 et 3000 paires de base et dont le contenu en nucléotide guanine et cytosine est supérieur à 50% (25). Les ICG associés aux gènes fortement transcrits sont généralement très peu ou non-méthylés (26, 27). Cependant, les ICG de plusieurs gènes développementaux clés, comme ceux de la famille Hox, sont fortement méthylés lorsqu'ils deviennent non nécessaires pendant la période péri-implantatoire (28). Les régions éloignées de ces îlots, dites *open sea*, sont généralement pauvres en CpG.

De plus, la régulation des gènes à empreinte (*imprinting genes*) pendant le développement se fait aussi via la méthylation. Les gènes à empreinte sont des gènes exprimés de façon monoallélique, donc seulement par un allèle, dépendante de l'origine parentale. À ce jour, plus de 100 gènes à empreinte chez la souris et plus de 70 chez l'humain ont été identifiés (29-31). La méthylation sur ces gènes est installée dans les gamètes par DNMT3a et DNMT3b, puis maintenue par l'action de DNMT1 après la fertilisation (8, 32, 33), comme il sera discuté à la section 1.2.3. Plusieurs maladies graves, telles que Prader-Willi ou Angelman, peuvent être associées à un défaut de l'empreinte. Ces maladies se caractérisent, entre autres, par des problèmes de la croissance normale et des retards intellectuels (34).

### 1.1.1.2 Les enzymes derrière la méthylation de l'ADN

La méthylation est apposée sur le génome par les enzymes ADN méthyltransférases (DNMT). Les mammifères possèdent cinq enzymes DNMT divisées en trois classes : DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b et DNMT3L (5, 8). L'ensemble des enzymes DNMT est essentiel à la vie et leur absence mène inévitablement à la mort embryonnaire ou néonatale.

Les enzymes DNMT3a et DNMT3b sont responsables de la méthylation *de novo* (35, 36). Les DNMT3 ciblent des CpGs qui étaient précédemment non méthylées afin d'y apposer de nouvelles marques de méthylation. Elles sont ainsi responsables de la méthylation du génome embryonnaire ainsi que des gamètes lors de la maturation (section 1.2 ; Figure 5). Puisque plusieurs gènes développementaux doivent absolument être réprimés après certains stades du développement, le rôle de ces deux enzymes est donc crucial pour le développement. L'enzyme DNMT3L, pour DNMT3-like, ne possède aucune activité catalytique. Il agit cependant comme cofacteur et stimulateur pour les DNMT3a et DNMT3b et joue un rôle de régulateur de l'établissement de l'empreinte génomique (37). Une troisième enzyme de méthylation *de novo* a aussi été découverte très récemment, DNMT3c, qui serait essentielle à la fertilité chez la souris en méthylant les promoteurs de certains rétrotransposons dans les cellules germinales mâles (38).

Les embryons déficients en DNMT3a se développent jusqu'à terme. Cependant, ils meurent très tôt après la naissance. Ceux déficients en DNMT3b meurent environ à mi-gestation. Une absence de DNMT3L résulte, quant à elle, à des souriceaux infertiles (36). Une perte transitoire de DNMT3a et DNMT3b dans un modèle de cellules souches embryonnaires implique de profonds changements dans le paysage épigénétique cellulaire, mais les cellules restent tout de même viables (39).

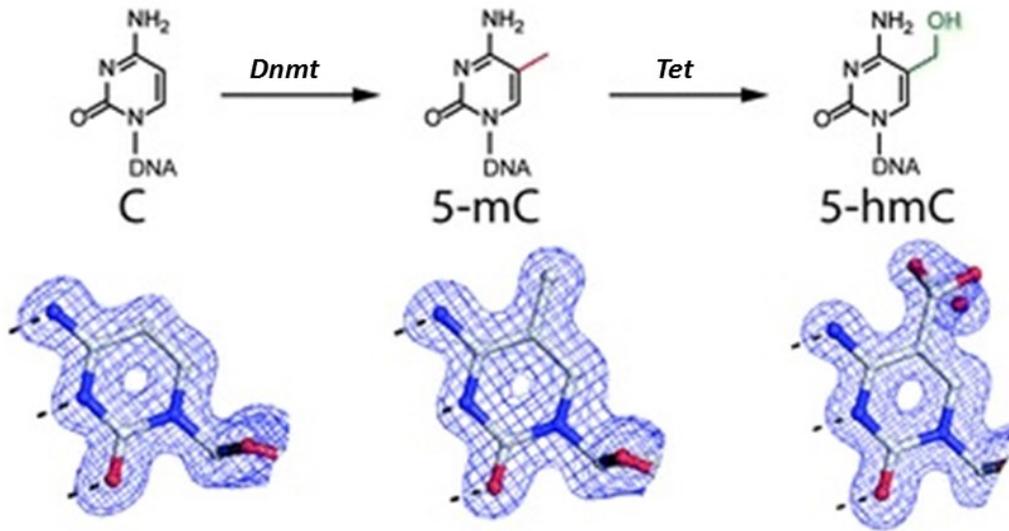
DNMT1 est responsable de catalyser la méthylation sur le nouveau brin d'ADN après sa synthèse (35, 40). Elle reconnaît donc l'ADN hémiméthylé, c'est-à-dire un brin qui est méthylé (le brin parent) et un brin qui ne l'est pas (le brin fille). C'est grâce à cette fonction que la méthylation est maintenue après la réplication et donc que la modification est conservée chez les cellules filles. Ainsi, on dit que la méthylation est une modification héritée. Comme

mentionné précédemment, DNMT1 sert aussi à maintenir la méthylation sur certains gènes cruciaux, dont les gènes à empreinte, pendant le remodelage épigénétique (8, 32, 33) (voir section 1.2).

L'absence complète de DNMT1 provoque une létalité embryonnaire au cours du premier trimestre (41, 42). Une perte transitoire de DNMT1 pendant la préimplantation dans un modèle de cellules souches embryonnaires produira des modifications importantes au niveau des gènes à empreinte et de certains autres gènes qui réagissent comme ces derniers à la perte de maintenance de la méthylation (32). Au niveau murin, aucun modèle viable de perte transitoire de DNMT1 n'est encore publié.

DNMT2 méthyle plutôt les résidus provenant des ARNs de transfert (43). Bien que très conservé à travers plusieurs espèces, dont l'humain, la souris, la drosophile et le ver, son rôle reste encore peu connu. Une étude récente a cependant montré qu'une absence de DNMT2 provoque une hypertrophie cardiaque chez la souris puisque cette enzyme semble limiter la croissance cardiaque en régulant la phosphorylation de l'ARN polymérase II (44). Une autre étude sur la souris a aussi montré que l'absence de DNMT2 provoque, entre autres, une réduction des télomères, une augmentation de l'apoptose, une augmentation de l'activité des DNMTs 1, 3a et 3b et donc une hyperméthylation globale de l'ADN et l'ARN (45).

Au contraire des DNMTs, les enzymes Ten Eleven Translocation (TET) sont responsables d'enlever la méthylation sur le génome en oxydant les 5-méthylcytosines (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) (Figure 2) (46, 47). Le rôle de la 5hmC est encore très peu connu. Cependant, de récentes études tendent à montrer un rôle pour la 5hmC dans certaines dérégulations et pathologies cérébrales et neurologiques (48, 49). Les vertébrés possèdent trois enzymes TET, soit TET1, TET2 et TET3 (50). TET 1 et 2 sont principalement impliquées dans la maintenance de la pluripotence dans les cellules souches (50) alors que TET3, seule forme de ces enzymes présentes pendant la préimplantation, est responsable de la déméthylation active pendant cette période (5, 50).

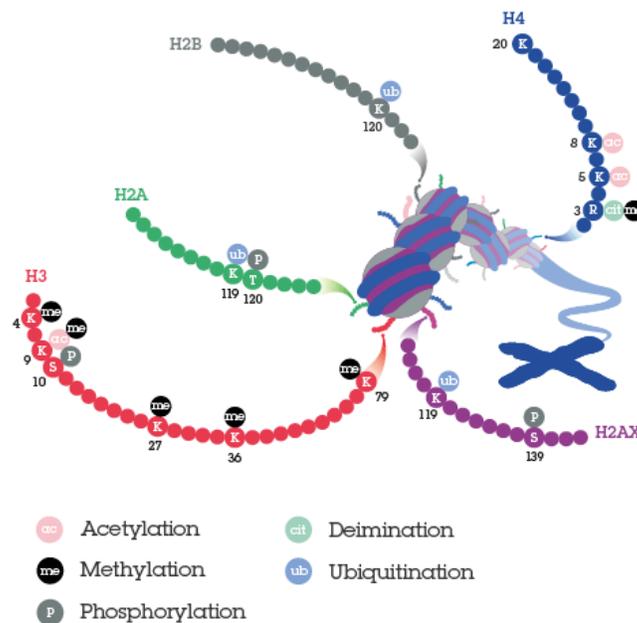


**Figure 2. Méthylation des cytosines de l'ADN par les enzymes *Dnmt* et déméthylation des 5-méthylcytosines en 5-hydroxyméthylcytosine par les enzymes *Tet*.** Adapté de Lercher, 2014 (51).

### 1.1.2 Les modifications d'histones

Les modifications des histones constituent une autre forme de régulation épigénétique. Ces modifications (e.g., méthylation, acétylation, phosphorylation) (Figure 3) sont apposées sur les extrémités N-terminale dépassant hors du nucléosome d'ADN, aussi appelées les queues des histones. Les modifications sont principalement ajoutées sur un acide aminé lysine, arginine ou sérine spécifique de l'histone. L'addition de ces groupements post-traductionnels régulera le niveau de compaction de l'ADN sur l'octamère d'histones et donc l'accessibilité aux promoteurs pour les facteurs transcriptionnelles (52, 53). Diverses enzymes sont responsables d'apposer ou d'enlever une ou quelques marques spécifiques sur un acide aminé précis d'une queue d'histone précise. Contrairement à la méthylation de l'ADN qui est généralement associée à la répression génique, les modifications d'histones peuvent avoir des effets d'activation ou de répression, selon la marque apposée et le résidu modifié. Par exemple, l'ajout de méthylation sur la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) est associé à la répression génique. Au contraire, l'ajout de méthylation sur la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4) est généralement associé aux

promoteurs de gènes activement transcrits, tout comme l'acétylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27ac). Des expériences récentes dans un modèle de cellules souches embryonnaires de souris montrent toutefois qu'il est possible d'observer une activité transcriptionnelle avant même l'apposition de ces marques activatrices sur le génome (54). L'ajout et le retrait des modifications d'histones sont extrêmement dynamiques et dépendants du contexte cellulaire ce qui, tout comme pour la méthylation d'ADN, rend l'étude et la compréhension précise du rôle de ces marques plus complexe que ce qui était d'abord décrit (révisé dans (55)).

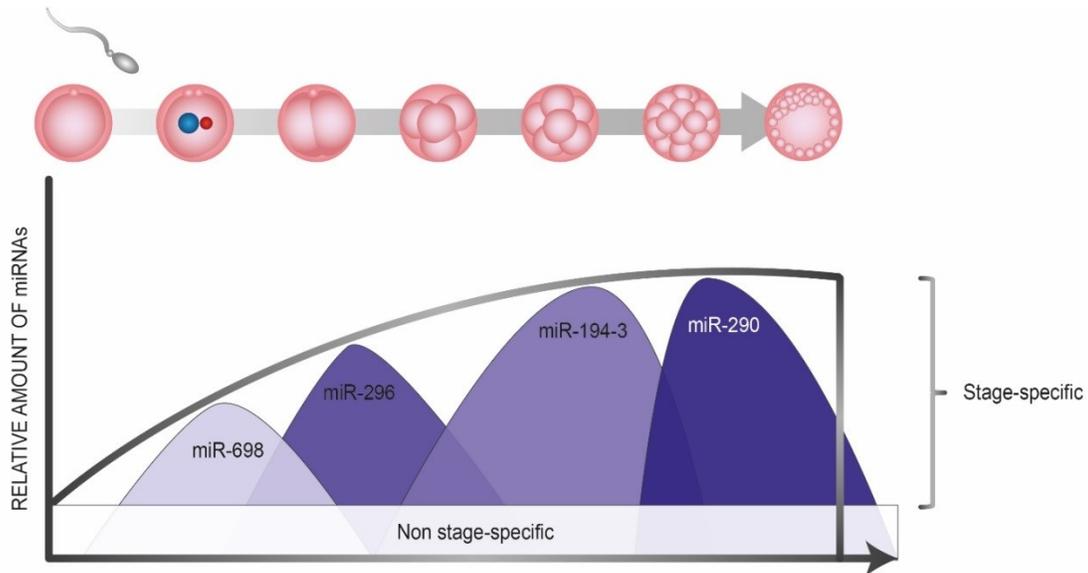


**Figure 3. Principales modifications des queues d'histones.** Adapté de Abcam.com

### 1.1.3 Les micro-ARNs

Les micro-ARNs (miARNs) sont de petits ARNs non codants (de 21 à 24 paires de base) qui sont impliqués dans la régulation post-traductionnelle de l'expression génique (56-58). Ils existent quelques centaines de micro-ARNs, certains avec une fonction précise dans un tissu en particulier ou un contexte cellulaire quelconque. Bien qu'un grand nombre de ces petits ARNs aient été identifiés, beaucoup d'entre eux ont encore une fonction inconnue.

Pendant le développement embryonnaire, les micro-ARNs d'origine maternelle sont nécessaires en contrôlant l'expression des gènes et l'abondance des ARNs messagers (59). Des études ont montré que l'absence complète des micro-ARNs pendant cette période entraîne la létalité embryonnaire (59, 60). La perte de certains miARNs précis est aussi connue pour causer des défauts de développement importants (60). Au courant des dernières années, de nombreuses études ont permis d'identifier le rôle précis de certains miARNs. Par exemple, il a été démontré que le regroupement miR-290-295 joue un rôle crucial dans le développement embryonnaire en régulant la pluripotence, le renouvellement et la reprogrammation cellulaire (61) (Figure 4). Une autre étude a aussi démontré que le micro-ARN miR-219 favorise la différenciation de cellules souches embryonnaires en cellules neurales (62). Plusieurs autres miARNs sont aussi connus pour jouer des rôles cruciaux dans le développement du cerveau, particulièrement au niveau du développement neural (63, 64) et des dérégulations de ces miARNs peuvent entraîner divers troubles neurodéveloppementaux (TND) comme le trouble du spectre de l'autisme (TSA) (65, 66). Il a aussi été avancé que les micro-ARNs seraient très importants lors de l'acquisition de l'indépendance du génome du jeune embryon en facilitant la transition entre les ARNs messagers maternels et ceux de l'embryon pendant la préimplantation (67-69). Après l'implantation, ils participent aussi à la spécification des trophoblastes (70). Bien que de grandes avancées aient été accomplies depuis les dernières années, les micro-ARNs sont des marques épigénétiques encore émergentes à propos desquels il reste beaucoup à connaître et à découvrir.



**Figure 4. Quantité relative de micro-ARNs pendant le développement.** La quantité globale de micro-ARNs augmente pendant toute la période préimplantatoire jusqu'à l'implantation ou plusieurs micro-ARNs non spécifiques sont exprimés de façon constante. Certains micro-ARNs, tels miR-698, miR-296, miR-194-3 et miR290 sont par contre exprimés seulement à certains stades spécifiques de la préimplantation. Adapté de Legault et *al.*, 2017 (71).

## 1.2 La période préimplantatoire et le remodelage épigénétique

La période préimplantatoire, soit la période entre la fertilisation de l'ovocyte par le spermatozoïde et l'implantation de l'embryon dans l'utérus, est un stade très important du remodelage épigénétique. Durant ces sept jours chez l'humain et ces quatre jours chez la souris, l'embryon voyage dans les trompes de Fallope vers l'utérus et l'environnement embryonnaire subit une multitude de changements, entre autres, au niveau des nutriments, du pH et des facteurs de croissance, qui sont cruciaux pour la viabilité et le développement du jeune embryon (72-74).

### 1.2.1 Développement embryonnaire préimplantatoire

Dès la fertilisation, le zygote, ou embryon 1-cellule, subit des divisions rapides et synchronisées qui permettent une croissance rapide du nombre de cellules. Chaque blastomère ou cellule embryonnaire et ses constituants sont individuellement répliqués à l'intérieur de la *zona pellucida* (i.e. zone pellucide), qui constitue une barrière protectrice pour l'embryon. Au stade 8-cellules, les blastomères deviennent polarisés par des interactions cellule-cellule très spécifiques (75-78). Le stade 8-cellules constitue aussi le début de la compaction des cellules qui progresse au cours des divisions subséquentes jusqu'à ce que les liens entre les cellules deviennent très peu détectables (75-78). Au cours de la période préimplantatoire, des divisions asymétriques mènent aussi à la formation de deux lignées cellulaires distinctes : la masse de cellules internes (*inner cell mass*, ICM) qui servira au développement de l'embryon et les cellules du trophoctoderme (TE) qui mèneront au développement du placenta et des tissus extra-embryonnaires (79, 80). Un processus de cavitation se produit pendant les divisions suivantes par la formation de *blastocœle*, de petites cavités remplies de fluide sécrété par les trophoblastes au stade de la *morula*. Ceci permet au blastocyste, la masse de cellules embryonnaires, de prendre de l'expansion en sortant de la *zona pellucida* pour son implantation dans l'utérus (80, 81).

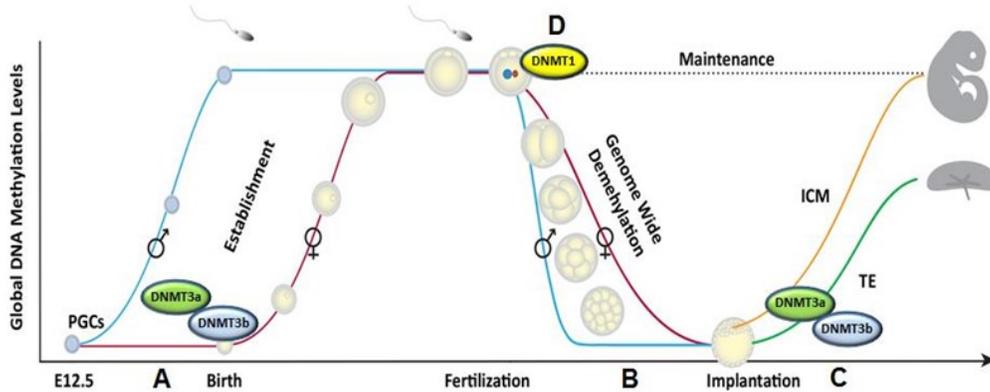
### 1.2.2 Déméthylation des génomes parentaux

En plus de ces changements morphologiques, le jeune embryon subit aussi de profonds changements épigénétiques pendant la préimplantation. Le remodelage ou la reprogrammation épigénétique est un processus représenté par une vague de déméthylation sur presque tout le génome pendant la préimplantation suivie d'une vague de reméthylation du génome embryonnaire après l'implantation comme démontré à la Figure 5. Cette reprogrammation permettra ultimement, à l'embryon d'acquérir son propre méthylome afin de réguler la transcription génique des cellules en processus de spécification et différenciation qui est

essentielle pour la suite du développement embryonnaire. De façon intéressante, la vague de déméthylation du génome se fait de façon désynchronisée entre l'allèle paternel et celui maternel (Figure 5) (82).

Le génome du sperme est fortement méthylé, près de 85% des CpGs du sperme sont en effet méthylés comparativement à environ 30% chez l'ovocyte (83). Juste après la fertilisation, l'allèle paternel perd ses protamines afin qu'elles soient remplacées par une acétylation rapide des histones H3 et H4 (84). Par la suite, son génome subit une déméthylation globale, à l'exception des gènes à empreinte et de certains rétrotransposons, dont la méthylation est conservée et doit être maintenue par DNMT1 (23, 32, 85). Des études suggèrent que les enzymes TET, principalement TET3, seraient majoritairement responsables de cette déméthylation active en convertissant les 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine (82, 84, 86, 87), un état intermédiaire entre la méthylation complète de la cytosine et l'absence de méthylation. D'autres études affirment plutôt que les premières réplifications de l'ADN sont responsables de l'effacement des marques de méthylation existante puisqu'elles sont diluées à chaque cycle entraînant une déméthylation passive (86, 88). Le mécanisme exact de cette déméthylation du génome paternel n'est donc pas parfaitement établi. Il semble cependant acceptable, grâce à ces études, d'affirmer que la déméthylation de l'allèle paternel est l'œuvre de ces deux mécanismes, principalement la déméthylation active (5).

La déméthylation de l'allèle maternel a longtemps été très controversée. Avec les informations obtenues par divers modèles d'études, il semble que l'allèle maternel soit sujet à une déméthylation beaucoup moins intense que l'allèle paternel et que ce soit plutôt l'effet d'une déméthylation passive, c'est-à-dire une dilution des marques de méthylation après la réplification de l'ADN, que par l'action de TET3 (86, 88). D'ailleurs, il a été démontré, par plusieurs études, que la protéine DPPA3 (*Developmental Pluripotency Associated 3*, aussi appelé STELLA ou PGC7) protège l'ADN méthylé de l'allèle maternel contre l'oxydation par TET3 (82, 84, 86, 87, 89).



**Figure 5. Profils de méthylation dans les gamètes et au cours du développement embryonnaire.** **A.** DNMT3a et DNMT3b établissent les profils de méthylation dans les gamètes à maturation. **B.** Après la fertilisation, une vague de déméthylation globale de tout le génome s'opère pendant toute la période préimplantatoire. C'est ce qu'on appelle le remodelage épigénétique et la mise en place du programme épigénétique embryonnaire. C'est à ce moment que le génome de l'embryon acquiert son autonomie. **C.** Après l'implantation, DNMT3a et DNMT3b établissent les marques de méthylation sur le génome embryonnaire, autant sur les cellules de la masse interne (ICM) qui mèneront à la formation de l'embryon que dans les cellules du trophoblaste (TE) qui mèneront à la formation du placenta. **D.** Pendant la vague de déméthylation, DNMT1 maintient les marques de méthylation sur certaines régions spécifiques du génome qui requièrent une méthylation constante, dont les gènes à empreinte et certains gènes agissant comme les gènes à empreinte (*imprinting like*). Adapté de McGraw et *al.*, 2013 (90).

### 1.2.3 Maintenance de la méthylation

Certaines régions des génomes parentaux doivent échapper à la vague de déméthylation et garder les marques établies dans les gamètes. Ces régions sont principalement les gènes à empreinte, les rétrotransposons et certaines régions spécifiques du génome (23, 32, 85). Ce maintien de la méthylation est, entre autres, crucial aux régions de contrôle de l'empreinte (*imprinted control regions*) durant ce remodelage embryonnaire pour le bon développement, voire pour la survie de l'embryon (9, 32). La méthylation sur ces régions durant la préimplantation est maintenue par différents isoformes de DNMT1 – DNMT1s (somatique) et DNMT1o (ovocyte) – puisque DNMT1 est absent durant cette période (91-95). DNMT1o est spécifiquement actif au stade 8-cellules du développement embryonnaire. L'absence de celui-ci

ou une perturbation de la méthylation à ce stade, soit le seul stade du développement où cette enzyme est active, résulte en des anomalies placentaires (95, 96) et des anomalies cérébrales létales à mi-gestation (92). Le maintien de la méthylation au stade 8-cellules est donc très important pour l'établissement du programme épigénétique embryonnaire et sera d'ailleurs particulièrement visé par notre étude. Une perturbation du maintien de la méthylation à ce stade peut avoir des conséquences épigénétiques graves qui perdurent au cours du développement.

#### **1.2.4 Méthylation du génome embryonnaire**

La déméthylation et l'acquisition de l'autonomie du génome embryonnaire jouent un rôle dans la compaction de la *morula* qui mènera à la formation du blastocyste et à l'établissement des deux populations de cellules distinctes. Le génome du jeune blastocyste deviendra totalement fonctionnel et, dès l'implantation, une reméthylation progressive se fera pendant les stades subséquents du développement de façon spécifique au sexe, au type cellulaire et aux tissus par l'action de DNMT3a et DNMT3L (97). Alors que la méthylation *de novo* augmente rapidement dans les cellules de la masse interne, la reméthylation des cellules du trophoctoderme est beaucoup moins intense, restant toujours hypométhylée en comparaison avec les cellules de la masse interne (98). Comme mentionné précédemment, cette vague est absolument nécessaire à la bonne mise en place du programme épigénétique embryonnaire et pour éviter que des erreurs épigénétiques potentielles provenant des gamètes parentaux viennent perturber le bon développement.

Tout juste après l'implantation, ce sont d'abord les CpGs des éléments transposables, ceux du corps des gènes et des promoteurs pauvres en CpG, qui sont méthylés. À ce stade, les promoteurs riches en CpG sont protégés de la méthylation. Par contre, cette protection semble de courte durée, puisqu'entre E4.5 et E5.5 chez la souris (soit tout juste après l'implantation du blastocyste), la méthylation augmente d'environ 50% (8), signifiant que la méthylation *de novo* du génome est un processus progressif, mais extrêmement rapide. Au stade E8.5, toujours chez la souris, des études ont démontré qu'environ 79% des promoteurs contenant des îlots CpG méthylés étaient reliés à des gènes germinaux. Les îlots CpG méthylés se retrouvant dans les

exons étaient, pour leur part, reliés à des gènes développementaux, responsables de l'embryogenèse et de la gastrulation. Ces séquences méthylées à E8.5 restent méthylées chez des tissus de souris adulte démontrant bien que l'acquisition de méthylation sur l'ADN est un processus stable pendant la période post-implantatoire (8).

Le remodelage épigénétique et la mise en place du programme épigénétique embryonnaire sont des processus très étudiés, mais dont il reste encore beaucoup à apprendre. Leur importance est sans équivoque et la sensibilité par lesquels ces mécanismes semblent être régulés démontre que des dérèglements au cours de cette période auront des conséquences graves pour l'embryon (79).

### **1.2.5 Vulnérabilité de la période préimplantatoire**

Un environnement intra-utérin adéquat tout au long de la grossesse est vital pour la bonne croissance de l'embryon. Dès la fin des années 1980, des études ont commencé à mettre en lumière le lien entre un environnement *in utero* imparfait et le risque de développement de certaines maladies (99). Ces études ont mené, un peu plus tard, à la théorie du DOHaD, Developmental Origin of Health and Disease par David Barker, qui, à l'époque, tout comme encore aujourd'hui, cherche à mettre en lumière le lien et le mécanisme entre l'environnement maternel pendant la grossesse et ses impacts sur la vie du futur enfant (100-102).

Étant donné son dynamisme et tous les changements qui y occurrent, la préimplantation est particulièrement sensible aux dérégulations et variations de l'environnement extérieur. Plusieurs études récentes ont d'ailleurs montré l'impact que l'environnement maternel peut avoir. Entre autres, Pagé-Larivière et *al.* ont démontré avec un modèle de culture d'embryons porcins que l'exposition au bromodichlorométhane, un agent chimique ajouté au traitement de l'eau pour éliminer les bactéries, diminue le taux de développement en blastocyste et cause des perturbations aux profils de méthylation d'ADN et aux profils transcriptionnelles (2). Une autre étude *in vitro* a montré que l'addition de Trichostatin A (un inhibiteur des histones déacétylases) et de *BIX-01294* (un inhibiteur de la méthyltransférase d'histone *Ehmt2/G9a*) améliore le

processus de reprogrammation épigénétique dans les cellules somatiques des embryons clonés en régulant positivement la transcription de divers facteurs de pluripotence comme *Oct4* et *Cdx2* (103). Un modèle de souris a aussi démontré que l'exposition, pendant la préimplantation à des cyclophosphamides, une drogue utilisée en chimiothérapie, induit des malformations congénitales chez les embryons (104).

D'autres études se sont attardées sur l'impact des manipulations faites pendant la préimplantation dans le contexte des méthodes de reproduction artificielle, comme la fécondation *in vitro*. Plusieurs études, principalement sur la souris ou le bovin, ont démontré des altérations épigénétiques sur divers gènes à empreinte, tels que *Igf2/H19* et *SNRPN*, (105-108) à la suite de manipulations *in vitro*. Chez l'humain, plusieurs études démontrent que les enfants nés de ces méthodes semblent plus enclins à être atteints de maladies reliées à un défaut d'empreinte génomique comme la maladie de Beckwith-Wiedemann et le syndrome d'Angelman (révisé dans (95)). Des méta-analyses des données de la littérature montrent, en fait, une augmentation de la prévalence des désordres de l'empreinte génomique chez les enfants issus de conception par fertilisation *in vitro* ou injection cytoplasmique de sperme par rapport à la prévalence des enfants issus de conception naturelle. Cependant, le lien de cause à effet direct entre les méthodes de fertilisation artificielle et l'augmentation de cette prévalence ne peut pas, pour l'instant, être établi (109, 110). Des études prenant aussi en compte le type de problème de fertilité devront être réalisées afin d'étudier l'implication du problème d'infertilité dans les désordres d'empreinte génomique. La plupart des cas étudiés démontrent en fait une perte de méthylation sur l'allèle maternel à une région de contrôle de l'empreinte génomique. Une étude récente montre aussi une baisse significative de la méthylation de l'ADN de 4730 CpGs dans des échantillons de sang de cordon d'une cohorte d'enfants issues des méthodes de reproduction artificielle (111). Une autre étude décrit que les niveaux globaux de méthylation d'ADN diffèrent entre les placentas issus de grossesses naturelles et ceux issus de grossesses reliées à l'utilisation de méthodes de reproduction artificielle (112).

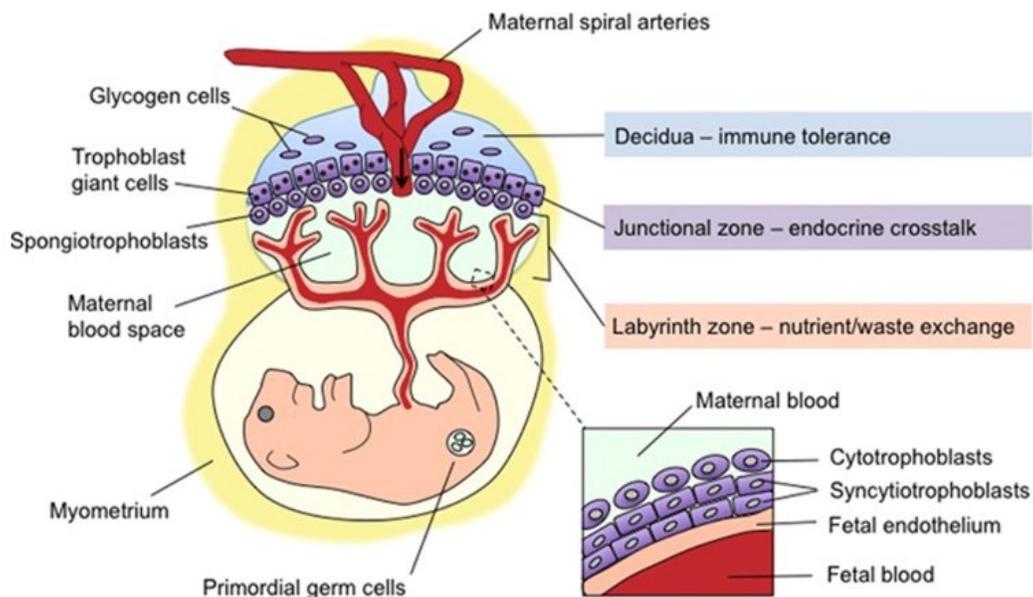
Même si l'oviducte et l'utérus répondent naturellement en essayant de balancer les effets néfastes extérieurs et d'offrir tout de même un environnement optimal pour le développement (113), il est indéniable, avec de tels résultats d'études, que l'environnement maternel pendant la grossesse, particulièrement pendant la période préimplantatoire, a un effet sur le développement

de l'embryon et, à long terme, aura des effets sur sa santé. Les mécanismes précis derrière ces impacts demeurent toutefois peu connus (79).

### **1.2.6 Le placenta, aussi vulnérable à l'environnement?**

Comme mentionné précédemment, les cellules du trophoctoderme (précurseurs des tissus extra-embryonnaires) et les cellules de la masse interne (précurseurs des tissus embryonnaires) sont dérivées du même bassin de blastomères avant la première spécification cellulaire observée dans le blastocyste. Donc, toutes perturbations survenant sur l'épigénome des blastomères avant leur spécification pourraient affecter les futurs tissus embryonnaires et extra-embryonnaires (e.g., le placenta).

Chez la souris, au stade du blastocyste, les cellules du trophoctoderme forment une membrane externe de cellules polarisées. Tout juste après l'implantation, ces cellules formeront rapidement l'ectoderme extra-embryonnaire et le cône ectoplacental. Les cellules externes du cône ectoplacental seront ensuite différenciées en trophoblastes qui iront, par la suite, s'invaginer dans le décidua maternel pour entrer en contact avec le sang maternel (114). Le chorion est formé peu après à partir de l'ectoderme embryonnaire et extra-embryonnaire. Grâce à l'interaction avec le cône ectoplacentaire, il fusionnera avec l'allantois pour former le placenta primitif. La différenciation des cellules de trophoblastes en sous-types cellulaires établira les différentes couches du placenta (115). La fusion de plusieurs trophoblastes mènera à la formation de syncytiotrophoblastes, des cellules multinucléées qui formeront des sites de vascularisation qui formera le labyrinthe du placenta, lieu d'échange de nutriments et d'oxygène. Une portion des trophoblastes du cône ectoplacentaire se différenciera, pour sa part, en spongiotrophoblastes et en cellules de glycogène pour former la zone jonctionnelle, la portion du placenta entre le labyrinthe du côté fœtal et le décidua maternel (Figure 6) (116).



**Figure 6. Schéma des différents types cellulaires composant le placenta murin à maturation.** Adapté de Bronson et Bale, 2016 (117).

Comme pour l'embryon, ces étapes de développement sont soumises à un contrôle strict par divers facteurs de transcription et épigénétiques qui peuvent être altérés par une perturbation provenant de l'environnement externe. L'impact d'une exposition prénatale néfaste pendant la préimplantation sur le placenta ne peut donc pas être négligé puisque celui-ci provient des mêmes cellules ayant subi la perturbation que l'embryon.

### 1.3 Exposition prénatale à l'alcool et Trouble du Spectre de l'Alcoolémie Fœtale

Il est connu qu'une exposition prénatale à l'alcool (EPA) par la mère peut avoir de graves conséquences sur l'enfant à naître. L'alcool est reconnu pour être un tératogène et un neurotoxique qui peut mener à une mort cellulaire excessive, en plus d'affecter les processus de différenciation et prolifération (118-120). Il semble aussi de plus en plus évident que les processus épigénétiques sont aussi affectés par une exposition prénatale à l'alcool. L'effet exact et le mécanisme derrière les perturbations épigénétiques causées par une exposition prénatale à

l'alcool ne sont toutefois pas encore élucidés. Particulièrement, les conséquences d'une exposition pendant la période préimplantatoire menant au Trouble du spectre de l'alcoolémie fœtale (TSAF) sont encore méconnues.

### **1.3.1 Le Trouble du Spectre de l'Alcoolémie Fœtale (TSAF)**

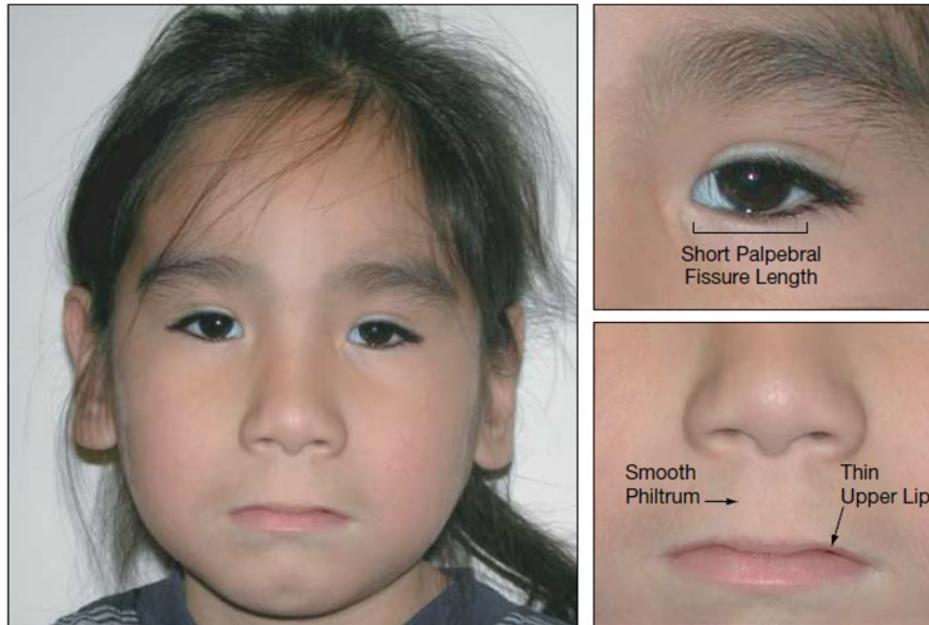
Le Trouble du Spectre de l'Alcoolisation Fœtale (TSAF) est un terme dit « parapluie », abritant les nombreux phénotypes et présentations reliées à une exposition prénatale à l'alcool (Figure 7). Plusieurs études épidémiologiques et prospectives ont mis en lumière le lien entre une prise d'alcool maternelle pendant la grossesse et divers symptômes maintenant inclus dans le TSAF, dont des retards de croissance, des défauts morphologiques et des troubles neurodéveloppementaux, en étudiant plusieurs cas où la consommation d'alcool pendant la grossesse a été confirmée (121-124).

On estime que 2 à 5% des enfants d'âge scolaire sont atteints d'une forme diverse de TSAF, la cause la plus évitable de morbidité à la naissance (125, 126). La présentation et la sévérité des symptômes sont extrêmement variables selon différents facteurs concernant l'exposition. On estime cependant à plusieurs milliards de dollars les coûts associés au TSAF incluant les coûts reliés aux soins de santé, aux services d'éducation spécialisée, aux services sociaux et aux frais de justice (127). Bien que très variées, la plupart des conséquences d'une exposition prénatale à l'alcool sont reliées à une dysfonction cérébrale due à un développement du cerveau altéré par la présence de métabolites néfastes (128). Malgré certaines spécificités, dont de fortes conséquences, au niveau du cerveau, les études réalisées jusqu'à présent sur l'exposition prénatale à l'alcool montrent que l'alcool peut, en fait, avoir un impact sur une variété d'organes. La gravité et la spécificité du phénotype dépendent en fait principalement du moment de l'exposition dans le développement, de sa durée et de la quantité d'alcool (129).



**Figure 7. Différents termes des désordres liés à une exposition prénatale à l'alcool regroupé sous le terme du Trouble du Spectre de l'Alcoolémie Fœtale (TSAF).** Adapté de FASDforever.com.

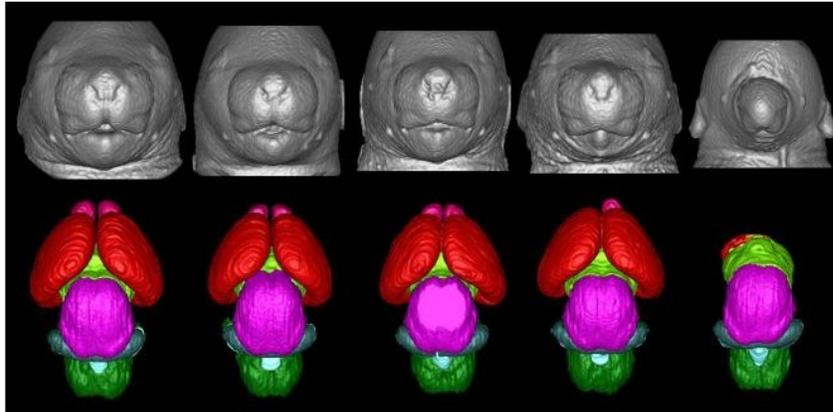
Le Syndrome de l'Alcoolisme Fœtale (SAF) est le phénotype TSAF le plus sévère relié à une exposition prénatale à l'alcool. Dès la naissance, les enfants atteints présentent des traits physiques caractéristiques, dont plusieurs anomalies craniofaciales (130). Entre autres, la plupart des enfants gravement atteints montrent une hypoplasie du nez, une fente palpébrale plus petite, une lèvre supérieure très mince et un philtrum hypoplasique (Figure 8) (130, 131). En plus de ces problèmes, les enfants SAF naissent avec un retard de croissance sévère et sont aussi atteints de grave déficience intellectuelle et mentale (125, 130-133). Les enfants atteints du SAF représentent environ 10% des enfants TSAF, soit environ 0.15% de la population (134, 135).



**Figure 8. Exemple de défauts faciaux caractéristiques observés chez les enfants atteints d'une forme sévère de TSAF.** Adapté de Sokol et *al.*, 2003 (136).

La plupart des enfants atteints du TSAF présentent plutôt des retards de croissance et intellectuel plus léger, sans les caractéristiques physiques uniques au SAF. Ces problèmes se présentent souvent par une variété de troubles neurodéveloppementaux (TND) comme un trouble du déficit de l'attention et de l'hyperactivité (TDAH), un problème de mémoire et de langage ou divers déficits d'apprentissage (4, 125, 130-133). Le TSAF se présente ainsi de façon invisible à la naissance et c'est plutôt lorsque l'enfant grandit et commence l'école que les problèmes commencent à être plus perceptibles.

Quelques études affirment que le cerveau antérieur pourrait être en grande partie responsable de plusieurs phénotypes des enfants atteints de TSAF puisqu'il a été démontré que cette région particulière du cerveau est associée à une forte expression de gènes liés à la neurodégénération ainsi qu'à des phénotypes autistiques chez divers enfants TSAF (137, 138). De plus, au cours du développement, les tissus adjacents au cerveau antérieur sont à l'origine de la formation de certaines portions du visage, dont le front, le nez et le philtrum (139) ce qui rappelle les anomalies craniofaciales présentes chez les enfants atteints par le SAF (Figure 9).



**Figure 9. Schéma d'imagerie par résonance magnétique des conséquences d'une altération du cerveau antérieur sur la formation du visage dans un modèle murin.**  
Adapté de O'Leary-Moore et *al.*, 2011.

### 1.3.2 Diagnostic du TSAF

Il n'existe, pour l'instant, aucun test moléculaire afin de diagnostiquer le TSAF ou ses symptômes de façon précoce. Les enfants présentant dès la naissance des traits craniofaciaux typiques, des retards intellectuels et de croissance visibles très tôt dans leur vie ainsi qu'avec une confirmation qu'il y a eu une exposition à l'alcool pendant la grossesse sont, pour le moment, les seuls enfants TSAF à pouvoir obtenir un diagnostic de SAF.

Des lignes directrices sont malgré tout en vigueur dans plusieurs pays, dont le Canada, afin de tenter d'identifier les enfants suspectés d'être atteints. Une approche systématique, le *4-Digit Diagnostic Code* est d'ailleurs en vigueur au Canada et fait intervenir une multitude de médecins et d'intervenants provenant de différents milieux afin de tenter de confirmer un TSAF chez un enfant soupçonné ou confirmé d'avoir été exposé à l'alcool au courant de la gestation (132, 140, 141). Malheureusement, cette méthode ne permet que très rarement un diagnostic positif chez les enfants présentant peu de traits et symptômes avant l'âge de 6 ans. Avant cet âge, il est aussi très difficile d'obtenir des résultats concluants pour plusieurs tests effectués, dont les évaluations psychologiques, en raison du très jeune âge de l'enfant (132). Pour cette raison, la plupart des enfants ne présentant aucun trait physique caractéristique ne peuvent pas

obtenir un diagnostic de TSAF précocement ce qui permettrait de réduire les effets néfastes sur la vie de l'enfant plus tard (142 , 143, 144). Ils sont plutôt diagnostiqués au cours de leur parcours scolaire alors que les problèmes deviennent plus accaparants. Certains sont même diagnostiqués très tard alors qu'ils sont de jeunes adultes. Ce manque de diagnostic précoce et efficace prive ainsi de nombreux enfants du support et des traitements nécessaires afin qu'il puisse avoir une vie comportant moins d'embûches.

Même si l'épigénétique présente un énorme potentiel comme biomarqueur du TSAF, une contrainte de taille s'impose : les modifications épigénétiques sont spécifiques à un tissu. Il faut donc être prudent lors du choix de l'échantillon. Il est évidemment impossible d'utiliser une partie de cerveau afin d'évaluer son paysage épigénétique chez l'humain. Il faut donc utiliser un autre tissu ou échantillon biologique en mesure de bien représenter ce qui se passe dans le cerveau, ce qui est, pour l'instant, peu connu. De nombreuses études ont, à ce jour, tenté de trouver un diagnostic moléculaire fiable pour le TSAF, principalement en utilisant des cellules épithéliales provenant de prélèvement buccal. Cette méthode non invasive fut, entre autres, utilisée pour deux études réalisées par des laboratoires de recherche canadiens. Dans le premier, le groupe du professeur Shiva M. Singh a analysé la méthylation de l'ADN extrait des prélèvements buccaux d'une cohorte déjà diagnostiquée TSAF et a trouvé 269 CpGs avec des niveaux de méthylation significativement différents de ceux d'une population contrôle. Ces changements étaient, entre autres, retrouvés sur des gènes impliqués dans les voies des protocadhérines, la signalisation *hippo* et la signalisation glutaminergique des synapses. De façon intéressante, bon nombre des CpGs avec une méthylation altérée reliés aux voies des protocadhérines étaient aussi affectés dans le cerveau de souris adulte d'un modèle murin TSAF (145). Une autre étude réalisée par le groupe du professeur Michael Kobor a, pour sa part, détecté 658 CpGs dont la méthylation était altérée en utilisant aussi des échantillons buccaux d'une cohorte d'enfants TSAF. De ce nombre, 41 CpGs présentaient une différence de méthylation supérieure à 5% en comparaison avec un groupe contrôle après correction pour les différences ethniques (146).

Ces deux études démontrent bien le potentiel d'utiliser un marqueur épigénétique afin d'identifier des régions qui semblent particulièrement vulnérables à l'alcool *in utero* dans le diagnostic du TSAF. Par contre, elles montrent aussi la complexité de trouver un marqueur

unique en raison des variables associées à l'exposition à l'alcool. En effet, la quantité, la durée de l'exposition (chronique ou unique) et le moment dans la grossesse de l'exposition sont toutes des choses qui peuvent faire varier la réponse moléculaire et phénotypique de l'exposition prénatale à l'alcool et rend donc le développement d'un marqueur unique extrêmement difficile (147). Les nombreux facteurs environnementaux et propres à chaque sujet rendent aussi les études humaines d'alcoolémie fœtale et la recherche de méthode diagnostique difficile. En effet, le profil génétique de la mère, sa santé, son mode de vie et l'exposition à d'autres contaminants ou substances chimiques (par exemple, la prise de drogue en plus de l'alcool) sont des facteurs qui influenceront aussi la réponse moléculaire à l'alcool (129, 146, 148).

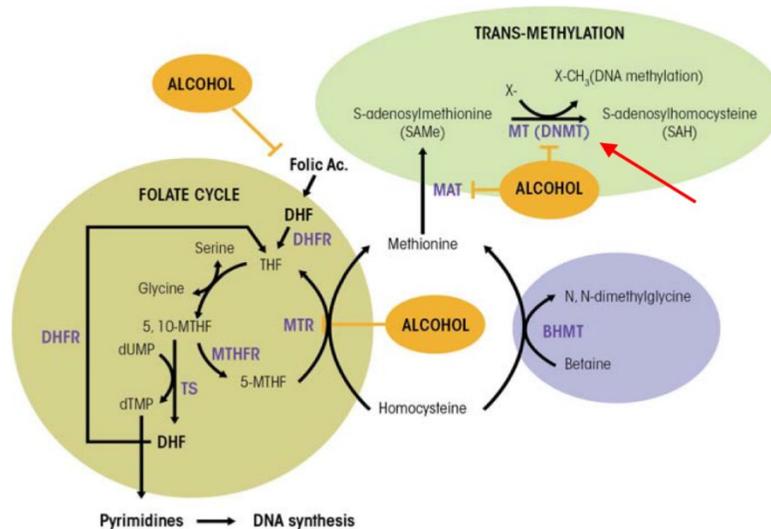
### **1.3.3 L'alcool et l'épigénétique**

En 1991, une première étude met la lumière sur l'effet de l'alcool sur l'épigénétique. Garro et *al.* ont, en effet, montré avec un modèle murin d'exposition prénatale à l'alcool que les cellules fœtales de souris ayant été exposées à l'alcool possédaient un niveau inférieur d'activité enzymatique des ADN méthyltransférases et donc avait des profils altérés de méthylation d'ADN. Ils ont aussi démontré que ces effets étaient dus à l'impact de l'acétaldéhyde, le principal métabolite de la dégradation de l'éthanol (149). La dégradation de l'alcool par l'alcool déshydrogénase génère, en effet, des molécules d'acétaldéhyde (150), un métabolite extrêmement toxique, générant des conséquences encore plus nocives que l'éthanol non dégradé. Par la suite, plusieurs études ont montré un ensemble de conséquences épigénétiques initiées par l'interférence de l'acétaldéhyde dans des processus métaboliques vitaux (149, 151, 152).

### 1.3.3.1 Effet de l'alcool sur le métabolisme du carbone

Une perturbation au niveau du paysage épigénétique après une exposition à l'alcool fut suggérée en raison de son effet sur le métabolisme du carbone (1C metabolism). Cette grande voie métabolique inclut, entre autres, le cycle de l'acide folique, le cycle méthionine-homocystéine et l'action des DNMTs, qui sont tous inhibés par l'alcool (133, 153). Ces effets sont principalement les conséquences d'une inhibition des enzymes du métabolisme et de la régénération de la méthionine (Figure 10) qui sont grandement affectés par l'alcool et principalement l'acétaldéhyde. La méthionine est un acide aminé essentiel pour la formation du S-adénosylméthionine (SAM) qui agit comme donneur principal de groupement méthyle dans diverses réactions, dont la méthylation de l'ADN. L'acétaldéhyde inhibe d'ailleurs l'activité de la méthionine synthase, responsable de prévenir la conversion de l'homocystéine en méthionine (154). L'acétaldéhyde réduit aussi l'expression d'un important transporteur de folate (RFC1) ce qui réduit l'absorption de folate par les reins et l'intestin (155). Le folate joue un rôle majeur durant le développement du cerveau et du système nerveux en étant le principal donneur de groupement méthyle (156, 157).

L'alcool, particulièrement l'acétaldéhyde, réduit donc la quantité de groupement SAM disponible, en plus de diminuer l'absorption de l'acide folique, ce qui réduit considérablement le nombre de groupements méthyles disponibles pour la méthylation de l'ADN et des histones. Combinée à l'action des enzymes DNMTs qui sont, elles aussi, inhibées par l'alcool, la réaction de méthylation de l'ADN est donc beaucoup plus difficile en présence d'alcool. Cela peut avoir de graves conséquences sur l'établissement et le maintien du paysage épigénétique ainsi que sur le développement de divers phénotypes (133, 153).



**Figure 10. Métabolisme du carbone (1C metabolism) et alcool.** Représentation des mécanismes du métabolisme du carbone inhibés par l'alcool qui, ultimement, mènent à une inhibition de la méthylation de l'ADN. L'alcool interfère, entre autres, dans les réactions du cycle de l'acide folique, celles du cycle méthionine-homocysteine et avec l'action des DNMTs. Adapté de Varela-rey et *al.*, 2013 (153).

### 1.3.3.2 L'épigénétique et l'alcool dans le développement du système nerveux

L'épigénétique joue aussi un rôle crucial dans le développement du système nerveux, entre autres, en régulant la méthylation monoallélique sur les gènes à empreinte et en établissant des profils de méthylation précis pour différents types cellulaires du cerveau afin de former les différentes structures du cerveau (11, 158-160). Une exposition prénatale à l'alcool peut ainsi mener à des malformations du cerveau et à des retards de croissance en perturbant l'établissement des patrons de méthylation spécifique pour le bon développement (148).

Une exposition à l'alcool pendant le développement du système nerveux aura plusieurs impacts négatifs. Une étude utilisant un modèle de cellules souches neurales murines a démontré que l'alcool cause une augmentation du temps normal du cycle cellulaire ce qui affecte particulièrement certains gènes spécifiques. À long terme, ce ralentissement du cycle cellulaire réduit aussi le nombre de cellules totales des différentes structures du cerveau et cause des retards de la croissance de celles-ci (161). Toujours en étudiant l'effet de l'alcool sur des cellules

souches neurales de souris, il a aussi été démontré que les conséquences sur l'épigénome de cette exposition causaient des retards de différenciation cellulaire (162) ainsi que des modifications dans l'expression de plusieurs gènes développementaux cruciaux, tels *Nestin* et *Pax6* (163).

En raison de ces fortes associations entre l'exposition à l'alcool, les dérégulations de divers mécanismes épigénétiques reliés à la méthylation et le développement du système nerveux, de nombreuses recherches se concentrent sur l'étude des mécanismes initiant cette cascade de conséquences entraînant ultimement des structures et fonctions cérébrales altérées par des dérégulations épigénétiques causées par l'exposition prénatale à l'alcool.

### **1.3.4 Modèles d'exposition à l'alcool**

Au début des années 90, plusieurs publications sur des modèles *in vitro* d'exposition à l'alcool voient le jour. Au départ, ces études avaient pour but d'étudier comment l'ajout d'alcool au milieu de culture pouvait en fait améliorer la croissance cellulaire. En étudiant plusieurs dosages différents, ils ont plutôt démontré l'effet néfaste de l'éthanol, variable selon la quantité d'alcool ajoutée. En effet, une étude de 1993 démontre que l'ajout de 0.4% (w/v) d'alcool au stade 1-cellule inhibe complètement le développement alors que l'ajout de 1.6% au stade 1 ou 2-cellules diminue considérablement la formation en blastocyste. Par contre, lorsque les embryons sont exposés à seulement 0.1% d'éthanol, une augmentation de la formation de blastocyste est observée en améliorant la sortie des embryons de la *zona pellucida* et en augmentant le taux d'implantation des embryons après le transfert (164). Une autre étude montre aussi que l'ajout de 0.05% et 0.1% au stade de *morula* améliore le processus de cavitation. Quelques-unes de ces études montrent aussi une augmentation du calcium intracellulaire après l'exposition à de faibles concentrations d'alcool (165, 166). L'augmentation du taux de calcium est couramment utilisée dans certaines manipulations *in vitro* afin de stimuler l'activation de l'ovocyte pour la fertilisation (167, 168). Ceci concorde avec les observations réalisées dans certaines études qui démontrent qu'une exposition à une faible concentration d'alcool dans le milieu de culture favorise le développement précoce de l'embryon (164, 169)(voir tableau 1). Il

est d'ailleurs connu que la concentration de calcium intracellulaire peut influencer l'expression génique de divers types cellulaires, comme dans les cellules neuronales (170-173). Donc, nous pouvons supposer qu'une augmentation du calcium intracellulaire à la suite d'une exposition à l'alcool pourrait également modifier les profils d'expression génique et ainsi affecter la croissance et le développement cellulaire. Cependant, les expériences *in vitro* d'exposition à l'alcool chez l'embryon préimplantatoire sont très sommaires et n'ont pas investigué les processus moléculaires pouvant mener à de possibles altérations épigénétiques ou transcriptionnelles. Un modèle d'étude du même genre fut aussi publié récemment. Pagé-Larivière et *al.* ont, en effet, exposé des embryons porcins à 0.2% d'alcool pendant toute la période préimplantatoire. En plus d'augmenter l'apoptose et de réduire le potentiel de la membrane mitochondriale, cette exposition a causé des dérégulations transcriptionnelles dans des gènes reliés aux voies d'activation du stress oxydatif et des dommages au système nerveux (174).

Un résumé des différents modèles *in vitro* d'exposition prénatale à l'alcool pendant la préimplantation est disponible au Tableau 1. Ces différents modèles ont été très utiles pour montrer les conséquences sommaires sur le développement du système nerveux lors d'une perturbation épigénétique causée par une exposition à l'alcool. Cependant, l'absence de métabolisme dans ce type de modèle ne permet pas pleinement d'évaluer les conséquences des métabolites et dérivés de l'alcool, comme l'acétaldéhyde, et ne représente donc pas concrètement ce qui se produit de façon *in vivo*.

#### **1.3.4.1 Les modèles animaux**

Les études d'exposition prénatale à l'alcool utilisant un modèle animal sont nombreuses et très diversifiées. Ces études permettent un excellent contrôle de plusieurs facteurs, comme l'environnement, le profil génétique et l'alimentation, qui ne peuvent être régulés dans les études utilisant des échantillons humains. Plus encore, l'utilisation des animaux permet l'accès à des types cellulaires, par exemple des cellules du cerveau, impossible à avoir de sujets humains pour des raisons évidentes. Ceci est très utile pour bien comprendre les mécanismes derrière l'EPA, particulièrement dans les études épigénétiques où les modifications sont spécifiques à chaque

tissu. Ces modèles permettent aussi une meilleure représentation du métabolisme humain que les modèles cellulaires.

Ainsi, de nombreuses études publiées ont permis de faire de grandes avancées sur les conséquences d'une exposition à l'alcool pendant la gestation. Malheureusement, les nombreuses divergences entre elles, ainsi que les zones grises encore non étudiées, laissent encore plusieurs questions en suspens sur le mécanisme derrière une EPA et son implication au niveau épigénétique. En raison de cette diversité, il est aussi très difficile de comparer ou combiner les résultats obtenus de chacune d'elles sans avoir un biais provenant du modèle utilisé.

Récemment, les altérations épigénétiques causées par une EPA ont particulièrement été investiguées. En effet, au cours des dernières années seulement, plus d'une dizaine de publications utilisant des modèles animaux d'exposition prénatale à l'alcool ont démontré qu'une exposition prénatale à l'alcool provoque des modifications au niveau de la méthylation de l'ADN, des modifications d'histones ou de la transcriptomique des embryons (4, 175-184). Comme mentionné précédemment, les divergences de la méthode rendent impossible tout partage des données pour conclure à un mécanisme concret. Les divergences sont, entre autres, au niveau du moment et de la durée d'exposition pendant la grossesse (trimestre de la grossesse, exposition chronique ou aiguë), de la méthode d'exposition (consommation volontaire, gavage, injection sous-cutanée ou intrapéritonéale) et la dose d'alcool consommée. L'effet du dosage et du moment d'exposition ont d'ailleurs été étudiés de façon plus spécifique.

Au niveau du dosage, Veazey *et al.* (185) se sont d'abord basés sur un modèle *in vitro* de cellules souches neurales pour affirmer que l'effet obtenu par différents types d'exposition (modérée ou aiguë) produit des conséquences distinctes au niveau des marques d'histones, une autre modification épigénétique. Ils ont aussi utiliser un modèle similaire *in* en injectant des femelles gestantes au jour post-fertilisation 7 avec 2 doses de 2.9g/kg d'éthanol de façon

Tableau I. Modèle *in vitro* d'exposition à l'alcool pendant la préimplantation. Adapté de Legault et al., 2017 (71).

Exposition		Modèle			Références
Temps	Concentration	Espèce	Durée	Résumé des principaux résultats	
<b>Blastocyste</b>	0.1%	Embryon de souris en culture	5 min	↑ Niveau d'ARNm de c-Myc	(186)
<b>Blastocyste</b>	0.1%	Embryon de souris en culture	5 min	↑ Niveau de calcium intracellulaire	(165)
<b>1-cellule, 2-cellules ou 4-cellules</b>	0.1%, 0.4% ou 1.6%	Embryon de souris en culture	24h	↓ Taux de blastocyste (1.6% 1-cell, 2-cell) Inhibition du développement (0.4% 1-cell) ↑ Taux de blastocyste (0.1% 1-cell, 2-cell)	(164)
<b>2-cellules</b>	0.05% à 1% (Différents types d'alcool)	Embryon de souris en culture	24h	↓ Taux de blastocyste dépendant de la dose (butanol, propanol, isopropanol, méthanol)	(166)
<b>Morula</b>	0.1% à 1% (différents types d'alcool)	Embryon de souris en culture	24h	↑ Niveau de calcium intracellulaire (0.1% ou 1% éthanol, 1% butanol)	(166)
<b>2-cellules</b>	0.1% ou 1%	Embryon de souris en culture	8 jours	↓ Taux de blastocyste (1%)	(169)
<b>2-cellules</b>	0.1% ou 1%	Embryon de souris en culture transféré <i>in vivo</i> à 4 jours	8 jours	↑ Taux d'implantation (0.1%) ↓ Taux d'implantation (1%) ↓ Taux de survie fœtale (1%)	(169)
<b>1-cellule</b>	0.2%	Embryon de porc en culture	7 jours	↓ Taux de blastocyste Changements dans les niveaux d'expression normaux Dysfonctions des mitochondries Activations de voies métaboliques reliées au système nerveux et au stress oxydatif	(174)

intrapéritonéale avec un intervalle de deux heures entre les doses. Ils ont démontré des effets importants au niveau de la méthylation de l'ADN et de la transcriptomique de plusieurs gènes cruciaux pour le développement, dont *Dnmt1*, *Kdm1a* et *Eed* (185). De plus, contrairement aux nombreux modèles d'étude d'exposition chronique à l'alcool (178, 180-182, 187, 188), ce modèle murin testait plutôt une exposition unique et aigüe.

Le moment de l'exposition à l'alcool influence aussi la réponse selon les processus développementaux qui sont affectés. Particulièrement au niveau du cerveau, différentes structures et fonctions se développent à chacun des trois trimestres de la grossesse. Au cours du premier trimestre, les premières structures cérébrales commencent à se développer et le tube neural se forme. La prolifération, migration et différenciation des neurones commencent au cours du 2<sup>e</sup> trimestre, alors que le développement cérébral est à son maximum pendant le troisième trimestre où les structures prennent forme et la prolifération et la croissance se fait rapidement. Il est important de noter que, chez la souris, l'équivalent au troisième trimestre humain se produit après la naissance, soit aux jours postnataux 0 à 9 environ (179, 189, 190). Une étude comportementale a été réalisée en 2013 par Mantha et *al.* (191) où ils ont exposé un modèle murin à l'alcool à des stades correspondant à l'équivalent de chacun des trois trimestres de grossesse chez l'humain, en débutant après la préimplantation. Ils ont en effet administré une dose d'éthanol correspondant à une exposition aigüe (deux doses de 2.5g/kg d'éthanol à 2h d'intervalle chacune, injectées de façon sous-cutanée) à deux moments à l'intérieur d'un même trimestre (E8/E11, E14/E16 ou P4/P7). Cette étude a montré des différences significatives au niveau des résultats à différents tests comportementaux et cognitifs. En parallèle à ces tests, Kleiber et *al.* (179), du même laboratoire, ont utilisé le même modèle d'exposition pour démontrer que, selon à quel stade du neurodéveloppement l'exposition à l'EtOH est faite, le patron de changement d'expression génique est différemment altéré. Conséquemment à cela, les processus biologiques et voies métaboliques affectés par l'alcool varient selon le moment de l'exposition (179, 192). Les résultats de ces deux études concordent donc avec les données de diverses études qui ont étudié les changements à la structure et morphologie du cerveau par une exposition à l'alcool à différents moments de la gestation (148). Il est ainsi clair que le moment de l'exposition a un impact sévère sur la réponse épigénétique embryonnaire et que certaines voies spécifiques seront affectées en fonction du stade du développement exposé à l'alcool. Ces

résultats fournissent aussi une première explication sur les divers symptômes et phénotypes des enfants TSAF, qui ne sont pas tous exposés à l'alcool au même moment et à la même fréquence pendant la grossesse.

Un autre facteur de divergence dans les études d'EPA utilisant un modèle animal est la méthode d'administration de l'alcool à l'animal. La méthode la plus simple et la plus représentative du métabolisme humain est évidemment de faire boire l'alcool à l'animal. Le modèle de consommation volontaire est donc couramment utilisé, particulièrement afin d'imiter une exposition chronique sur une longue période. Par contre, cette méthode permet seulement d'obtenir une approximation de la quantité d'alcool ingurgitée en mesurant le volume restant dans la bouteille. La concentration d'alcool dans le sang pouvant être obtenue par cette méthode varie entre 80 à 120 mg/dL ce qui n'est pas très élevé considérant que la souris métabolise l'alcool beaucoup plus rapidement que l'humain (193-195). Des méthodes alternatives, telles que le gavage, sont donc utilisées pour les modèles voulant étudier une exposition aiguë à l'alcool et où il est nécessaire d'obtenir des concentrations élevées d'alcool (environ 200mg/dL). Bien que cette méthode reproduit assez bien le métabolisme de l'alcool chez l'humain, il s'agit d'une méthode difficile et extrêmement invasive qui induit beaucoup de stress chez l'animal ce qui amène beaucoup de variabilité supplémentaire (196). Une étude utilisant cette méthode montre d'ailleurs plus de changements entre les contrôles gavés et non gavés qu'entre les échantillons gavés à l'alcool et les contrôles gavés (11).

Pour cette raison, plusieurs modèles utilisent plutôt l'injection intrapéritonéale ou sous-cutanée d'alcool qui permet aussi d'obtenir une concentration d'alcool sanguine au-dessus de 200mg/dL et qui génère peu de stress chez l'animal (196). Bien que l'alcool absorbé de cette façon soit métabolisé par le foie de la souris, elle ne passe cependant pas par le tractus gastrointestinal comme elle le ferait dans un cas de consommation humaine (197, 198). La méthode d'injection permet de déterminer précisément la quantité d'alcool à laquelle la souris est exposée et permet aussi de cibler une période précise du développement pour l'exposition.

### 1.3.4.2 Modèle d'exposition prénatale à l'alcool pendant la préimplantation

Malgré les centaines de papiers pouvant être consultés concernant une exposition prénatale à l'alcool et le trouble du spectre de l'alcoolémie fœtale, les études se concentrant sur la période préimplantatoire sont plutôt rares. La plupart de celles-ci étudient une exposition chronique à travers une longue période de la grossesse débutant pendant la préimplantation et se poursuivant après pendant le reste du développement embryonnaire. Ces modèles ont permis de grandes avancées sur les effets structuraux et fonctionnels au cerveau ainsi que sur les conséquences épigénétiques et transcriptionnelles causées par ce type d'exposition. Par contre, l'exposition prolongée empêche de connaître le moment où le défaut est initié et l'effet exact de l'exposition exclusivement pendant la préimplantation. Un résumé des différents modèles *in vivo* d'exposition prénatale chronique débutant pendant la préimplantation peut d'ailleurs être consulté au tableau 2.

Quelques études ont aussi utilisé un modèle animal pour investiguer les conséquences morphologiques d'une exposition prénatale à l'alcool exclusivement pendant la préimplantation (résumé au tableau 3). Au courant des années 1980, une série d'études provenant du laboratoire du Dr Sandor se sont attardées sur différents types d'exposition prénatale à l'alcool pendant la période préimplantatoire à l'aide de différents types de modèles (souris, rat, *in vitro*) ainsi que différents moments et durées d'exposition. Ils ont, entre autres, prouvé que l'EPA augmente les taux d'anomalies morphologiques, cause des retards de développement, diminue le taux d'implantation ainsi que le poids fœtal et celui du placenta (199-206). Ils ont aussi démontré l'impact nocif de l'acétaldéhyde dans les conséquences de l'exposition prénatale à l'alcool. Après injection intraveineuse d'acétaldéhyde, ils ont en effet observé des conséquences similaires ou plus importantes que lors d'injection d'éthanol non métabolisé. Ils ont observé des conséquences encore plus importantes lorsqu'ils ont empêché la métabolisation de l'acétaldéhyde par l'administration d'Antacol, faisant ainsi considérablement augmenter la concentration d'acétaldéhyde dans le sang en inhibant l'action de l'acétaldéhyde déshydrogénase (207).

**Tableau II. Modèle *in vivo* d'exposition chronique à l'alcool débutant pendant la préimplantation. Adapté de Legault et al., 2017 (71).**

Exposition			Modèle			Références	
Temps	Concentration	Méthode	Espèces	Âge	Tissu	Résumé des principaux résultats	
<b>E0.5 à E8.5</b>	EtOH 10%	Consommation volontaire	Souris	P87	Hippocampe	↑ Expression miR 135a, 135b, 467b-5p, 487b ↑ Expression Slc17a6 ↓ Méthylation d'ADN au promoteur de Slc17a6 ↑ H3K4me3 au promoteur de Slc17a6 ↓ protéine Vglut2	(182)
<b>E0.5 à E8.5</b>	EtOH 10%	Consommation volontaire	Souris	P87	Hippocampe	↑ Expression SLC17a6	(181)
<b>Toute la gestation et 10 jours après</b>	EtOH 10%	Consommation volontaire	Souris	P70	Cerveau entier	↓ Développement des réflexes, de la coordination et de l'apprentissage ↑ Anxiété ↓ Glra1, Grin2c	(180)
<b>Toute la gestation et 6 jours après</b>	EtOH 10%	Consommation volontaire	Souris	P60, P100		↓ Peur contextuelle ↑ Temps d'inspection d'un nouvel objet	(188)
<b>E1 à E22</b>	4.5g/kg	Gavage	Rat	P21	Hippocampe	↑ Activité des DNMTs Changement d'expression des gènes Dnmt1, Dnmt3a et MeCP2	(11)
<b>E1 à E16</b>	EtOH 4%	Diète liquide	Souris	E17, P7	Hippocampe	Méthylation d'ADN altéré (par coloration) Formation retardée de l'hippocampe ↓ Prolifération et maturation des cellules de l'hippocampe	(208)

<b>E0.5 à E8.5</b>	10% EtOH	Consommation volontaire	Souris	P28, P60	Hippocampe	<p>↑ Expression de 14 gènes + 2 micro-ARN (P28)</p> <p>↓ Expression de 9 gènes + 1 micro-ARN (P28)</p> <p>Changement de méthylation d'AND sur des CpGs spécifiques de Vmn2r64, Olfr110, Olfr601 (P28)</p> <p>Asymétrie des structures du cerveau (P60)</p>	(175)
<b>E1 à E18</b>	5g/kg	Diète liquide	Rat	E21	Astrocytes, cerveau	<p>↓ Immunoréactivité de GFAP, transcription et expression et stabilité d'ARNm (astrocytes)</p> <p>↑ Méthylation de GFAP (cerveau)</p>	(128)
<b>E1 à E20</b>	6.0 g/kg par jour	Intubation	Rat	E21, E33	Bulbe olfactif	<p>↓ Niveau d'ARNm de BDNF (E21, E33)</p> <p>↓ Nombre de cellules olfactives (E33)</p> <p>↑ Méthylation d'ADN de BDNF</p>	(209)
<b>E0.5 à E8.5</b>	10% EtOH	Consommation volontaire	Souris Agouti	P21	ADN de la queue	<p>↑ Méthylation D'ADN de l'allèle Avy</p> <p>↓ Poids de souriceaux</p>	(210)
<b>E1 à E22</b>		Diète liquide	Rat	P21, P55	Hippocampe et cerveau entier	<p>↑ Concentration d'homocystéine et de méthionine</p> <p>↓ Expression d'ARNm de Mtr, Mat2a (cerveau) (P21)</p> <p>↓ Expression d'ARNm de Mtr and Cbs (hippocampe) (P55, mâles)</p> <p>↑ Expression d'ARNm de Mtr, Mat2a, Mthfr, and Cbs (hippocampe) (P55, femelles)</p>	(211)
<b>Toute la gestation et 10 jours après</b>	10% EtOH	Consommation volontaire	Souris	P70	Cerveau	Changements de méthylation d'ADN (6660 promoteurs)	(4)

Une autre étude d'un groupe de recherche différent a aussi montré de nombreuses conséquences physiques chez des embryons au jour embryonnaire 15, après une exposition à 0.02mL/g ou 0.03mL/g d'éthanol 25% pendant une des six premières journées de la gestation. Ces défauts incluent une augmentation du taux de résorption et de mort fœtale, des anomalies craniofaciales (hydrocéphalie, microtie, hypoplasie des mandibulaires et maxillaires, défauts de la fente palatine), une diminution du poids fœtal et une augmentation du poids du placenta (212). Lors d'une expérience où ils ont étudié des embryons au jour de gestation E14 et E18 après une exposition à 0.03mL/g d'EtOH 25% au jour E2 et E6, ils ont aussi découvert une augmentation des mécanismes compensatoires et que donc bien que la croissance des embryons au jour E14 était retardée par rapport aux embryons contrôles, les différences étaient moindres au jour E18 (212). Ces études précoces ont énormément servi à la description et la caractérisation des conséquences morphologiques physiques d'une exposition prénatale à l'alcool.

À ce jour, la période préimplantatoire est cependant sous-étudiée au niveau épigénétique et moléculaire en utilisant des modèles animaux. En 2009, Haycock et Ramsay (160) ont pourtant montré qu'une exposition aiguë à l'alcool aux jours E1.5 et E2.5 dans un modèle de souris mène à de nombreux défauts physiques et moléculaires chez l'embryon et le placenta. Cette étude a confirmé les observations faites par une étude précédente (212) en démontrant que l'embryon ainsi que les placentas à mi-gestation (10.5 jours post-fertilisation) étaient significativement plus petits et montraient un retard de croissance par rapport aux échantillons contrôles. Du côté de l'épigénétique, cette étude a démontré que la méthylation sur l'allèle paternel du gène à empreinte *H19* était perdue dans le placenta et inchangée chez l'embryon (160). Malheureusement, seule la méthylation de ce gène en particulier a été étudiée.

**Tableau III. Modèle *in vivo* d'exposition maternelle à l'alcool visant spécifiquement la préimplantation. Adapté de Legault et al., 2017 (71).**

Exposition			Modèle				Référence
Temps	Concentration	Méthode	Espèce	Âge	Tissu	Résumé des principaux résultats	
<b>E1.5 et E2.5</b>	2.9g/kg	Gavage	Souris	E10.5	Embryon et Placenta	Retard de croissance (embryon et placenta) ↓ Méthylation de l'allèle paternel de H19/Igf2 (placenta)	(160)
<b>Un des premiers 6 jours (E1.5-E6.5)</b>	0.02mL/g ou 0.03mL/g d'EtOH 25%	Injection	Souris	E15	Embryon et Placenta	↑ Résorption et mort fœtale ↓ Poids fœtal (0.03mL/g group) ↑ Poids du placenta Anomalies craniofaciales et systématiques	(212)
<b>E2 et E6</b>	0.03mL/g	Injection	Souris	E14 ;16 ; 18	Embryon et Placenta	Retard de croissance sévère (E14) ↓ Poids fœtal (aux trois stades)	(212)
<b>E4</b>	NA	Injection IV	Souris	E6	Blastocyste	↓ Implantation	(200)
<b>E3 et E4</b>	NA	Injection IV	Souris	E19	Embryon et Placenta	↓ Poids fœtal et du placenta ↓ Taux d'implantation ↓ Transfert d'embryon dans l'oviducte Retard de développement Anomalies morphologiques	(206)
<b>E0 à E3</b>	EtOH 25%	Consommation obligatoire	Souris	P0	Embryon et Placenta	Aucune différence dans la taille des portées et le poids des souriceaux	(169)

Ces études montrent bien qu'une exposition précoce à l'alcool pendant la gestation peut avoir de graves conséquences dans le développement et le devenir du jeune embryon. Plus encore, l'étude de Haycock montre que le placenta semble aussi affecté. Ceci est tout à fait logique, puisque l'exposition se faisant très tôt dans le développement embryonnaire, une portion des cellules affectées par l'exposition formera la population de cellules du trophoctoderme après l'implantation et donc ultimement le placenta (voir Figure 5). Plusieurs questions restent cependant sans réponse et doivent encore être étudiées, particulièrement les conséquences épigénétiques où seule la méthylation du gène *H19* a été étudiée. Puisque l'exposition se produit pendant la période de reprogrammation épigénétique, il est donc logique de croire que plusieurs régions de l'épigénome seraient affectées.

## 1.4 Problématique : alcool et préimplantation

Ces quelques modèles n'ont qu'en partie permis de faire la lumière sur les conséquences néfastes de l'alcool sur le paysage épigénétique. Plus encore, peu de modèles concentrent leur étude sur les conséquences épigénétiques au niveau du cerveau, organe fortement affecté par l'exposition prénatale à l'alcool et à l'origine de plusieurs symptômes du TSAF. Nous en connaissons donc encore que très peu sur les mécanismes derrière une exposition prénatale à l'alcool. L'effet d'une exposition unique et critique (*binge-like exposure*) est aussi très peu étudié, particulièrement pendant la période préimplantatoire. Les effets épigénétiques, entre autres, sont totalement inconnus, à l'exception des découvertes sur le gène *H19* étudié par Haycock en 2009 (160). La période préimplantatoire est pourtant une période critique de la reprogrammation épigénétique où des perturbations environnementales peuvent causer des dérégulations du programme fœtal qui affecteront le développement cérébral et persisteront pendant la suite du développement embryonnaire, l'enfance et la vie adulte.

Au cours des dernières années, le taux de consommation d'alcool chez les femmes en âge de procréer a considérablement augmenté. Particulièrement, le taux de consommation excessive ou *binge drinking*, soit pour une femme moyenne la prise de plus de quatre

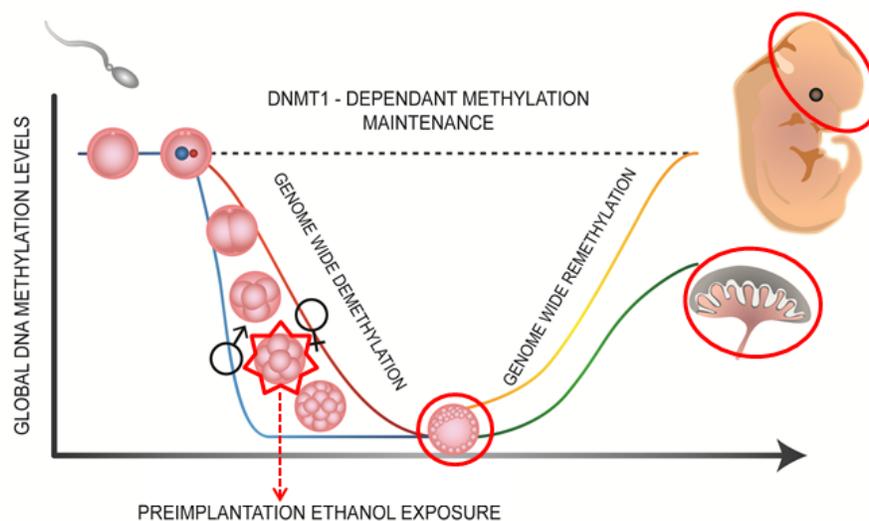
consommations à l'intérieur de deux heures, a augmenté de 17.5% entre 2005 et 2012 (213). En plus de cela, le taux de consommation d'alcool pendant la grossesse est aussi en hausse à travers le monde. Il a d'ailleurs été démontré qu'une consommation d'alcool excessive unique engendre des conséquences plus graves chez l'enfant qu'une prise d'alcool chronique (214). Ces chiffres inquiétants font dire à plusieurs études que le taux d'enfants atteints d'un TSAF sera en hausse au cours des prochaines années (213, 215, 216).

Des études estiment qu'au Canada et à travers le monde près de 40% des grossesses ne sont pas planifiées. Au Canada seulement, cela représente environ 160 000 enfants par année (217) dont les premiers jours de vie embryonnaire ont pu se faire dans un environnement sous-adéquat puisque leurs mères ignoraient complètement qu'elles étaient enceintes. Il est important de se rappeler que même si l'embryon n'est pas encore implanté, l'environnement maternel peut tout de même l'affecter. Étant donné qu'il a été démontré que la période préimplantatoire est une période où l'embryon est particulièrement sensible à l'environnement externe, la connaissance des mécanismes derrière une perturbation à ce stade est critique si nous voulons déterminer l'impact d'EPA sur la fonction des cellules du cerveau.

À la naissance, le TSAF passe souvent inaperçu étant donné que beaucoup des problèmes reliés à cette condition sont des troubles neurodéveloppementaux (TND) et qu'il n'existe aucune méthode moléculaire de diagnostic. Les TND sont souvent détectés plus tard lorsque l'enfant éprouve des difficultés scolaires et sociales ce qui le prive de suivi et de soutien adéquat pendant toutes ses premières années de vie. Considérant que la prévalence du TSAF dans la population est de 2 à 5%, parfois même plus dans certaines populations vulnérables (125), un nombre énorme d'enfants souffrant possiblement d'un TND est privé de soins adéquats. Il est donc urgent de développer nos connaissances sur les mécanismes moléculaires et les manifestations épigénétiques derrière le TSAF afin de permettre une prise en charge immédiate des enfants atteints dès leur naissance et, éventuellement, de développer des traitements épigénétiques afin de rétablir les profils de méthylation normaux.

## 2. Hypothèse

Notre hypothèse de recherche est qu'un environnement *in oviduct* néfaste résultant d'une exposition prénatale à l'alcool (EPA) unique pendant la période préimplantatoire perturbera la bonne mise en place du programme épigénétique embryonnaire et causera des altérations épigénétiques et développementales au niveau du cerveau et du placenta.



**Figure 11. Schéma des profils de méthylation au cours du développement embryonnaire et les tissus affectés par une exposition prénatale à l'alcool au stade 8-cellules.** Adapté de Legault et *al.*, 2017 (71).

## 3. Objectifs

Nous avons établi au laboratoire un modèle murin d'alcoolémie fœtale imitant une consommation excessive d'alcool (*binge*) durant la première semaine de grossesse chez l'humain. En utilisant ce modèle, l'objectif général du projet est de déterminer comment une exposition prénatale à l'alcool pendant la période préimplantatoire affectera le développement embryonnaire et les profils de méthylation d'ADN. Les résultats présentés ici vont répondre à deux sous-objectifs de ce grand projet de recherche.

### **3.1 Caractérisation des anomalies morphologiques**

Je déterminerai d'abord l'étendue des anomalies morphologiques chez l'embryon et le placenta (E10.5, E18.5) suite à une exposition prénatale à l'alcool pendant la période préimplantatoire à l'aide d'un système d'évaluation morphologique.

### **3.2 Analyse préliminaire des profils d'expression génique**

Une étude préliminaire des profils d'expression génique par qPCR sera ensuite réalisée afin de valider l'effet de notre exposition à l'alcool sur des gènes impliqués dans le développement embryonnaire, le développement du système nerveux et les modifications épigénétiques. Une liste de 12 gènes dont les profils d'expression sont altérés dans divers modèles d'expression à l'alcool dans la littérature seront testés dans cette évaluation sommaire de l'expression génique dans le cerveau antérieur. Les profils d'expression seront aussi étudiés en fonction du sexe de l'embryon.

### **3.3 Établissement des profils de méthylation**

Je déterminerai ensuite comment une exposition prénatale à l'alcool pendant la période préimplantatoire affectera les profils de méthylation d'ADN du cerveau antérieur de l'embryon et du placenta à mi-gestation (E10.5) par *Reduced Representation Bisulfite Sequencing* (RRBS). Les changements de méthylation seront caractérisés selon leur localisation chromosomique et génomique et la catégorie des gènes atteints afin d'avoir une meilleure compréhension des fonctions pouvant être affectées par les perturbations des profils de méthylation d'ADN. En étudiant particulièrement le cerveau antérieur et le placenta, nous souhaitons, d'une part, comprendre comment le développement cérébral et nerveux est atteint et pourrait expliquer

plusieurs troubles neurodéveloppementaux chez les enfants souffrant de TSAF. D'autre part, nous souhaitons aussi évaluer comment les tissus extra-embryonnaires découlant de cellules aux profils de méthylation perturbés seront atteints après leur spéciation en cellules du trophoctoderme. Les changements de méthylation au niveau du placenta et du cerveau seront aussi étudiés en fonction du sexe afin de déterminer si certaines différences de méthylation spécifiques au sexe sont entraînées par l'exposition à l'alcool.

## **4. Matériel et méthode**

### **4.1 Modèle murin TSAF et analyses visuelles lors des dissections**

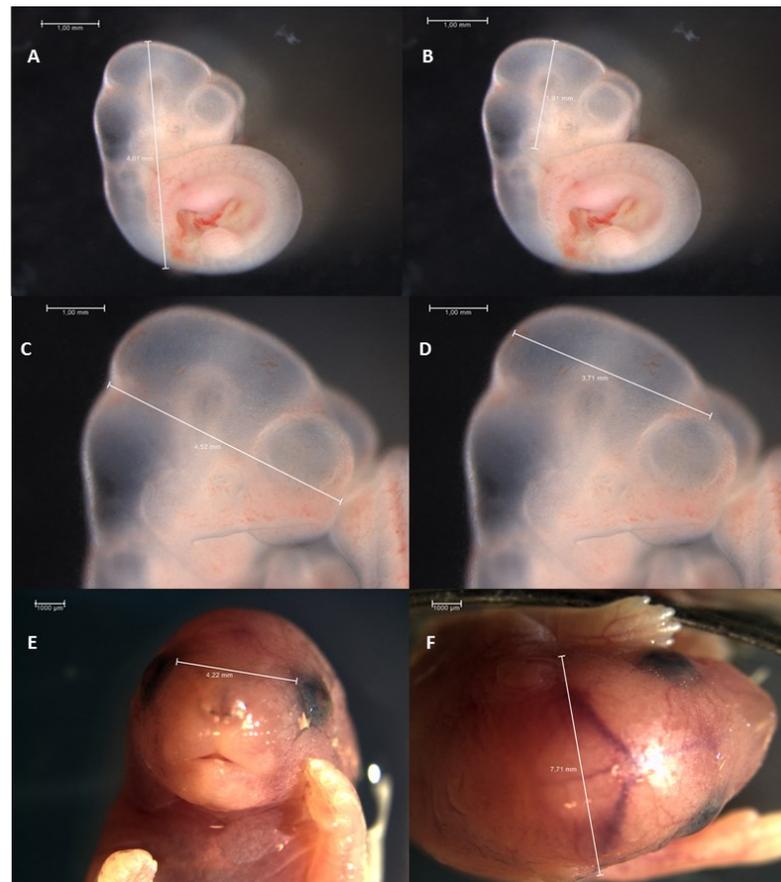
Afin de réaliser ces objectifs, j'ai d'abord mis en place un modèle murin d'alcoolisation fœtale. Pour les raisons expliquées plus haut, nous avons choisi de cibler de façon précise le stade 8-cellules de la période préimplantatoire qui correspond au jour embryonnaire 2.5 (E2.5) chez la souris. Le protocole développé et les expériences réalisées avec les souris ont été faits en symbiose avec la réglementation du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) et approuvés par le Comité institutionnel des bonnes pratiques animales en recherche (CIBPAR) du Centre de recherche du CHU Ste-Justine, protocole #604.

Les souris femelles C57BL/6 d'environ 8 semaines sont accouplées avec un mâle de même souche génétique. Le matin où un bouchon vaginal est présent est désigné comme le jour embryonnaire E0.5. L'exposition à l'alcool est faite en utilisant un protocole de consommation excessive d'alcool (*binge drinking*) déjà décrit dans la littérature (138) et qui permet d'obtenir une concentration sanguine d'alcool équivalente à 200-300mg/dL chez l'humain. Nous procédons ainsi à l'injection des femelles gestantes à E2.5 avec deux doses de 2.5g/kg d'éthanol 50% de façon sous-cutanée données avec deux heures d'intervalle entre les deux doses. Cette dose permet d'obtenir une concentration sanguine d'alcool chez la souris d'environ 200mg/dL pendant 4 heures (218). Les contrôles sont injectés avec de la saline 0,15M plutôt que de

l'éthanol. Une approche d'injection d'EtOH est utilisée afin de créer un environnement de consommation excessive (*binge-like exposure*) plutôt qu'un modèle de gavage afin de réduire l'impact du stress maternel induit par la méthode et introduisant beaucoup de variabilité dans les résultats (11, 196). Au jour E2.5, nous avons validé que nous injectons bien au stade 8-cellules en procédant au rinçage des trompes d'une femelle gestante au jour E2.5 et en procédant au décompte des cellules pour chaque embryon par microscopie.

Les embryons au jour embryonnaire E10.5 (mi-gestation) et E18.5 sont prélevés et évalués selon des critères établis pour divers défauts morphologiques et anomalies de développement (e.g., structure cérébrale anormale, hémorragie cérébrale, anomalie du tube neural, polyplôidie, défaut oculaire, etc.). Les tissus seront, entre autres, pesés (E18.5 seulement), mesurés et photographiés afin de déterminer si l'exposition à l'alcool a un effet sur la croissance normale et l'apparence du tissu. Les mesures sont prises à l'aide du logiciel *LasX* de *Leica Microsystems* qui permet des mesures précises des régions voulues. Ces mesures pour l'embryon sont la longueur couronne-croupe de l'embryon, la hauteur de la tête, la distance entre le nez et le derrière de la tête, la longueur du cerveau supérieur (E10.5), la distance entre les yeux (E18.5 seulement) et la largeur de la tête (E18.5 seulement). Les différentes mesures prises peuvent être visualisées à la Figure 12. Pour le placenta, l'aire est déterminée (largeur  $\times$  longueur). En attendant les résultats d'expériences d'analyse histologique en cours, une analyse subjective sur l'aspect visuel a été effectuée afin de déterminer le niveau de vascularisation du placenta. Certains placentas ayant été exposés à l'alcool semblaient, en effet, montrer une présence accrue de sang qui sera confirmée par histologie. Une analyse par *chi-carré* a été réalisée afin de déterminer si les embryons exposés à l'alcool présentaient significativement plus d'anomalies morphologiques et si les mères exposées étaient plus sujettes de porter au moins un embryon portant une anomalie. Des analyses statistiques ont aussi été réalisées par *unpaired t test* avec test de Kolmogorov-Smirnov afin de déterminer si les différentes mesures et tailles prises pendant les dissections étaient statistiquement différentes entre les deux conditions. Il est important de noter que pour ces deux analyses, les embryons qui étaient expulsés du sac vitellin lors de la dissection sont exclus puisque la pression et la force engendrée par l'expulsion déforment gravement l'embryon ce qui empêche d'identifier clairement si un défaut d'origine embryonnaire est présent ou non. Ainsi, un total de 115 embryons provenant

de 16 mères exposées à l'alcool et 91 embryons provenant de 13 mères contrôles ont été utilisés pour les analyses statistiques au stade E10.5. Pour le stade E18.5, 84 embryons provenant de 11 mères exposées à l'alcool et 62 embryons provenant de 8 mères contrôles ont été analysés.



**Figure 12. Mesures prises lors de la dissection des embryons au jour E10.5. A.** Longueur couronne-croupe (E10.5 et E18.5). **B.** Hauteur de la tête (E10.5 et E18.5). **C.** Distance nez-derrrière de la tête (E10.5 et E18.5). **D.** Taille du cerveau (E10.5 et E18.5). **E.** Distance entre les yeux (E18.5). **F.** Largeur de la tête (E18.5)

Le placenta et le cerveau antérieur (forebrain) des embryons seront isolés afin d'établir les profils de méthylation de ce tissu spécifique. **Le cerveau antérieur est particulièrement visé en raison de son rôle dans plusieurs phénotypes du TSAF et de son implication dans la formation de certaines portions du visage atteinte chez les enfants atteints de la forme grave du TSAF** (voir section 1.3.1).

## 4.2 Sexage des embryons

Les embryons de souris sont sexés par un protocole de PCR utilisant l'ADN extrait du sac vitellin. L'ADN est extrait par purification sur colonne (Biobasic #BS628) et une amplification PCR est faite en utilisant des amorces pour une région du gène *Ddx3* (voir Tableau IV pour les séquences) qui amplifieront une bande d'environ 745 bp sur le chromosome X et une bande d'environ 676 bp sur le chromosome Y. Après migration sur gel d'agarose 2%, il est ainsi possible de déterminer si l'embryon est de sexe mâle (2 bandes) ou femelle (1 bande intense).

**Tableau IV. Séquences des amorces utilisées pour le sexage des embryons.**

Nom de l'amorce	Séquence
<b>Ddx3-For</b>	CCGATCTAGAGTCCGTCCTT
<b>Ddx3-Rev</b>	TCCTTAGGAAAAGTAGCACTAAACA

## 4.3 Expression génique par PCR quantitative

Des oligonucléotides pour 12 gènes reliés au système nerveux (*Nestin*, *Dcl2*, *Akt1*, *Fabp7*), au développement (*Eed*, *Igf2*) ou à divers processus épigénétiques (*Dnmt1*, *Ehmt1*, *Ehmt2*, *Ezh2*, *Ash2l*, *Wdr5*) furent établis avec le logiciel Primer3 et optimisés par qPCR sur l'appareil LightCycler 96 de Roche avec l'enzyme QPCR BIO SyGreen blue mix Lo-Rox Bluemix (D-Mark #PB20.15-05). L'ARN de 11 cerveaux antérieurs contrôles et 20 cerveaux antérieurs exposés à l'éthanol fut extrait avec le kit DNA/RNA micro kit (QIAGEN #80284) puis converti en cDNA avec l'enzyme SuperScript IV (ThermoFisher Scientific #18090-050) en suivant les protocoles du manufacturier pour ces étapes. Les qPCR ont été faites en triplicata pour tous les échantillons en utilisant le gène *Hprt1* comme gène contrôle. Ce gène fut choisi pour sa stabilité supérieure dans nos conditions (en comparaison avec *Gapdh* et *Pgk1*). Plusieurs

essais dans la littérature ont aussi montré que l'expression d'*Hprt1* est stable et reproductible dans plusieurs conditions (219-223). Les résultats de qPCR ont été analysés par la méthode des Delta Ct et de la quantification relative (*fold change*) comme décrite dans Bustin et al., 2009 (224).

#### **4.4 Analyse des profils de méthylation par RRBS**

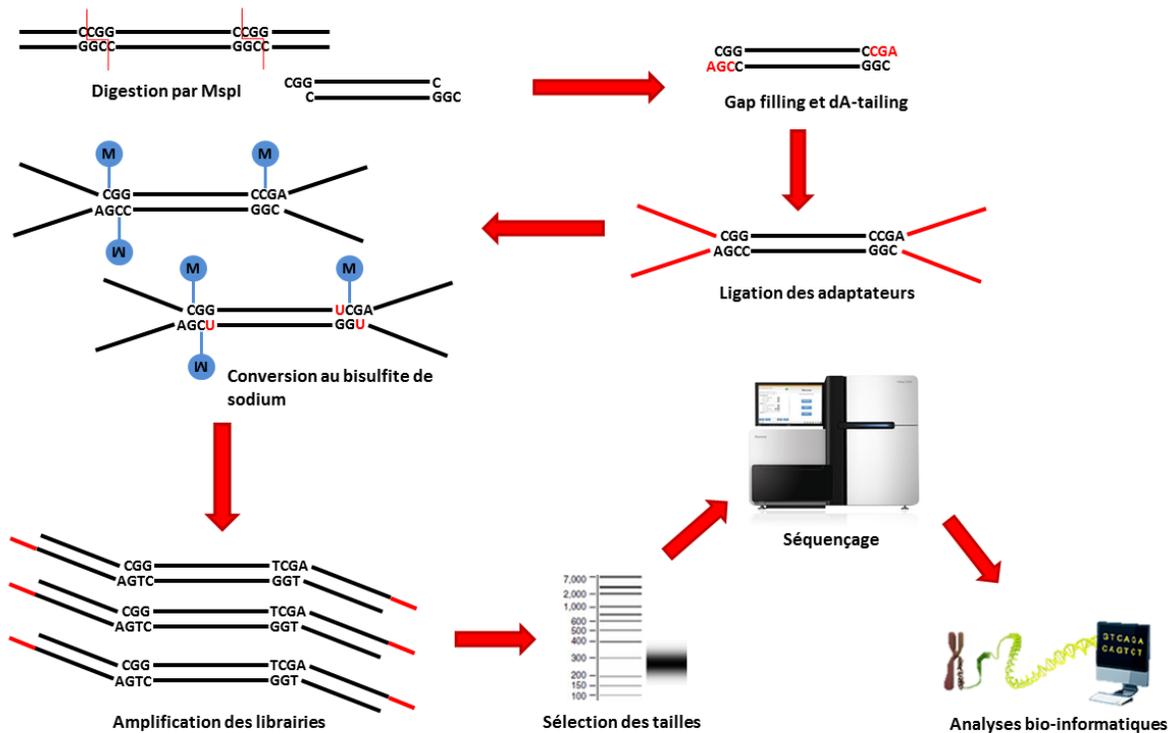
Les profils de méthylation ont été établis de façon quantitative à partir d'ADN de cerveaux antérieurs ainsi que de placentas en utilisant la technique de *Reduced Representation Bisulfite Sequencing* (RRBS). Nous avons établi les profils de méthylation des cerveaux antérieurs et des placentas sur 8 échantillons contrôles (4 mâles et 4 femelles) et 12 échantillons exposés à l'alcool (6 mâles et 6 femelles) provenant d'embryons au stade E10.5. Les échantillons ont été choisis aléatoirement de façon à obtenir un nombre égal de mâles et de femelles et les deux tissus d'un même embryon devaient être disponibles. Étant donné que ce ne sont pas tous les embryons d'une même portée qui seront affectés de la même façon par l'alcool, nous avons choisi d'analyser un nombre plus élevé d'échantillons ETOH afin de statistiquement identifier les régions similaires ayant subi une perturbation de méthylation de l'ADN dans chaque embryon. Pour les échantillons exposés à l'éthanol, nous avons sélectionné un nombre égal d'embryons ou de placentas morphologiquement atteints et de tissus visuellement non affectés. Les librairies de RRBS sont faites individuellement pour chaque tissu de chaque échantillon. De cette façon, les profils de méthylation pour chacun des échantillons sont établis individuellement et permettront des analyses de sous-catégorie d'échantillons (par exemple, analysé seulement la méthylation des échantillons morphologiquement atteints en comparaison à celles des contrôles) dans la suite du projet.

Le RRBS est une approche réduite à l'échelle du génome entier qui permet d'obtenir une vue d'ensemble des profils de méthylation du génome sans devoir séquencer le génome entier. Cette technique donne des résultats pour environ 10-15% des 20 millions de CpGs chez la souris (9). Elle a démontré une bonne reproductibilité dans diverses études provenant de différents types de tissus ou différentes espèces (225-229).

Nous avons développé notre propre protocole de RRBS (230) en nous basant sur des méthodes déjà existantes (231, 232). Brièvement, nous procédons à l'extraction de l'ADN génomique à l'aide du QIAamp DNA micro kit (QIAGEN #56304) en utilisant du EB (QIAGEN #19086) plutôt que du AE pour l'élution. Nous procédons, par la suite, à la digestion de 500ng d'ADN pendant 16h avec l'enzyme Msp1 (NEB #R0106M). Cette enzyme coupe, en fait, à l'intérieur de CpGs ce qui permet d'obtenir des fragments d'ADN digérés contenant au moins deux CpGs, soit un à chaque extrémité. Après une étape de *gap filling* et d'ajout d'un nucléotide adénosine à l'aide de l'enzyme Kleenow 3'-5' (NEB #M0212M), des adaptateurs méthylés (NEB #E7535L) sont ligués aux fragments d'ADN par la T4 ligase (NEB #M0202M) avant la conversion des fragments d'ADN au bisulfite de sodium (QIAGEN #59824) qui convertit les cytosines non méthylées en uracile. Il est ainsi très important d'utiliser des adaptateurs qui sont méthylés afin de conserver la séquence de ceux-ci et d'éviter qu'elle soit convertie par le traitement au bisulfite de sodium. Des bibliothèques sont, par la suite, amplifiées à partir des fragments d'ADN converti à l'aide d'index compatible avec les technologies de séquençage d'Illumina (NEB #E7535L). Pour cette étape, nous avons développé une méthode de PCR quantitative qui permet de visualiser directement l'amplification des échantillons et d'arrêter la réaction pendant la phase linéaire d'amplification, évitant ainsi la suramplification des bibliothèques. Cette suramplification, qui débute lorsque la courbe atteint une phase de plateau, favorise l'amplification de fragments chimériques, c'est-à-dire un seul amplicon comportant plusieurs portions de séquences de plusieurs fragments (233, 234). Ces amplicons chimériques seront séquencés inutilement puisque les analyses bio-informatiques rejeteront ces séquences inconnues du génome de référence. Les bibliothèques sont donc générées par qPCR sur l'appareil LightCycler96 de Roche à partir de l'ADN converti au bisulfite en utilisant l'enzyme Pfu Cx Turbo HotStart (Agilent #600414) et en ajoutant du SYBR Green (LifeTechnologies #S7563) pour le suivi de la réaction qui est arrêtée tout juste avant la phase de plateau. Une étape de sélection des tailles est finalement réalisée par couplage avec billes magnétiques Agencourt AmPure XP (Beckman-Coulter #A63881) afin de sélectionner les bibliothèques en 200 et 300 paires de base pour le séquençage. Un résumé de ces étapes peut être visualisé à la Figure 13.

Les échantillons sont séquencés sur l'appareil d'Illumina HiSeq 2500, de façon 125bp *paired-end*, ce qui séquence le fragment à partir des deux extrémités. Ceci permet donc d'obtenir

des lectures de séquençage pairées, c'est-à-dire une paire de séquence correspondant au séquençage d'un même fragment. Au total, un peu plus de 200 millions de lectures de séquençage sont obtenues par ligne de séquençage. 10 échantillons par ligne sont séquençés afin d'obtenir un minimum de 20 millions de lectures par échantillon. Le séquençage est fait à la plate-forme de génomique du Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill.



**Figure 13. Schéma des différentes étapes du Reduced Representation Bisulfite Sequencing.** Brièvement, l'ADN extrait est d'abord digéré avant la ligation des adaptateurs grâce à l'étape d'ajout d'une queue simple de A. L'ADN est, par la suite, converti au bisulfite de sodium avant d'amplifier les librairies par PCR. Une dernière étape de lavage permet de sélectionner les tailles de librairies pour le séquençage de nouvelle génération. Les résultats de séquençage sont finalement analysés par bio-informatique.

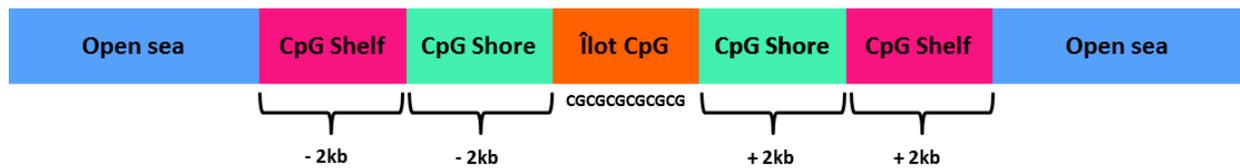
Nous utilisons une approche par bio-informatique pour le traitement des données de séquençage. Un pipeline d'analyse déjà en place dans notre groupe de recherche nous permet de déterminer de façon statistique et stringente les régions différentiellement méthylées de nos échantillons exposés à l'éthanol versus nos contrôles (32, 95). Brièvement, les lectures brutes de séquençage sont d'abord converties au format *fastq*, puis, on retire les adaptateurs servant à

reconnaître l'échantillon au séquençage et les séquences de faible qualité avec le logiciel Trim Galore version 0.3.3. Les lectures sont, par la suite, alignées au génome de référence, dans notre cas le génome murin version mm10 avec le logiciel bsmap (version 2.90) conçu spécifiquement pour être en mesure de procéder à l'alignement des séquences converties au bisulfite de sodium (235). Ce logiciel permet aussi de déterminer les cytosines qui étaient méthylées et celles non méthylées pour chaque librairie individuelle. Les données de méthylation obtenues par bsmap sont, par la suite, formatées par le « package » MethyKit sur le logiciel R (236). À partir de ces données, un script R maison, développé par notre collaborateur en bio-informatique permet d'obtenir les régions différentiellement méthylées entre l'ensemble des librairies de chaque condition. Ce script compare le génome par tuile de 100 paires de base. Pour être valide dans l'analyse, chaque tuile doit contenir au moins deux CpGs, donc deux mesures de méthylation, et avoir une couverture de séquençage d'au moins 10X. Une tuile est dite différentiellement méthylée ou DMT, lorsque la différence du pourcentage de méthylation des échantillons contrôles et ceux traités est d'au moins 20% avec une *q-value* inférieure à 0.01. Au total, environ 250 000 tuiles sont générées et analysées par ce script comparatif. Pour une tuile donnée, la moyenne du pourcentage de méthylation de chacune des librairies d'un tissu contrôle (cerveau antérieur ou placenta) est ainsi comparée à la moyenne du pourcentage de méthylation de l'ensemble des librairies EtOH du même tissu.

## **4.5 Analyses complémentaires des régions différentiellement méthylées**

Après avoir déterminé les régions différentiellement méthylées dans les embryons E10.5, plusieurs analyses complémentaires sont réalisées pour en apprendre plus sur ces régions. Le logiciel Bedtools (version 2.26.0) (237) est utilisé pour déterminer si les régions affectées se retrouvent dans des îlots CpGs (ICG), aux abords des îlots ou très loin de ceux-ci (*CpG island*, *Shores*, *Shelves*, *Open sea* (Figure 14). Nous utilisons les données publiques disponibles sur le site du UCSC pour les coordonnées des îlots CpGs et selon des standards établis par la littérature, nous pouvons ensuite déterminer la proximité de si la région et de l'îlot. Ce logiciel

permet aussi de déterminer les tuiles qui se retrouvent dans les éléments répétés et les régions de contrôle de l’empreinte (*imprinted control regions*) grâce à la comparaison des coordonnées génomiques.



**Figure 14. Représentation visuelle des îlots CpG et des régions adjacentes à ceux-ci.**

Une étape d’annotation avec le logiciel Homer (version 4.1) (238) permet de déterminer dans quel gène les régions différentiellement méthylées sont situées. Par la suite, une analyse d’ontologie génique en utilisant l’outil Metascape (239), disponible sur le web, permet de déterminer si les régions affectées sont enrichies pour certaines voies métaboliques ou processus biologiques. Les analyses ont été faites à l’aide des paramètres par défaut.

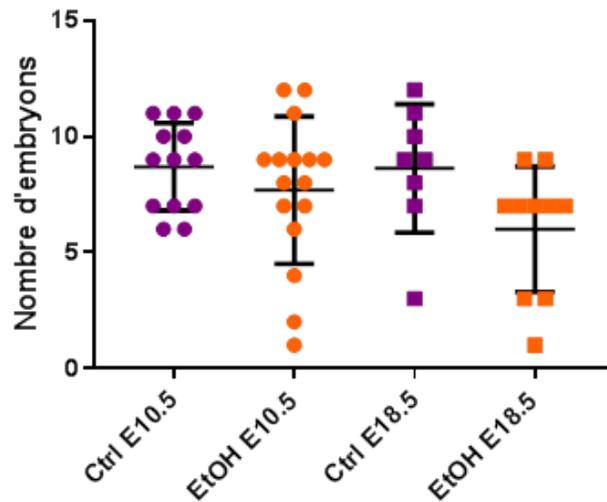
Le logiciel bio-informatique R permet aussi de faire de nombreuses analyses de comparaison, de recherches d’éléments communs et de générer certains types de graphiques. Outre son utilisation dans le pipeline, R a, entre autres, été utilisé pour identifier les régions communes entre le placenta et le cerveau antérieur et générer certains graphiques.

Toutes ces analyses subséquentes permettront de déterminer si certaines régions du génome ou des familles de gènes semblent plus vulnérables à l’exposition à l’alcool pendant la préimplantation.

## 5. Résultats

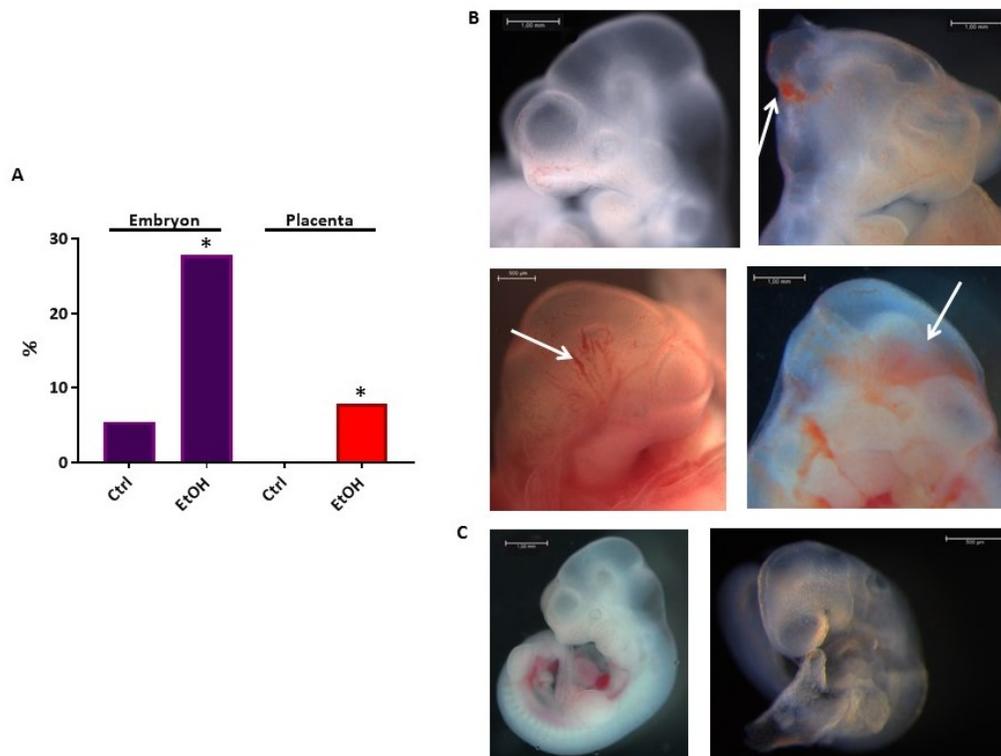
### 5.1 Anomalies morphologiques à mi-gestation suite à une exposition à l'alcool pendant la période préimplantatoire

Plusieurs exemples dans la littérature démontrent qu'une exposition prénatale à l'alcool (EPA) pendant la période préimplantatoire peut entraîner différentes anomalies plus tard au cours du développement *in utero* (e.g., malformations cérébrales et craniofaciales, retard de croissance) (160, 206, 212). Cependant, les conséquences exactes reliées à une EPA de type *binge-drinking* (e.g., absorption rapide de grandes quantités d'alcool) à un stade précis de la préimplantation demeurent inconnues. Afin de déterminer l'étendue des anomalies morphologiques précisément associées à ce type de consommation pendant la période préimplantatoire, nous avons établi un nouveau modèle ciblant le jour embryonnaire 2.5 (E2.5 : embryon 8-cellules). Des femelles gestantes au jour E2.5 ont été injectées avec 2.5g/kg d'éthanol ou de la saline (0.15M) pour les contrôles à 2h d'intervalle. Au jour E10.5 (mi-gestation chez la souris), nous avons effectué des césariennes pour récolter les embryons afin de les évaluer à l'aide d'un système d'évaluation dysmorphologique. Aucune différence n'a été observée au niveau du nombre moyen d'embryons vivants à mi-gestation entre les contrôles (moyenne de 8.1 embryons, n= 13 mères) et les EtOH (moyenne de 7.5 embryons, n= 16 mères) (Figure 15). Cependant, le nombre d'embryons des mères exposées à l'alcool montre plus de variabilité que chez les mères contrôles. D'ailleurs, trois mères exposées à l'alcool avaient un nombre beaucoup plus petit d'embryons vivants que la moyenne dans les autres mères du même groupe. Comme critère d'évaluation morphologique pour les embryons (Ctrl n = 91 et EtOH n = 115), nous avons noté les déformations, la présence anormale de sang dans le cerveau ainsi que l'apparence générale de l'embryon afin d'évaluer s'il y avait un retard dans le développement (exemple d'anomalie morphologique aux Figures 16 (E10.5) et 18 (18.5)). Pour les placentas (Ctrl n = 91 et EtOH n = 115), nous avons principalement déterminé la taille et l'apparence (e.g., vascularisation et texture) générale de ceux-ci.



**Figure 15. Nombre d'embryons pour chacune des conditions aux stades E10.5 et E18.5.** Stade E10.5; Ctrl n = 13 et EtOH n = 16. Stade E18.5; Ctrl n = 8 et EtOH n = 11.

Lors de la prise de ces mesures, nous avons observé diverses malformations mineures ou sévères chez les embryons et les placentas ayant été exposés à l'alcool. Nous avons observé qu'un nombre significativement plus élevé d'embryons exposés à l'alcool présentait des anomalies morphologiques visibles (tout type confondu) en comparaison avec les embryons contrôles (27.83% vs 5.49%,  $p = 3.4 \times 10^{-5}$ ). Les placentas présentaient aussi des défauts morphologiques apparents, principalement une décoloration (e.g., une apparence moins foncée) qui pourrait indiquer un possible manque de vascularisation. 7.83% des placentas exposés à l'alcool montraient des anomalies, soit significativement plus que les placentas contrôles où aucune anomalie n'a été perçue ( $p = 0.0064$ ) (Figure 16 et Tableau V). Ces résultats démontrent que notre modèle d'exposition prénatale à l'alcool qui imite une consommation excessive d'alcool à un stade précis de la période préimplantatoire cause une augmentation significative dans le nombre d'anomalies morphologiques observées à mi-gestation tant chez l'embryon que chez le placenta.



**Figure 16. Les embryons et placentas à mi-gestation exposés à l'alcool présentent plus d'anomalies morphologiques.** **A.** Pourcentage d'embryons et de placentas présentant une anomalie morphologique à mi-gestation. **B.** Embryon contrôle (en haut à gauche) et trois exemple d'anomalies morphologiques présentes au cerveau chez les embryons exposés à l'alcool soit une déformation du cerveau (en haut à droite) ou une présence anormale de sang au cerveau (en bas). **C.** Embryon contrôle (gauche) et embryon EtOH avec un retard de croissance sévère (à droite). Ctrl  $n = 91$  ; EtOH  $n = 115$ . Embryon \*  $p = 3.4 \times 10^{-5}$  et placenta \*  $p = 0.0064$  par *test chi-carré*.

Bien qu'un nombre plus élevé d'embryons et de placentas présentent un défaut morphologique, nous voulions savoir si ces tissus provenaient d'un nombre restreint de mères ou si les tissus morphologiquement atteints étaient plutôt retrouvés de façon ponctuelle chez la plupart des mères exposées à l'alcool. Nous avons donc utilisé les données relevées lors de la prise de mesure afin de déterminer combien de mères portaient au moins un embryon présentant une anomalie morphologique. Pour les embryons, nous obtenons que 15 mères sur un total de 16 traités à l'alcool avaient au moins un embryon affecté visuellement, soit significativement plus que les 4 mères sur 13 traitées à la saline ( $p = 0.0004$ ). Au niveau du placenta, 5 mères sur 16 exposés à l'alcool portaient au moins un embryon affecté visuellement, soit significativement

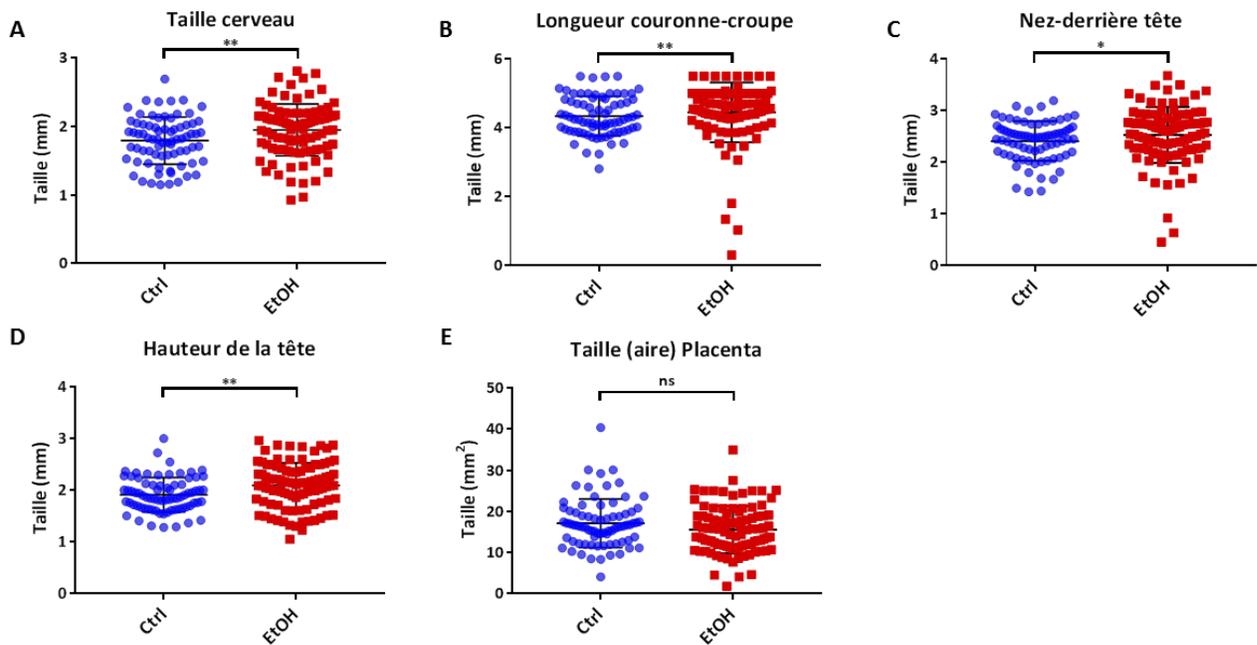
plus que chez les souris contrôles où aucune mère ne portait de placenta anormal ( $p = 0.02$ ). Les mères exposées à l'alcool sont donc plus susceptibles de porter au moins un embryon ou un placenta présentant une anomalie visuelle à mi-gestation. Ces résultats montrent bien que les tissus anormaux ne proviennent pas d'un nombre restreint de mères, mais plutôt qu'un ou quelques embryons par portée présentent au moins un défaut morphologique en réponse à l'exposition prénatale à l'alcool pendant la préimplantation.

**Tableau V. Embryons et placentas présentant une anomalie à E10.5**

	Ctrl ( <i>n</i> = 91)	EtOH ( <i>n</i> = 115)	Valeur $X^2$	<i>p</i> -value
<b>Embryons avec une anomalie</b>	5	32	17.19	$3.4 \times 10^{-5}$
<b>Mères avec au moins un embryon anormal</b>	4	13	12.59	0.0004
<b>Placentas avec une anomalie</b>	0	6	7.45	0.0064
<b>Mères avec au moins un placenta anormal</b>	0	5	4.91	0.0267

**Chi-carré**

Puisqu'une exposition prénatale à l'alcool peut mener à des retards de croissance ou des anomalies de croissance chez les embryons et placentas (160, 212), nous avons voulu déterminer si notre modèle d'EPA, pendant la préimplantation, entraîne ce type de conséquences. Nous avons effectué une série de mesures pour chaque embryon lors de leur dissection à E10.5 et la distribution de ces mesures est présentée à la Figure 17. Les analyses statistiques montrent une augmentation significative entre la longueur couronne-croupe (Ctrl = 4.34mm vs EtOH = 4.60mm,  $p < 0.01$ ), la distance entre le nez et le derrière de la tête (Ctrl = 1.79mm vs EtOH = 1.95mm,  $p < 0.05$ ), la hauteur de la tête (Ctrl = 2.41mm vs EtOH = 2.59mm,  $p < 0.05$ ) et la taille du cerveau (Ctrl = 1.91mm vs EtOH = 2.10mm,  $p < 0.01$ ) entre les embryons contrôles et ceux exposés à l'éthanol (Tableau VI). Cependant, aucune différence significative au niveau de la taille du placenta n'a été observée entre les deux conditions. L'exposition à l'alcool affecte donc la croissance de l'embryon à la mi-gestation, sans toutefois causer des retards marqués chez le placenta.



**Figure 17. Distribution des principales mesures associées à des anomalies de croissance à E10,5.** **A.** Taille (longueur) du cerveau (partie supérieure). **B.** Taille couronne-croupe de l'embryon. **C.** Distance nez-derrrière de la tête de l'embryon. **D.** Hauteur de la tête. **E.** Aire du placenta. Ctrl n = 91 ; EtOH n = 115. \* = p-value < 0,05 \*\* = p-value < 0,01 par *unpaired t test* avec *test de Kolmogorov-Smirnov*.

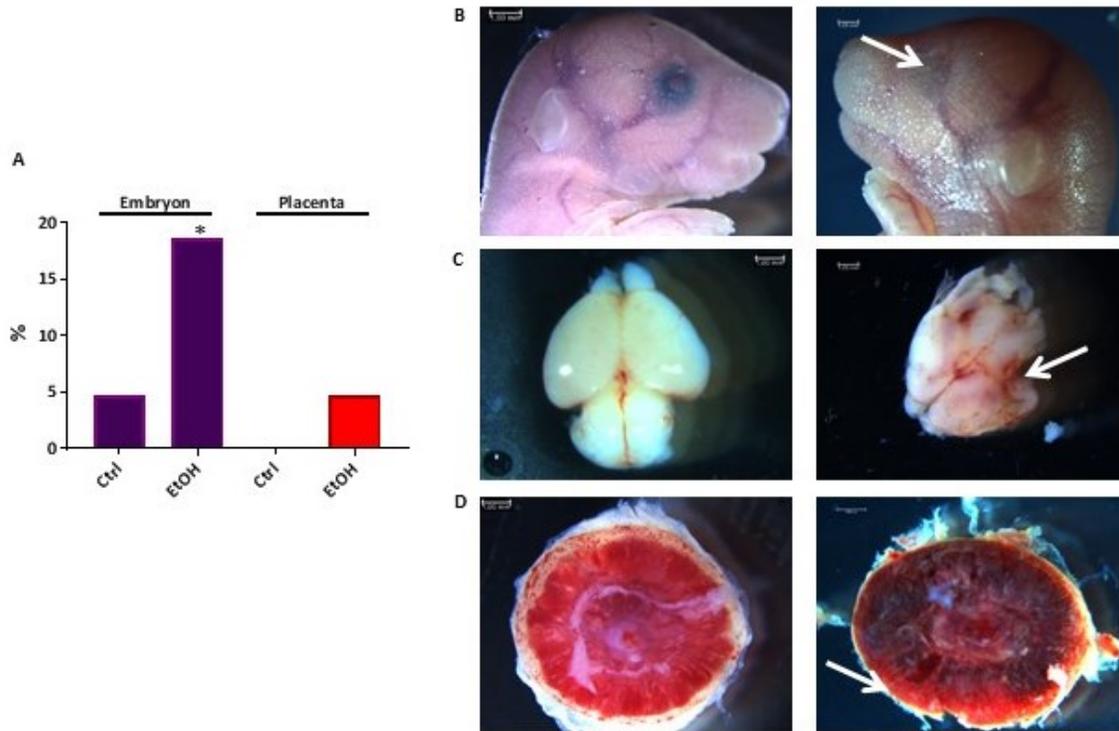
**Tableau VI. Mesures associées à des anomalies de croissance à E10.5**

	Moyenne Ctrl (n = 91)	Moyenne EtOH (n = 115)	p-value	
<b>Longueur couronne-croupe (mm)</b>	4.34	4.60	0.0032	**
<b>Distance nez-derrrière tête (mm)</b>	1.79	1.95	0.0253	*
<b>Hauteur de la tête (mm)</b>	2.41	2.59	0.0012	**
<b>Taille cerveau (mm)</b>	1.91	2.10	0.0096	**
<b>Taille placenta (aire) (mm<sup>2</sup>)</b>	17.30	15.74	0.0889	ns

*unpaired t test, avec test de Kolmogorov-Smirnov*

## 5.2 Anomalies morphologiques chez les embryons et placentas à E18.5 exposés à l'alcool pendant la préimplantation

Afin de déterminer si les anomalies présentes à mi-gestation (E10.5) étaient toujours présentes et perceptibles juste avant la naissance, nous avons récolté et évalué des embryons au jour E18.5. À ce stade, 19.05% des embryons exposés à l'alcool présentaient une des diverses anomalies morphologiques visibles par microscopie, soit significativement plus que les 3.23% observés chez les embryons contrôles ( $p = 0.0025$ ). Le pourcentage d'anomalies placentaires est aussi plus élevé chez les échantillons exposés à l'éthanol (3.57%) que chez les contrôles (0%) où aucune anomalie n'a été observée. Par contre, ces pourcentages sont statistiquement non significatifs ( $p = 0.13$ ) (Figure 18). Le nombre d'embryons analysés doit cependant être augmenté afin de pouvoir tirer des conclusions fiables pour cette analyse. Les anomalies placentaires observées sont surtout associées à un tissu plus épais montrant parfois des caillots de sang. Ces anomalies n'ont pas affecté le nombre d'embryons vivants puisqu'aucune différence significative n'a été observée au niveau du nombre d'embryons vivants par mère entre les deux conditions (moyenne de 7.7 embryons par portée,  $n=8$  portées contrôles; moyenne de 6 embryons par portée,  $n=11$  portées EtOH) (Figure 15). Comme c'était le cas pour les embryons à E10.5, le nombre d'embryons vivants des mères EtOH montre plus de variabilité que les contrôles ce nombre était aussi beaucoup plus petit pour trois mères EtOH que le nombre moyen d'embryons vivants des autres mères. Ces données demeurent préliminaires et nous augmentons présentement le nombre d'échantillons pour chaque groupe. Cependant, nous constatons que les embryons E18.5 ayant été exposés à l'alcool pendant la préimplantation sont plus sujets à présenter une anomalie morphologique que les embryons contrôles à la naissance et que, structurellement, les placentas ne semblent pas affectés. D'ailleurs, ces anomalies ne semblent pas létales *in utero* puisqu'elles persistent jusqu'à la fin de la gestation sans causer l'arrêt du développement embryonnaire.



**Figure 18. Les embryons et placentas à E18.5 exposés à l'alcool présentent plus d'anomalies morphologiques.** **A.** Pourcentage d'embryons et de placentas présentant une anomalie morphologique à E18.5. **B.** Embryon contrôle (à gauche) et embryon EtOH présentant une anomalie morphologique (l'absence d'un œil) (à droite). **C.** Cerveau contrôle (à gauche) et cerveau EtOH, friable et présentant beaucoup de sang (à droite). **D.** Placenta contrôle (à gauche) et placenta EtOH très épais et présentant de petits caillots de sang (à droite). Ctrl n = 62 ; EtOH n = 84. \*  $p = 0.0025$  par *test chi-carré*.

Nous voulions par la suite déterminer si, tout comme pour les embryons à mi-gestation, les embryons présentant une anomalie en fin de gestation provenaient d'une majorité de mères ou plutôt d'un nombre limité de mères. Nous avons ainsi déterminé, à partir des données récoltées, combien de mères portaient au moins un embryon ou placenta avec une anomalie morphologique. Au niveau des embryons, 8 mères exposées à l'alcool sur 11 étaient porteuses d'au moins un embryon présentant une anomalie, soit significativement plus que les mères contrôles où 2 mères sur 8 portaient un embryon avec une anomalie ( $p = 0.0397$ ) (Tableau VII). Aucune différence significative n'est présente au niveau du nombre de mères portant au moins un placenta morphologiquement anormal. Tout comme à mi-gestation, les mères au stade E18.5 sont plus susceptibles de porter au moins un embryon avec une anomalie morphologique. Ces

embryons anormaux proviennent ponctuellement de l'ensemble des mères et ne sont pas issus d'un nombre restreint de portées.

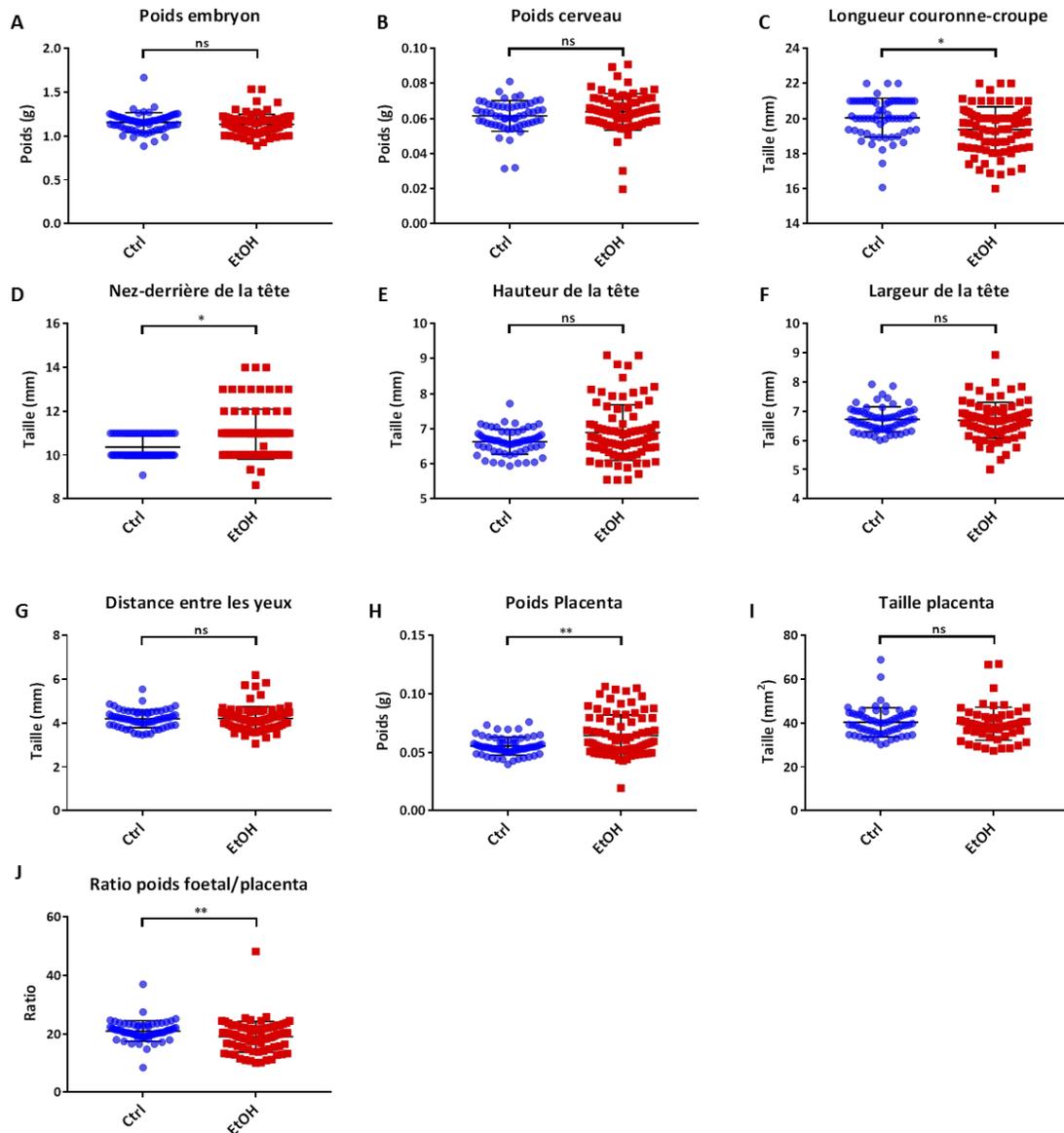
**Tableau VII. Pourcentage d'embryons et de placentas présentant une anomalie à E18.5.**

	<b>Ctrl (n = 62)</b>	<b>EtOH (n = 84)</b>	<b>Valeur X<sup>2</sup></b>	<b>p-value</b>
<b>Embryons avec une anomalie</b>	2	17	9.12	0.0025
<b>Mères avec au moins un embryon anormal</b>	2	8	4.23	0.0397
<b>Placentas avec une anomalie</b>	0	3	2.26	0.13
<b>Mères avec au moins un placenta anormal</b>	0	2	2.59	0.11

**Chi-carré**

Puisque plusieurs modèles rapportent des différences au niveau de la croissance et de la taille des embryons en fin de gestation ou à la naissance (206, 210, 212), nous avons procédé à la prise de plusieurs mesures lors des dissections des embryons au stade E18.5 afin de déterminer si l'exposition à l'alcool pendant la préimplantation entraîne des retards ou dérèglements de croissance. Le poids des embryons ne présente aucune différence significative entre les deux conditions. Par contre, la distribution des longueurs couronne-croupe des embryons exposés à l'alcool est significativement plus petite que celle des échantillons contrôles (Ctrl = 20.05mm vs EtOH = 19.38mm,  $p < 0.05$ ) (Figure 19 et Tableau VII). Au contraire, la distance entre le nez et le derrière de la tête est légèrement, mais significativement, plus grande chez les embryons exposés à l'alcool (Ctrl = 10.36 mm vs EtOH = 10.96mm,  $p < 0.05$ ) (Figure 19 et Tableau VII). Les autres mesures prises ne présentaient pas de différences significatives entre les deux conditions ( $p < 0.05$ ). Les poids des placentas exposés à l'alcool sont significativement supérieurs aux placentas contrôles (Ctrl = 0.0553g vs EtOH = 0.0642g,  $p < 0.01$ ) (Figure 19 et Tableau VII) alors qu'aucune différence significative n'est observée au niveau de la taille de celui-ci. Le ratio du poids fœtal sur le poids du placenta est, pour sa part, significativement inférieur chez les embryons exposés à l'EtOH par rapport aux échantillons contrôles (Ctrl = 20.99 vs EtOH = 19,  $p < 0.001$ ). Nos résultats démontrent qu'une exposition à l'alcool

pendant la préimplantation causera des anomalies de croissance durant la gestation qui perdureront longtemps après la période d'exposition et sont ainsi visibles en fin de gestation.



**Figure 19. Distribution des principales mesures associées à des anomalies de croissance à E18,5. A.** Poids de l'embryon. **B.** Poids du cerveau. **C.** Longueur couronne-croupe. **G.** Distance entre les yeux. **D.** Distance nez-derrière de la tête de l'embryon. **E.** Hauteur de la tête. **F.** Largeur de la tête. **H.** Poids du placenta. **I.** Taille (aire) du placenta. **J.** Ratio poids embryon/placenta. Ctrl n = 62 ; EtOH n = 84. \* =  $p$ -value < 0,05 \*\* =  $p$ -value < 0,01 par *unpaired t test* avec test de Kolmogorov-Smirnov.

**Tableau VIII. Mesures associées à des anomalies de croissance à E18.5**

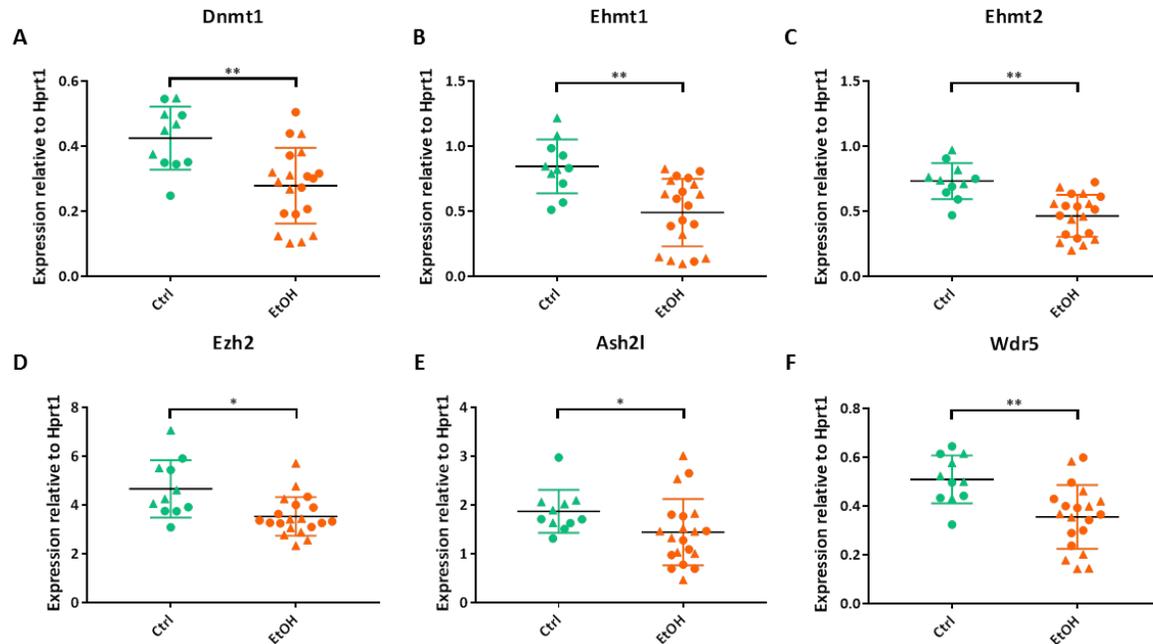
	Moyenne Ctrl (n = 62)	Moyenne EtOH (n = 84)	p-value	
<b>Poids embryon (g)</b>	1.16	1.13	0.1926	ns
<b>Poids cerveau (g)</b>	0.0615	0.0637	0.5105	ns
<b>Longueur couronne-croupe (mm)</b>	20.05	19.38	0.0364	*
<b>Distance nez-derrrière tête (mm)</b>	10.36	10.96	0.038	*
<b>Hauteur de la tête (mm)</b>	6.63	6.89	0.0501	ns
<b>Largeur de la tête (mm)</b>	6.72	6.69	0.7092	ns
<b>Distance entre les yeux (mm)</b>	4.20	4.21	0.948	ns
<b>Poids placenta (g)</b>	0.0553	0.0642	0.0067	**
<b>Taille placenta (aire) (mm<sup>2</sup>)</b>	40.33	39.71	0.7293	ns
<b>Ratio poids foetal/placental</b>	20.99	19	0.0005	***

*unpaired t test, avec test de Kolmogorov-Smirnov*

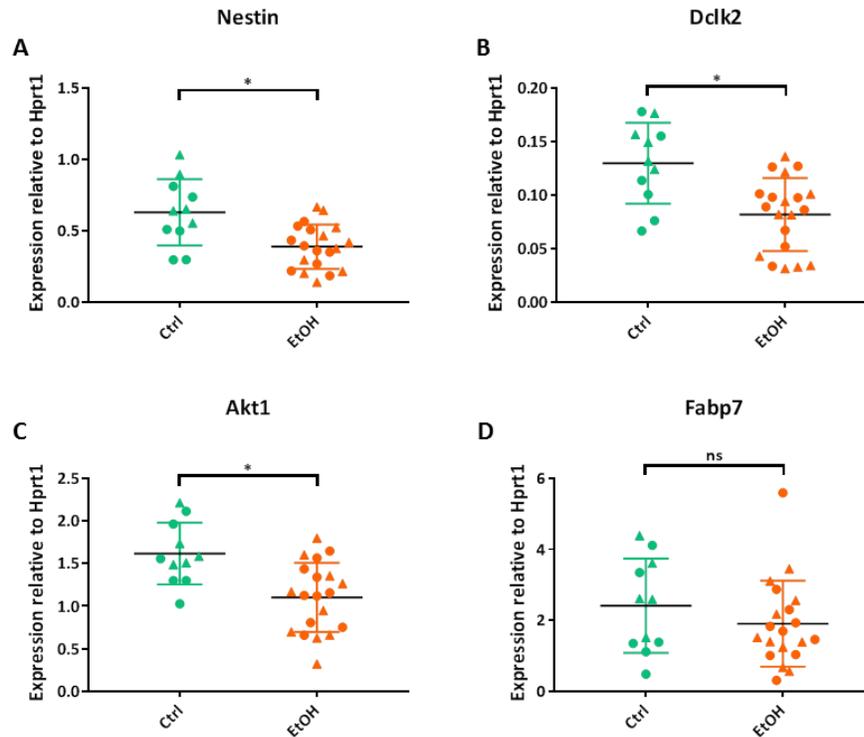
### **5.3 Expression génique modifiée chez les cerveaux antérieurs à mi-gestation exposés à l'alcool pendant la préimplantation**

Plusieurs modèles variés d'exposition prénatale à l'alcool ont montré des différences significatives d'expression génique dans différents modèles cellulaires. Afin de déterminer si notre exposition à l'alcool pendant la période préimplantatoire a un effet sur la modulation du transcriptome du cerveau antérieur, nous avons réalisé une étude sommaire par qPCR sur l'ARN extrait des cerveaux antérieurs. Les 12 gènes choisis démontrent une expression altérée dans divers autres modèles d'exposition prénatale à l'alcool et sont reliés à l'épigénétique (*Dnmt1*, *Ehmt1*, *Ehmt2*, *Ezh2*, *Ash2l* et *Wdr5*), au système nerveux (*Nestin*, *Dcl2*, *Akt1* et *Fabp7*) et au développement (*Eed* et *Igf2*) (163, 185). Sur les 12 gènes testés, 11 montrent une différence significative d'expression relative au gène contrôle *Hprt1* entre les échantillons exposés à l'alcool (n = 20) et les contrôles (n = 11) (Figures 20 - 22). Nous remarquons ainsi que seul le gène *Fabp7* semble exprimé de façon similaire entre les 2 conditions et ne montre pas de

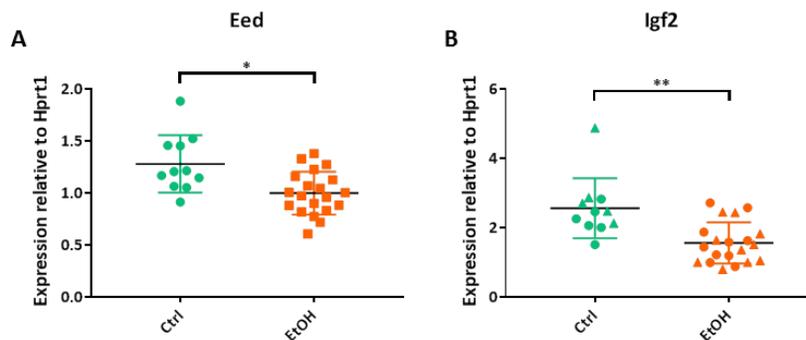
différences d'expression significatives. Cette expérience préliminaire démontre que la régulation de l'expression de nombreux gènes dans le cerveau antérieur est affectée par une EPA pendant la préimplantation, ce qui suggère la présence de perturbations épigénétiques dans ce tissu.



**Figure 20. Expression génique altérée par qPCR dans certains gènes liés à la mise en place et au maintien de modifications épigénétiques dans les cerveaux antérieurs d'embryons E10.5 exposés à l'alcool pendant la préimplantation.** Expression relative des gènes **A. Dnmt1**, **B. Ehmt1**, **C. Ehmt2**, **D. Ezh2**, **E. Ash2l**, **F. Wdr5**. L'expression de *Hprt1* a été utilisée comme référence contrôle dans le calcul statistique par *unpaired t test* avec test de Kolmogorov-Smirnov. \* = *p-value* < 0,05 \*\* = *p-value* < 0,01 Ctrl = 11 ; EtOH = 20



**Figure 21. Expression génique altérée par qPCR dans certains gènes liés au développement et au fonctionnement du système nerveux dans les cerveaux antérieurs d'embryons E10.5 exposés à l'alcool pendant la préimplantation.** Expression relative des gènes **A. Nestin**, **B. gène Dclk2**, **C. Akt1**, **D. Fabp7**. L'expression de *Hprt1* a été utilisée comme référence contrôle dans le calcul statistique par *unpaired t test* avec test de Kolmogorov-Smirnov. \* = *p-value* < 0,05 \*\* = *p-value* < 0,01 Ctrl = 11 ; EtOH = 20



**Figure 22. Expression génique altérée par qPCR dans certains gènes liés au développement embryonnaire dans les cerveaux antérieurs d'embryons E10.5 exposés à l'alcool pendant la préimplantation.** Expression relative des gènes **A. Eed**, **B. Igf2**. L'expression de *Hprt1* a été utilisée comme référence contrôle dans le calcul statistique par *unpaired t test* avec test de Kolmogorov-Smirnov. \* = *p-value* < 0,05 \*\* = *p-value* < 0,01 Ctrl = 11 ; EtOH = 20

## 5.4 Profils de méthylation altérés chez les cerveaux antérieurs à mi-gestation exposés à l'alcool pendant la préimplantation

Plusieurs études montrent que des perturbations épigénétiques pourraient être derrière la dérégulation persistante de l'expression de certains gènes cruciaux impliqués dans le développement et fonctionnement du cerveau, et ainsi de nombreux phénotypes observés chez les enfants atteints du TSAF. Ici, nous avons voulu déterminer si une exposition prénatale à l'alcool d'un embryon préimplantatoire, menant à la perturbation d'expression génique, affecte également les profils de méthylation d'ADN à mi-gestation. Pour ce faire, nous avons récolté des cerveaux antérieurs d'embryons à mi-gestation et utilisé la technique de *Reduced Representation Bisulfite Sequencing* (RRBS) couplé avec des analyses bio-informatiques.

Nous avons d'abord fait une analyse comparant la méthylation de tous les échantillons (e.g., cerveaux antérieurs) exposés à l'éthanol (n = 12) à celle de tous les échantillons contrôles (n = 8). Nos analyses bio-informatiques nous ont permis d'identifier 686 régions différentiellement méthylées (DMT ; tuile de 100pb avec une couverture de séquençage de 10X ou plus, contenant au moins 2 CpGs avec une différence de méthylation d'au moins 20% et une *q-value* inférieur à 0.01) à travers le génome de nos échantillons ayant subi une exposition prénatale à l'alcool (Figure 24). De ce nombre, 585 régions sont hyperméthylées, c'est-à-dire que les échantillons exposés à l'alcool ont gagné de la méthylation (>20% de méthylation) par rapport aux échantillons contrôles, et 101 régions sont hypométhylées, c'est-à-dire qu'elles ont donc perdu de la méthylation (<20% de méthylation) par rapport aux contrôles. La méthylation d'un grand nombre de régions dans le cerveau antérieur est donc affectée par l'exposition à l'alcool tôt dans la gestation. Des analyses individuelles, non présentées dans ce mémoire, montrent que certains embryons, en corrélation avec leur apparence morphologique, présentent plus ou moins de régions affectées. Cependant, pour le reste des analyses présentées ici, nous focaliserons sur les régions qui sont affectées dans l'ensemble des tissus (e.g., tous les contrôles vs tous les exposés à l'éthanol). Nous avons principalement cherché à déterminer si ces DMTs étaient particulièrement présentes et enrichies dans certaines régions ou structures spécifiques

de l'ADN associées avec la transcription et la stabilité du génome, ou ayant un impact sur le développement embryonnaire.

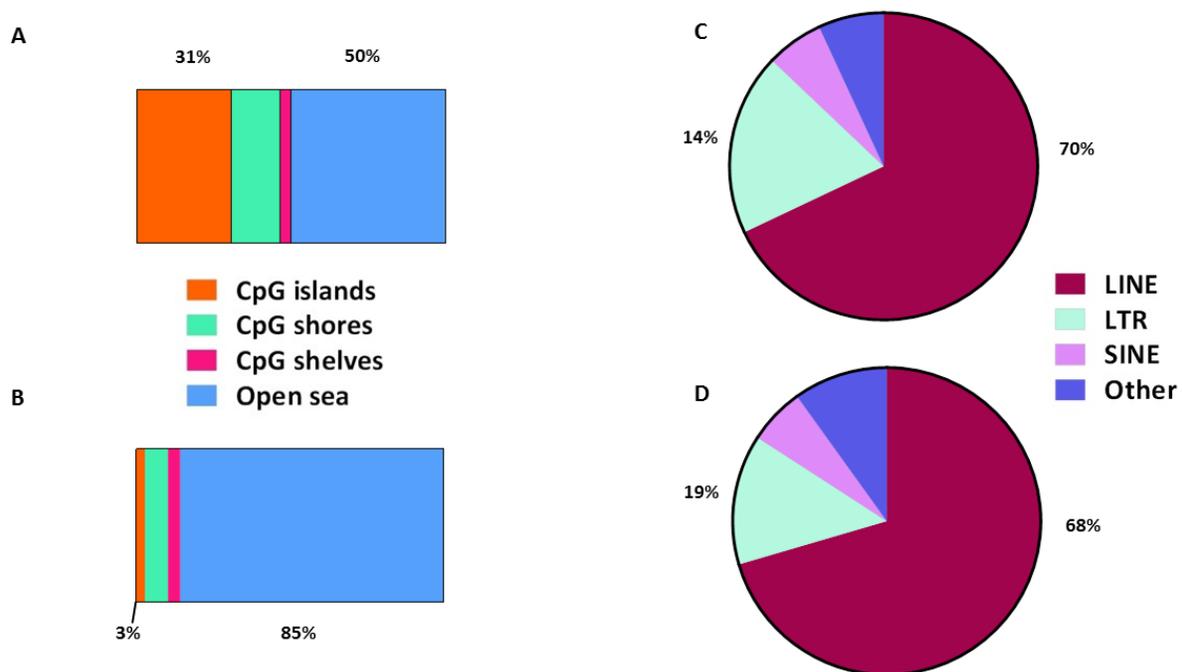
#### **5.4.1 Analyse des DMTs du cerveau antérieur dans les régions riches en CpGs**

Les régions riches en CpG, ou îlots CpG (ICG) agissent comme des régions régulatrices et sont surtout situées dans ou très près des promoteurs des gènes. Les ICG associés aux gènes fortement transcrits sont généralement très peu ou non-méthylés (26, 27) et, à l'opposé, deviennent fortement méthylés lorsqu'il est temps d'inactiver un gène (28). Une analyse comparant les coordonnées associées avec les DMTs et celles fournies par la base de données publiques de l'UCSC a permis de déterminer le nombre de DMTs retrouvés dans les ICG, dans les régions en bordure ou très éloignées de ceux-ci. Comme il est possible de le constater à la Figure 23, environ 30% de toutes les tuiles analysées de nos données brutes de séquençage se retrouvent dans les îlots CpGs alors qu'à peine 3% des régions DMTs sont dans ces régions. Au contraire, 50% de toutes les tuiles analysées se retrouvent dans des régions dites *open sea*, c'est-à-dire à plus de 4000kb d'un îlot CpG, alors que plus de 85% des DMTs sont dans cette région. Les régions où la méthylation est affectée se retrouvent donc plus éloignées des régions riches en CpGs. Bien que le pourcentage de DMTs se retrouvant dans les ICG soit mineur, plusieurs des gènes associés à ces régions, dont *Npdc* (prolifération des cellules neurales) et le gène à empreinte *Grb10*, sont particulièrement intéressants dans notre modèle et pourraient avoir un impact significatif sur les différents phénotypes du TSAF.

#### **5.4.2 Analyse des DMTs du cerveau antérieur dans les éléments répétés**

Longtemps considérés comme des régions inutiles du génome, les éléments répétés sont, aujourd'hui, mieux connus pour leur implication dans la stabilité du génome et des

chromosomes. Afin de déterminer si nos régions différentiellement méthylées sont situées dans ces éléments, nous avons procédé à une analyse comparant les coordonnées de nos DMTs avec celles des différents éléments répétés (e.g, LINE, LTR, SINE) obtenus à partir de la banque de données publiques du UCSC. Comme il peut être observé à la Figure 23, la distribution des éléments répétés est extrêmement similaire entre l'ensemble des tuiles analysées et les DMTs du cerveau antérieur. Il est important de préciser que plusieurs coordonnées de régions répétées peuvent se retrouver à l'intérieur d'une même tuile d'analyse de 100 paires de base. Au total, 68.37% des DMTs contiennent au moins un élément répété ce qui est similaire aux 70.18% des tuiles totales analysées qui contiennent au moins un élément répété (différence non significative par test de *chi-carré*). Ceci indique donc qu'aucun enrichissement particulier pour un type d'élément répété ne se retrouve dans les régions où la méthylation est altérée.



**Figure 23. Les régions différentiellement méthylées du cerveau antérieur sont principalement éloignées des îlots CpGs et ont une distribution normale dans les éléments répétés.** **A.** Distribution de toutes les tuiles du cerveau antérieur analysées dans les îlots CpGs et en bordure ceux-ci (n = 291639). **B.** Distribution des DMTs du cerveau antérieur dans les îlots CpGs et en bordure ceux-ci (n = 686). **C.** Distribution de toutes les tuiles du cerveau antérieur analysées dans les différents types d'éléments répétés (n = 213411) **D.** Distribution des DMTs du cerveau antérieur dans les différents types d'éléments répétés (n = 469).

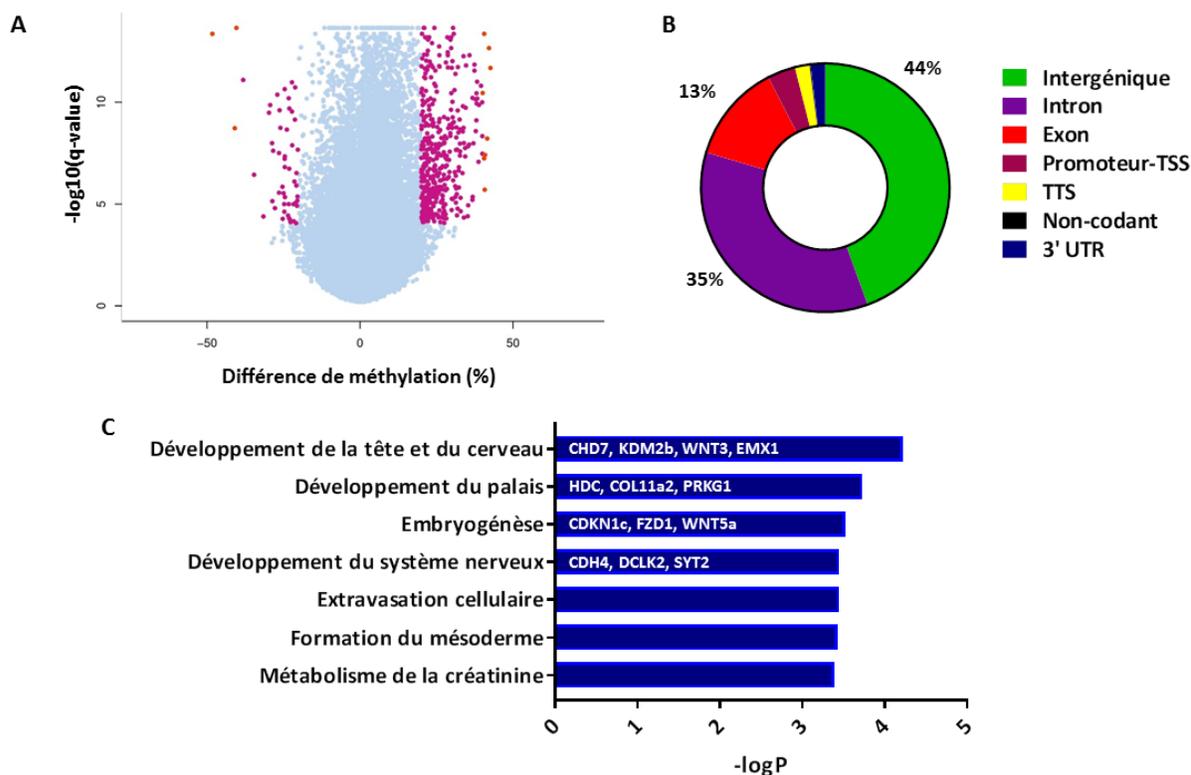
### **5.4.3 Analyse des DMTs du cerveau antérieur dans les régions du contrôle de l’empreinte génomique**

Étant donné que les perturbations, pendant la mise en place du programme épigénétique embryonnaire, sont connues pour avoir un impact sur la méthylation des gènes à empreinte (32, 107), nous avons voulu, par la suite, déterminer si certaines de ces régions étaient différentiellement méthylées dans notre modèle. Nous avons utilisé les coordonnées des régions de contrôles de l’empreinte (*imprinted control regions*) de 24 gènes à empreinte bien caractérisés et nous les avons comparées avec les coordonnées de nos DMTs. Nous avons trouvé des changements de méthylation pour deux gènes à empreinte, soit une augmentation de la méthylation de 21% dans le centre d’empreinte du gène *Grb10* et une augmentation de 45% dans le centre d’empreinte du gène *Zrsr1*. La perturbation que nous causons par notre exposition à l’alcool pendant la reprogrammation épigénétique entraîne donc des dérégulations des profils de méthylation sur certaines régions du contrôle de l’empreinte dans certains gènes du cerveau antérieur des embryons à mi-gestation exposés à l’alcool pendant la préimplantation.

### **5.4.4 Annotation génomique des DMTs du cerveau antérieur et implication fonctionnelle.**

Nous voulions aussi savoir concrètement quelles sont précisément les annotations génomiques de nos régions différentiellement méthylées, c’est-à-dire dans quelle portion du génome, associée à des gènes ou non, elles sont situées. L’étape d’annotation avec le logiciel Homer a permis de déterminer le gène correspondant à chaque région et la distribution de ces régions à travers les différentes portions du gène (e.g., intron, exon, promoteur) qui peut être visualisée à la Figure 24. Nous observons ainsi qu’une majorité de ces régions (56%) se situent dans des régions géniques et 44% dans des régions intergéniques. Nous avons aussi remarqué que certaines des régions fortement atteintes correspondaient à des gènes jouant des rôles majeurs dans le développement, tel *Cbx2* responsable du remodelage de la chromatine et du

maintien de l'état de répression de plusieurs gènes pendant le développement embryonnaire et *Wnt5a* qui joue un rôle crucial dans l'embryogenèse et le signallement cellulaire (Tableau IX). Afin de déterminer dans quel processus biologique ou cellulaire ces régions différenciellement méthylées sont impliquées, nous avons procédé à une analyse d'enrichissement d'ontologie génique avec l'outil Metascape. Pour les DMTs du cerveau antérieur, nous obtenons majoritairement des voies associées au développement embryonnaire, à la morphogénèse et au développement du système nerveux (Figure 24).



**Figure 24. 686 régions différenciellement méthylées (DMTs) chez les cerveaux antérieurs d'embryons E10.5 exposés à l'alcool pendant la préimplantation. A.** *Volcano plot* montrant le log de la *q-value* en fonction de la différence de méthylation entre les deux conditions pour chaque région analysée. Chaque point correspond à une tuile de 100 paires de base analysée. **B.** Distribution des 686 DMTs du cerveau antérieur à travers les portions du génome. **C.** Voies métaboliques les plus impliquées dans les DMTs géniques du cerveau antérieur déterminées par analyse d'enrichissement d'ontologie génique (Metascape) et exemple de gènes altérés dans les voies les plus affectées. Ctrl n = 8 ; EtOH n = 12

**Tableau IX. Exemple de gènes particulièrement affectés dans le cerveau antérieur par l'exposition prénatale à l'alcool et résumé de leurs fonctions.**

<b>Gène</b>	<b>Localisation</b>	<b>Changement de méthylation</b>	<b>Fonction</b>
<i>Cbx2</i>	Exon	45%	Remodelage de la chromatine des histones pour maintenir l'état de répression de transcription de plusieurs gènes pendant le développement
<i>Zrsr1</i>	Promoteur	45%	Se lie à l'ADN et l'ARN ; gène à empreinte
<i>Wnt5a</i>	Exon	45%	Rôle dans l'embryogenèse et le signallement cellulaire
<i>Eab1</i>	Intron	43%	Rôle dans le développement des reins, des arcs branchiaux, des yeux et des oreilles
<i>Edem3</i>	Intron	-48%	Contrôle de qualité des protéines dans le réticulum endoplasmique

L'ensemble de ces analyses montre bien qu'une exposition prénatale à l'alcool pendant la préimplantation entraîne des dérégulations des profils de méthylation qui sont perpétuées dans le développement embryonnaire et perceptibles dans le cerveau antérieur à mi-gestation. Même si les régions dérégulées se retrouvent dans l'ensemble du génome, nos résultats montrent qu'une proportion des régions atteintes ont des fonctions spécifiques et importantes dans le développement ou la régulation du système nerveux.

## **5.5 Profils de méthylation altérés chez les placentas à mi-gestation exposés à l'alcool pendant la préimplantation**

Les cellules du placenta sont dérivées du trophoctoderme du jeune embryon à la suite de processus d'implantation. Des dérégulations épigénétiques causées par une perturbation pendant la préimplantation ont le potentiel d'être transmises pendant le processus de spécification normal des cellules du trophoctoderme et donc d'affecter les cellules du placenta. Ainsi, nous avons voulu déterminer l'impact d'une exposition prénatale à l'alcool pendant la

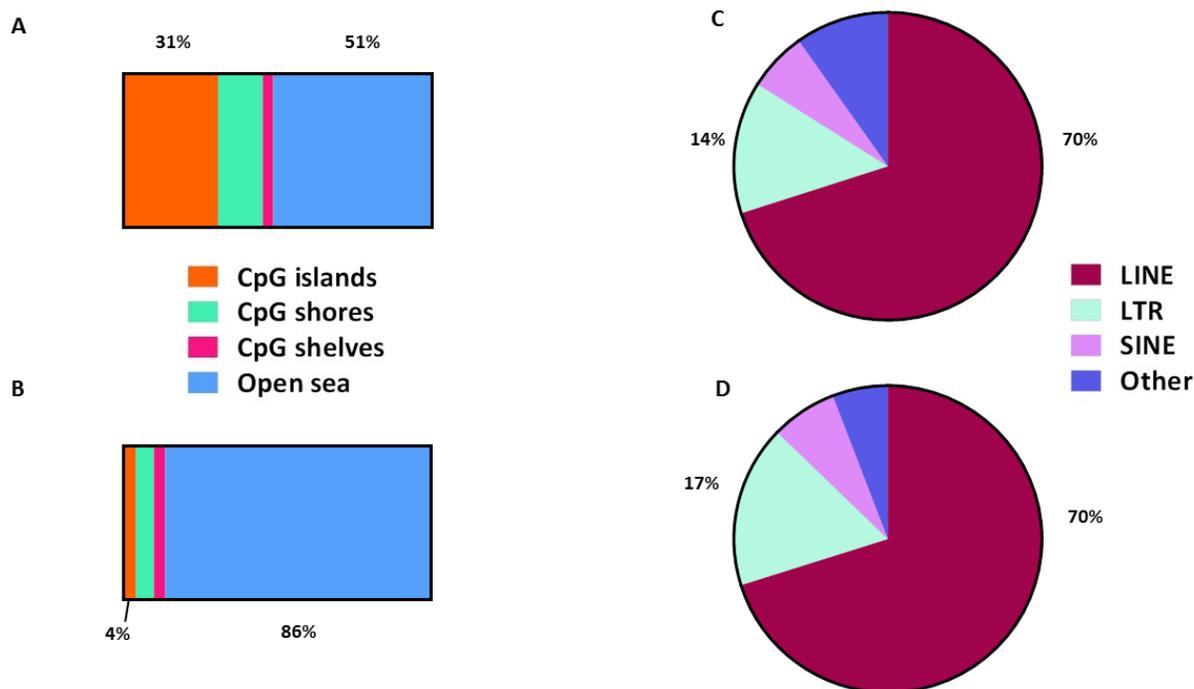
préimplantation sur les profils de méthylation du placenta. Nous avons donc procédé à cette analyse avec la technique du *Reduced Representation Bisulfite Sequencing* suivi d'analyses bio-informatiques. Une analyse comparant la méthylation de tous les échantillons de placentas exposés à l'alcool par rapport aux échantillons contrôle montre 2942 régions différentiellement méthylées (DMT), dont 852 régions hyperméthylées et 2090 régions hypométhylées (Figure 26). Tout comme pour le cerveau, le placenta présente des dérégulations de ces profils de méthylation, en accord avec notre hypothèse de départ. Cependant, l'exposition à l'alcool entraîne une perte de méthylation pour la majorité des régions atteintes au niveau du placenta, alors que nous observions un gain pour le cerveau antérieur. Par la suite, nous nous sommes intéressés aux différentes régions atteintes ainsi qu'à leurs fonctions cellulaires.

### **5.5.1 Analyse des DMTs du placenta dans les régions riches en CpGs**

Afin de déterminer la proximité des régions différentiellement méthylées avec les régions riches en CpGs, nous avons donc procédé à une analyse des coordonnées génomiques de nos DMTs et de celles de la banque de données de l'UCSC. De façon similaire à ce qui a été observé dans le cerveau antérieur, seulement un peu moins de 4% des DMTs se retrouvent directement dans des îlots CpGs alors que plus de 30% des tuiles analysées au total en font partie. 86% des DMTs du placenta se retrouvent dans les régions éloignées (*open sea*) et un peu moins de 10% à moins de 4000kb (*CpGs shores* et *CpGs shelves*) (Figure 25). Les régions situées dans les îlots CpGs incluent des gènes tels *Neurod2* (différenciation des neurones), *Dact1* (régulation pendant le développement) et *Bcl11b* (répression de la transcription) dont la dérégulation peut avoir de graves conséquences sur le développement embryonnaire. De façon générale, les DMTs du placenta sont cependant éloignés des régions riches en CpGs.

## 5.5.2 Analyse des DMTs du placenta dans les éléments répétés

La distribution en éléments répétés des DMTs fut aussi analysée par comparaison des coordonnées. Encore une fois, aucune différence significativement dans la distribution des éléments LINE, SINE, LTR et autres n'est observée entre les DMTs et l'ensemble des tuiles analysées (Figure 25). De plus, 74.05% du total des tuiles analysées et 76.95% des DMTs du placenta contiennent au moins une coordonnée d'élément répété. Ces chiffres sont très similaires entre eux et la différence non significative indique encore une fois qu'aucun enrichissement pour les éléments répétés n'ait retrouvé dans les DMTs du placenta.



**Figure 25. Les régions différentiellement méthylées du placenta sont principalement éloignées des îlots CpGs et ont une distribution normale dans les éléments répétés.** **A.** Distribution de toutes les tuiles du cerveau antérieur analysées dans les îlots CpGs et en bordure ceux-ci (n = 270244). **B.** Distribution des DMTs du cerveau antérieur dans les îlots CpGs et en bordure ceux-ci (n = 2942). **C.** Distribution de toutes les tuiles du cerveau antérieur analysées dans les différents types d'éléments répétés (n = 200109) **D.** Distribution des DMTs du cerveau antérieur dans les différents types d'éléments répétés (n = 2264).

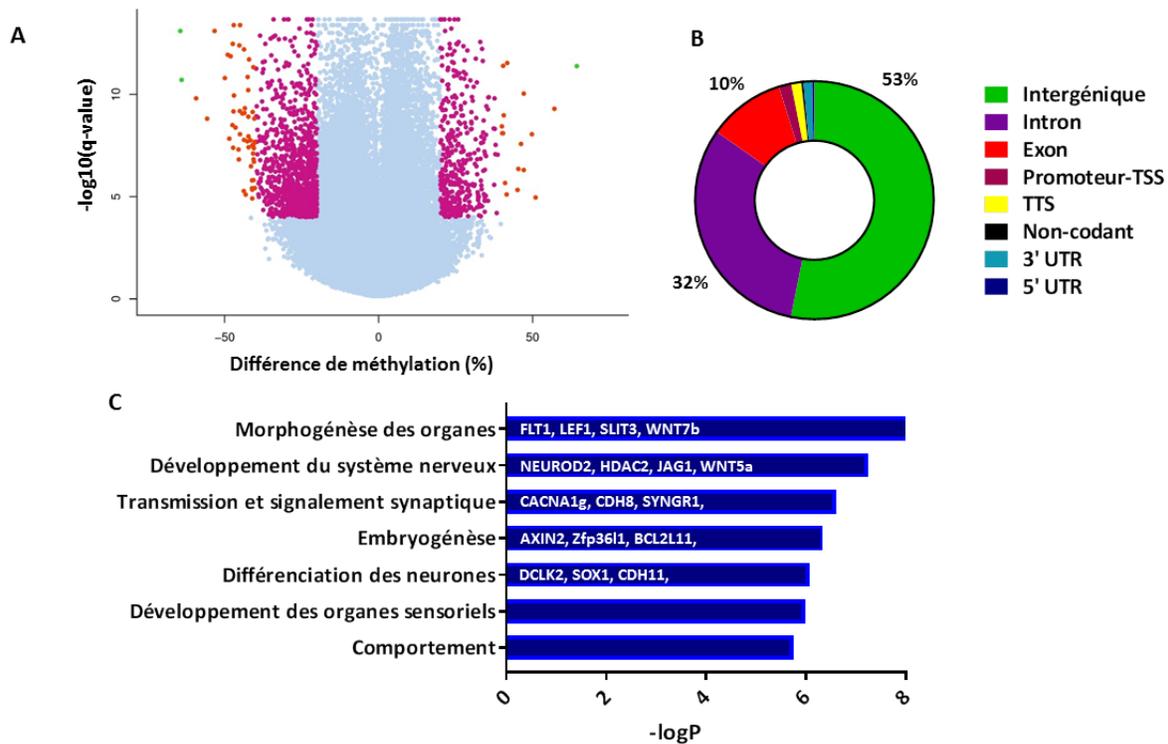
### **5.5.3 Analyse des DMTs du placenta dans les régions du contrôle de l’empreinte génomique**

Étant donné que le modèle d’exposition prénatale à l’alcool pendant la préimplantation montre des dérégulations du gène à empreinte *H19* dans le placenta, nous voulions déterminer si certaines régions de contrôle de l’empreinte allaient aussi être affectées dans notre modèle d’exposition. En comparant les coordonnées génomiques de nos régions différentiellement méthylées avec les coordonnées des régions de contrôle de l’empreinte de 24 gènes à empreinte bien connus, dont *H19*, nous avons trouvé une augmentation de la méthylation du gène *Mest* de 26% chez les placentas exposés à l’alcool. L’exposition à l’alcool pendant la préimplantation est donc susceptible d’entraîner des dérégulations dans certaines régions de contrôle de l’empreinte qui sont perceptibles dans les tissus extra-embryonnaires à mi-gestation. Malheureusement, la région associée avec le gène *H19* n’est pas couverte par nos analyses RRBS et sera étudiée ultérieurement.

### **5.5.4 Annotation génomique des DMTs du placenta et implication fonctionnelle.**

Dans le but de déterminer dans quel gène sont précisément situées nos régions différentiellement méthylées, nous avons procédé à l’annotation des DMTs avec le logiciel Homer. En observant la distribution de ces régions différentiellement méthylées à la Figure 26), nous remarquons que nous avons majoritairement (53%) des régions intergéniques. Quelques exemples de gènes les plus affectés peuvent aussi être consultés au Tableau x, où nous remarquons des fonctions reliées au développement et à la transcription. De façon très intéressante, lorsque nous avons procédé à l’analyse d’ontologie génique avec l’outil Metascape, nous obtenons majoritairement des processus associés à la morphogénèse des organes, au système nerveux et la transmission synaptique (Figure 26 graphbar metascape version avec gènes). Les résultats sont donc très similaires avec ceux obtenus pour le cerveau antérieur et

donc aussi en lien avec les conséquences observées chez les enfants TSAF. Ces résultats démontrent bien les conséquences épigénétiques d'une exposition prénatale à l'alcool pendant la préimplantation sur les tissus extra-embryonnaires comme le placenta. Ces perturbations pourraient entraîner de graves dysfonctions placentaires et ainsi avoir un impact direct sur le développement adéquat de l'embryon et leur possible implication dans les pathologies des enfants atteints de TSAF.



**Figure 26. 2942 régions différentiellement méthylées (DMTs) chez les placentas exposés à l'alcool pendant la préimplantation.** **A.** *Volcano plot* montrant le log de la *q-value* en fonction de la différence de méthylation entre les deux conditions pour chaque région analysée. Chaque point correspond à une tuile de 100 paires de base analysée. **B.** Distribution des 2942 DMTs du placenta à travers les portions du génome. **C.** Voies métaboliques les plus impliquées dans les DMTs géniques du placenta déterminées par analyse d'enrichissement d'ontologie génique (Metascape) et exemple de gènes altérés dans les voies les plus affectées. Ctrl n = 8 ; EtOH n = 12

**Tableau X. Exemples de gènes particulièrement affectés dans le placenta par l'exposition prénatale à l'alcool et résumé de leurs fonctions.**

Gène	Localisation	Changement de méthylation	Fonction
<i>Sertad3</i>	Intron	64%	Co-activateur de la transcription
<i>Stat6</i>	Promoteur	46%	Facteur de transcription ; rôle dans l'activité anti-apoptotique
<i>Dnah17</i>	Exon	-64%	Associé aux microtubules d'axones (dynéine axonémale)
<i>Tcf23</i>	Intron	-56%	Facteur de transcription impliqué dans la pluripotence des cellules souches
<i>Drosha</i>	Intron	-53%	Synthèse des micro-ARN

## 5.6 Régions communes affectées chez le placenta et le cerveau antérieur

Étant donné que les résultats précédents montrent que la méthylation d'ADN est affectée autant dans le placenta que dans le cerveau antérieur de l'embryon et que ces régions altérées sont enrichies pour des voies métaboliques similaires entre les deux tissus, nous nous sommes demandé si les dérégulations de méthylation au niveau du placenta pourraient en fait refléter l'impact au niveau du cerveau. Nous avons donc voulu savoir si certaines régions identiques pouvaient être affectées autant dans le cerveau antérieur que le placenta. Pour déterminer ceci, nous avons donc procédé à une analyse comparative des coordonnées des tuiles de 100 paires de base entre chacune des listes de DMTs. 21 DMTs, soit exactement la même région dont la méthylation est altérée dans les deux tissus, ressortent de cette analyse. De ce nombre, 10 régions se retrouvaient dans des régions géniques. Plusieurs gènes associés à ces régions ont d'ailleurs des fonctions directes en lien avec plusieurs dérégulations observées chez les enfants TSAF comme il peut être observé au Tableau XI. Entre autres, le gène *Dclk2* est impliqué dans l'organisation de l'hippocampe et *Lrfn4* dans la transmission synaptique. Ces deux gènes sont donc cruciaux pour le bon développement et fonctionnement du système nerveux. Des gènes reliés à l'épigénétique, comme *Dnmt3a*, responsable de la méthylation *de novo* du génome, et

*Pdcd5*, qui régule l'acétyltransférase *Kat5*, font aussi partie de la liste de régions communément affectées dans le cerveau antérieur et le placenta. Les autres gènes sont aussi extrêmement importants avec des fonctions connexes dans le développement (*Csrp2*) ou dans l'organisation et les fonctions cellulaires (*Cacng8*, *Helb*, *Plec*). Ces résultats montrent bien que l'exposition prénatale à l'alcool pendant la préimplantation peut affecter autant les tissus embryonnaires que ceux extra-embryonnaires. Les régions communes affectées autant dans le cerveau antérieur que dans le placenta sont particulièrement intéressantes en raison de leur lien avec plusieurs phénotypes et anomalies présentent chez les enfants atteints de TSAF. Il est possible que ces régions soient particulièrement susceptibles d'être dérégulées suite à une perturbation pendant la préimplantation, et ce, peu importe leur tissu.

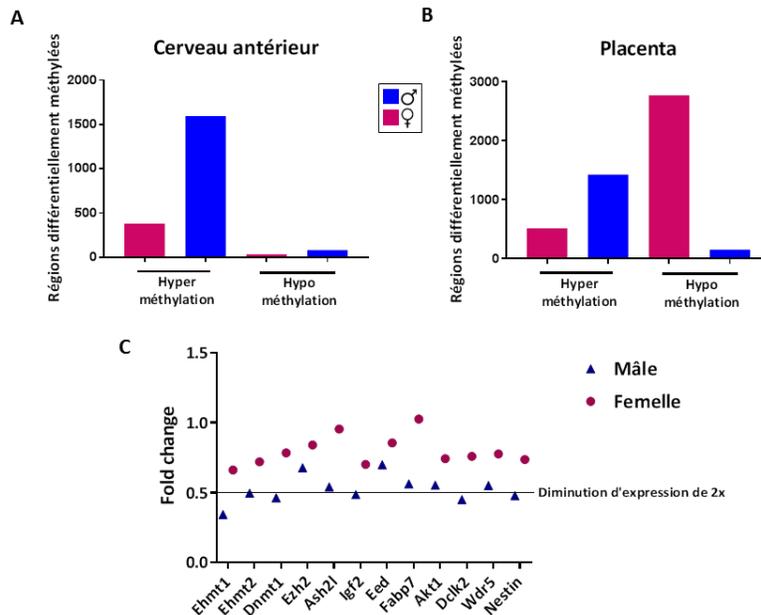
**Tableau XI. Liste des régions géniques communes affectées dans le cerveau antérieur et le placenta et résumé de leurs fonctions.**

<b>Gène</b>	<b>Localisation</b>	<b>Fonction</b>
<i>Cacng8</i>	Promoteur-TSS	Activité dans les canaux à calcium voltage-dépendant
<i>Csrp2</i>	Intron	Régulation de processus reliés au développement et à la différenciation cellulaire
<i>Dclk2</i>	Intron	Organisation de l'hippocampe
<i>Dnmt3a</i>	Exon	Méthylation <i>de novo</i> de l'ADN
<i>Gm15413</i>	Intron	Gène prédit. Fonction inconnue
<i>Helb</i>	Exon	Hélicase nécessaire pour la réplication de l'ADN
<i>Lrfn4</i>	Exon	Transmission synaptique
<i>Pdcd5</i>	Exon	Régulation de l'acétyltransférase KAT5
<i>Plec</i>	Exon	Rôle crucial dans le maintien de l'intégrité des tissus
<i>Spock1</i>	Intron	Inhibition de protéases

## **5.7 Différence spécifique au sexe dans les profils de méthylation de cerveaux antérieurs et placentas exposés à l'alcool**

Les garçons sont reconnus pour être plus susceptibles de développer certains types de troubles neurodéveloppementaux (240-246). Cependant, très peu de modèles d'alcoolémie fœtale discriminent les filles et les garçons lors de leurs études. Étant donné que certaines perturbations épigénétiques entraînent des conséquences différentes chez les tissus mâles et femelles (95, 247), nous étions particulièrement intéressés à déterminer si notre modèle entraînait des dérégulations spécifiques pour chaque sexe. Nous avons ainsi procédé à l'analyse des profils de méthylation en séparant les embryons mâles et femelles. Cette analyse comparait donc la méthylation des embryons exposés à l'alcool d'un sexe seulement par rapport à la méthylation des embryons contrôles du même sexe. Étonnamment, nous obtenons des profils généraux de dérégulations divergents pour chacun des sexes.

Pour le cerveau antérieur, les mâles semblent beaucoup plus affectés que les femelles avec environ trois fois plus de régions affectées (1677 DMTs pour les mâles et 417 DMTs pour les femelles). Par contre, pour les deux sexes, il s'agissait majoritairement de DMTs hyperméthylés par rapport au contrôle. Ces différences peuvent être visualisées à la Figure 27. Pour le placenta, ce sont les femelles qui sont plus affectées au niveau du nombre de DMTs, avec environ deux fois plus de régions de méthylation altérées que les mâles (1585 DMTs pour les mâles et 3292 DMTs pour les femelles). Étonnamment, nous avons aussi observé une différence dans la nature des DMTs. En effet, les DMTs des embryons femelles étaient majoritairement hypométhylés alors que ceux des embryons mâles étaient hyperméthylés par rapport aux embryons contrôles de même sexe (Figure 27). Malgré ces divergences dans les profils de méthylation, l'analyse d'ontologie pour les deux sexes séparés montre que des voies métaboliques similaires ou aux fonctions reliées sont atteintes chez les deux sexes (résultats non montrés).



**Figure 27. Différences dans les profils de méthylation entre les mâles et les femelles embryons exposés à l'alcool pendant la préimplantation.** **A.** Régions hyperméthylées et hypométhylées du cerveau antérieur lors de l'analyse des mâles et des femelles séparément **B.** Régions hyperméthylées et hypométhylées du placenta lors de l'analyse des mâles et des femelles séparément. Mâle Ctrl = 4 ; Femelle Ctrl = 4 ; Mâle EtOH n = 6 ; Femelle EtOH n = 6. **C.** Fold change de l'expression génique entre les échantillons de cerveaux EtOH et contrôle séparément pour les mâles et les femelles (Mâle Ctrl = 6 ; Femelle Ctrl = 5 ; Mâle EtOH n = 10 ; Femelle EtOH n = 10).

Puisque nous avons observé beaucoup de différences dans les DMTs de l'analyse en séparant les mâles et les femelles, nous avons aussi fait une comparaison des régions communes entre le placenta et le cerveau comme nous avons fait avec les DMTs de tous les échantillons, mais cette fois en utilisant les régions différentiellement méthylées obtenues par l'analyse en séparant les sexes. Plusieurs régions additionnelles se retrouvent dans les listes mâles ou femelles qui ne faisaient pas partie des régions obtenues lors de l'analyse avec les deux sexes combinés. Chez les mâles, 21 régions communes supplémentaires dont 13 dans des régions géniques ressortent de cette analyse (Tableau XII). Certaines de ces régions sont situées dans des gènes intéressants, comme les gènes à empreinte *Grb10* (région de contrôle de l'empreinte) et *Ntm* ou le gène *Cdh4* qui joue un rôle crucial dans la segmentation du cerveau et la croissance neuronale pendant le développement embryonnaire. Du côté des femelles, 16 régions communes supplémentaires affectées dans le placenta et le cerveau antérieur dont 6 dans des régions

géniques ont été trouvées (Tableau XIII. Ces régions semblent particulièrement impliquées dans la formation du cytosquelette (*Kank1* et *Peak1*) et dans les récepteurs olfactifs (*Olfir70*).

**Tableau XII. Régions géniques affectées dans le cerveau antérieur et le placenta des embryons mâles.**

Nom du gène	Localisation	Résumé de leur fonction
<i>Bcl11b</i>	Intron	Régulation négative de la transcription, remodelage du nucléosome
<i>Cdh4</i>	Intron	Segmentation du cerveau et croissance neuronale
<i>Gm10814</i>	Intron	Non caractérisé
<i>Grb10</i>	Intron	Gène à empreinte, récepteur à facteur de croissance
<i>Kcnk18</i>	Intron	Maintenance du potentiel d'action (contraction musculaire)
<i>Kprp</i>	Exon	Différentiation des kératinocytes
<i>Mir7237</i>	Intron	Non caractérisé
<i>Ntm</i>	Intron	Croissance et adhésion des neurites
<i>Procr</i>	Exon	Coagulation du sang
<i>Rsad1</i>	Exon	Réaction d'oxydation
<i>Tshr</i>	Intron	Métabolisme thyroïdien cellulaire
<i>Ugcg</i>	Intron	Biosynthèse des glycosphingolipides
<i>Wbscr17</i>	Intron	Trafic membranaire

**Tableau XIII. Régions géniques affectées dans le cerveau antérieur et le placenta des embryons femelles.**

Nom du gène	Localisation	Résumé de leur fonction
<i>Ankrd9</i>	Exon	Modification post-traductionnelle des protéines
<i>Gatsl2</i>	Intron	Régulation négative de la voie de signalisation TORC1
<i>Kank1</i>	Intron	Formation du cytosquelette
<i>Olfir70</i>	Exon	Récepteur olfactif
<i>Peak1</i>	Intron	Formation du cytosquelette et élongation de l'adhésion focale
<i>Zfp982</i>	Intron	Protéine à doigt de zinc. Fonction non caractérisée

Finalement, à la suite de ces informations, nous avons refait une analyse de nos résultats d'expression génique (Figures 20 - 22), mais cette fois en analysant séparément les résultats provenant des mâles et femelles. Les cerveaux antérieurs des échantillons mâles ont une expression relative aux contrôles plus faibles et donc un *fold change*, c'est-à-dire une variation par rapport aux échantillons contrôles plus grand, que ce que l'on observe chez les femelles (Figure 27). En corrélation avec ce qui est observé pour la méthylation, les embryons mâles sont plus affectés que les embryons femelles avec une réduction de l'expression génique plus importante.

Ces résultats montrent clairement que les placentas et embryons mâles et femelles ne répondent pas de la même façon à une exposition prénatale à l'alcool pendant la préimplantation. Plusieurs éléments qui seront évalués pendant la suite du projet permettront d'en découvrir davantage sur ces différences entre les mâles et les femelles.

## 6. Discussion

Pour cette étude, nous avons développé un modèle murin simulant une exposition prénatale de type *binge* pendant la préimplantation, soit au tout début de la grossesse. Considérant l'augmentation du taux de consommation excessive d'alcool (*binge*) chez les femmes et le taux alarmant de grossesses non planifiées (213, 217), il est primordial d'évaluer les conséquences à long terme pour l'enfant exposé et les mécanismes derrière ce type d'exposition. Notre étude démontre qu'une telle exposition augmente le taux d'anomalies morphologiques chez les embryons à mi-gestation et en fin de gestation. Par la suite, nous avons démontré que cette exposition induisait la dérégulation des profils de méthylation d'ADN chez l'embryon (cerveau antérieur) et le placenta à mi-gestation dans des régions et voies métaboliques cruciales pour le développement embryonnaire et du système nerveux. Nos résultats démontrent qu'une consommation d'alcool maternelle pendant la mise en place du programme embryonnaire cause des conséquences néfastes majeures dans le développement normal.

## 6.1 Évolution des anomalies morphologiques entre E10.5 et E18.5

Plusieurs anomalies morphologiques détectées à mi-gestation sont toujours présentes chez les embryons au stade E18.5, suggérant que ces anomalies seront aussi présentes à la naissance. Ceci est aussi observé par divers modèles d'exposition où, suivant une exposition prénatale à l'alcool à un stade varié, des embryons en fin de gestation ou à la naissance présentent des anomalies morphologiques similaires à ce que nous observons. Cela corrèle aussi avec les défauts craniofaciaux et autres phénotypes morphologiques des enfants atteints du TSAF (248-250).

Nous observons une légère baisse du pourcentage d'embryons présentant une anomalie morphologique entre le stade E10.5 et E18.5 (27.83% à E10.5 contre 19.05% à E18.5). Bien que statistiquement non significative, nous observons une légère baisse dans le nombre d'embryons vivants par mère entre E10.5 et E18.5 (moyenne de 7.5 embryons par portée à E10.5 et 6 embryons à E18.5). Il est ainsi possible que certains embryons gravement atteints morphologiquement meurent en cours de gestation ce qui fait baisser le pourcentage d'anomalies visibles à E18.5. Il est aussi possible que certaines anomalies de développement soient peu à peu corrigées au cours du développement et donc moins importantes à la fin de la gestation. Notons par exemple, l'augmentation significative de la hauteur de la tête des embryons exposés à l'alcool à mi-gestation, alors qu'en fin de gestation, aucune différence significative n'est observée entre les deux conditions (voir Tableaux VI et VIII). Ces résultats sont similaires aux effets compensatoires observés par Padmanabhan et *al.*, dans leur modèle d'exposition préimplantatoire (212). Certains défauts observés à E10.5 sont aussi impossibles à visualiser à E18.5 en raison du niveau de développement et de la complexité des différentes structures. Par exemple, la peau et l'organisation des nombreux organes à E18.5 nous empêchent d'avoir une vue d'ensemble de l'embryon comme c'est le cas à E10.5 où le développement est encore à un stade relativement simpliste. Pour cette raison, les études histologiques seront particulièrement importantes à E18.5 afin d'identifier certaines anomalies qui pourraient ne pas avoir été perçues lors de la dissection. Le modèle le plus similaire au nôtre, celui de Haycock et Ramsay (160), a étudié les poids des embryons et placentas à E10.5 lors des dissections, mais

n'a pris aucune mesure de taille. Malgré des analyses divergentes (puisque nous n'avons pas pesé les embryons au stade E10.5), nous observons de fortes similitudes entre nos conclusions et leurs observations. Grâce à notre méthode d'évaluation et à notre prise de mesures précises au microscope, nous avons pu établir qu'une exposition prénatale à l'alcool à un stade bien précis de la préimplantation entraîne des anomalies cérébrales et placentaires en plus d'entraîner des divergences dans la croissance embryonnaire.

Contrairement à ce qui a précédemment été observé dans la littérature avec des modèles d'alcoolémie fœtale à des stades plus tardifs du développement, les embryons à mi-gestation exposés à l'éthanol sont plus grands et ont une tête et un cerveau légèrement plus grand que les embryons contrôles. Ces observations nous rappellent celles faites avec d'autres modèles visant la période de préimplantation. Par exemple, des anomalies comme le « Syndrome du gros veau », où l'embryon bovin soumis à différentes perturbations (e.g., méthodes de fertilisation *in vitro*, clonage par transfert nucléaire, ou diète maternelle particulière) pendant la préimplantation donne un veau plus gros que la normale (251, 252). Des anomalies épigénétiques ont aussi été associées à ce syndrome. Plusieurs études ont démontré que les animaux issus de clonage et souffrants du Syndrome du gros veau ont des dérégulations de méthylation d'ADN et d'expression des gènes *Igf2* et causent aussi certaines dérégulations morphologiques. Certaines anomalies observées dans notre modèle pourraient donc être spécifiques au stade où notre modèle expose l'embryon à l'alcool puisque nous causons une perturbation directement *H19* (108, 253, 254). Certaines régions de contrôle de l'empreinte montraient d'ailleurs des dérégulations dans notre modèle (*Grb10* et *Zrsr1* dans le cerveau antérieur et *Mest* dans le placenta). En plus d'induire différents troubles neurodéveloppementaux, les maladies causées par une perte de l'empreinte, telles Prader-Willi ou Beckwith-Wiedemann, causent aussi de légères anomalies morphologiques similaires à nos résultats d'analyse morphologique. La méthylation spécifiquement sur les régions de contrôle de l'empreinte devra d'ailleurs être étudiée plus en détail par la méthode de pyroséquençage.

## 6.2 Impacts de l'exposition prénatale précoce sur l'expression génique

Notre expérience préliminaire évaluant les profils d'expression de 12 gènes cruciaux pour le développement embryonnaire, le système nerveux ou les modifications épigénétiques a permis d'obtenir un aperçu de l'impact de notre exposition sur les profils transcriptionnels. L'expression de 11 de ces gènes provenant de résultats d'études utilisant différents modèles d'exposition à l'alcool était en effet diminuée dans notre modèle d'exposition à l'alcool pendant la préimplantation, et ce, même s'ils provenaient de modèles d'exposition totalement différents. Par exemple, pour certains de ces gènes (*Dnmt1*, *Eed*, *Ezh2* et *Ehmt2*), une dérégulation similaire a pu être observée lors d'une exposition de type *binge* dans un modèle de cellules souches neurales (163, 185). Plusieurs études ont démontré que des conséquences importantes sont associées à une baisse ou une perte d'expression en début de développement de ces différents gènes. Par exemple, il a été démontré qu'une perte transitoire de *Dnmt1* dans un modèle de cellule souche embryonnaire entraîne des conséquences sur la méthylation de certains gènes qui perdureront même après un rétablissement de l'expression normale du gène (32). Pour l'instant, aucun autre modèle d'exposition à l'alcool ayant étudié l'expression génique n'a démontré de changement spécifique à ces gènes. Cependant, l'exposition à l'alcool pour ces différents modèles se fait beaucoup plus tardivement au cours de la gestation, ce qui pourrait suggérer que les altérations que nous observons sont caractéristiques à une exposition précoce à l'alcool ou bien au cerveau antérieur. Il reste maintenant à déterminer si notre exposition a causé des changements dans le mécanisme de régulation de ces gènes, ce qui pourrait causer une altération à long terme du niveau protéique de ces gènes. Le fait qu'une exposition prénatale à l'alcool pendant la préimplantation affecte directement l'expression de gènes cruciaux pour le développement, le système nerveux et les processus épigénétiques dans le cerveau pourrait avoir des conséquences durables pour l'enfant et être impliqué dans le développement et le fonctionnement anormal du cerveau chez les enfants atteints du TSAF.

### **6.3 Caractérisation des régions atteintes et impact possible de ces changements sur le développement du système nerveux**

L'établissement du programme épigénétique embryonnaire est une étape cruciale du développement. Plusieurs facteurs perturbant cette période, comme une absence de la maintenance de la méthylation de l'ADN par un *knock out* complet *Dnmt1* ou ses isoformes entraînent la mort embryonnaire tôt dans le développement (41, 42). L'alcool est bien connu pour inhiber différents mécanismes liés à la méthylation d'ADN. En visant directement la période de reprogrammation épigénétique qui commence en début de grossesse, nous cherchons précisément à connaître l'impact de l'exposition sur les mécanismes liés à la méthylation d'ADN. Puisque nos embryons sont viables, notre exposition à l'alcool n'induit donc pas une inhibition complète des *Dnmts* et du maintien de la méthylation, mais semble plutôt causer des dérégulations dans les processus de reprogrammation et de maintien de la méthylation. Ces dérégulations se traduisent par des altérations des profils normaux de méthylation d'ADN qui sont visibles autant dans le génome embryonnaire qu'extra-embryonnaire. Nos résultats démontrent ainsi qu'une perturbation provenant de l'environnement maternel pendant la reprogrammation embryonnaire et épigénétique peut entraîner des dérégulations qui seront perceptibles plus tard dans le développement. Bien que ponctuelles et répandues à travers le génome, les analyses de méthylation d'ADN montrent bien l'impact possible de ces dérégulations sur le développement de phénotypes et troubles variées.

Les dérégulations de méthylation observées dans le placenta concordent bien avec notre hypothèse de départ : une perturbation épigénétique au stade 8-cellules entrainera des anomalies des profils de méthylation d'ADN qui seront visibles dans les tissus embryonnaires et extra-embryonnaires dérivant tous deux des huit cellules ayant subi la perturbation. Ceci corrèle avec les travaux de Haycock qui, après une exposition à l'alcool pendant la préimplantation, avait observé des profils altérés de la méthylation sur certains CpGs du gène *H19* dans le placenta (160). Une technique alternative, le pyroséquençage (255, 256), sera d'ailleurs utilisée afin d'obtenir les pourcentages de méthylation précis de ces CpGs spécifiques dans les cerveaux antérieurs et les placentas afin de pouvoir comparer de façon plus précise les résultats entre nos

modèles similaires. Les régions dont la méthylation est altérée autant dans le cerveau antérieur que dans le placenta semblent montrer que certaines régions du génome sont particulièrement sensibles et que les dérégulations persistent à travers les différenciations en type cellulaire varié.

Bien que pour les deux tissus, près de la moitié des régions différenciellement méthylées sont intergéniques et loin des promoteurs riches en CpGs, elles ne sont pas pour le moins non importantes. Ces régions sont en fait très riches en éléments répétés qui ont un rôle clé dans la stabilité du génome et des chromosomes lors de la réplication. Les régions intergéniques contiennent aussi beaucoup d'*enhancers*, qui sont en fait des régulateurs distaux des promoteurs et donc peuvent avoir un impact important sur l'expression génique. Le silençage de certains éléments répétés, tel que LINE1 trop tôt dans le développement entraîne un remodelage de la chromatine à l'état de répression qui empêche la transcription de certains gènes cruciaux. Au contraire, une suractivation de ces mêmes éléments empêche le remodelage graduel de la chromatine qui se produit pendant le développement et qui permet de réprimer des gènes devenus non nécessaires (257). L'activation de rétrotransposons et d'éléments répétés est aussi associée à de nombreux types de cancers (258-260). L'établissement des profils de méthylation adéquats et donc critiques pour ces régions et des dérégulations peut aussi mener à des problèmes de développement.

L'analyse d'ontologie génique réalisée à partir des régions géniques différenciellement méthylées, autant pour le cerveau antérieur que pour le placenta, démontre bien l'impact que les changements de méthylation pourraient avoir dans différentes voies métaboliques de l'embryogenèse, de la morphogénèse et de la régulation du système nerveux. Ces résultats sont très significatifs pour nous puisqu'ils sont en lien étroit avec les défauts de croissance et les troubles neurodéveloppementaux que nous retrouvons chez les enfants atteints du TSAF. Ils corrént aussi avec plusieurs anomalies morphologiques, entre autres, un retard de croissance important et des déformations cérébrales observées chez nos échantillons. Les voies métaboliques atteintes corrént aussi avec certains modèles d'alcoolémie foetale. Par exemple, Chater-Diehl et *al.* ont démontré des changements de méthylation dans des voies reliées à la croissance et la différenciation cellulaire chez des souris adultes après une exposition prénatale à l'alcool pendant l'équivalent du premier trimestre humain (176). Un modèle d'exposition à l'alcool d'embryons en culture a aussi démontré des modifications des profils de méthylation

d'ADN dans des gènes reliés à la morphogénèse des neurones, au développement neural et au remodelage de la chromatine (261). De façon individuelle, certains gènes affectés ont aussi des rôles spécifiques très importants. Par exemple, le rôle essentiel de *Dnmt3a* dans l'apprentissage et le développement de la mémoire a récemment été démontré et une perte de ce gène peut donc créer des problèmes cognitifs importants (262). Bien que provenant de modèles d'étude et d'exposition variés, ces résultats montrent bien l'impact de la méthylation de l'ADN sur les processus reliés au développement et au système nerveux.

Le placenta est connu pour jouer un rôle important dans le développement de troubles neurodéveloppementaux (TND) lorsque des perturbations, comme le stress, altèrent le fonctionnement placentaire (263) ou dans des pathologies gestationnelles comme la prééclampsie. Les dérégulations observées pourraient donc avoir un impact direct dans les pathologies développées par les enfants TSAF. Des études supplémentaires pour évaluer comment les fonctions normales du placenta sont affectées par les altérations des profils normaux de la méthylation pourraient donc nous en apprendre davantage sur son rôle dans le TSAF. Avec des DMTs affectant les voies de diverses fonctions du système nerveux, comme la transmission et le signalement synaptique ou la différenciation des neurones, le rôle du placenta dans le développement des TNDs est indéniable. Un mécanisme combinant des effets épigénétiques du placenta et du cerveau pourrait bien expliquer certains troubles neurodéveloppementaux présents chez les enfants TSAF.

Bien que le lien et mécanisme exact derrière les dérégulations épigénétiques initiées en début de grossesse par une exposition à l'alcool et le développement de troubles neurodéveloppementaux chez l'enfant doit être plus profondément investigué, nos résultats démontrent clairement l'impact possible des modifications des profils de méthylation d'ADN sur le système nerveux et le développement embryonnaire.

## **6.4 Le placenta comme indicateur du facteur de risque de développement d'un TND relié à une exposition prénatale à l'alcool**

Les résultats de méthylation obtenus des placentas suivant l'exposition à l'alcool pendant la préimplantation nous amènent à penser à un nouveau rôle pour le placenta : celui de biomarqueurs afin de déterminer si le jeune embryon a été exposé à l'alcool pendant la grossesse. Jusqu'à présent, la recherche de biomarqueurs épigénétiques pour le TSAF est surtout réalisée sur des cellules épithéliales buccales, entre autres, avec les études récentes de Laufer et *al.* (145) et Portales-Casamar et *al.* (146) discuté à la section 1.3.2. Pour l'instant, ces études réalisées sur des enfants déjà diagnostiqués montrent beaucoup de variabilité dans les résultats. Ceci s'explique, entre autres, par les différents modes et milieux de vie des enfants ainsi que l'âge variable à laquelle les enfants ont été testés. Les cellules épithéliales buccales utilisées ont aussi subi de nombreuses différenciations et des renouvellements au cours des années de vie de l'enfant depuis l'exposition initiale ce qui fait que la méthylation de ces cellules particulières n'est pas nécessairement un bon indicateur des dérégulations produites au cerveau pendant le développement embryonnaire.

Utiliser le placenta comme marqueurs moléculaires du TSAF dès la naissance entrainerait une énorme avancée dans le domaine. Étant donné que les cellules du placenta sont composées d'un nombre limité de types cellulaires provenant du trophoctoderme, les profils de méthylation de ce tissu sont très pertinents pour comprendre et indiquer ce qui s'est produit au début du développement embryonnaire lors de notre exposition à l'alcool. Pour l'instant, aucun modèle d'exposition à l'alcool où l'exposition est faite plus tard dans le développement, alors que le placenta est déjà formé, n'a établi les profils de méthylation des placentas. Il serait intéressant de vérifier si les dérégulations de méthylation obtenues avec notre modèle sont spécifiques à une exposition durant la préimplantation ou si certaines dérégulations seront présentes dans le placenta, peu importe le stade d'exposition.

Le placenta permettrait un test non invasif dès la naissance avec une grande quantité d'ADN disponible pour analyse. Des régions spécifiques et robustes où la méthylation d'ADN est particulièrement affectée pourraient ainsi être ciblées pour l'analyse. Cet outil de diagnostic ou du moins, ce prédicteur de risque de développement d'un phénotype TSAF, permettrait d'obtenir un diagnostic précoce du TSAF et ainsi un meilleur suivi de l'état de l'enfant et une prise en charge rapide et efficace. Les enfants pourraient, entre autres, être placés dans des programmes spécialisés afin de les aider à réduire l'impact de leurs symptômes sur leur comportement et apprentissage et ainsi mieux s'adapter dans leur milieu scolaire et personnel (143, 144). À long terme, ces programmes permettraient une nette amélioration de leur qualité de vie. Les altérations des profils de méthylation à travers le génome des tissus extra-embryonnaires à la suite d'une exposition à l'alcool pendant la préimplantation apportent une vision nouvelle des conséquences de l'alcoolémie fœtale et apportent aussi des connaissances qui pourraient mener au développement de nouveaux outils diagnostiques. Ces outils pourraient améliorer grandement le futur des enfants atteints de TSAF.

## **6.5 Altérations spécifiques au sexe des profils de méthylation d'ADN**

Les différences que nous observons au niveau des profils de méthylation et d'expression entre les mâles et les femelles sont très intéressantes et constituent en fait une découverte majeure de notre recherche. En effets, nos résultats montrent que les embryons mâles ont un plus grand nombre de régions où la méthylation est altérée dans le cerveau antérieur que les embryons femelles. Pour ce tissu, les régions altérées pour les deux sexes étaient majoritairement hyperméthylées, c'est-à-dire que les cerveaux antérieurs des embryons à mi-gestation exposés à l'alcool semblent gagner de la méthylation suite à l'exposition. L'expression génique des gènes évalués préliminairement était d'ailleurs plus diminuée chez les cerveaux antérieurs mâles que femelles. Les femelles sont, pour leur part, plus fortement affectées au niveau du placenta, où elles montrent plus du double de régions altérées que les placentas mâles.

Des profils divergents très intéressants sont d'ailleurs observés pour le placenta où les femelles ont majoritairement des régions où la méthylation a diminué alors que les mâles montrent majoritairement de l'hyperméthylation, tout comme pour le cerveau antérieur. Ces différences n'ont d'ailleurs aucun lien avec le chromosome X puisqu'une analyse en excluant les chromosomes X et Y donne des résultats avec des variations entre les mâles et les femelles identiques (analyses non incluses dans ce mémoire).

Les études utilisant les modèles animaux évaluant l'impact d'une exposition prénatale à l'alcool distinctement sur les embryons mâles et femelles sont, pour l'instant, très rares. Quelques études avec des expositions variées ont, par exemple, démontré une réduction du volume cérébral dépendante du sexe dans un modèle de rat d'exposition prénatale chronique à l'alcool (264). Un modèle murin d'exposition prénatale chronique a aussi observé des altérations dans les fonctions exécutives de la souris à l'âge adulte variable selon le sexe (265). Par contre, aucune observation n'a été faite concernant les différences épigénétiques spécifiques au sexe reliées à l'exposition prénatale à l'alcool.

Du côté humain, aucune discrimination n'est faite lorsque les phénotypes sont décrits ou lors des études de prévalence. Quelques études sur des sujets diagnostiqués avec un TSAF ont toutefois été réalisées et ont montré des différences reliées, entre autres, aux réponses à des stimuli auditifs (266) et aux mouvements des yeux (267), deux indicateurs du fonctionnement cérébral. De façon générale et sans lien avec l'alcool, les garçons sont aussi connus pour être quatre à huit fois plus susceptibles d'être atteints d'un trouble neurodéveloppemental, notamment un trouble du spectre de l'autisme, un trouble du déficit de l'attention et de l'hyperactivité (TDAH) ou de la schizophrénie précoce (240-246). Le mécanisme et l'explication concrète derrière les différences que nous observons sont donc pour l'instant inconnus. Étant donné que nous effectuons notre exposition durant la reprogrammation épigénétique, il est possible que la perturbation de certains mécanismes entraîne des dérégulations variables selon le sexe de l'embryon.

Au niveau du placenta, la méthylation des femelles est aussi affectée dans un modèle de perturbation de *Dnmt1o* par *knock out* précisément au stade huit cellules (95). Le fait que notre exposition à l'alcool soit directement à ce stade semble donc jouer un rôle important dans les profils de méthylation divergents entre les mâles et les femelles. Ceci renforce le fait que la

période préimplantatoire, spécialement le stade 8-cellules, est une période cruciale pour le développement embryonnaire. Les conséquences et mécanismes expliquant ces dérèglements doivent cependant être mieux étudiés. Quelques modèles étudiant l'impact du stress prénatal tôt pendant la grossesse sur le placenta observent aussi des particularités spécifiques au sexe intéressantes. Dans un premier modèle, il a été démontré que le placenta des embryons femelles exposés au stress a un niveau d'expression de plusieurs gènes supérieure à celui des mâles. Cela pourrait d'ailleurs concorder avec l'hypométhylation globale des placentas femelles dans notre modèle d'exposition à l'alcool. Une expression réduite du gène *Ogt* en particulier entrainerait des dysfonctions placentaires chez les mâles affectant leur développement cérébral alors que les femelles sont très peu ou pas affectées. (268-272). Plus en lien avec l'épigénétique, un autre modèle a démontré une réduction de l'expression de *11B-HSD2* dans les placentas d'embryon femelles qui serait associée à une augmentation de la méthylation du promoteur de ce gène ainsi qu'à une augmentation de l'expression de *Dnmt3a* (273, 274). La méthylation de *Dnmt3a* était d'ailleurs affectée dans notre modèle. Bien que totalement différentes de notre modèle d'exposition prénatale à l'alcool, ces études démontrent bien que des différences phénotypiques et moléculaires peuvent subvenir après une perturbation provenant de l'environnement maternel tôt dans la gestation. Les gènes identifiés dans ces exemples d'études, *Ogt* et *11B-HSD2* ne sont malheureusement pas analysés par le RRBS en raison d'une couverture de séquençage trop faible pour être significative dans notre modèle d'analyse bio-informatique. Nous allons ainsi utiliser le pyroséquençage afin d'obtenir de façon quantitative les pourcentages de méthylation des CpGs associés avec la régulation d'expression de ces régions.

## 6.6 Limitations de l'étude

Une des limitations de cette étude est associée avec une exposition de type *binge* précisément au stade 8-cellules. Nous ne pouvons pas conclure, pour l'instant, que cette exposition reflète ce qui se passerait si la perturbation était produite à un autre stade embryonnaire dans la période de reprogrammation épigénétique. Il serait intéressant de déterminer si des résultats similaires seraient obtenus avec d'autres modèles d'exposition

strictement pendant la préimplantation. Par exemple, est-ce que des profils de méthylation semblables seraient obtenus si nous procédions à une exposition de type *binge* au stade 2-cellules ou encore si nous procédions à une exposition chronique à partir de la fertilisation jusqu'au stade 8 ou 16-cellules avec une faible dose d'alcool? Plus encore, est-ce que les différences marquantes entre les tissus mâles et femelles que nous avons observées seraient aussi présentes si notre perturbation est faite avant le stade 8-cellules? Investiguer différents types d'exposition toujours pendant la préimplantation et le remodelage épigénétique serait donc particulièrement intéressant afin de bien comprendre les mécanismes et conséquences derrière une exposition à l'alcool en tout début de grossesse.

Une autre limitation est associée avec la méthode que nous utilisons pour quantifier la méthylation, le RRBS. Même si cette dernière permet d'obtenir une vision d'ensemble des profils de méthylation à travers le génome en offrant la quantification précise d'environ 2 millions de CpGs, nous ne pouvons pas savoir à quel point le reste du génome, non couvert, est perturbé par notre exposition à l'alcool. Une technique comme le Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) où le génome entier est séquencé pourrait pallier à cette limite. Cependant, le prix associé à cette méthode est, pour l'instant, beaucoup trop élevé pour justifier son utilisation. De plus, les méthodes basées sur la conversion bisulfite standard ne permettent pas de discriminer l'ADN méthylé et l'ADN hydroxyméthylé (5mC vs 5hmC). La 5hmC représente en fait moins de 1% des cytosines (275, 276). Lorsque nous en saurons plus sur l'impact et rôle du 5hmC, particulièrement au niveau du cerveau, il deviendra peut-être alors nécessaire, dans la suite de ce projet, d'utiliser des méthodes additionnelles pour faire la distinction entre ces deux modifications à des endroits d'intérêts. Les méthodes permettant de discriminer les deux modifications incluent des techniques tels que le Tet-Assisted Bisulfite Sequencing (Tab-Seq) (277) ou encore le oxBS-Seq qui inclut l'addition d'un traitement oxydatif à la méthode de conversion bisulfite conventionnel permettant de différencier les 5hmC des 5mC (278).

## 6.7 Perspectives

Plusieurs travaux restent à faire dans le but de mieux comprendre les mécanismes épigénétiques dérégulés par une exposition prénatale à l'alcool de type *binge* pendant la préimplantation et leurs impacts sur les structures et le fonctionnement cellulaire.

Plusieurs autres stades embryonnaires devront être étudiés afin d'établir clairement la chronologie des dérégulations épigénétiques de son origine jusqu'à la vie adulte. Concrètement, nous voulons déterminer comment le dérèglement initié au stade 8-cellules est perpétué à travers le développement et jusqu'à la vie adulte et quels sont les mécanismes derrière l'établissement de ces dérégulations. L'évaluation des profils de méthylation sur les embryons au stade E18.5 permettra ainsi de déterminer l'évolution des dérèglements épigénétiques entre la mi-gestation et la fin de celle-ci. Nous voulons aussi savoir si certains types cellulaires spécifiques sont atteints par notre exposition à l'alcool. Nous étudierons particulièrement l'expression génique au niveau cellulaire (*single-cell*) par Drop-Seq afin de déterminer si l'atteinte de certains types cellulaires du cerveau pourrait expliquer certains phénotypes neurodéveloppementaux des enfants atteints de TSAF. Comme mentionné précédemment, nous allons aussi procéder à des analyses histologiques sur les tissus à différents stades. Ces études histologiques seront aussi un élément crucial afin de déterminer si certains types cellulaires du cerveau sont particulièrement affectés par l'exposition à l'alcool ou si, par exemple, l'exposition entraîne une augmentation de l'apoptose cellulaire. Des marqueurs, tels que *Gfap* (astrocytes), *Iba-1* (microglia), *Tuj-1* (neurones), *Gad65* (neurones inhibiteurs), *CaMKII- $\alpha$*  (neurones activateurs), *c-Cas-3* (apoptose) et  *$\gamma$ -H2AX* (dommage à l'ADN), seront utilisés afin d'avoir une vision globale des conséquences cellulaires au niveau du cerveau en plus des conséquences épigénétiques. Le placenta sera aussi étudié avec des marqueurs, tels que la lectine (vascularisation), *CD45* (cellules du villus), cytokératine (trophoblastes), *PPAR- $\gamma$*  (syncytiotrophoblastes) et *CD68* (macrophages). Des colorations permettront aussi de visualiser les conséquences structurelles de l'exposition à l'alcool sur les différents tissus. Différents tests comportementaux (e.g., *spontaneous open-field activity*, *elevated plus maze*, *T-maze*, test des trois chambres) sont présentement en cours avec des souriceaux âgés de 40 jours afin de déterminer les impacts concrets de l'exposition à l'alcool

pendant la préimplantation sur les fonctions cérébrales de jeunes souris. Les résultats obtenus pourront aussi être comparés avec ceux d'un modèle similaires d'exposition de type *binge* à plusieurs stades plus tard dans la grossesse réalisé par Mantha et *al.* (191).

Un autre volet de cette étude cherchera à déterminer s'il est possible de corriger en partie ou en totalité les dérégulations dans les profils de méthylation par la consommation d'une diète maternelle particulière. Une diète enrichie en folate ou en choline, par exemple, pourrait permettre de ré-établir les profils de méthylation normaux chez l'embryon. Plusieurs études montrent l'effet bénéfique de ces diètes afin d'atténuer les conséquences néfastes de l'exposition à l'alcool dans des modèles murins (révisé dans (279)). Une récente étude a aussi démontré une amélioration de la mémoire d'enfants atteints du TSAF qui consommaient une diète enrichie en choline (280). Il sera donc intéressant de voir l'impact d'une telle diète sur les profils de méthylation des embryons et des placentas exposés à l'alcool pendant la préimplantation. Les profils de méthylation du placenta pourraient d'ailleurs permettre un suivi du rétablissement des profils de méthylation du cerveau de l'embryon à la naissance. L'impact des diètes sur les fonctions cérébrales pourra aussi être évalué par les différents tests comportementaux.

## Conclusion

En conclusion, ces résultats démontrent pour la première fois qu'une exposition prénatale à l'alcool à un stade précis de la période préimplantatoire entraîne des anomalies morphologiques et des dérégulations importantes des profils de méthylation d'ADN des cerveaux antérieurs et de placentas à mi-gestation. Les régions altérées dans chacun des tissus sont particulièrement impliquées dans les voies du développement embryonnaire et celle du fonctionnement et de la régulation du système nerveux, toutes deux grandement affectées chez les enfants atteints de TSAF. Des régions de contrôle de l'empreinte sont aussi affectées par l'exposition à l'alcool corrélant avec une perturbation de la reprogrammation épigénétique. L'ensemble de ces résultats suggère l'implication de processus et dérégulations épigénétiques dans les phénotypes associés avec une consommation excessive d'alcool pendant la période préimplantatoire. De plus, les dérégulations des profils de méthylation du placenta pourraient éventuellement servir au diagnostic moléculaire du TSAF, et ce, dès la naissance. Nos résultats démontrent aussi pour la première fois d'importantes différences relatives au sexe de l'embryon, autant au niveau de la méthylation de l'ADN que de l'expression génique en réponse à une exposition prénatale à l'alcool. Nos travaux démontrent donc que, même si l'embryon n'est pas encore attaché physiquement à la mère, une consommation d'alcool pendant la préimplantation entraîne des dérèglements épigénétiques chez l'embryon qui perdurent pendant le développement. Finalement, l'ensemble des résultats actuels et futurs permettra assurément une meilleure compréhension des mécanismes épigénétiques derrière les conséquences délétères d'une exposition prénatale à l'alcool pendant la préimplantation en déterminant comment une perturbation dans la reprogrammation épigénétique peut ultimement mener à un dérèglement de l'expression génique et un développement altéré du cerveau.

## Bibliographie

1. Kundakovic M, Gudsnuk K, Franks B, Madrid J, Miller RL, Perera FP, et al. Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(24):9956-61.
2. Page-Lariviere F, Tremblay A, Campagna C, Rodriguez MJ, Sirard MA. Low concentrations of bromodichloromethane induce a toxicogenomic response in porcine embryos in vitro. *Reproductive toxicology (Elmsford, NY)*. 2016;66:44-55.
3. Wang J, Cao M, Yang M, Lin Y, Che L, Fang Z, et al. Intra-uterine undernutrition amplifies age-associated glucose intolerance in pigs via altered DNA methylation at muscle GLUT4 promoter. *Br J Nutr*. 2016;116(3):390-401.
4. Laufer BI, Mantha K, Kleiber ML, Diehl EJ, Addison SM, Singh SM. Long-lasting alterations to DNA methylation and ncRNAs could underlie the effects of fetal alcohol exposure in mice. *Disease models & mechanisms*. 2013;6(4):977-92.
5. Canovas S, Ross PJ. Epigenetics in preimplantation mammalian development. *Theriogenology*. 2016;86(1):69-79.
6. Champagne FA. Epigenetics and developmental plasticity across species. *Developmental psychobiology*. 2013;55(1):33-41.
7. Zaidi SK, Young DW, Montecino M, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, et al. Architectural epigenetics: mitotic retention of mammalian transcriptional regulatory information. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(20):4758-66.
8. Auclair G, Guibert S, Bender A, Weber M. Ontogeny of CpG island methylation and specificity of DNMT3 methyltransferases during embryonic development in the mouse. *Genome biology*. 2014;15(12):545.
9. Trasler JM. Gamete imprinting: setting epigenetic patterns for the next generation. *Reproduction, fertility, and development*. 2006;18(1-2):63-9.
10. Xu J, Sinclair KD. One-carbon metabolism and epigenetic regulation of embryo development. *Reproduction, fertility, and development*. 2015;27(4):667-76.

11. Perkins A, Lehmann C, Lawrence RC, Kelly SJ. Alcohol exposure during development: Impact on the epigenome. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2013;31(6):391-7.
12. Kiefer JC. Epigenetics in development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2007;236(4):1144-56.
13. Pinney SE. Mammalian Non-CpG Methylation: Stem Cells and Beyond. *Biology*. 2014;3(4):739-51.
14. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature genetics*. 1998;19(2):187-91.
15. Keshet I, Lieman-Hurwitz J, Cedar H. DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell*. 1986;44(4):535-43.
16. Lande-Diner L, Zhang J, Ben-Porath I, Amariglio N, Keshet I, Hecht M, et al. Role of DNA methylation in stable gene repression. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(16):12194-200.
17. Ehrlich M, Lacey M. DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression. *Epigenomics*. 2013;5(5):553-68.
18. Hahn MA, Wu X, Li AX, Hahn T, Pfeifer GP. Relationship between gene body DNA methylation and intragenic H3K9me3 and H3K36me3 chromatin marks. *PloS one*. 2011;6(4):e18844.
19. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature reviews Genetics*. 2012;13(7):484-92.
20. Gregory TR. Synergy between sequence and size in large-scale genomics. *Nature reviews Genetics*. 2005;6(9):699-708.
21. Padeken J, Zeller P, Gasser SM. Repeat DNA in genome organization and stability. *Current opinion in genetics & development*. 2015;31:12-9.
22. Nishibuchi G, Dejardin J. The molecular basis of the organization of repetitive DNA-containing constitutive heterochromatin in mammals. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*. 2017;25(1):77-87.

23. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*. 2000;403(6769):501-2.
24. Dulac C. Brain function and chromatin plasticity. *Nature*. 2010;465(7299):728-35.
25. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology*. 1987;196(2):261-82.
26. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 2009;462(7271):315-22.
27. Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*. 2008;454(7205):766-70.
28. Borgel J, Guibert S, Li Y, Chiba H, Schubeler D, Sasaki H, et al. Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nature genetics*. 2010;42(12):1093-100.
29. Edwards CA, Ferguson-Smith AC. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Current opinion in cell biology*. 2007;19(3):281-9.
30. Ishida M, Moore GE. The role of imprinted genes in humans. *Molecular aspects of medicine*. 2013;34(4):826-40.
31. Wilkins JF, Ubeda F, Van Cleve J. The evolving landscape of imprinted genes in humans and mice: Conflict among alleles, genes, tissues, and kin. *Bioessays*. 2016;38(5):482-9.
32. McGraw S, Zhang JX, Farag M, Chan D, Caron M, Konermann C, et al. Transient DNMT1 suppression reveals hidden heritable marks in the genome. *Nucleic acids research*. 2015;43(3):1485-97.
33. Ross PJ, Canovas S. Mechanisms of epigenetic remodelling during preimplantation development. *Reproduction, fertility, and development*. 2016;28(1-2):25-40.
34. Cheon CK. Genetics of Prader-Willi syndrome and Prader-Will-Like syndrome. *Annals of pediatric endocrinology & metabolism*. 2016;21(3):126-35.
35. Robertson KD. DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene*. 2002;21(35):5361-79.
36. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247-57.

37. Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science (New York, NY)*. 2001;294(5551):2536-9.
38. Barau J, Teissandier A, Zamudio N, Roy S, Nalesso V, Herauld Y, et al. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science (New York, NY)*. 2016;354(6314):909-12.
39. King AD, Huang K, Rubbi L, Liu S, Wang CY, Wang Y, et al. Reversible Regulation of Promoter and Enhancer Histone Landscape by DNA Methylation in Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell reports*. 2016;17(1):289-302.
40. Turek-Plewa J, Jagodzinski PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cellular & molecular biology letters*. 2005;10(4):631-47.
41. Lei H, Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R, et al. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)*. 1996;122(10):3195-205.
42. Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, et al. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature*. 2007;450(7171):908-12.
43. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, et al. Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science (New York, NY)*. 2006;311(5759):395-8.
44. Ghanbarian H, Wagner N, Polo B, Baudouy D, Kiani J, Michiels JF, et al. Dnmt2/Trdmt1 as Mediator of RNA Polymerase II Transcriptional Activity in Cardiac Growth. *PloS one*. 2016;11(6):e0156953.
45. Lewinska A, Adamczyk-Grochala J, Kwasniewicz E, Wnuk M. Downregulation of methyltransferase Dnmt2 results in condition-dependent telomere shortening and senescence or apoptosis in mouse fibroblasts. *Journal of cellular physiology*. 2017;232(12):3714-26.
46. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science (New York, NY)*. 2009;324(5929):930-5.

47. Ponnaluri VK, Maciejewski JP, Mukherji M. A mechanistic overview of TET-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;436(2):115-20.
48. Sun W, Zang L, Shu Q, Li X. From development to diseases: the role of 5hmC in brain. *Genomics*. 2014;104(5):347-51.
49. He D, Fu CJ, Baldauf SL. Multiple Origins of Eukaryotic *cox15* Suggest Horizontal Gene Transfer from Bacteria to Jakobid Mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol*. 2016;33(1):122-33.
50. Yin X, Xu Y. Structure and Function of TET Enzymes. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016;945:275-302.
51. Lercher L, McDonough MA, El-Sagheer AH, Thalhammer A, Kriaucionis S, Brown T, et al. Structural insights into how 5-hydroxymethylation influences transcription factor binding. *Chemical communications (Cambridge, England)*. 2014;50(15):1794-6.
52. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science (New York, NY)*. 2001;293(5532):1074-80.
53. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403(6765):41-5.
54. Galonska C, Ziller MJ, Karnik R, Meissner A. Ground State Conditions Induce Rapid Reorganization of Core Pluripotency Factor Binding before Global Epigenetic Reprogramming. *Cell stem cell*. 2015;17(4):462-70.
55. Henikoff S, Shilatifard A. Histone modification: cause or cog? *Trends Genet*. 2011;27(10):389-96.
56. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(2):99-110.
57. Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature reviews Genetics*. 2012;13(4):271-82.
58. Hara Y, Ago Y, Takano E, Hasebe S, Nakazawa T, Hashimoto H, et al. Prenatal exposure to valproic acid increases miR-132 levels in the mouse embryonic brain. *Mol Autism*. 2017;8:33.
59. Hossain MM, Salilew-Wondim D, Schellander K, Tesfaye D. The role of microRNAs in mammalian oocytes and embryos. *Animal reproduction science*. 2012;134(1-2):36-44.

60. Alberti C, Cochella L. A framework for understanding the roles of miRNAs in animal development. *Development (Cambridge, England)*. 2017;144(14):2548-59.
61. Yuan K, Ai WB, Wan LY, Tan X, Wu JF. The miR-290-295 cluster as multi-faceted players in mouse embryonic stem cells. *Cell & bioscience*. 2017;7:38.
62. Wu H, Zhao J, Fu B, Yin S, Song C, Zhang J, et al. Retinoic acid-induced upregulation of miR-219 promotes the differentiation of embryonic stem cells into neural cells. *Cell death & disease*. 2017;8(7):e2953.
63. Sun AX, Crabtree GR, Yoo AS. MicroRNAs: regulators of neuronal fate. *Current opinion in cell biology*. 2013;25(2):215-21.
64. Volvert ML, Rogister F, Moonen G, Malgrange B, Nguyen L. MicroRNAs tune cerebral cortical neurogenesis. *Cell death and differentiation*. 2012;19(10):1573-81.
65. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(12):861-74.
66. Geaghan M, Cairns MJ. MicroRNA and Posttranscriptional Dysregulation in Psychiatry. *Biological psychiatry*. 2015;78(4):231-9.
67. Li XY, Cui XS, Kim NH. Transcription profile during maternal to zygotic transition in the mouse embryo. *Reproduction, fertility, and development*. 2006;18(6):635-45.
68. Yang Y, Bai W, Zhang L, Yin G, Wang X, Wang J, et al. Determination of microRNAs in mouse preimplantation embryos by microarray. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2008;237(9):2315-27.
69. Svoboda P. Why mouse oocytes and early embryos ignore miRNAs? *RNA biology*. 2010;7(5):559-63.
70. Viswanathan SR, Mermel CH, Lu J, Lu CW, Golub TR, Daley GQ. microRNA expression during trophoctoderm specification. *PloS one*. 2009;4(7):e6143.
71. Legault LM, Bertrand-Lehouillier V, McGraw S. Preimplantation alcohol exposure and developmental programming of FASD: An epigenetic perspective. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2017.
72. Feuer S, Rinaudo P. Preimplantation stress and development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2012;96(4):299-314.
73. Fisher DA. The unique endocrine milieu of the fetus. *The Journal of clinical investigation*. 1986;78(3):603-11.

74. Kaufman MH, Kaufman MH. The atlas of mouse development: Academic press London; 1992.
75. Ducibella T, Ukena T, Karnovsky M, Anderson E. Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. *The Journal of cell biology*. 1977;74(1):153-67.
76. Handyside AH. Distribution of antibody- and lectin-binding sites on dissociated blastomeres from mouse morulae: evidence for polarization at compaction. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1980;60:99-116.
77. Reeve WJ, Ziomek CA. Distribution of microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos: evidence for surface polarization at compaction. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1981;62:339-50.
78. Pratt HP, Ziomek CA, Reeve WJ, Johnson MH. Compaction of the mouse embryo: an analysis of its components. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1982;70:113-32.
79. Watkins AJ, Lucas ES, Fleming TP. Impact of the periconceptual environment on the programming of adult disease. *Journal of developmental origins of health and disease*. 2010;1(2):87-95.
80. Fleming TP, Johnson MH. From egg to epithelium. *Annual review of cell biology*. 1988;4:459-85.
81. Stephenson RO, Rossant J, Tam PP. Intercellular interactions, position, and polarity in establishing blastocyst cell lineages and embryonic axes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(11).
82. Guo F, Li X, Liang D, Li T, Zhu P, Guo H, et al. Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote. *Cell stem cell*. 2014;15(4):447-58.
83. Seisenberger S, Peat JR, Hore TA, Santos F, Dean W, Reik W. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2013;368(1609):20110330.
84. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science (New York, NY)*. 2001;293(5532):1089-93.

85. Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, Takahashi N, Fukuda A, Yayoi O, et al. Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. *PLoS genetics*. 2012;8(1):e1002440.
86. Guo H, Zhu P, Yan L, Li R, Hu B, Lian Y, et al. The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature*. 2014;511(7511):606-10.
87. Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, Boiani M, et al. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nature communications*. 2011;2:241.
88. Shen L, Inoue A, He J, Liu Y, Lu F, Zhang Y. Tet3 and DNA replication mediate demethylation of both the maternal and paternal genomes in mouse zygotes. *Cell stem cell*. 2014;15(4):459-70.
89. Nakamura T, Liu YJ, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, et al. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature*. 2012;486(7403):415-9.
90. McGraw S, Shojaei Saadi HA, Robert C. Meeting the methodological challenges in molecular mapping of the embryonic epigenome. *Molecular human reproduction*. 2013;19(12):809-27.
91. Hirasawa R, Chiba H, Kaneda M, Tajima S, Li E, Jaenisch R, et al. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes & development*. 2008;22(12):1607-16.
92. Toppings M, Castro C, Mills PH, Reinhart B, Schatten G, Ahrens ET, et al. Profound phenotypic variation among mice deficient in the maintenance of genomic imprints. *Hum Reprod*. 2008;23(4):807-18.
93. Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, et al. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell*. 2001;104(6):829-38.
94. Cirio MC, Martel J, Mann M, Toppings M, Bartolomei M, Trasler J, et al. DNA methyltransferase 1o functions during preimplantation development to preclude a profound level of epigenetic variation. *Dev Biol*. 2008;324(1):139-50.

95. McGraw S, Oakes CC, Martel J, Cirio MC, de Zeeuw P, Mak W, et al. Loss of DNMT1o disrupts imprinted X chromosome inactivation and accentuates placental defects in females. *PLoS genetics*. 2013;9(11):e1003873.
96. Whidden L, Martel J, Rahimi S, Richard Chaillet J, Chan D, Trasler JM. Compromised oocyte quality and assisted reproduction contribute to sex-specific effects on offspring outcomes and epigenetic patterning. *Human molecular genetics*. 2016.
97. Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes & development*. 2014;28(8):812-28.
98. Robinson WP, Price EM. The human placental methylome. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015;5(5):a023044.
99. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ (Clinical research ed)*. 1989;298(6673):564-7.
100. Waterland RA, Michels KB. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annual review of nutrition*. 2007;27:363-88.
101. Barker DJ. The developmental origins of well-being. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2004;359(1449):1359-66.
102. Barker DJ. Developmental origins of adult health and disease. *Journal of epidemiology and community health*. 2004;58(2):114-5.
103. Cao Z, Hong R, Ding B, Zuo X, Li H, Ding J, et al. TSA and BIX-01294 Induced Normal DNA and Histone Methylation and Increased Protein Expression in Porcine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. *PloS one*. 2017;12(1):e0169092.
104. Rengasamy P. Congenital Malformations Attributed to Prenatal Exposure to Cyclophosphamide. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2016.
105. Li T, Vu TH, Ulaner GA, Littman E, Ling JQ, Chen HL, et al. IVF results in de novo DNA methylation and histone methylation at an Igf2-H19 imprinting epigenetic switch. *Molecular human reproduction*. 2005;11(9):631-40.
106. Suzuki J, Jr., Therrien J, Filion F, Lefebvre R, Goff AK, Smith LC. In vitro culture and somatic cell nuclear transfer affect imprinting of SNRPN gene in pre- and post-implantation stages of development in cattle. *BMC Dev Biol*. 2009;9:9.

107. Smith LC, Therrien J, Filion F, Bressan F, Meirelles FV. Epigenetic consequences of artificial reproductive technologies to the bovine imprinted genes SNRPN, H19/IGF2, and IGF2R. *Frontiers in genetics*. 2015;6:58.
108. Smith LC, Suzuki J, Jr., Goff AK, Filion F, Therrien J, Murphy BD, et al. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2012;47 Suppl 4:107-14.
109. Lazaraviciute G, Kauser M, Bhattacharya S, Haggarty P, Bhattacharya S. A systematic review and meta-analysis of DNA methylation levels and imprinting disorders in children conceived by IVF/ICSI compared with children conceived spontaneously. *Human reproduction update*. 2014;20(6):840-52.
110. Vermeiden JP, Bernardus RE. Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection? *Fertility and sterility*. 2013;99(3):642-51.
111. El Hajj N, Haertle L, Dittrich M, Denk S, Lehnen H, Hahn T, et al. DNA methylation signatures in cord blood of ICSI children. *Hum Reprod*. 2017:1-9.
112. Ghosh J, Coutifaris C, Sapienza C, Mainigi M. Global DNA methylation levels are altered by modifiable clinical manipulations in assisted reproductive technologies. *Clin Epigenetics*. 2017;9:14.
113. Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertility and sterility*. 1996;65(2):349-53.
114. Latos PA, Hemberger M. From the stem of the placental tree: trophoblast stem cells and their progeny. *Development (Cambridge, England)*. 2016;143(20):3650-60.
115. Simmons DG, Natale DR, Begay V, Hughes M, Leutz A, Cross JC. Early patterning of the chorion leads to the trilaminar trophoblast cell structure in the placental labyrinth. *Development (Cambridge, England)*. 2008;135(12):2083-91.
116. Simmons DG, Fortier AL, Cross JC. Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta. *Dev Biol*. 2007;304(2):567-78.
117. Bronson SL, Bale TL. The Placenta as a Mediator of Stress Effects on Neurodevelopmental Reprogramming. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2016;41(1):207-18.

118. Miller MW. Limited ethanol exposure selectively alters the proliferation of precursor cells in the cerebral cortex. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1996;20(1):139-43.
119. Cui SJ, Tewari M, Schneider T, Rubin R. Ethanol promotes cell death by inhibition of the insulin-like growth factor I receptor. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1997;21(6):1121-7.
120. Zhang FX, Rubin R, Rooney TA. Ethanol induces apoptosis in cerebellar granule neurons by inhibiting insulin-like growth factor 1 signaling. *Journal of neurochemistry*. 1998;71(1):196-204.
121. Muggli E, Matthews H, Penington A, Claes P, O'Leary C, Forster D, et al. Association Between Prenatal Alcohol Exposure and Craniofacial Shape of Children at 12 Months of Age. *JAMA pediatrics*. 2017;171(8):771-80.
122. Feldman HS, Jones KL, Lindsay S, Slymen D, Klonoff-Cohen H, Kao K, et al. Prenatal alcohol exposure patterns and alcohol-related birth defects and growth deficiencies: a prospective study. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2012;36(4):670-6.
123. Larkby CA, Goldschmidt L, Hanusa BH, Day NL. Prenatal alcohol exposure is associated with conduct disorder in adolescence: findings from a birth cohort. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2011;50(3):262-71.
124. Alati R, Davey Smith G, Lewis SJ, Sayal K, Draper ES, Golding J, et al. Effect of prenatal alcohol exposure on childhood academic outcomes: contrasting maternal and paternal associations in the ALSPAC study. *PloS one*. 2013;8(10):e74844.
125. May PA, Baete A, Russo J, Elliott AJ, Blankenship J, Kalberg WO, et al. Prevalence and characteristics of fetal alcohol spectrum disorders. *Pediatrics*. 2014;134(5):855-66.
126. May PA, Gossage JP, Kalberg WO, Robinson LK, Buckley D, Manning M, et al. Prevalence and epidemiologic characteristics of FASD from various research methods with an emphasis on recent in-school studies. *Developmental disabilities research reviews*. 2009;15(3):176-92.
127. Popova S, Stade B, Bekmuradov D, Lange S, Rehm J. What do we know about the economic impact of fetal alcohol spectrum disorder? A systematic literature review. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*. 2011;46(4):490-7.

128. Valles S, Pitarch J, Renau-Piqueras J, Guerri C. Ethanol exposure affects glial fibrillary acidic protein gene expression and transcription during rat brain development. *Journal of neurochemistry*. 1997;69(6):2484-93.
129. Lunde ER, Washburn SE, Golding MC, Bake S, Miranda RC, Ramadoss J. Alcohol-Induced Developmental Origins of Adult-Onset Diseases. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2016;40(7):1403-14.
130. Clarren SK, Smith DW. The fetal alcohol syndrome. *The New England journal of medicine*. 1978;298(19):1063-7.
131. Astley SJ, Clarren SK. A case definition and photographic screening tool for the facial phenotype of fetal alcohol syndrome. *The Journal of pediatrics*. 1996;129(1):33-41.
132. Chudley AE, Conry J, Cook JL, Looock C, Rosales T, LeBlanc N. Fetal alcohol spectrum disorder: Canadian guidelines for diagnosis. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2005;172(5 Suppl):S1-s21.
133. Kobor MS, Weinberg J. Focus on: epigenetics and fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. 2011;34(1):29-37.
134. Mattson SN, Riley EP, Gramling L, Delis DC, Jones KL. Neuropsychological comparison of alcohol-exposed children with or without physical features of fetal alcohol syndrome. *Neuropsychology*. 1998;12(1):146-53.
135. Popova S, Lange S, Probst C, Gmel G, Rehm J. Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2017;5(3):e290-e9.
136. Sokol RJ, Delaney-Black V, Nordstrom B. Fetal alcohol spectrum disorder. *Jama*. 2003;290(22):2996-9.
137. Judson MC, Bergman MY, Campbell DB, Eagleson KL, Levitt P. Dynamic gene and protein expression patterns of the autism-associated met receptor tyrosine kinase in the developing mouse forebrain. *The Journal of comparative neurology*. 2009;513(5):511-31.
138. Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, et al. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science (New York, NY)*. 2000;287(5455):1056-60.

139. Sulik KK. Fetal alcohol spectrum disorder: pathogenesis and mechanisms. *Handbook of clinical neurology*. 2014;125:463-75.
140. Astley SJ, Clarren SK. Diagnosing the full spectrum of fetal alcohol-exposed individuals: introducing the 4-digit diagnostic code. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*. 2000;35(4):400-10.
141. Astley SJ. Validation of the fetal alcohol spectrum disorder (FASD) 4-Digit Diagnostic Code. *Journal of population therapeutics and clinical pharmacology = Journal de la therapeutique des populations et de la pharamcologie clinique*. 2013;20(3):e416-67.
142. Benz J, Rasmussen C, Andrew G. Diagnosing fetal alcohol spectrum disorder: History, challenges and future directions. *Paediatr Child Health*. 2009;14(4):231-7.
143. Streissguth AP. *Fetal alcohol syndrome: A guide for families and communities*: Paul H Brookes Publishing; 1997.
144. Streissguth AP, Bookstein FL, Barr HM, Sampson PD, O'Malley K, Young JK. Risk factors for adverse life outcomes in fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects. *Journal of developmental and behavioral pediatrics : JDBP*. 2004;25(4):228-38.
145. Laufer BI, Kapalanga J, Castellani CA, Diehl EJ, Yan L, Singh SM. Associative DNA methylation changes in children with prenatal alcohol exposure. *Epigenomics*. 2015;7(8):1259-74.
146. Portales-Casamar E, Lussier AA, Jones MJ, MacIsaac JL, Edgar RD, Mah SM, et al. DNA methylation signature of human fetal alcohol spectrum disorder. *Epigenetics & chromatin*. 2016;9:25.
147. Nykjaer C, Alwan NA, Greenwood DC, Simpson NA, Hay AW, White KL, et al. Maternal alcohol intake prior to and during pregnancy and risk of adverse birth outcomes: evidence from a British cohort. *Journal of epidemiology and community health*. 2014;68(6):542-9.
148. Riley EP, McGee CL. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)*. 2005;230(6):357-65.
149. Garro AJ, McBeth DL, Lima V, Lieber CS. Ethanol consumption inhibits fetal DNA methylation in mice: implications for the fetal alcohol syndrome. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1991;15(3):395-8.
150. Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis*. 2012;16(4):667-85.

151. Jin B, Park DW, Nam KW, Oh GT, Lee YS, Ryu DY. CpG methylation of the mouse CYP1A2 promoter. *Toxicology letters*. 2004;152(1):11-8.
152. Barak AJ, Beckenhauer HC, Tuma DJ. Methionine synthase. a possible prime site of the ethanolic lesion in liver. *Alcohol (Fayetteville, NY)*. 2002;26(2):65-7.
153. Varela-Rey M, Woodhoo A, Martinez-Chantar ML, Mato JM, Lu SC. Alcohol, DNA methylation, and cancer. *Alcohol research : current reviews*. 2013;35(1):25-35.
154. Barak AJ, Beckenhauer HC, Tuma DJ. Betaine effects on hepatic methionine metabolism elicited by short-term ethanol feeding. *Alcohol (Fayetteville, NY)*. 1996;13(5):483-6.
155. Hamid A, Wani NA, Rana S, Vaiphei K, Mahmood A, Kaur J. Down-regulation of reduced folate carrier may result in folate malabsorption across intestinal brush border membrane during experimental alcoholism. *Febs j*. 2007;274(24):6317-28.
156. Meethal SV, Hogan KJ, Mayanil CS, Iskandar BJ. Folate and epigenetic mechanisms in neural tube development and defects. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2013;29(9):1427-33.
157. Black MM. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. *Food and nutrition bulletin*. 2008;29(2 Suppl):S126-31.
158. Singh RP, Shiue K, Schomberg D, Zhou FC. Cellular epigenetic modifications of neural stem cell differentiation. *Cell transplantation*. 2009;18(10):1197-211.
159. Haycock PC. Fetal alcohol spectrum disorders: the epigenetic perspective. *Biology of reproduction*. 2009;81(4):607-17.
160. Haycock PC, Ramsay M. Exposure of mouse embryos to ethanol during preimplantation development: effect on DNA methylation in the h19 imprinting control region. *Biology of reproduction*. 2009;81(4):618-27.
161. Hicks SD, Middleton FA, Miller MW. Ethanol-induced methylation of cell cycle genes in neural stem cells. *Journal of neurochemistry*. 2010;114(6):1767-80.
162. Zhou FC, Balaraman Y, Teng M, Liu Y, Singh RP, Nephew KP. Alcohol alters DNA methylation patterns and inhibits neural stem cell differentiation. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2011;35(4):735-46.
163. Veazey KJ, Carnahan MN, Muller D, Miranda RC, Golding MC. Alcohol-induced epigenetic alterations to developmentally crucial genes regulating neural stemness and differentiation. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2013;37(7):1111-22.

164. Leach RE, Stachecki JJ, Armant DR. Development of in vitro fertilized mouse embryos exposed to ethanol during the preimplantation period: accelerated embryogenesis at subtoxic levels. *Teratology*. 1993;47(1):57-64.
165. Stachecki JJ, Yelian FD, Schultz JF, Leach RE, Armant DR. Blastocyst cavitation is accelerated by ethanol- or ionophore-induced elevation of intracellular calcium. *Biology of reproduction*. 1994;50(1):1-9.
166. Kowalczyk CL, Stachecki JJ, Schultz JF, Leach RE, Armant DR. Effects of alcohols on murine preimplantation development: relationship to relative membrane disordering potency. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1996;20(3):566-71.
167. Ebner T, Montag M. Artificial oocyte activation: evidence for clinical readiness. *Reproductive biomedicine online*. 2016;32(3):271-3.
168. Vanden Meerschaut F, Nikiforaki D, Heindryckx B, De Sutter P. Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. *Reproductive biomedicine online*. 2014;28(5):560-71.
169. Wiebold JL, Becker WC. In-vivo and in-vitro effects of ethanol on mouse preimplantation embryos. *Journal of reproduction and fertility*. 1987;80(1):49-57.
170. Studzinski DM, Callahan RE, Benjamins JA. Increased intracellular calcium alters myelin gene expression in the N20.1 oligodendroglial cell line. *Journal of neuroscience research*. 1999;57(5):633-42.
171. Menezes A, Zeman R, Sabban E. Involvement of intracellular or extracellular calcium in activation of tyrosine hydroxylase gene expression in PC12 cells. *Journal of neurochemistry*. 1996;67(6):2316-24.
172. West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, et al. Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(20):11024-31.
173. Johnson CM, Hill CS, Chawla S, Treisman R, Bading H. Calcium controls gene expression via three distinct pathways that can function independently of the Ras/mitogen-activated protein kinases (ERKs) signaling cascade. *J Neurosci*. 1997;17(16):6189-202.
174. Page-Lariviere F, Campagna C, Sirard MA. Mechanisms involved in porcine early embryo survival following ethanol exposure. *Toxicol Sci*. 2017.

175. Marjonen H, Sierra A, Nyman A, Rogojin V, Grohn O, Linden AM, et al. Early maternal alcohol consumption alters hippocampal DNA methylation, gene expression and volume in a mouse model. *PloS one*. 2015;10(5):e0124931.
176. Chater-Diehl EJ, Laufer BI, Castellani CA, Alberry BL, Singh SM. Alteration of Gene Expression, DNA Methylation, and Histone Methylation in Free Radical Scavenging Networks in Adult Mouse Hippocampus following Fetal Alcohol Exposure. *PloS one*. 2016;11(5):e0154836.
177. Mantha K, Laufer BI, Singh SM. Molecular changes during neurodevelopment following second-trimester binge ethanol exposure in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorder: from immediate effects to long-term adaptation. *Developmental neuroscience*. 2014;36(1):29-43.
178. Kleiber ML, Laufer BI, Wright E, Diehl EJ, Singh SM. Long-term alterations to the brain transcriptome in a maternal voluntary consumption model of fetal alcohol spectrum disorders. *Brain research*. 2012;1458:18-33.
179. Kleiber ML, Mantha K, Stringer RL, Singh SM. Neurodevelopmental alcohol exposure elicits long-term changes to gene expression that alter distinct molecular pathways dependent on timing of exposure. *Journal of neurodevelopmental disorders*. 2013;5(1):6.
180. Kleiber ML, Wright E, Singh SM. Maternal voluntary drinking in C57BL/6J mice: advancing a model for fetal alcohol spectrum disorders. *Behavioural brain research*. 2011;223(2):376-87.
181. Zhang CR, Chong S. Gene expression in the mouse brain following early pregnancy exposure to ethanol. *Genomics data*. 2016;10:107-8.
182. Zhang CR, Ho MF, Vega MC, Burne TH, Chong S. Prenatal ethanol exposure alters adult hippocampal VGLUT2 expression with concomitant changes in promoter DNA methylation, H3K4 trimethylation and miR-467b-5p levels. *Epigenetics & chromatin*. 2015;8:40.
183. Pan B, Zhu J, Lv T, Sun H, Huang X, Tian J. Alcohol consumption during gestation causes histone3 lysine9 hyperacetylation and an alternation of expression of heart development-related genes in mice. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2014;38(9):2396-402.

184. Gavin DP, Kusumo H, Sharma RP, Guizzetti M. Ethanol-induced changes in poly (ADP ribose) polymerase and neuronal developmental gene expression. *Neuropharmacology*. 2016;110(Pt A):287-96.
185. Veazey KJ, Parnell SE, Miranda RC, Golding MC. Dose-dependent alcohol-induced alterations in chromatin structure persist beyond the window of exposure and correlate with fetal alcohol syndrome birth defects. *Epigenetics & chromatin*. 2015;8:39.
186. Leach RE, Rout UK, Schultz JF, Saunders DE, Armant DR. Ethanol elevates c-Myc levels in cultured mouse preimplantation embryos. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1999;23(5):778-84.
187. Boehm SL, 2nd, Moore EM, Walsh CD, Gross CD, Cavelli AM, Gigante E, et al. Using drinking in the dark to model prenatal binge-like exposure to ethanol in C57BL/6J mice. *Developmental psychobiology*. 2008;50(6):566-78.
188. Allan AM, Chynoweth J, Tyler LA, Caldwell KK. A mouse model of prenatal ethanol exposure using a voluntary drinking paradigm. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2003;27(12):2009-16.
189. Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJ. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology*. 2007;28(5):931-7.
190. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev*. 2010;20(4):327-48.
191. Mantha K, Kleiber M, Singh S. Neurodevelopmental timing of ethanol exposure may contribute to observed heterogeneity of behavioral deficits in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorder (FASD). *Journal of Behavioral and Brain Science*. 2013;3(01):85.
192. Kleiber ML, Laufer BI, Stringer RL, Singh SM. Third trimester-equivalent ethanol exposure is characterized by an acute cellular stress response and an ontogenetic disruption of genes critical for synaptic establishment and function in mice. *Developmental neuroscience*. 2014;36(6):499-519.
193. Anderson ML, Nokia MS, Govindaraju KP, Shors TJ. Moderate drinking? Alcohol consumption significantly decreases neurogenesis in the adult hippocampus. *Neuroscience*. 2012;224:202-9.

194. Crabbe JC, Harris RA, Koob GF. Preclinical studies of alcohol binge drinking. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1216:24-40.
195. Abel EL. Behavioral teratology of alcohol (animal model studies of the fetal alcohol syndrome). CRC Press. 1982;3:59-81.
196. Patten AR, Fontaine CJ, Christie BR. A comparison of the different animal models of fetal alcohol spectrum disorders and their use in studying complex behaviors. *Frontiers in pediatrics*. 2014;2:93.
197. DiPadova C, Worner TM, Julkunen RJ, Lieber CS. Effects of fasting and chronic alcohol consumption on the first-pass metabolism of ethanol. *Gastroenterology*. 1987;92(5 Pt 1):1169-73.
198. Brandon-Warner E, Schrum LW, Schmidt CM, McKillop IH. Rodent models of alcoholic liver disease: of mice and men. *Alcohol (Fayetteville, NY)*. 2012;46(8):715-25.
199. Checiu M, Sandor S. The effect of ethanol upon early development in mice and rats. III. In vivo effect of acute ethanol intoxication upon implantation and early postimplantation stages in mice. *Morphologie et embryologie*. 1981;27(2):117-22.
200. Checiu M, Sandor S. The effect of ethanol upon early development in mice and rats. IV. The effect of acute ethanol intoxication of day 4 of pregnancy upon implantation and early postimplantation development in mice. *Morphologie et embryologie*. 1982;28(2):127-33.
201. Checiu M, Sandor S. The effect of ethanol upon early development in mice and rats. V. In vivo effect of acute preimplantation intoxication with or without previous chronic alcoholization. *Morphologie et embryologie*. 1983;29(3):149-57.
202. Checiu M, Sandor S. The effect of ethanol upon early development in mice and rats. XI. Pathogenetic aspects studied by reciprocal transfer of preimplantation embryos. *Morphologie et embryologie*. 1987;33(1):13-8.
203. Checiu M, Sandor S. The effect of ethanol upon early development in mice and rats. XII. The effect of chronic biparental or paternal alcohol intake upon preimplantation development in mice. *Morphologie et embryologie*. 1988;34(1):13-21.
204. Fazakas-Todea I, Checiu M, Sandor S. The effect of ethanol upon early development in mice and rats. VIII. The effect of chronic consumption of some beverages upon preimplantation development in rats. *Morphologie et embryologie*. 1985;31(4):249-56.

205. Sandor S, Checiu M, Fazakas-Todea I, Garban Z. The effect of ethanol upon early development in mice and rats. I. In vivo effect upon preimplantation and early postimplantation stages. *Morphologie et embryologie*. 1980;26(3):265-74.
206. Checiu M, Sandor S. The effect of ethanol upon early development in mice and rats. IX. Late effect of acute preimplantation intoxication in mice. *Morphologie et embryologie*. 1986;32(1):5-11.
207. Checiu M, Sandor S, Garban Z. The effect of ethanol upon early development in mice and rats. VI. In vivo effect of acetaldehyde upon preimplantation stages in rats. *Morphologie et embryologie*. 1984;30(3):175-84.
208. Chen Y, Ozturk NC, Zhou FC. DNA methylation program in developing hippocampus and its alteration by alcohol. *PloS one*. 2013;8(3):e60503.
209. Maier SE, Cramer JA, West JR, Sohrabji F. Alcohol exposure during the first two trimesters equivalent alters granule cell number and neurotrophin expression in the developing rat olfactory bulb. *Journal of neurobiology*. 1999;41(3):414-23.
210. Kaminen-Ahola N, Ahola A, Maga M, Mallitt KA, Fahey P, Cox TC, et al. Maternal ethanol consumption alters the epigenotype and the phenotype of offspring in a mouse model. *PLoS genetics*. 2010;6(1):e1000811.
211. Ngai YF, Sulistyoningrum DC, O'Neill R, Innis SM, Weinberg J, Devlin AM. Prenatal alcohol exposure alters methyl metabolism and programs serotonin transporter and glucocorticoid receptor expression in brain. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2015;309(5):R613-22.
212. Padmanabhan R, Hameed MS. Effects of acute doses of ethanol administered at pre-implantation stages on fetal development in the mouse. *Drug and alcohol dependence*. 1988;22(1-2):91-100.
213. Dwyer-Lindgren L, Flaxman AD, Ng M, Hansen GM, Murray CJ, Mokdad AH. Drinking Patterns in US Counties From 2002 to 2012. *American journal of public health*. 2015;105(6):1120-7.
214. Pierce DR, West JR. Blood alcohol concentration: a critical factor for producing fetal alcohol effects. *Alcohol (Fayetteville, NY)*. 1986;3(4):269-72.

215. Tan CH, Denny CH, Cheal NE, Sniezek JE, Kanny D. Alcohol use and binge drinking among women of childbearing age - United States, 2011-2013. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2015;64(37):1042-6.
216. Wilsnack SC, Wilsnack RW, Kantor LW. Focus on: women and the costs of alcohol use. *Alcohol research : current reviews*. 2013;35(2):219-28.
217. Sedgh G, Singh S, Hussain R. Intended and unintended pregnancies worldwide in 2012 and recent trends. *Studies in family planning*. 2014;45(3):301-14.
218. Clarren SK, Bowden DM. Fetal alcohol syndrome: a new primate model for binge drinking and its relevance to human ethanol teratogenesis. *The Journal of pediatrics*. 1982;101(5):819-24.
219. Foss DL, Baarsch MJ, Murtaugh MP. Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Animal biotechnology*. 1998;9(1):67-78.
220. Marten NW, Burke EJ, Hayden JM, Straus DS. Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1994;8(8):538-44.
221. Hendriks-Balk MC, Michel MC, Alewijnse AE. Pitfalls in the normalization of real-time polymerase chain reaction data. *Basic research in cardiology*. 2007;102(3):195-7.
222. Svingen T, Letting H, Hadrup N, Hass U, Vinggaard AM. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions. *PeerJ*. 2015;3:e855.
223. Stephens AS, Stephens SR, Morrison NA. Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages. *BMC Res Notes*. 2011;4:410.
224. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*. 2009;55(4):611-22.
225. Wang L, Sun J, Wu H, Liu S, Wang J, Wu B, et al. Systematic assessment of reduced representation bisulfite sequencing to human blood samples: A promising method for large-sample-scale epigenomic studies. *Journal of biotechnology*. 2012;157(1):1-6.

226. Wang J, Xia Y, Li L, Gong D, Yao Y, Luo H, et al. Double restriction-enzyme digestion improves the coverage and accuracy of genome-wide CpG methylation profiling by reduced representation bisulfite sequencing. *BMC genomics*. 2013;14:11.
227. Doherty R, Couldrey C. Exploring genome wide bisulfite sequencing for DNA methylation analysis in livestock: a technical assessment. *Frontiers in genetics*. 2014;5:126.
228. Gao F, Zhang J, Jiang P, Gong D, Wang JW, Xia Y, et al. Marked methylation changes in intestinal genes during the perinatal period of preterm neonates. *BMC genomics*. 2014;15:716.
229. Couldrey C, Brauning R, Bracegirdle J, Maclean P, Henderson HV, McEwan JC. Genome-wide DNA methylation patterns and transcription analysis in sheep muscle. *PLoS one*. 2014;9(7):e101853.
230. Legault L-M, Bertrand-Lehouillier V, McGraw S. Quantitative amplification of Reduced Representation Bisulfite Sequencing libraries to reduce chimeric amplicons amplification. In preparation.
231. Boyle P, Clement K, Gu H, Smith ZD, Ziller M, Fostel JL, et al. Gel-free multiplexed reduced representation bisulfite sequencing for large-scale DNA methylation profiling. *Genome biology*. 2012;13(10):R92.
232. Gu H, Smith ZD, Bock C, Boyle P, Gnirke A, Meissner A. Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nature protocols*. 2011;6(4):468-81.
233. Lahr DJ, Katz LA. Reducing the impact of PCR-mediated recombination in molecular evolution and environmental studies using a new-generation high-fidelity DNA polymerase. *BioTechniques*. 2009;47(4):857-66.
234. Schloss PD, Gevers D, Westcott SL. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS one*. 2011;6(12):e27310.
235. Xi Y, Li W. BSMAP: whole genome bisulfite sequence MAPPING program. *BMC bioinformatics*. 2009;10:232.
236. Akalin A, Kormaksson M, Li S, Garrett-Bakelman FE, Figueroa ME, Melnick A, et al. methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome biology*. 2012;13(10):R87.

237. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2010;26(6):841-2.
238. Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, et al. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell*. 2010;38(4):576-89.
239. Tripathi S, Pohl MO, Zhou Y, Rodriguez-Frandsen A, Wang G, Stein DA, et al. Meta- and Orthogonal Integration of Influenza "OMICs" Data Defines a Role for UBR4 in Virus Budding. *Cell host & microbe*. 2015;18(6):723-35.
240. Walker CK, Krakowiak P, Baker A, Hansen RL, Ozonoff S, Hertz-Picciotto I. Preeclampsia, placental insufficiency, and autism spectrum disorder or developmental delay. *JAMA pediatrics*. 2015;169(2):154-62.
241. Braithwaite EC, Kundakovic M, Ramchandani PG, Murphy SE, Champagne FA. Maternal prenatal depressive symptoms predict infant NR3C1 1F and BDNF IV DNA methylation. *Epigenetics*. 2015;10(5):408-17.
242. Togher KL, Togher KL, O'Keeffe MM, O'Keeffe MM, Khashan AS, Khashan AS, et al. Epigenetic regulation of the placental HSD11B2 barrier and its role as a critical regulator of fetal development. *Epigenetics*. 2014;9(6):816-22.
243. Avishai-Eliner S, Brunson KL, Sandman CA, Baram TZ. Stressed-out, or in (utero)? *Trends in neurosciences*. 2002;25(10):518-24.
244. Buss C, Entringer S, Davis EP, Hobel CJ, Swanson JM, Wadhwa PD, et al. Impaired executive function mediates the association between maternal pre-pregnancy body mass index and child ADHD symptoms. *PloS one*. 2012;7(6):e37758.
245. Sandman CA, Glynn LM, Davis EP. Is there a viability-vulnerability tradeoff? Sex differences in fetal programming. *Journal of psychosomatic research*. 2013;75(4):327-35.
246. Khashan AS, Abel KM, McNamee R, Pedersen MG, Webb RT, Baker PN, et al. Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Archives of general psychiatry*. 2008;65(2):146-52.
247. Whidden L, Martel J, Rahimi S, Chaillet JR, Chan D, Trasler JM. Compromised oocyte quality and assisted reproduction contribute to sex-specific effects on offspring outcomes and epigenetic patterning. *Human molecular genetics*. 2016;25(21):4649-60.

248. O'Leary-Moore SK, Parnell SE, Godin EA, Dehart DB, Ament JJ, Khan AA, et al. Magnetic resonance microscopy-based analyses of the brains of normal and ethanol-exposed fetal mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010;88(11):953-64.
249. Lipinski RJ, Hammond P, O'Leary-Moore SK, Ament JJ, Pecevich SJ, Jiang Y, et al. Ethanol-induced face-brain dysmorphology patterns are correlative and exposure-stage dependent. *PloS one*. 2012;7(8):e43067.
250. Anthony B, Vinci-Booher S, Wetherill L, Ward R, Goodlett C, Zhou FC. Alcohol-induced facial dysmorphology in C57BL/6 mouse models of fetal alcohol spectrum disorder. *Alcohol (Fayetteville, NY)*. 2010;44(7-8):659-71.
251. Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of reproduction*. 1998;3(3):155-63.
252. McEvoy TG, Robinson JJ, Aitken RP, Findlay PA, Robertson IS. Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. *Animal reproduction science*. 1997;47(1-2):71-90.
253. Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature genetics*. 2001;27(2):153-4.
254. Yang L, Chavatte-Palmer P, Kubota C, O'Neill M, Hoagland T, Renard JP, et al. Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. *Molecular reproduction and development*. 2005;71(4):431-8.
255. Tost J, Dunker J, Gut IG. Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing. *BioTechniques*. 2003;35(1):152-6.
256. Huntriss J, Woodfine K, Huddleston JE, Murrell A, Picton HM. Analysis of DNA Methylation Patterns in Single Blastocysts by Pyrosequencing(R). *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2015;1315:259-70.
257. Jachowicz JW, Bing X, Pontabry J, Boskovic A, Rando OJ, Torres-Padilla ME. LINE-1 activation after fertilization regulates global chromatin accessibility in the early mouse embryo. *Nature genetics*. 2017;49(10):1502-10.

258. Argaw-Denboba A, Balestrieri E, Serafino A, Cipriani C, Bucci I, Sorrentino R, et al. HERV-K activation is strictly required to sustain CD133+ melanoma cells with stemness features. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR. 2017;36(1):20.
259. Coskran TM, Jiang Z, Klaunig JE, Mager DL, Obert L, Robertson A, et al. Induction of endogenous retroelements as a potential mechanism for mouse-specific drug-induced carcinogenicity. *PloS one*. 2017;12(5):e0176768.
260. Babaian A, Mager DL. Endogenous retroviral promoter exaptation in human cancer. *Mobile DNA*. 2016;7:24.
261. Liu Y, Balaraman Y, Wang G, Nephew KP, Zhou FC. Alcohol exposure alters DNA methylation profiles in mouse embryos at early neurulation. *Epigenetics*. 2009;4(7):500-11.
262. Morris MJ, Adachi M, Na ES, Monteggia LM. Selective role for DNMT3a in learning and memory. *Neurobiology of learning and memory*. 2014;115:30-7.
263. Bale TL. The placenta and neurodevelopment: sex differences in prenatal vulnerability. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2016;18(4):459-64.
264. Rodriguez CI, Davies S, Calhoun V, Savage DD, Hamilton DA. Moderate Prenatal Alcohol Exposure Alters Functional Connectivity in the Adult Rat Brain. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2016;40(10):2134-46.
265. Marquardt K, Sigdel R, Caldwell K, Brigman JL. Prenatal ethanol exposure impairs executive function in mice into adulthood. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2014;38(12):2962-8.
266. Tesche CD, Kodituwakku PW, Garcia CM, Houck JM. Sex-related differences in auditory processing in adolescents with fetal alcohol spectrum disorder: A magnetoencephalographic study. *NeuroImage Clinical*. 2015;7:571-87.
267. Paolozza A, Munn R, Munoz DP, Reynolds JN. Eye movements reveal sexually dimorphic deficits in children with fetal alcohol spectrum disorder. *Front Neurosci*. 2015;9:76.
268. Howerton CL, Bale TL. Targeted placental deletion of OGT recapitulates the prenatal stress phenotype including hypothalamic mitochondrial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(26):9639-44.

269. Howerton CL, Morgan CP, Fischer DB, Bale TL. O-GlcNAc transferase (OGT) as a placental biomarker of maternal stress and reprogramming of CNS gene transcription in development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(13):5169-74.
270. Kim DR, Bale TL, Epperson CN. Prenatal programming of mental illness: current understanding of relationship and mechanisms. *Current psychiatry reports*. 2015;17(2):5.
271. Mueller BR, Bale TL. Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *J Neurosci*. 2008;28(36):9055-65.
272. Morgan CP, Bale TL. Early prenatal stress epigenetically programs dysmasculinization in second-generation offspring via the paternal lineage. *J Neurosci*. 2011;31(33):11748-55.
273. Pankevich DE, Mueller BR, Brockel B, Bale TL. Prenatal stress programming of offspring feeding behavior and energy balance begins early in pregnancy. *Physiology & behavior*. 2009;98(1-2):94-102.
274. Jensen Pena C, Monk C, Champagne FA. Epigenetic effects of prenatal stress on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2 in the placenta and fetal brain. *PloS one*. 2012;7(6):e39791.
275. Song CX, Szulwach KE, Fu Y, Dai Q, Yi C, Li X, et al. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nature biotechnology*. 2011;29(1):68-72.
276. Li W, Liu M. Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. *Journal of nucleic acids*. 2011;2011:870726.
277. Yu M, Hon GC, Szulwach KE, Song CX, Zhang L, Kim A, et al. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell*. 2012;149(6):1368-80.
278. Booth MJ, Ost TW, Beraldi D, Bell NM, Branco MR, Reik W, et al. Oxidative bisulfite sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nature protocols*. 2013;8(10):1841-51.
279. Young JK, Giesbrecht HE, Eskin MN, Aliani M, Suh M. Nutrition implications for fetal alcohol spectrum disorder. *Advances in nutrition*. 2014;5(6):675-92.
280. Wozniak JR, Fuglestad AJ, Eckerle JK, Fink BA, Hoecker HL, Boys CJ, et al. Choline supplementation in children with fetal alcohol spectrum disorders: a randomized, double-

blind, placebo-controlled trial. The American journal of clinical nutrition.  
2015;102(5):1113-25.

*La persévérance, la détermination  
et la motivation d'aujourd'hui  
mènent au succès de demain.*