

Université de Montréal

**Protection contre les effets d'une exposition prénatale à l'alcool durant la préimplantation
chez l'embryon par une diète maternelle enrichie en donneurs de méthyles**

Par

Mélanie Breton-Larrivée

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

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

Avril, 2021

© Mélanie Breton-Larrivée, 2021

Université de Montréal

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

**Protection contre les effets d'une exposition prénatale à l'alcool durant la préimplantation
chez l'embryon par une diète maternelle enrichie en donneurs de méthyles**

Présenté par

Mélanie Breton-Larrivée

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Nikolaus Heveker

Président-rapporteur

Dr. Serge McGraw

Directeur de recherche

Dr. Cathy Vaillancourt

Membre du jury

Résumé

La consommation d'alcool pendant la grossesse peut entraîner des conséquences néfastes sur le développement de l'enfant et mener aux troubles du spectre de l'alcoolisation fœtale (TSAF). Cependant on en connaît peu sur son effet durant la période de préimplantation. Cette période est reconnue comme étant sensible à l'environnement, majoritairement dû au fait qu'elle est caractérisée par la reprogrammation dynamique des profils de méthylation de l'ADN. L'alcool est reconnu pour altérer les mécanismes impliqués dans les processus de méthylation de l'ADN (e.g., cycle du folate, actions des DNMTs). Récemment, nous avons démontré qu'une exposition prénatale à l'alcool éthylique durant la préimplantation altère les futurs profils de méthylation de l'ADN du cerveau et augmente le nombre de défauts morphologiques à la mi-gestation. Il n'y a présentement aucun traitement pour les TSAF, mais certaines études suggèrent qu'une diète enrichie en donneurs de groupement méthyles (e.g., folate, choline), nécessaires aux réactions de méthylation, pourrait atténuer les effets d'une exposition prénatale à l'alcool. C'est pourquoi nous avons voulu déterminer si une diète enrichie en donneurs de groupements méthyles pouvait apporter une protection aux embryons ayant subi une exposition prénatale à l'alcool durant la préimplantation. Pour ce faire, une diète standard ou enrichie a été donnée à des souris 4 semaines avant la gestation et pendant celle-ci. Les femelles gestantes ont reçu une dose d'alcool au jour E2.5, puis nous avons récolté les embryons à E10.5 et E18.5 pour évaluer les anomalies physiques et faire l'analyse de la méthylation des cerveaux antérieurs. Nos résultats démontrent que la diète enrichie prévient ou élimine un certain nombre de défauts morphologiques à E10.5 et E18.5. Nous avons aussi observé que la diète enrichie n'affectait pas la mise en place et le maintien de la méthylation et l'expression des gènes à empreintes durant le développement. La diète enrichie en donneurs de groupements méthyles aide donc à prévenir certains effets nuisibles de l'exposition prénatale à l'alcool survenant durant la préimplantation.

Mots-clés : Épigenétique, méthylation de l'ADN, exposition prénatale à l'alcool, Troubles du spectre de l'alcoolisation fœtale, développement embryonnaire, environnement maternel, troubles neurodéveloppementaux, donneurs de groupements méthyles, diète enrichie, folate

Abstract

Alcohol consumption during pregnancy can have a significant impact on the development of the child and lead to fetal alcohol spectrum disorders (FASD). Nonetheless, little is known about its effect during the pre-implantation period. However, we know that this period is very sensitive to the environment, mainly because of major reprogramming of DNA methylation patterns. Moreover, alcohol can alter the mechanisms involved in DNA methylation processes (e.g., folate cycle, actions of DNMTs). Recently, we have shown that prenatal alcohol exposure (PAE) during preimplantation alters future DNA methylation patterns of the young embryo brain and increases the number of morphological defects. There is currently no treatment for FASD, but studies suggest that a diet enriched in methyl donors (e.g., folate, choline), which are necessary for methylation reactions, may mitigate the effects of PAE. Therefore, we wanted to determine if a diet enriched in methyl group donors could provide protection to embryos against a PAE during preimplantation. To do so, a standard or enriched diet was given to mice 4 weeks before and during gestation. Pregnant females were exposed to alcohol at day E2.5, then we harvested embryos (E10.5, E18.5) to assess physical abnormalities and analyse forebrain methylation. Our results demonstrate that the enriched diet reduces or eliminates defects at E10.5 and E18.5. We also observed that the fortified diet did not affect the establishment and maintenance of methylation and expression of imprinted genes during development. Thus, our results show that a methyl enriched diet can prevent some of the adverse effects of prenatal alcohol exposure occurring during preimplantation.

Keywords: Epigenetic, DNA methylation, prenatal alcohol exposure, Fetal alcohol spectrum disorders, embryonic development, maternal environment, neurodevelopmental disorders, methyl donors, enriched diet, folate

Table des matières

Résumé.....	5
Abstract.....	7
Table des matières.....	9
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures.....	15
Liste des sigles et abréviations.....	17
Remerciements.....	23
Chapitre 1 – Introduction.....	25
1.1.1 Développement de l’embryon au cours de la préimplantation.....	27
1.1.2 Vulnérabilité de la période préimplantatoire.....	28
1.1.3 Reprogrammation de la méthylation de l’ADN chez l’embryon préimplantatoire.....	31
1.1.3.1 Les enzymes impliquées dans la méthylation de l’ADN.....	31
1.1.3.2 La vague de reprogrammation.....	33
1.2 Exposition prénatale à l’alcool et troubles du spectre de l’alcoolisation fœtale.....	35
1.2.1 Troubles du spectre de l’alcoolisation fœtale.....	36
1.2.2 Modèles TSAF d’exposition prénatale à l’alcool durant la préimplantation.....	39
1.2.3 Effet de l’alcool sur le développement du cerveau.....	40
1.2.3.1 Effets directs sur le développement du cerveau.....	41
1.2.3.2 Effets indirects sur le développement du cerveau.....	42
1.2.3 Effet de l’alcool sur l’épigénétique durant le développement embryonnaire.....	43
1.2.4.1 Effet de l’alcool sur les modifications d’histones.....	43
1.2.4.2 Effet de l’alcool sur les micro-ARNs.....	45

1.2.4.3 Effet de l'alcool sur la méthylation de l'ADN	46
1.3 Impact d'une diète enrichie en donneurs de groupements méthyles	51
1.3.1 Métabolisme du carbone (1C).....	52
1.3.2 Donneurs de groupements méthyles et développement.....	53
1.3.2.1 Folate.....	53
1.3.2.2 Choline, bétaïne et vitamine B12.....	54
1.3.3 Effet de l'alcool sur les donneurs de groupements méthyles	56
1.3.4 Modèles d'exposition à l'alcool avec une diète	57
1.4 Problématique, hypothèse et objectifs.....	61
1.4.1 Problématique.....	61
1.4.2 Hypothèse	61
1.4.3 Objectifs	61
Chapitre 2 – Matériel et méthodes.....	63
2.1 Modèle murin d'exposition prénatale à l'alcool lors de la préimplantation avec diètes	63
2.2 Coloration du squelette.....	65
2.3 Sexage des embryons.....	66
2.4 Analyse des profils de méthylation	66
2.5 Analyse bioinformatique du séquençage.....	68
2.6 Analyse de l'expression génique	69
2.7 Analyse statistique	69
Chapitre 3 – Résultats	71
3.1 Atténuation des défauts morphologiques (E10.5) causées par une exposition prénatale à l'alcool par la prise d'une diète enrichie en donneurs de groupements méthyles.	71

3.2 Atténuation des défauts morphologiques par la prise d'une diète enrichie en donneurs de groupements méthyles à E18.5.....	76
3.3 Effet de la diète enrichie contre une exposition prénatale à l'alcool sur le squelette des embryons à E18.5.....	81
3.4 Effet de la diète enrichie contre une exposition prénatale à l'alcool sur la méthylation et l'expression des gènes à empreintes	84
Chapitre 4 – Discussion	95
4.1 Impact de la diète sur la prévention de défauts morphologiques suivant une exposition prénatale à l'alcool chez l'embryon préimplantatoire.....	96
4.2 Effets de la diète contre la prise d'alcool durant la préimplantation sur le squelette d'embryons E18.5.....	97
4.3 Implications chez l'embryon des altérations épigénétiques et géniques.....	98
4.5 Limitations de l'étude.....	99
4.6 Perspectives	100
4.7 Conclusion	102
Références bibliographiques.....	105
Annexes	127

Liste des tableaux

Tableau 1. –	Exemples de concentration d'alcool dans le sang selon le niveau d'intoxication pour une femme de 55kg une heure après la consommation [134, 135].	39
Tableau 2. –	Études de l'effet d'une exposition à l'alcool sur la méthylation de l'ADN à divers stades	49
Tableau 3. –	Études de l'effet d'une diète enrichie en donneurs de groupements méthyles contre l'effet d'une exposition prénatale à l'alcool.	60
Tableau 4. –	Séquences des amorces utilisées pour le sexage.	66
Tableau 5. –	Aspects morphologiques des embryons à E10.5.	72
Tableau 6. –	Embryons et portées présentant un défaut morphologique à E10.5	76
Tableau 7. –	Aspects morphologiques des embryons E18.5.	78
Tableau 8. –	Embryons et portées présentant un défaut morphologique à E18.5	81
Tableau 9. –	Séquences des amorces des gènes utilisés pour le qPCR.	127
Tableau 10. –	Séquences des amorces des gènes utilisés pour le PCR1 de la technique <i>Implicon</i>	129
Tableau 11. –	Amorces avec les index pour le PCR2 de la technique <i>Implicon</i> .	131

Liste des figures

Figure 1. – Développement de l’embryon de la souris durant la période préimplantatoire.	27
Figure 2. – Vague de reprogrammation épigénétique.....	35
Figure 3. – Métabolisme du carbone 1C et les cibles de l’alcool.....	53
Figure 4. – Schéma du modèle murin d’exposition prénatale à l’alcool éthylique avec une diète enrichie en donneurs de groupements méthyles.....	64
Figure 5. – Exemples de mesures des embryons aux stades E10.5 et E18.5.....	65
Figure 6. – Schéma représentant la méthode <i>Implicon</i>	68
Figure 7. – La diète enrichie en donneurs de groupements méthyles n’a pas d’effet sur le développement des embryons à la mi-gestation.	72
Figure 8. – La diète enrichie en donneurs de groupements méthyles réduit les effets d’une exposition à l’alcool éthylique de type <i>binge drinking</i> chez les embryons E10.5.....	74
Figure 9. – Effet de la diète contre l’exposition à l’alcool éthylique sur les portées au stade E10.5.	75
Figure 10. – La diète enrichie en donneurs de groupements méthyles corrige certains changements morphologiques causés par l’alcool éthylique chez les embryons à E18.5.	77
Figure 11. – La diète enrichie en donneurs de groupements méthyles réduit les défauts associés à une exposition prénatale à l’alcool de type <i>binge-drinking</i> à E18.5.....	80
Figure 12. – Effet de la diète contre l’exposition à l’alcool éthylique sur les portées au stade E18.5.	81
Figure 13. – La diète enrichie ne prévient pas les légers retards d’ossification causés par une exposition prénatale à l’alcool éthylique.....	83
Figure 14. – L’exposition prénatale à l’alcool éthylique causent de faibles changements au niveau de la moyenne de méthylation des gènes à empreinte.....	85
Figure 15. – Niveaux de méthylation et d’expression des gènes à empreinte <i>Peg10</i> , <i>Mest-Peg1</i> et <i>Snrpn</i> suivant une exposition prénatale à l’alcool éthylique.....	87

Figure 16. – Niveaux de méthylation et d’expression des gènes à empreinte <i>Kcnq1</i> , <i>Plagl1</i> , <i>Zac1</i> et <i>Grb10</i> suivant une exposition prénatale à l’alcool éthylique.....	88
Figure 17. – Niveaux de méthylation et d’expression des gènes à empreinte <i>Igf2r</i> , <i>Commd1</i> et <i>Zrsr1</i> suivant une exposition prénatale à l’alcool éthylique.....	89
Figure 18. – Niveaux de méthylation et d’expression des gènes à empreinte <i>Gpr1</i> , <i>Zdbf2</i> , <i>Nnat</i> et <i>Gnas</i> suivant une exposition prénatale à l’alcool éthylique.....	90
Figure 19. – Niveaux de méthylation et d’expression des gènes à empreinte <i>H13</i> , <i>Mcts2</i> , <i>Nesp</i> et <i>Nap1/5</i> suivant une exposition prénatale à l’alcool éthylique.. ..	91
Figure 20. – Niveaux de méthylation et d’expression des gènes à empreinte <i>Peg3</i> , <i>Meg3</i> , <i>Dlk1</i> et <i>Dio3</i> suivant une exposition prénatale à l’alcool éthylique.....	92
Figure 21. – Niveaux de méthylation et d’expression des gènes à empreinte <i>Peg13</i> , <i>Igf2</i> et <i>H19</i> suivant une exposition prénatale à l’alcool éthylique.	93

Liste des sigles et abréviations

5caC: 5-carboxylcytosine

5fC : 5-formylcytosine

5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine

5mC : 5-méthylcytosine

5-MTHF : 5-méthyltétrahydrofolate

5,10-MTHF : 5,10-méthylènetetrahydrofolate

ADH : Alcool déshydrogénase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BHMT : Méthyltransférase bêtaïne-homocystéine

BPA : Bisphénol A

Chr : Chromosome

CpG : Cytosine-phosphate-guanine

Ctl : Contrôle

E10.5 : Jour embryonnaire 10.5

EtOH : Éthanol

DHF : Dihydrofolate

DMG : Diméthylglycine

DNMT : ADN méthyltransférase

FAD : Flavine-adénine-dinucléotide

HH : Stade Hamburger Hamilton

hpf: Heures post-fécondation

ICR : Région contrôle de l’empreinte (*Imprinting control region*)

IMU : Identifiant moléculaire unique

jpgf: Jour post-fécondation

KCl : Chlorure de potassium

KOH : Hydroxyde de potassium

MAT : Méthionine adénosyltransférase

MTHFR : Méthylènetétrahydrofolate réductase

MTR : Méthionine synthase

pb : Paire de bases

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PLP : Phosphate de pyridoxal

qPCR : PCR quantitatif

ROS: Espèces réactives de l’oxygène (*reactive oxygen species*)

TDAH: Troubles du déficit de l’attention avec/sans hyperactivité

TDG: Thymine-DNA glycosylase

TET: Enzyme *ten-eleven translocation*

THF: Tétrahydrofolate

TSAF : Troubles du spectre de l’alcoolisation foetale

SAF : Syndrome de l’alcoolisation foetale

SAHH : S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase

SAH : S-adénosylhomocystéine

SAM : S-adénosylméthionine

SHMT : Sérine hydroxyméthytransférase

Zn : Zinc

« Sometimes science is more art than science [...] »

-Rick Sanchez

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, **Dr Serge McGraw**, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire lors de mes stages et de ma maîtrise. Il est un excellent mentor qui a à cœur la réussite de ses étudiants et est toujours présent lorsque nous avons besoin de conseils pour nos projets. J'ai beaucoup appris durant mon cheminement dans ton laboratoire et j'ai pu développer des compétences qui me seront utiles tout au long de ma carrière scientifique. Je serai toujours reconnaissante du soutien que tu m'as apporté et des connaissances que tu m'as transmises.

J'aimerais aussi remercier mes collègues de laboratoire présents et passés qui ont fait passer ces années si vite. Merci à Lisa (*fellow cat lover*) qui a enduré mes milles et une questions, Karine, Elizabeth (*other fellow cat lover*), Anthony, Alexandra, Gilberto, Virginie et Alba. J'ai adoré le temps passé avec vous avec nos discussions autant scientifiques qu'anodines et les fous rires que ça a pu engendrés.

Je remercie aussi mes parents qui m'ont toujours encouragé à poursuivre mes études et à donner le meilleur de moi-même. Ils m'ont beaucoup aidé à travers ces années et je ne pourrai jamais être assez reconnaissante pour tout ce qu'ils ont fait pour moi. Un gros merci à toute ma famille et mes amis d'être présents pour moi et de m'offrir leur support!

Finalement, merci à ma sœur Kristel sans qui je n'aurais probablement jamais eu le courage de faire un stage à Montréal (qui était plutôt effrayant pour une fille venant d'un petit village) ni la chance de rencontrer cette équipe extraordinaire. J'aimerais aussi la remercier d'être la meilleure des sœurs et de toujours être là pour moi dans les bons comme les mauvais moments. Et un merci spécial à mes deux petites boules de poils (Zanalia et Naïko) pour m'avoir apporté du réconfort durant toutes ces années.

Chapitre 1 – Introduction

Une exposition prénatale à l'alcool peut avoir des conséquences graves sur le développement de l'enfant et mener aux troubles du spectre de l'alcoolisation fœtale (TSAF). Ces troubles englobent un éventail d'incapacités cognitives et physiques qui sont permanentes pour les enfants nés de mères qui ont consommé de l'alcool pendant la grossesse. Il n'existe présentement aucun traitement pour empêcher ou rectifier les déficits associés au TSAF. Même si on sait qu'une exposition à l'alcool est néfaste à tout moment pendant la grossesse, il demeure que nous connaissons très peu l'effet de l'alcool durant les premiers jours de gestation, soit pendant la période de préimplantation. Le fait que la moitié des grossesses sont non-planifiées, qu'il est impossible de détecter un signe de grossesse à ce stade du développement, et qu'il y a un taux croissant de consommation excessive d'alcool chez les jeunes femmes font que cette période représente un risque élevé d'exposition [1-7]. De plus, la période de préimplantation est particulièrement sensible aux perturbations provenant de l'environnement maternel puisque lors des premières divisions cellulaires, les profils épigénétiques (e.g., méthylation de l'ADN) sont activement reprogrammés chez l'embryon. La mise en place des profils de méthylation d'ADN est cruciale pour le bon développement de l'embryon/fœtus, mais peut être affectée par l'alcool qui est connu pour altérer les mécanismes qui participent dans la méthylation de l'ADN (e.g. action des DNMTs, cycle du folate). Dans l'une de nos récentes études, nous avons démontré qu'une exposition prénatale à l'alcool éthylique durant la période préimplantatoire augmentent le nombre de défauts morphologiques et affectent les profils de méthylation d'ADN à long terme dans le cerveau antérieur chez l'embryon à mi-gestation [8]. Comme plusieurs nutriments sont impliqués dans la production de groupements méthyles nécessaires pour la méthylation d'ADN, des études suggèrent qu'une diète maternelle enrichie en donneurs de groupements méthyles pourrait atténuer les effets de l'alcool en prévenant certaines anomalies embryonnaires [9-14].

Suivant cette rationnelle, pendant ma maîtrise j'ai voulu définir si un régime maternel enrichi en donneurs de méthyles protège les embryons préimplantatoires de l'exposition à l'alcool et améliore le développement embryonnaire. Dans les prochaines sous-sections, je vais réviser différents concepts rattachés à ce sujet.

1.1 Période préimplantatoire et vulnérabilité de l'embryon

La période préimplantatoire du développement embryonnaire commence dès la fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde, et prend fin lorsque l'embryon s'implante dans l'utérus de la mère (Figure 1). Ce processus est similaire chez tous les mammifères, cependant sa durée peut différer selon l'espèce (e.g., 4 jours chez la souris, 7 jours chez l'humain). Lors de cette période, l'embryon se déplace dans les trompes de Fallope vers l'utérus afin de s'implanter; le moment où l'embryon se fixe dans la paroi de la cavité utérine. Durant ce trajet, l'embryon va subir des changements dans son environnement, entre autres, au niveau des facteurs de croissances et des nutriments qui permettent le développement de celui-ci [15-17]. De plus, divers facteurs externes (e.g., nutrition, alcool) ou expériences (e.g., stress, dépression) subies par la mère peuvent venir influencer l'environnement utérin et avoir un impact positif ou négatif sur le développement du jeune embryon. Puisqu'une chaîne d'évènements (e.g., première spécification cellulaire, reprogrammation épigénétique) hautement coordonnés se succèdent au cours des premiers jours de développement embryonnaire, toute perturbation dans ce processus pourrait venir influencer le développement pré et postnatal.

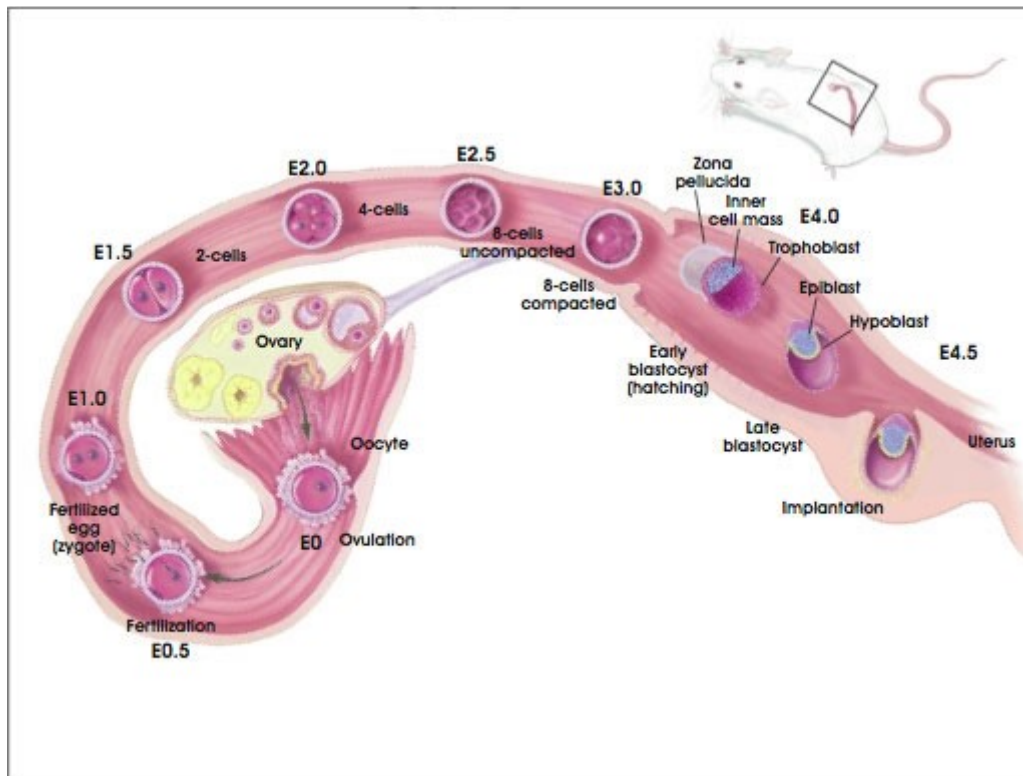


Figure 1. – **Développement de l’embryon de la souris durant la période préimplantatoire.** Suite à l’ovulation, l’ovocyte entre dans les trompes utérines où il sera fécondé par le spermatozoïde. Il subira ensuite plusieurs divisions cellulaires avant de s’implanter dans l’utérus.

(© 2001 Terese Winslow) [18]

1.1.1 Développement de l’embryon au cours de la préimplantation

Lorsque l’embryon 1-cellule entame sa migration en direction de l’utérus, il débute un processus de divisions cellulaires rapides. Ces divisions cellulaires sont dites réductrices puisque le nombre de cellules augmentent sans changer le volume de l’embryon. Le jeune embryon est protégé par une barrière, établie par l’ovocyte, qui se nomme zone pellucide. Cette matrice extra-cellulaire est composée de glycoprotéines sulfatées qui sont également importantes dans le processus de fécondation. Lorsque l’embryon atteint le stade 4-cellules, les cellules vont commencer à exprimer les jonctions d’adhérence menant au processus de compaction. Au stade 8-cellules, la polarité des cellules est établie via des protéines se trouvant à leur surface et selon l’orientation

de la division cellulaire, les divisions seront symétriques ou asymétriques afin d'établir différentes polarités dans les cellules filles subséquentes [19-21]. Les divisions asymétriques permettent aussi le début de la différenciation des cellules notamment en cellules du trophoctoderme qui formeront le placenta et les tissus extra-embryonnaires ainsi qu'en cellules de la masse interne qui est composée des cellules souches nécessaires au développement de l'embryon. Au stade de blastocyste, ces deux lignées cellulaires sont distinctes et une cavité de fluide est formée [22, 23]. Cette cavitation amniotique permet l'expansion du blastocyste pour que ce dernier puisse briser et sortir de la zone pellucide afin de débiter son implantation dans l'utérus [22] .

1.1.2 Vulnérabilité de la période préimplantatoire

Plusieurs études ont démontré que l'environnement maternel a une grande influence sur le devenir de l'enfant, et que la présence d'un environnement suboptimal ou néfaste peut augmenter les chances de développer des maladies (revu dans [24, 25]). Nous n'avons qu'à penser aux études épidémiologiques du Dr. David Barker, qui ont mené à l'élaboration de la théorie des origines développementales de la santé et maladie (DOHaD : *Developmental Origins of Health and Disease*). Entre autres, il a été démontré qu'une sous-nutrition pendant la gestation était un contributeur important du faible poids à la naissance et à l'origine précoce de troubles cardiaques et métaboliques à l'âge adulte due à une mauvaise programmation foetale [26-28]. Cependant, on connaît moins les effets d'un environnement maternel suboptimal (e.g., stress, nutrition, alcool, drogues) sur le jeune embryon lors de la période de préimplantation.

L'étude d'impacts environnementaux nocifs pendant la période préimplantatoire a longtemps été ignorée puisqu'on pensait qu'un embryon ayant subi une exposition lors de la préimplantation passait par un principe de tout ou rien; c'est-à-dire que l'embryon succomberait à l'exposition ou ne subirait aucun effet à long terme [29]. Cette idée a été depuis abandonnée puisque plusieurs études démontrent que même le contact avec les cellules de l'appareil reproducteur de la mère peut avoir un effet sur le développement de l'embryon notamment via des mécanismes épigénétiques dynamiques lors de cette période (revu dans [29]). Maintenant, un nombre d'études démontrent qu'un impact néfaste pendant la mise en place des profils épigénétiques de l'embryon peut mener à différents problèmes développementaux (revu dans [24, 25]). Par

exemples, des études *in vivo* chez la souris ont démontré qu'une exposition durant la préimplantation par des composés chimiques (e.g., bisphénol A (BPA), méthoxychlore) ou l'alcool éthylique pouvaient entraver le développement de l'embryon en causant, entre autres, des retards de croissance [8, 30, 31]. En effet, une exposition au BPA de 100mg/kg/jour de E0.5-E3.5 causaient un retard de développement et plusieurs embryons se retrouvaient aux stades de morula au lieu de blastocyste [30].

De plus, les technologies de reproduction assistée (e.g. fécondation *in vitro*, culture d'embryons *in vitro*, vitrification d'embryons) sont de bons exemples pour démontrer la vulnérabilité de l'embryon durant la période préimplantatoire. Bien que la plupart des enfants issus de la reproduction assistée sont en santé, ces techniques sont associées à un risque plus élevé de prééclampsie, d'une restriction de croissance intra-utérine, de défauts à la naissance [32-35] et des troubles de l'empreinte génomique [36, 37]. Une étude a d'ailleurs démontré que ces technologies augmentaient l'incidence de 4 types de désordres de l'empreinte chez l'humain soient les syndromes de Beckwith-Wiedemann, Angelman, Prader-Willi et Silver-Russel [38]. Plusieurs ont émis l'hypothèse que le maintien de la méthylation d'ADN sur les régions associées à ces syndromes peut être affecté à la suite des manipulations *in vitro*. Au cours des dernières décennies, les technologies de reproduction assistée ont beaucoup évolué et, à ce jour, il ne semble toujours pas y avoir de protocole standard à travers les cliniques, ou en recherche. En effet, au tout début de la culture des embryons *in vitro*, les laboratoires utilisaient un niveau d'oxygène de 20% jusqu'à ce que des études démontrent que le niveau d'oxygène dans l'appareil reproducteur de la femme était inférieur soit entre 2% et 8% et semblait plus optimal entre 5-7% puisqu'une plus grande proportion d'embryons atteignait le stade de blastocyste [39, 40]. La concentration d'oxygène dans le milieu de l'embryon est importante puisqu'elle régule des événements du développement préimplantatoire de l'embryon et une concentration trop élevée peut arrêter le développement de l'embryon en plus d'affecter la transcriptomique et l'épigénomique via le stress oxydatif (revu dans [40-44]). Les composants des milieux de culture pour la culture *in vitro* d'embryons ont aussi beaucoup changé avec le temps. Par exemple, l'utilisation de sérum ou de milieux de culture utilisés pour les tissus a cessé après que des études ont démontré qu'ils avaient des effets néfastes au niveau de la morphologie et du métabolisme

de l'embryon (e.g. production excessive de lactate, dégénération de la mitochondrie, syndrome du gros veau (*Large offspring syndrome*) [45]. Cependant, les milieux de culture présentent encore des manques ou des excès de facteurs clés et de métabolites comparativement aux fluides de l'environnement maternel. Une étude a démontré que les milieux actuels avaient tous un effet variable sur la méthylation des régions à empreintes des embryons tels que *H19*, *Peg3* et *Snrpn*. Cependant, certains milieux arrivaient à mieux maintenir la méthylation [36]. Une autre étude a ajouté des fluides de l'appareil reproducteur de la mère au milieu de culture et ont démontré qu'avec cette addition au milieu de culture, les embryons avaient moins d'anomalies morphologiques, épigénétiques et transcriptomiques [46]. Ce qui démontre de surcroît la vulnérabilité de l'embryon durant la période préimplantatoire et l'importance que l'environnement possède tous les nutriments et facteurs de croissances nécessaires à un développement sain. De plus, une étude chez la souris a montré que la cryopréservation des embryons par vitrification était associée à des altérations épigénétiques. Une baisse de la méthylation a été observé au niveau de certains gènes à empreinte maternelle, ce qui a augmenté leur expression et favorisé la restriction de croissance de l'embryon [47]. Comme il est possible que plusieurs techniques de reproduction soient utilisées, cela apporte des questionnements par rapport aux possibles effets cumulatifs de diverses techniques. La sévérité de l'impact dépendra du type de techniques utilisées, du stade embryonnaire où ces techniques sont effectuées ainsi que du nombre de cellules affectées.

Le placenta et son développement peut aussi être affecté à la suite d'une exposition pendant la période préimplantatoire puisque les cellules du trophoctoderme proviennent des blastomères présents dans l'embryon préimplantatoire. Il a même été démontré que les tissus du trophoctoderme étaient plus sensibles aux perturbations et subissaient une perte plus importante de méthylation que les tissus de l'embryon après l'utilisation de techniques de reproduction assistée (revu dans [24, 48, 49]). Une mauvaise fonction placentaire peut aussi mener à des conséquences négatives sur l'embryon puisque le placenta est un intermédiaire essentiel entre l'embryon et la mère. Toutefois, pour mon projet je me suis uniquement concentrée sur le développement de l'embryon.

1.1.3 Reprogrammation de la méthylation de l'ADN chez l'embryon préimplantatoire

Un des facteurs qui joue un rôle clé dans la vulnérabilité du jeune embryon préimplantatoire est notamment dû à une vague de reprogrammation dynamique qui remodèle les profils de méthylation de l'ADN sur le génome embryonnaire (Figure 2). Avant de discuter de ce processus dynamique, je ferai un bref rappel des modifications épigénétiques et plus particulièrement de la méthylation de l'ADN.

1.1.3.1 Les enzymes impliquées dans la méthylation de l'ADN

Une des modifications épigénétiques la plus étudiée et la mieux comprise est la méthylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN est effectuée par les ADN méthyltransférases (DNMTs) qui ajoutent un groupement méthyle (CH₃) sur les cytosines principalement dans un contexte de dinucléotides cytosine-phosphate-guanine (CpG) [50, 51]. La méthylation de l'ADN joue un rôle important dans la répression de la transcription des gènes. Elle est essentielle à différents processus physiologiques tels que l'empreinte génomique, l'inactivation des éléments transposables et l'inactivation du chromosome X [52, 53].

Les enzymes responsables de la méthylation *de novo* de l'ADN sont DNMT3A et DNMT3B. Elles permettent donc d'établir les nouveaux profils de méthylation menant à la détermination des lignées cellulaires de l'embryon et sont notamment responsables de l'établissement des profils de méthylation au niveau des gènes à empreinte dans les gamètes [50, 54, 55]. Pour que leur activité soit optimale, DNMT3A et DNMT3B requièrent la présence de DNMT3L (DNA methyltransferase-like) qui est similaire aux DNMTs, mais qui ne possède pas de fonction enzymatique [56]. L'enzyme DNMT1 permet l'héritabilité de la méthylation en maintenant celle-ci lors des divisions cellulaires [51]. Celle-ci agit lors des divisions cellulaires, car elle préfère des substrats hémi-méthylés qui sont présents durant ce processus cellulaire puisque seulement le brin parental est méthylé lors de la réplication de l'ADN. L'enzyme DNMT1 est aussi essentielle au maintien de la méthylation des gènes à empreintes qui permettent le développement normal de l'embryon lors de la reprogrammation de l'épigénome [51].

La méthylation de l'ADN est très stable, mais reste un processus dynamique sensible à son environnement lors des différentes périodes du développement afin de réguler l'expression des gènes y étant associés. Il est donc parfois nécessaire de retirer la méthylation afin de permettre l'expression de certains gènes. La déméthylation de l'ADN ne peut se faire directement et se fera donc de manière passive ou active. La déméthylation passive est due à une baisse de l'activité de DNMT1 causant la perte de la méthylation dans les divisions cellulaires subséquentes [57, 58]. La déméthylation active, quant à elle, sera conduite par des enzymes qui vont modifier les groupements méthyles présents sur les cytosines. Celles-ci sont les enzymes *ten-eleven translocation* (TET1, TET2, TET3) qui sont des dioxygénases [59]. Elles agissent en convertissant une 5-méthylcytosine (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) par oxydation, la cytosine n'est donc plus reconnue comme méthylée et il y aura une déméthylation passive lors des divisions cellulaires subséquentes [59-61]. Les enzymes TET possède aussi un mécanisme de déméthylation active qui permet de convertir une 5mC en 5-formylcytosine (5fC), puis en 5-carboxylcytosine (5caC) et celles-ci peuvent être excisées par le mécanisme d'excision de base médié par la thymine-DNA glycosylase (TDG) [62, 63].

Il y a 20-30 millions, dépendamment de l'espèce, de sites CpGs répartis à travers le génome, et ceux-ci auront des effets différents selon leur localisation (e.g., enhancers, promoteurs, corps du gène). Plusieurs études démontrent que la méthylation localisée dans le corps du gène (e.g. exons, introns) représente des gènes activement transcrits tandis que la méthylation au niveau des promoteurs est associée à une répression des gènes [64, 65]. Chez les mammifères, les promoteurs contenant des îlots CpG (c.-à.-d. des régions ayant une plus grande densité de CpGs) contrôlent l'expression de 60-80% des gènes selon l'espèce [66, 67]. Il a été observé que la méthylation au niveau des promoteurs contenant un îlot CpG réprime l'expression des gènes en empêchant le recrutement de la machinerie de transcription, tout en recrutant des complexes qui viendront fortifier l'environnement répressif. Inversement, lorsque la méthylation est absente à ces promoteurs, la chromatine devient accessible et une activation de la transcription est observée [68-71].

1.1.3.2 La vague de reprogrammation

Avant la fécondation, les cellules germinales mâle (spermatozoïde) et femelle (ovocyte) sont essentiellement dépourvues de méthylation d'ADN et acquièrent leurs profils au cours de leur maturation et de leur développement. Au final, le spermatozoïde a un pourcentage de CpGs méthylés d'environ 85%, contrairement à 30% pour l'ovocyte [72]. Après la fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde, les génomes parentaux du zygote subissent une vague de déméthylation à l'exception des régions différenciellement méthylées du génome (Figure 2, [52, 53]). Le génome paternel provenant du spermatozoïde est d'abord déméthylé activement par TET3 durant les premières heures suivant la fécondation, puis passivement à partir de la première division mitotique tandis que le génome maternel conserve sa méthylation jusqu'à la première division cellulaire pour être ensuite déméthylé passivement. Cette déméthylation va se poursuivre pour les deux génomes parentaux jusqu'à l'implantation de l'embryon (humain: E7.0, souris: E4.0) [73-77]. Cette reprogrammation épigénétique est nécessaire pour que l'embryon puisse acquérir l'expression de transcrits à partir de son propre génome ainsi qu'à réguler l'expression spécifique des gènes impliqués dans son développement.

Lors de cette perte globale de la méthylation de l'ADN, certaines régions du génome doivent protéger et maintenir leurs profils de méthylation. Parmi ces régions, on retrouve les gènes à empreintes, les gènes agissant comme les gènes à empreinte (*imprinted-like*) ainsi que les rétrotransposons [54, 80, 81]. Les gènes à empreinte sont exprimés de façon monoallélique, selon l'origine parentale, et doivent garder cette différence de méthylation pour continuer d'exprimer un seul allèle. Les gènes à empreinte sont nécessaires afin de réguler la croissance de l'embryon et du placenta, la différenciation somatique ainsi que les fonctions cérébrales de l'enfant tout au long de sa vie [82-85]. Une mauvaise maintenance de méthylation sur les régions de contrôle de l'empreinte (ICR) lors de la vague de reprogrammation peut mener à divers désordres tels que les syndromes d'Angelman (gène affecté: *UBE3A*) et de Prader-Willi (gène affecté: *SNRPN*) qui causent notamment des retards intellectuels et de développement chez l'humain [86]. La méthylation de ces régions est maintenue par des isoformes de l'enzyme DNMT1 soit DNMT1s (somatique) et DNMT1o (ovocyte) [87-91]. Lors du stade 8-cellules, c'est l'isoforme DNMT1o qui est présent et qui maintient la méthylation. La perte de DNMT1o ou une altération de son activité

entraînent des anomalies du placenta et des anomalies au cerveau causant la mort de l'embryon [90, 91]. Il est donc essentiel durant les premiers jours de l'embryon que ces régions, régulées par la méthylation d'ADN, établissent de façon adéquate leurs profils dans les gamètes et maintiennent ces profils de méthylation au cours de la vague de reprogrammation afin d'assurer un développement normal.

Après l'implantation de l'embryon, les enzymes DNMT3A et DNMT3B vont progressivement remétyler le génome de l'embryon (Figure 2). L'apposition de la méthylation se fait de manière spécifique au sexe, aux types de cellules et de tissus composant l'organisme [78]. Les cellules de la masse cellulaire interne (futur embryon) subissent plus de méthylation de novo que les cellules du trophoctoderme (futur placenta) qui auront un niveau plus bas de méthylation [79]. Parmi les premières régions à être reméthylées, il y a les promoteurs pauvres en CpGs, les CpGs du corps du gène ainsi que ceux des éléments transposables. Les promoteurs riches en CpG sont encore protégés de la méthylation, mais rapidement les niveaux de méthylation augmentent à environ 50% aux stades E4.5 et E5.5 chez la souris [50]. Le processus de reméthylation s'effectue donc plutôt rapidement même s'il est progressif. Au stade E8.5, environ 79% des îlots CpG méthylés sont reliés à des gènes germinaux chez la souris. Les CpGs méthylés se trouvant dans les exons étaient dans des gènes qui agissaient dans l'embryogenèse et la gastrulation. La méthylation de ces régions persiste jusqu'à l'âge adulte, ce qui montre que la méthylation de l'ADN est stable après l'implantation. Ces processus épigénétiques sont encore peu compris malgré les nombreuses études effectuées. Néanmoins, il y a une évidence que ces processus peuvent avoir un impact important sur le développement embryonnaire dû à leur sensibilité à l'environnement et aux diverses perturbations potentielles particulièrement lors de la période de préimplantation [23].

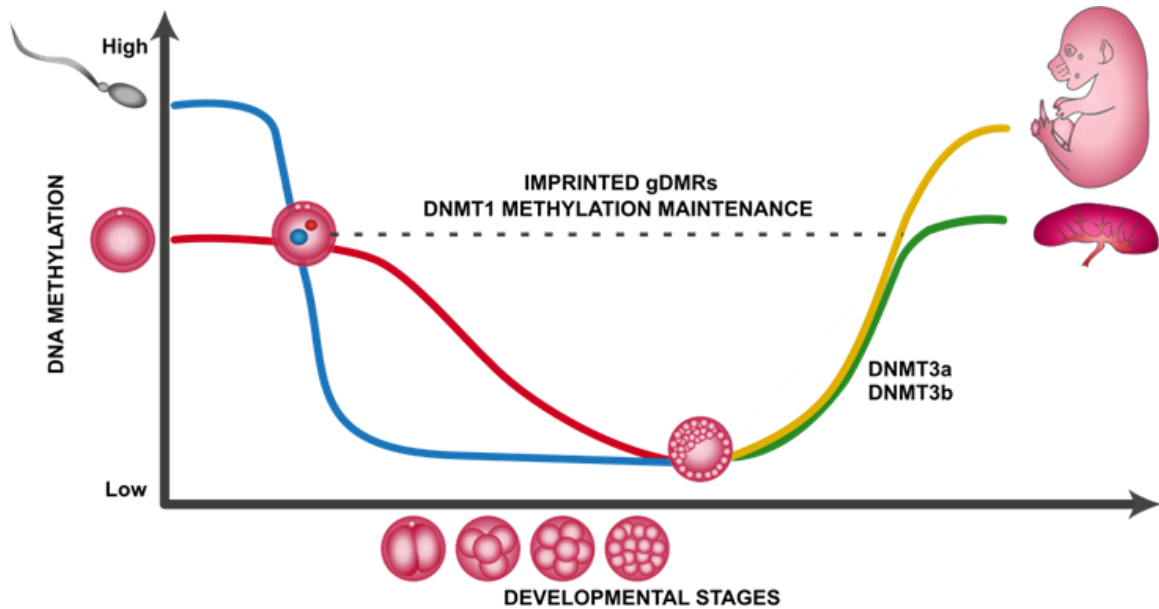


Figure 2. – **Vague de reprogrammation épigénétique.** Après la fécondation, il y a une perte globale de la méthylation à travers le génome (ligne bleue – allèle paternel, ligne rouge – allèle maternel) à l'exception des gènes à empreinte qui sont maintenus par DNMT1 (ligne pointillée). La méthylation est ensuite remise après l'implantation de l'embryon par les enzymes DNMT3A et DNMT3B (ligne jaune – embryon, ligne verte – placenta). [74]

1.2 Exposition prénatale à l'alcool et troubles du spectre de l'alcoolisation fœtale

Un des facteurs de l'environnement maternel connu pour son effet néfaste durant la grossesse sur le développement de l'embryon est l'alcool. Celui-ci peut agir en tant que tératogène, mais aussi comme neurotoxine en causant la mort cellulaire ainsi qu'en perturbant les processus de différenciation et de prolifération [92-94]. L'alcool peut aussi nuire à la méthylation via l'action des DNMTs et le cycle du folate. L'éthanol est dégradé en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase (ADH) et le cytochrome p450 2e1 [95]. L'acétaldéhyde est le principal métabolite de la dégradation de l'éthanol et il a été démontré que c'était celui avec le plus grand impact sur la méthylation de l'ADN [96]. De plus, le métabolisme de l'éthanol peut générer plusieurs types d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) causant un stress oxydatif qui peut affecter, entre autres, les enzymes du métabolisme du carbone (1C) [95, 97]. En termes de neurotoxicité, certains

modèles ont démontré que plusieurs processus impliqués dans le développement du cerveau (e.g. neurogenèse, migration des cellules, adhésion des cellules, croissance des axones, formation des synapses) étaient affectés et un modèle en particulier a montré que l'éthanol pouvait réduire le nombre de neurones ainsi que la densité des épines dendritiques dans l'hippocampe concordant avec les troubles d'apprentissage et de mémoire (revu dans [98]). De nombreuses études ont démontré que l'alcool en fortes doses ou en doses chroniques durant la grossesse peut avoir un impact néfaste sur l'embryon (revu dans [25]), mais nous en connaissons très peu sur une exposition unique de type *binge drinking* durant la préimplantation et comment celle-ci peut contribuer aux troubles du spectre de l'alcoolisation foétale.

1.2.1 Troubles du spectre de l'alcoolisation foétale

Chaque année, ce sont 600 000 à 1 millions d'enfants qui naissent avec les troubles du spectre de l'alcoolisation foétale (TSAF). Les TSAF est un terme utilisé pour désigner les divers problèmes cognitifs et physiques causés par la prise maternelle d'alcool durant la grossesse. Selon la dose et le moment d'exposition, il est possible que les enfants ne soient pas atteints de troubles physiques (e.g. malformations crâniofaciales, retard de croissance intra-utérin, défauts des structures cérébrales), mais qu'ils présentent tout de même des troubles neurodéveloppementaux tels qu'une déficience intellectuelle pouvant aller de faible à sévère et des problèmes d'apprentissage [99-102]. On estime que ce sont 3-5% des enfants qui sont affectés par un des phénotypes du TSAF dans la population nord-américaine [103]. La plupart des enfants (90%) avec TSAF vont avoir des symptômes dit « invisibles » tels qu'une déficience intellectuelle légère, des troubles du comportement (e.g. Trouble du Déficit de l'Attention avec/sans Hyperactivité (TDAH)) et de la mémoire [104-108]. Ces problèmes seront généralement détectés plus tard dans le développement de l'enfant notamment lorsque ce dernier éprouve des difficultés scolaires (e.g. troubles du comportement, déficit d'attention, difficultés d'apprentissage). Les enfants atteints de TSAF ont aussi souvent des problèmes de régulation de l'émotion et plus de chances de développer des maladies mentales. Dans une étude analysant une banque de données canadienne de personnes avec un diagnostic TSAF, presque la moitié des personnes atteintes présentaient un trouble de régulation de l'émotion. Ces personnes avaient aussi plus de chance de présenter un diagnostic de troubles du comportement, de l'attachement

ou de stress post-traumatique que ceux sans problème de régulation de l'émotion. Ils étaient aussi plus enclins à avoir un historique de tentatives de suicide [109].

Étant donné la variabilité des phénotypes et le manque d'outils pour donner un diagnostic approprié, les TSAF sont souvent sous-diagnostiqués [110]. Il n'y a d'ailleurs pas de diagnostic moléculaire (e.g. biomarqueurs, analyses génomiques/épigénomiques) pour les enfants atteints de TSAF, mais les modifications épigénétiques sont explorés comme potentiels biomarqueurs. En effet, deux études canadiennes ont été effectuées à partir de cellules épithéliales buccales de cohortes d'enfants atteints de TSAF et quelques centaines de CpG différenciellement méthylés ont été observés. Dans l'une des études, certaines altérations de la méthylation de l'ADN étaient aussi retrouvées dans le cerveau de leur modèle murin d'exposition prénatale à l'alcool [111, 112]. Cependant, les modifications épigénétiques comportent encore beaucoup de limitations puisqu'elles sont spécifiques à un tissu, elles vont dépendre des circonstances de l'exposition ainsi que des autres facteurs environnementaux de la mère (e.g. nutrition, mode de vie, expositions aux drogues ou contaminants) [113]. Donc, il est difficile de développer un seul marqueur pour les TSAF.

Chez les individus avec TSAF, la majorité des symptômes observés sont associés à l'effet néfaste de l'alcool sur le développement du cerveau qui mène à un dysfonctionnement cérébral [114]. La forme la plus sévère de l'exposition à l'alcool est le syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF) et représentent 10% des enfants touchés par les TSAF. Les enfants affectés ont des anomalies morphologiques notamment au niveau crâniofacial (e.g. une fente palpébrale plus petite, une hypoplasie du nez, une lèvre supérieure très fine, un philtrum hypoplasique) [104, 115]. Ils sont aussi atteints de déficience intellectuelle sévère et des retards de croissance importants [104-108]. Plusieurs études démontrent que les phénotypes associés aux TSAF proviendraient surtout du cerveau antérieur, composé de neurones GABAergiques, cholinergiques, glutamatergiques ainsi que des interneurones GABAergiques [116-121], car il est associé à différents gènes impliqués dans la neurodégénération et serait aussi impliqué dans les phénotypes autistiques observés chez certains enfants atteints [122, 123]. De plus, le cerveau antérieur est adjacent aux tissus qui formeront une partie du visage comme le front, le nez et le philtrum qui sont particulièrement affectés chez les enfants atteints du SAF [124].

Les TSAF présentent un vaste éventail de phénotypes et cette variabilité s'explique par différents facteurs comme le moment de l'exposition durant le développement, la durée de l'exposition, la fréquence de l'exposition, les niveaux d'alcool dans le sang lors de l'exposition ainsi que le statut nutritionnel de la mère [125]. Un facteur important est le taux d'alcool dans le sang de la mère, car une seule dose très élevée d'alcool ($\geq 200\text{mg/dL}$) peut être plus dommageable pour le cerveau de l'embryon en développement qu'une exposition répétée avec un taux faible ($\leq 100\text{mg/dL}$) par exemple (Tableau 1, [126, 127]). En effet, les hauts taux d'alcool dans le sang peuvent augmenter la neurotoxicité même avec une seule dose administrée durant le développement du cerveau tel que démontré dans une étude où 2 x 2,8g/kg d'éthanol a été donné à des femelles gestantes au jour embryonnaire 8 (E8.0) causant des anomalies structurales du cerveau (e.g. réduction du volume de certaines régions du cerveau) [128]. Dans une étude, une exposition de 5,0g/kg au jour post natal 7 (P7), qui correspond au troisième trimestre pour le développement du cerveau humain chez le modèle murin, diminuait la neurogenèse dans l'hippocampe du cerveau adulte [129]. Chez l'humain, une étude a démontré qu'il y avait plus d'enfants qui présentaient des déficits fonctionnels (e.g. vitesse de traitement, motricité fine, coordination préhensile) dont les mères avaient un ou deux épisodes de *binge drinking* (plus de 5 verres) par semaine durant leur grossesse que celles buvant plus fréquemment avec une moyenne de consommation de 1-4 verres (revu dans [127, 130]). De plus, les déficiences nutritionnelles de la mère (e.g. folate) vont exacerber l'effet de l'alcool sur le développement de l'embryon [131-133]. En effet, des études démontrent qu'il y a une augmentation de résorption et que les embryons subissent une baisse de poids, plus de malformations et plus d'hyperactivité avec des déficiences en zinc ou choline comparativement aux groupes exposés à l'alcool sans déficience [131, 132]. Il est donc essentiel d'étudier les différents moments et types d'exposition afin de mieux comprendre les mécanismes entourant une exposition prénatale à l'alcool.

Tableau 1. – Exemples de concentration d'alcool dans le sang selon le niveau d'intoxication pour une femme de 55kg une heure après la consommation [134, 135].

Niveau d'intoxication	Nombre de verres pour une femme de 55kg	Concentration d'alcool dans le sang (mg/dL)
Faible	1-3	0-100
Moyen	3-7	100-200
Élevé	7-9	200-300
Très élevé	≥10	300-400
Potentiellement léthal	>10	>400

*La concentration moyenne de la dose de notre modèle (2 x 2,5g/kg d'éthanol à 2h d'intervalle) est de 158, 31 mg/dL (moyen), mais avec un pic de 284,00mg/dL (élevé) (voir section 2.1).

1.2.2 Modèles TSAF d'exposition prénatale à l'alcool durant la préimplantation

Les modèles TSAF *in vitro* et *in vivo* sont d'une importance capitale étant donné les limitations pratiques et éthiques des études sur des sujets humains afin de développer les connaissances sur comment l'exposition affecte le développement et les processus moléculaires impliqués, et comment il serait possible d'atténuer ou prévenir les effets de l'alcool. De plus, les modèles TSAF limitent la variabilité de l'environnement, ce qui permet de mieux déterminer l'impact de l'alcool seul sur le bébé en développement.

Pour modéliser les TSAF, certaines études se sont tournées vers des modèles *in vitro*. C'est le cas de Leach *et al.* qui ont exposé des embryons de souris aux stades 1-cellules, 2-cellules ou 4-cellules à l'éthanol durant 24h. Ils ont utilisé différentes doses soient 0.1%, 0.4% ou 1.6%. Ils ont remarqué qu'avec les deux plus fortes doses, il y avait une inhibition du développement ainsi

qu'un taux plus faible d'embryons atteignant le stade de blastocyste [136]. Dans une autre étude, ils ont testé différents types d'alcool avec des doses variant de 0,05% à 1%. À la suite d'une exposition au stade 2-cellules, ils ont remarqué que plus le pourcentage d'alcool était élevé, moins il y avait d'embryons capables de faire la transition au stade de blastocyste [137]. Similairement, une étude a démontré que les zygotes de porc exposés *in vitro* réussissaient plus difficilement à se rendre au stade de blastocyste. Ceux qui arrivaient au stade blastocyste avaient une expression anormale des gènes et avaient des problèmes au niveau de la mitochondrie [138].

D'autres études ont préféré utiliser des modèles *in vivo* pour observer l'effet de l'alcool sur les premiers stades des embryons. C'est le cas de Padmanabhan et Hameed qui ont exposé des embryons aux stades E2.0 et E6.0 à 0,03mL/g d'éthanol. Ils ont observé des retards de croissance importants à E14.0 ainsi qu'une baisse du poids des embryons pour les différents temps observés (E14.0; E16.0; E18.0) [139]. Un autre groupe a démontré qu'en plus d'une baisse de poids des embryons, il y avait une diminution de l'implantation des embryons lors d'une exposition à E3.0 et E4.0 ainsi que des retards de développement et des défauts morphologiques [140, 141]. Ces études démontrent que même si l'embryon n'est pas attaché à la mère, il peut être affecté par l'environnement maternel et la prise d'alcool va perturber le développement de l'embryon.

Une exposition à l'alcool durant la période préimplantatoire est donc néfaste pour le développement de l'embryon malgré qu'il ne soit pas encore en contact direct, via le site d'implantation ou le placenta, avec la mère. Étant donné que les enfants atteints de TSAF ont beaucoup de troubles neurodéveloppementaux, il serait particulièrement intéressant de voir l'effet de l'alcool durant la préimplantation sur le développement du cerveau.

1.2.3 Effet de l'alcool sur le développement du cerveau

Il est maintenant bien établi que l'alcool peut affecter directement le développement du cerveau. Cependant, l'effet d'une exposition sur le cerveau au tout début de la grossesse est encore peu caractérisé. Pourtant, le tout début de la grossesse est une période vulnérable aux expositions puisque cela peut prendre jusqu'à 6 semaines avant que les femmes découvrent qu'elles sont enceintes [142]. Cette période est une des plus importantes pour le développement de l'enfant

puisque c'est à ce moment que les cellules souches sont en croissance et que les lignées cellulaires se spécifient.

La première étape du développement du cerveau est la neurulation qui survient après la gastrulation. Lors de la gastrulation, les cellules souches vont se différencier en cellules neurales progénitrices qui vont former la plaque neurale (souris : E7.5; humain : E19). L'invagination de la plaque neurale va ensuite mener à la formation du tube neural (souris : E8.5; humain: E20-27). À la suite de la fermeture du tube neural, les cellules progénitrices neurales vont former une couche au centre du tube. Par la suite, les structures précurseurs (c.-à-d. prosencéphale, mésencéphale et rhombencéphale) du cerveau commencent à se former (souris : E9.5; humain : E28). Pendant ce temps, une organisation neurale s'effectue afin de dicter aux stades ultérieurs quel type de cellules neurales doit être exprimé et se termine dans la 8^e semaine de grossesse chez l'humain. À partir de la 6^e semaine de grossesse (souris : E12.0; humain : E42), la production de neurones commencent et débutent leur migration vers le cortex où, une fois établis, ils commenceront leur différenciation en différents types de neurones. La neurogenèse du cortex se termine vers la 15^e semaine de grossesse chez l'humain (E108) et à la naissance pour la souris. Le cerveau va d'ailleurs continuer de se développer même après la naissance chez les deux espèces. De plus, le développement du cerveau qui survient durant le troisième trimestre chez l'humain se fera après la naissance chez la souris [143-146]. C'est pourquoi certaines études sur l'alcool se font à des stades postnataux chez la souris.

1.2.3.1 Effets directs sur le développement du cerveau

Dans des modèles animaux, il a été observé que les malformations crâniofaciales, perçus chez les enfants atteints du SAF, survenaient lorsque l'exposition à l'alcool avait lieu dans ce qui correspond au premier trimestre chez l'humain [147, 148]. Alors qu'une exposition dans les autres trimestres engendrait plutôt une perte neuronale [149].

Vers la fin de la gastrulation et le début de la neurulation chez la souris (E7.0), il a été démontré qu'une exposition de 2 x 2,9g/kg (~440mg/dL) d'éthanol pouvait mener à des holoprosencéphalies ainsi que des dysplasies corticales (c.-à-d. irrégularités sur la surface cérébrale corticale) dans les embryons E17.0 [150]. Dans un modèle similaire, les résultats

suggéraient une perte de myéline durant le développement ce qui pourrait influencer la conduction des influx nerveux [151]. Dans un stade plus avancé de la neurulation, les souris exposées (injections) à E9.0 avec la même dose que les études précédentes ont aussi démontré une morphologie anormale au niveau du cortex cérébral, de l'hippocampe et du striatum droit [152]. Lors d'une exposition chronique de E0.0-E8.5 (10% v/v éthanol), ils ont observé que les embryons présentaient des microcéphalies ainsi que des malformations crâniofaciales typiques de ce qui est observé chez les enfants SAF [147]. Une autre étude d'exposition chronique à l'éthanol de E0.0-E19.0 a démontré qu'il y avait des altérations dans l'établissement des interactions intranéocorticales et l'expression de gènes impliqués dans le développement du néocortex. Les souris exposées avant la naissance présentaient plus d'anxiété en plus d'une coordination motrice et une intégration sensorimotrice réduite [153]. Dans un modèle d'exposition (2 x 2,5g/kg éthanol à P7.0) correspondant au troisième trimestre chez l'humain, les souris exposées présentaient une réduction du volume du cerveau en plus d'une perte d'interneurones et de neurones à l'âge adulte [154]. Ce qui démontre que l'alcool induit des changements qui persistent dans le temps.

1.2.3.2 Effets indirects sur le développement du cerveau

Plusieurs études *in vitro* ont démontré qu'une exposition tôt dans le développement des embryons pouvaient affecter les cellules souches embryonnaires (revu dans [155]). Des études ont d'ailleurs démontré qu'une exposition à l'alcool juste avant la différenciation menait à une altération de l'expression de facteurs de transcription (e.g., *Sox2*, *Oct4*, *Nanog*) qui dictent les lignées cellulaires et le phénotype de différenciation des cellules en cellules souches neurales était changé [156, 157].

Une étude *in vivo* réalisée chez la souris par Padmanabhan et Hameed (1988) a démontré que, lorsque les mères recevaient une seule dose de 5.9g/kg d'éthanol durant l'un des 6 premiers jours (E1-E6) post-fécondation, l'embryon E15.0 démontrait une diminution de poids. Ces 6 premiers jours incluent la présence de cellules embryonnaires totipotentes et pluripotentes, incluant celles présentes dans le blastocyste et dans l'embryon en processus d'implantation dans l'utérus. Bien que ces expositions soient avant la neurulation et le développement neural, ils ont démontré que le développement du cerveau était affecté. En effet,

à E2.0 ou E3.0, des fortes doses uniques de 3.9g/kg ou 5.9g/kg causaient une dilatation des ventricules du cerveau et une diminution de l'épaisseur corticale (9-11% à E2.0 et 25-51%) à E3.0 [139]. Donc, ces expériences suggéraient pour une première fois qu'une exposition importante à l'alcool éthylique dans les premiers jours de la grossesse peut avoir un impact négatif sur le développement du cerveau. Cet impact pourrait être causé, entre autres, par un mauvais établissement des modifications épigénétiques causant un développement erroné des structures du cerveau par la dérégulation de la différenciation des cellules neurales et de l'expression des gènes neuraux (revu dans [155])

1.2.3 Effet de l'alcool sur l'épigénétique durant le développement embryonnaire

Les modifications épigénétiques sont l'une des principales composantes dans la régulation de l'expression génique et joue un rôle clé durant le développement du jeune embryon. Celle-ci permet de réguler de façon dynamique l'expression des gènes par, entre autres, l'ajout de modifications chimiques sur le génome qui seront spécifiques à l'activation ou la répression des gènes. L'épigénome sert également d'intermédiaire entre l'environnement et le génome afin de moduler l'expression des gènes. La régulation de la transcription joue un rôle important durant le développement embryonnaire puisque divers mécanismes sont établis afin d'assurer la spécification de différentes lignées cellulaires. Il est donc capital que les modifications épigénétiques soient établies de façon précise puisqu'un dérèglement pourrait créer un déséquilibre dans les marques actives et répressives de l'expression des gènes et affecter les processus de différenciation cellulaire essentiels au développement normal de l'enfant. Plusieurs études ont démontré que l'alcool peut interférer avec les différents processus épigénétiques soient les modifications d'histones, les micros-ARNs et la méthylation de l'ADN [96, 158-169]. L'impact de l'alcool sur ces processus durant le développement embryonnaire sera discuté plus en détails dans les prochaines sous-sections.

1.2.4.1 Effet de l'alcool sur les modifications d'histones

Les modifications d'histones ont aussi un rôle important à jouer dans la régulation de l'expression des gènes. Ces modifications (e.g. acétylation, phosphorylation, méthylation) apposées sur les

queues N-terminale des histones sont très différentes en termes de groupements chimiques, mais également en termes de fonctions (e.g., activatrice, répressive) et de localisation sur le génome (e.g., promoteur, région intergénique, corps du gène) [170]. Comme les histones peuvent être méthylées, elles sont aussi dépendantes des mêmes donneurs de groupements méthyles que l'on observe dans le processus de la méthylation de l'ADN et donc sensibles à une exposition prénatale à l'alcool. Une étude a démontré qu'en plus d'avoir un effet sur les groupements méthyles, et donc la méthylation, la présence d'alcool pourrait augmenter l'apport en groupements acétyles [171]. En plus de pouvoir affecter l'apposition normale des marques d'histones, l'exposition prénatale à l'alcool peut aussi influencer l'activité des différentes enzymes permettant l'ajout ou le retrait des différentes marques d'histones.

Peu d'études se concentrent sur l'effet de l'alcool sur les modifications d'histones durant les premiers jours de la grossesse. Cependant, une étude a démontré que lors d'une exposition périconceptionnelle (4 jours préconception et 4 jours de gestation) l'expression de l'histone déacétylase *Hdac2* était augmentée dans l'hippocampe des mâles à 18 mois d'âge chez le rat [162]. Ce qui suggère qu'une exposition tôt durant la grossesse peut avoir des effets à long terme sur l'acétylation des histones. Lorsque l'exposition survient plus tard, au jour P7, une augmentation de l'expression de *G9a*, qui est responsable de la mono- et diméthylation des résidus lysine 9 et 27 de l'histone H3, a été observé suivi d'une augmentation des marques H3K9me2 et H3K27me2 [167]. Dans une autre étude, ils ont remarqué globalement une diminution de H3K27ac et une augmentation de H3K4me3 dans l'hippocampe des souris à P70 suivant une exposition néonatale aiguë [158]. Une étude plus récente a démontré qu'à la suite d'une dose aiguë d'alcool éthylique à P7 chez la souris entraînait une augmentation de H3K4me3 total ainsi que l'expression de *Kmt2e* (lysine méthyltransférase 2E), qui joue un rôle dans la régulation de la transcription, dans le cortex et le cérébellum [165]. Encore une fois, nous remarquons à travers ces études que la période de développement et le niveau d'exposition à l'alcool influence grandement le phénotype moléculaire observé.

Certains modèles *in vitro* sont aussi utilisés pour démontrer l'effet d'une exposition prénatale à l'alcool sur les modifications d'histones. Par exemple, un groupe de recherche a utilisé des neurosphères faites à partir de cellules souches du cerveau d'embryons de souris à E12.5 et ces

neurosphères ont été exposés à l'EtOH durant 5 jours. Ils ont observé une réduction des niveaux de H3K4me3 et H3K27me3 dans les promoteurs de gènes impliqués dans la régulation de cellules souches neurales et des gènes développementaux Hox. Ils ont aussi observé une diminution de la marque H3K27me3 dans les transposons [169].

Donc il est évident que peu importe le stade d'exposition, les modifications d'histones peuvent être affectées et ce, de manière permanente. Les marques d'histones sont essentielles à chaque stade du développement afin d'assurer la régulation de l'expression des gènes. Ces altérations des marques d'histones peuvent avoir un impact sur la pluripotence des cellules, la morphologie du corps (e.g. régulation des gènes HOX), la différenciation des lignées cellulaires ainsi que l'organogenèse [172]).

1.2.4.2 Effet de l'alcool sur les micro-ARNs

Les micro-ARNs sont aussi impliqués dans la régulation de l'expression génique et est un autre mécanisme pouvant expliquer les effets d'une exposition prénatale à l'alcool. D'ailleurs, il a été démontré que l'alcool pouvait perturber les micro-ARNs dans le cerveau en développement causant des anomalies morphologiques et structurales ainsi que des troubles du comportement (revu dans [173]).

Parmi les micro-ARNs impliqués dans le développement du cerveau, miR-9 a été associé aux défauts crâniotaxiaux. Celui-ci participe entre autres dans les processus de prolifération des progéniteurs neuraux et la différenciation. Lors d'une exposition à l'alcool éthylique tôt dans le développement, il a été démontré que son expression était diminuée dans des cellules neurales progénitrices chez la souris [174], mais aussi chez le poisson-zèbre [168, 175]. De plus, chez le poisson-zèbre, un knockdown de miR-9 causaient des défauts crâniotaxiaux similaires à ceux observés durant une exposition à l'alcool tel que la microcéphalie [175]. Une autre étude effectuée chez la souris a procédé à un double knockout de miR-9 et ils ont observé un amincissement de la plaque corticale. Ce qui est aussi observé dans les modèles murins d'exposition prénatale à l'alcool [176, 177].

Un autre micro-ARN impliqué dans le développement des neurones est miR-153. Son expression est aussi diminuée dans les progéniteurs neuraux suivant une exposition à l'alcool. MiR-153 cible

les facteurs nucléaires *NFIA* et *NFIB* qui sont impliqués dans la neurogenèse et la gliogenèse [177-181]. Lors de la perte de miR-153, l'expression de ces deux facteurs est augmentée causant une diminution des cellules progénitrices en favorisant la réponse des cellules aux cytokines gliogéniques. Donc, la maturation des cellules progénitrices se fait de façon prématurée et mène à un mauvais développement du cortex [181]. Il a aussi été observé que le changement d'expression de miR-153 dans un modèle d'exposition à l'alcool chez le poisson-zèbre causait des troubles du comportement telle que l'hyperactivité qui est aussi observé chez les enfants atteints de TSAF [168].

Plusieurs autres micro-ARNs sont affectés par une exposition à l'alcool, ce qui montre que ceux-ci sont aussi impliqués et peuvent expliquer en partie la tératogénicité de l'alcool. L'alcool affecte plusieurs mécanismes de régulation, ce qui témoigne de sa complexité et de la nécessité d'investiguer ces différents mécanismes.

1.2.4.3 Effet de l'alcool sur la méthylation de l'ADN

Tel que mentionné précédemment, la méthylation de l'ADN est un des mécanismes principaux de la régulation de l'expression génique. L'action des DNMTs et le cycle du folate sont essentiels pour l'ajout de groupements méthyles sur l'ADN. Cependant, il a été démontré qu'une exposition prénatale à l'alcool peut inhiber les DNMTs, réduire l'absorption du folate et inhiber certaines enzymes impliquées dans le cycle du folate. De plus, les ROS (espèces réactives de l'oxygène) générés par l'alcool peuvent aussi transformées les cytosines méthylées en hydroxyméthylcytosines qui est reconnu par les enzymes TETs qui s'occupent de la déméthylation de l'ADN [184].

Les premiers à montrer qu'une exposition prénatale à l'alcool éthylique durant la mi-gestation (E9.0-11.0) avait un effet sur l'épigénétique sont Garro *et al.* en 1991 (Tableau 2). Ils ont observé une perte globale de méthylation de l'ADN dans les embryons de souris à E11.0 qui était causée par une inhibition de l'activité des DNMTs. De plus, ils ont démontré que l'acétaldéhyde, qui est produit lors de la dégradation de l'éthanol, était la principale cause de ces effets [96]. Ces résultats ont mené au développement de différents modèles TSAF avec divers types d'exposition (e.g., chronique, *binge*) à différents stades de la grossesse. Dans ces différents modèles, une

augmentation et une perte de méthylation de l'ADN peuvent être observées, ce qui s'explique par le fait qu'une exposition à l'alcool peut soit induire via des mécanismes reliés au stress oxydatif [185, 186] ou inhiber l'activité des DNMTs via une action directe sur les DNMTs ou en agissant sur le métabolisme du carbone 1C [96, 184].

Lors d'expositions à l'alcool éthylique à P7 chez la souris, il a été démontré qu'à une dose élevée (~450mg/dL) les niveaux de DNMT1 et DNMT3A étaient plus faibles causant de l'hypométhylation, alors qu'avec une dose moins élevée (~200mg/dL) il y avait une augmentation de DNMT3A [164, 166]. Dans une étude avec une exposition à E8.25, une dose élevée d'alcool éthylique causait de l'hypométhylation de gènes à empreintes, de gènes impliqués dans le développement et dans les modifications d'histones chez les embryons à E10. Alors que dans une autre étude avec une dose chronique d'alcool éthylique (~120-160mg/dL) de E7 à E16, ils ont observé une augmentation globale des niveaux de 5mC et de 5hmC accompagnée d'une baisse de la prolifération et de la maturation des cellules de l'hippocampe [187]. Chez le rat, une exposition chronique débutant à E7.0 a causé une augmentation de l'expression de DNMT1, DNMT3B et MeCP2 dans l'hypophyse. Ils ont aussi observé une hyperméthylation au niveau des CpGs du promoteur du gène D2R (récepteur de la dopamine de type 2) [160]. Chez l'humain, un groupe de recherche a observé qu'une cohorte d'enfants atteint du SAF avaient une perte de méthylation au niveau des ICR des gènes *KvDMR1* et *PEG3* [163]. Ces études démontent que les différentes DNMTs sont sensibles à la présence d'alcool.

On en connaît encore très peu sur l'effet de l'alcool durant la préimplantation et son impact sur la méthylation à l'ADN, mais quelques études se sont concentrées sur cette période. Haycock et Ramsay ont démontré qu'une exposition à l'alcool éthylique de 2,9g/kg aux stades E1.5 et E2.5 causait des restrictions de croissance chez l'embryon à E10.5. De plus, ils ont détecté une baisse de méthylation de l'ADN sur l'allèle paternel du gène à empreinte *H19*, un régulateur négatif de croissance et de prolifération, dans le placenta de ces embryons. Ils suggèrent que cette perte de méthylation dans le placenta serait une cause possible des restrictions de croissance intra-utérines des placentas [161]. Dans un autre modèle animal (poisson médaka), après une exposition tôt dans le développement, l'expression de DNMT1 était réduite alors qu'il ne semblait pas y avoir de baisse d'expression pour DNMT3A et DNMT3B [159]. Cela démontre donc que la

fonction de DNMT1 peut être affectée, ce qui aura un impact considérable sur l'épigénome de l'embryon étant donné son rôle dans le maintien de la méthylation.

Pour étudier l'effet de l'alcool lors de la préimplantation, notre laboratoire a développé un modèle d'exposition prénatale à l'alcool à l'alcool éthylique de type *binge drinking* (consommation excessive) durant la préimplantation. Dans ce modèle, les souris gestantes sont exposées au stade E2.5 (8-cellules) à deux reprises avec 2,5g/kg d'éthanol à 2h d'intervalle par injection sous-cutanée. Cette exposition génère une concentration moyenne d'alcool dans le sang de 158,31 mg/dL durant une période de 4h avec un pic de 284,00 mg/dL 3h après la première injection. Nos données démontrent que cette exposition augmentait le nombre de défauts morphologiques (e.g., anomalies du cerveau, retards de croissance) observés au stade E10.5 en plus d'affecter la méthylation de l'ADN dans le cerveau antérieur. Une perte partielle de la maintenance de la méthylation au niveau des régions contrôles de l'empreinte ainsi qu'une altération de la méthylation *de novo* au niveau de régions impliquées dans le développement du cerveau antérieur ont été observées. Certaines des différences de méthylation observées étaient sexe-spécifiques, avec les mâles présentant un plus grand nombre de régions différentiellement méthylées ainsi que des changements plus importants dans le pourcentage de méthylation. Cependant, le mécanisme causant ces différences sexe-spécifiques reste encore inconnu. Ces résultats démontrent qu'une exposition à l'alcool éthylique durant la préimplantation peut quand même avoir un effet sur le développement du cerveau via ses profils de méthylation bien que l'exposition soit survenue avant le début de la neurulation et mener à des phénotypes associés aux TSAF [8].

Tableau 2. – Études de l'effet d'une exposition à l'alcool sur la méthylation de l'ADN à divers stades

Organisme modèle TSAF	Type d'exposition prénatale à l'alcool	Temps d'exposition	Stade étudié	Effets de l'exposition	Références
Médaka (Poisson)	300mM (milieu)	0-2 dpf	2-6 dpf	Réduction de l'expression de DNMT1 à 2dpf, malformations crâniofaciales et microcéphalies	[159]
Souris	2,9g/kg (gavage)	E1.5-E2.5	E10.5	Perte de méthylation du gène à empreinte H19 et restrictions de croissance au niveau de l'embryon et du placenta	[161]
Souris	2x 2.5g/kg (sous-cutané) 2h d'intervalle 284mg/dL après 3h	E2.5	E10.5	Augmentation des défauts morphologiques, altérations sexe-spécifiques de la méthylation de l'ADN de gènes à empreintes dans le cerveau antérieur	[8]
Souris	4% (v/v) (diète liquide) ~120-160mg/dL	E7-E16	E17	Augmentation de l'épaisseur du neuroépithélium et réduction de 5mC et 5hmC, augmentation de 5-mC et 5-hmC dans le champs ammonien, réduction de la prolifération et de la maturation des cellules de l'hippocampe	[187]
Rat	6,7%v/v (diète liquide) ~120-150mg/dL	E7-E21	P60-P90	Augmentation des niveaux d'ARNm de DNMT1, DNMT3B et MeCP2 dans l'hypophyse, hyperméthylation de CpGs au promoteur du gène D2R	[160]
Souris	88mM (milieu de culture) ~400 mg/dL	E8,25	~E10	Hyperméthylation de gènes du métabolisme et hypométhylation de gènes à empreintes, du développement et de la chromatine.	[188]
Souris	2x 3g/kg (gavage)	E9-E11	E11	Hypométhylation de l'ADN, inhibition des DNMTs	[96]

Tableau 2. – Études de l'effet d'une exposition à l'alcool sur la méthylation de l'ADN à divers stades (suite)

Organisme modèle TSAF	Type d'exposition prénatale à l'alcool	Temps d'exposition	Stade étudié	Effets de l'exposition	Références
Souris	2x 1.0g/kg (sous-cutané) 2h d'intervalle ~200mg/dL après 3h	P7	P7	Légère neurodégénérescence, augmentation de l'expression des protéines DNMT3A et MeCP2	[166]
Souris	2x 2.5g/kg (sous-cutané) 2h d'intervalle ~450mg/dL après 3h	P7	P7	Réduction de DNMT1 et DNMT3A causant de l'hypométhylation	[164]
Humain	Enfants diagnostiqués avec SAF	Variable	1-16 ans	Perte de méthylation au niveau des ICR des gènes <i>KvDMR1</i> et <i>PEG3</i> dans les cellules du sang et de la bouche	[163]

1.3 Impact d'une diète enrichie en donneurs de groupements méthyles

Il est bien établi que la nutrition maternelle a un impact significatif sur le développement de l'embryon et qu'une malnutrition seule peut entraîner divers troubles développementaux. La carence en folate est d'ailleurs bien connue pour causer des défauts du tube neural [189]. Le folate fait partie du métabolisme du carbone qui dépend de plusieurs nutriments dont les besoins maternels sont augmentés durant la grossesse et la lactation pour pourvoir aux besoins de l'embryon, mais aussi du placenta. Les carences alimentaires peuvent aussi causer l'altération des profils de méthylation (déficience en folate), de la différenciation des progéniteurs neuraux, des niveaux globaux de méthylation dans l'hippocampe et de la mémoire (déficience en choline) [190, 191]. Il a aussi été démontré que plusieurs femmes n'atteignent pas l'apport recommandé de plusieurs des nutriments impliqués dans le métabolisme du carbone et donc des donneurs de groupements méthyles, et ce, malgré la mise en place en 1998 au Canada, d'une politique d'enrichissement des farines en acide folique afin de réduire les malformations congénitales du tube neural (e.g. anencéphalie, spina bifida) dans la population [192-194]. La malnutrition peut aussi augmenter les effets néfastes de certaines expositions comme l'alcool qui réduit déjà l'absorption du folate par l'intestin et les reins [195, 196]. Le folate joue un rôle important dans la production de donneurs de groupements méthyles, ce qui indique que l'alimentation est un facteur clé de l'établissement normal des profils de méthylation et plus particulièrement pour le jeune embryon. Cependant, même si nous savons que les profils de méthylation sont altérés par l'alcool lors de la préimplantation, nous ne savons pas comment la nutrition de la mère peut atténuer ou exacerber ce type d'exposition. C'est pourquoi, dans mon projet, nous voulons tester si une diète enrichie en donneurs de groupements méthyles peut avoir un effet protecteur et diminuer l'impact d'une exposition à l'alcool éthylique sur le jeune embryon préimplantatoire. La diète que nous avons sélectionnée est enrichie en folate, choline, bêtaïne et vitamine B12 et leur importance dans le développement ainsi que la méthylation sera discutée plus en détails dans les prochaines sections.

1.3.1 Métabolisme du carbone (1C)

Le métabolisme du carbone est composé du cycle du folate, le cycle de la méthionine ainsi que la voie des DNMTs qui peuvent tous être affectés par l'alcool [97, 106]. Cette voie métabolique est donc dépendante de plusieurs nutriments (e.g. le folate, la choline, la bêtaïne et la vitamine B12). Dans le cycle du folate, le folate provenant de la diète est converti en dihydrofolate (DHF) puis en tétrahydrofolate (THF) par la dihydrofolate réductase. Le THF est ensuite transformé en 5,10-méthylèneTHF et sera rapidement converti en 5-méthylTHF par la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR). Le 5-méthylTHF peut être recyclé par la méthionine synthase (MTR ou MS) en THF à l'aide de son cofacteur (vitamine B12) tout en produisant de la méthionine à partir de l'homocystéine. La méthionine peut aussi être générée dans le foie en faisant la conversion de la bêtaïne, un produit dérivé de la choline, via la méthyltransférase bêtaïne-homocystéine (BHMT). La méthionine peut ensuite être utilisée dans le cycle de la méthionine afin de produire via l'enzyme méthionine adénosyltransférase (MAT) le donneur de groupement méthyle S-adénosylméthionine (SAM) et cette réaction est ATP-dépendante. SAM sera utilisé par les DNMTs pour les réactions de méthylation de l'ADN. Le 5,10-méthylèneTHF est aussi utilisé dans la voie de synthèse des pyrimidines (Figure 3, [97]).

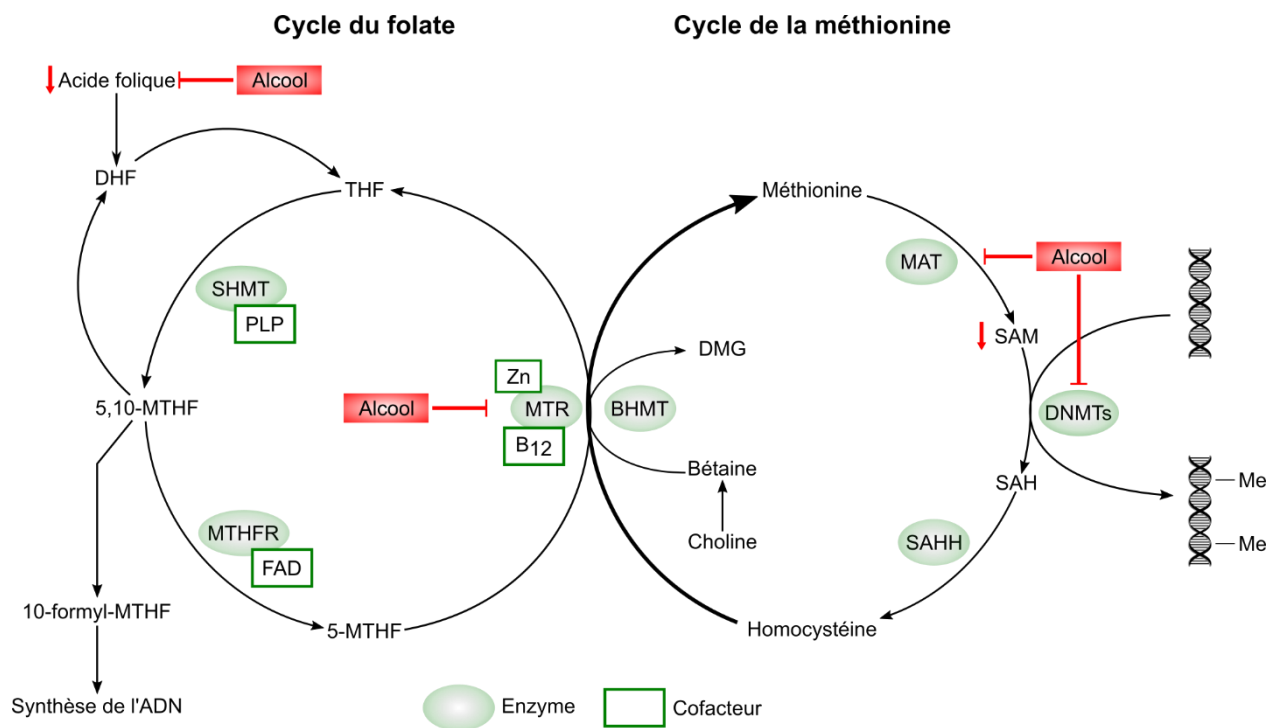


Figure 3. – **Métabolisme du carbone 1C et les cibles de l'alcool.** Le métabolisme du carbone 1C est composé du cycle du folate et du cycle de la méthionine. L'acide folique est converti après plusieurs étapes en méthionine, puis en S-adenosylméthionine qui va donner le groupement méthyle aux DNMTs. L'absorption du folate ainsi que les enzymes impliquées dans la formation de SAM ou de la méthylation de l'ADN sont des cibles de l'alcool.

1.3.2 Donneurs de groupements méthyles et développement

Le folate, la choline, la bétaine et la vitamine B12 sont essentiels pour le développement notamment au niveau du cerveau et malgré qu'ils participent dans des voies biochimiques différentes, ils participent tous dans le métabolisme du carbone 1C. Ce qui expliquerait leur importance dans la fermeture du tube neural et la neurogenèse dans le cerveau du jeune embryon [194, 197].

1.3.2.1 Folate

Le folate, également appelé acide folique ou vitamine B9, participe à la formation de donneurs de groupements méthyles, mais est aussi impliqué dans la biosynthèse des purines. À partir du THF et du formate, le 10-formylTHF est formé pour ensuite être utilisé dans la voie de synthèse

des purines [194]. Aussi, le folate peut promouvoir indirectement les activités antioxydantes [198]. Les carences en folate peuvent affecter l'embryon par la perturbation de la biosynthèse de l'ADN, l'accumulation de l'homocystéine à des niveaux nocifs ainsi que l'altération des réactions de méthylation [194].

Comme mentionné précédemment les carences en folate augmentent les risques de troubles neurodéveloppementaux, mais peut aussi causer de l'hypométhylation qui affectera l'expression des gènes [199]. Cependant, un excès peut aussi être défavorable pour le développement de l'embryon. Dans un modèle murin avec une supplémentation de 20mg/kg d'acide folique (10x l'apport recommandé), ils ont observé que cette supplémentation avait des effets délétères sur l'embryon causant des retards de croissance et des défauts au niveau du cœur [200]. Une autre étude a démontré que la même dose d'acide folique pouvait altérer le développement du cortex ainsi que le comportement des souriceaux [201]. Chez l'humain, certaines études suggèrent que la supplémentation en acide folique pourrait avoir un impact sur les risques d'asthme, de cancer, de résistance à l'insuline et des troubles du comportement [202]. Pour une femme enceinte, l'apport maximal tolérable en folate est de 1000µg/jour et la dose recommandée est de 600µg/jour [203]. Il est donc important de rester dans les limites recommandées afin de ne pas nuire au développement de l'embryon.

1.3.2.2 Choline, bêtaïne et vitamine B12

La choline est impliquée dans divers processus. Elle peut notamment être utilisée pour la formation de neurotransmetteurs (acétylcholine), pour la biosynthèse des membranes cellulaires (phosphatidylcholine, sphingomyéline) et dans la formation de donneurs de groupements méthyles. La choline joue un rôle important dans le développement du cerveau puisqu'elle est impliquée dans divers processus (e.g., prolifération et différenciation des cellules progénitrices, neurogenèse, gliogenèse, survie cellulaire, migration et plasticité synaptique). Il est notamment nécessaire au développement de l'hippocampe impliqué dans les fonctions d'apprentissage, de mémoire et d'attention (revu [204]). Lorsqu'elle est oxydée, la choline permet de former la bêtaïne à l'aide de la choline déhydrogénase. La bêtaïne peut alors être transformée en méthionine et jouer un rôle dans la biosynthèse de la S-adénosylméthionine qui est le donneur de groupements méthyles le plus important pour les réactions de méthylation.

Des niveaux bas de choline pourrait alors affecter le développement de l'embryon par 4 mécanismes différents. Ces mécanismes sont l'altération de la biosynthèse de l'acétylcholine, une perturbation de l'intégrité des membranes cellulaires, et comme le folate, l'accumulation de l'homocystéine et l'altération des réactions de méthylation. Selon une étude, une diète basse en choline diminuait le nombre de cellules progénitrices neurales [205]. De plus, une faible concentration de choline peut augmenter l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la différenciation via l'hypométhylation de l'ADN [191]. Alors qu'une diète enrichie en choline augmentait la neurogenèse dans le cerveau de l'embryon et réduisait l'apoptose dans ces cellules [206, 207]. Chez la souris, une concentration de choline allant jusqu'à 5mg/kg a des effets bénéfiques dans des modèles d'exposition ou de neuropathologie [208, 209]. Des études chez l'humain ont montré que la supplémentation en choline permettait d'améliorer les fonctions cognitives des enfants (revu dans [204, 210, 211]). Durant la grossesse, il est recommandé d'avoir un apport de 450mg/jour, mais l'apport maximal tolérable s'élève à 3500mg/jour [203].

La bétaine, aussi appelé triméthylglycine, possèdent deux principales fonctions soient celle d'osmolyte et celle de donneurs de groupements méthyles. Sa fonction d'osmolyte permet de protéger les cellules et ses composants contre les stress de l'environnement (e.g., quantité faible d'eau, salinité élevée, températures extrêmes) [212]. Il a été démontré dans une étude *in vitro* que la bétaine protégeait les embryons de souris dans les stades de préimplantation face à l'augmentation de l'osmolarité (revu dans [213, 214]). La bétaine a aussi des propriétés antioxydantes qui protègent contre les effets du stress oxydatif causé par notamment l'alcool [215]. La bétaine est essentielle au développement, entre autres, à cause de son rôle de donneur de groupements méthyles, mais pourrait aussi avoir un rôle à jouer au tout début du développement puisqu'elle est emmagasinée dans l'embryon jusqu'au stade de blastocyste chez la souris (revu dans [214]). Chez l'humain et la souris, il ne semble pas y avoir d'apport recommandé pour la bétaine probablement dû au fait qu'elle peut être générée par la choline. Cependant, chez l'humain l'apport estimé est de 100-300mg/jour et un apport de 9- 15g/jour est considéré sécuritaire (revu dans [212, 216]).

La vitamine B12 joue un rôle crucial dans la division cellulaire et la différenciation. Elle est aussi importante pour le développement du cerveau notamment au niveau de la myélinisation du

système nerveux central [197]. Les femmes consommant peu de viandes ont plus de chances d'avoir des carences en vitamine B12 (< 200pg/ml), ce qui peut mener à des restrictions de croissance intra-utérines, des défauts du tube neural, des retards de développement et un faible poids à la naissance [197, 217]. De plus, certaines études chez les enfants ont démontré qu'une déficience modérée à sévère en vitamine B12 pouvaient entraîner une démyélinisation du cerveau ainsi qu'une atrophie du cerveau [197, 218, 219]. Dans une étude chez des femmes indiennes, une supplémentation de vitamine B12 (50µg/jour) durant la grossesse a permis de réduire le nombre d'enfants avec un faible poids à la naissance comparativement au groupe contrôle [220]. Chez l'humain, il n'y a pas encore de maximum tolérable d'établi pour la vitamine B12 lors de la grossesse dû au manque de données sur les potentielles conséquences d'un excès [203].

Ces nutriments font partie de cycles qui sont interreliés entre eux et donc lorsqu'il y a un déséquilibre dans un, l'autre va essayer de compenser [216]. Par exemple, les souris avec un knockout du gène *Mthfr* (baisse de 5-méthylTHF) ont des concentrations diminuées de bêtaïne et de choline afin de favoriser la conversion de l'homocystéine en méthionine [221]. Un déséquilibre pourrait donc engendrer des effets nuisibles sur d'autres voies biochimiques puisque ces nutriments sont impliqués dans plusieurs voies.

1.3.3 Effet de l'alcool sur les donneurs de groupements méthyles

L'alcool (acétaldéhyde) réduit l'absorption du folate au niveau des intestins ainsi que des reins et peut réduire l'expression des récepteurs de folate au niveau du placenta diminuant l'apport de folate à l'embryon [184]. La baisse d'absorption de folate peut entraîner une augmentation de l'utilisation de la choline diminuant son apport pour d'autres voies métaboliques impliqués, entres autres, dans le développement du cerveau [222]. L'alcool va aussi inhiber différentes enzymes du cycle de l'acide folique [97, 196]. L'alcool est capable d'inhiber la MTR réduisant par la même occasion les niveaux de SAM. Cette réduction de SAM cause une augmentation de la concentration de SAH inhibant l'action des DNMTs, ce qui peut causer de l'hypométhylation [184]. Pour compenser, l'activité de BHMT peut être induite après la prise d'alcool, mais ne peut pas être maintenue sur une période prolongée d'exposition [223]. Une exposition à l'alcool peut

aussi interférer avec l'activité de MAT en créant des espèces réactives d'oxygènes (ROS) qui vont inhiber MAT nécessaire à la conversion de la méthionine en SAM. Il y a donc moins de donneurs de groupements méthyles disponibles pour faire les réactions de méthylation, ce qui peut causer une hypométhylation de l'ADN. De plus, l'alcool et l'un de ses produits de dégradation soit l'acétaldéhyde peuvent tous deux avoir un effet sur l'activité des DNMTs en inhibant son activité et donc diminuer les réactions de méthylation de l'ADN [97]. Deux études chez l'humain ont démontré que la consommation d'alcool des alcooliques chroniques causait une réduction de la concentration de folate et une baisse d'expression des DNMTs, mais une augmentation de l'homocystéine [224, 225]. Une hyperhomocystéinémie peut augmenter les chances d'avoir un AVC chez ces personnes [225]. Dans une autre étude chez le rat, une exposition prénatale à l'alcool éthylique de type chronique (9-17g/kg) a causé une augmentation de la méthionine et l'homocystéine dans le plasma des mères alors que seulement la méthionine était augmentée dans les embryons à E21. Cette augmentation était aussi accompagnée d'une baisse d'expression des gènes *Mtr* et *Mat2a* dans le cerveau de ces embryons [226]. La prise d'alcool va alors grandement affecter les réactions de méthylation et peut affecter l'établissement des profils de méthylation de l'embryon en développement si la mère consomme durant sa grossesse.

1.3.4 Modèles d'exposition à l'alcool avec une diète

Lors de la grossesse et de l'allaitement, les besoins maternels en donneurs de groupements méthyles sont augmentés. La plupart des femmes n'atteignent pas l'apport recommandé exacerbant l'effet de l'alcool. Certaines études ont démontré qu'une supplémentation des différents donneurs de groupements méthyles peut avoir un effet protecteur face à une exposition prénatale à l'alcool. Ces études sont essentielles pour mieux comprendre les mécanismes par lesquels l'alcool affecte la progéniture des mères ayant consommé de l'alcool et éventuellement avoir des méthodes préventives qui peuvent mitiger l'impact d'une exposition prénatale à l'alcool.

En 1988, il a été démontré qu'une importante dose d'éthanol (2 fois 2,5g/kg à 4 h d'intervalle) avec une diète déficiente en folate au stade E11.5 chez le rat résultait en 3 fois plus d'embryons

morts ou résorbés que la diète déficiente sans alcool éthylique [227]. Ce qui montre que le statut nutritionnel de la mère est très important lors du développement et lors d'une exposition.

D'autres études ont démontré que plusieurs donneurs de groupements méthyles tels que la choline, bétaine, vitamine B12 et le folate sont capables de mitiger les effets nocifs d'une exposition (Tableau 3, [9-14]). Par exemple, lorsqu'une diète enrichie en folate (10,25mg/kg) était donnée à la mère, le développement du cœur de l'embryon était protégé d'une exposition prénatale à l'alcool éthylique considérée comme une consommation excessive (*binge drinking*) chez la souris [12]. Chez le poisson-zèbre, Cadena *et al.* ont démontré qu'un enrichissement en folate dans le milieu pouvait mitiger partiellement les effets d'une exposition au début du développement de l'embryon au niveau des défauts morphologiques et du comportement [10].

Dans une étude chez la souris, la diète enrichie en bétaine (50µg/ml) permettait de minimiser les défauts morphologiques causés par une exposition à l'alcool éthylique durant la préimplantation en plus de diminuer l'effet sur les niveaux globaux de méthylation. Ils ont aussi observé que la présence d'un supplément de bétaine diminuait la quantité de ROS [14]. Des effets similaires de la bétaine ont aussi été observés dans un modèle utilisant des embryons aviaires [11].

Quant à la choline, une étude effectuée chez les rats a montré qu'un supplément donné en même temps qu'une exposition prénatale à l'alcool éthylique (E7 à E21) pouvait prévenir les altérations de la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur *Pomc* et l'expression de *Pomc* dans les cerveaux de rats adultes [9]. Aussi, la sévérité des malformations au cerveau et les déficits comportementales semblent être réduits lors d'interventions postnatales avec du folate ou de la choline [190, 194]. En effet, dans une étude de suivi de 4 ans sur des enfants atteints de TSAF qui ont reçu 500 mg de choline par jour pendant 9 mois entre l'âge de 2 et 5 ans, les auteurs ont observé que les enfants traités avaient une intelligence non verbale plus élevée, une meilleure compétence visuo-spatiale, une meilleure capacité de mémoire de travail, une meilleure mémoire verbale et moins de symptômes comportementaux et de troubles de l'attention et d'hyperactivité que le groupe placebo [13]. Cela démontre que la choline a un effet durable, même 4 ans après le traitement. Cependant, ces interventions postnatales ne peuvent pas renverser les phénotypes puisque les dommages sont déjà établis au niveau des structures des

cerveaux. Ce qui nous pousse à croire qu'une diète enrichie en divers nutriments de donneurs de groupements méthyles pourrait mitiger les effets d'une exposition prénatale à l'alcool et que l'effet de protection de la diète pourrait être plus important si elle est donnée tôt durant la grossesse lorsque l'embryon est au tout début du développement. De plus, il est important de cibler différentes composantes du cycle afin d'éviter de créer un déséquilibre dans celui-ci par l'augmentation d'une seule composante.

Tableau 3. – Études de l'effet d'une diète enrichie en donneurs de groupements méthyles contre l'effet d'une exposition prénatale à l'alcool.

Organisme modèle TSAF	Type d'exposition prénatale à l'alcool	Temps d'exposition	Stade étudié	Nutriments enrichis	Effet de l'enrichissement	Références
Souris	2 x 2,9g/kg EtOH (injections intrapéritonéales)	E6,75 (gastrulation)	E7.5, E15.5	Folate 10,25mg/kg E0.5-E15.5	Protection du développement du cœur. Normalisation de l'expression des gènes du métabolisme des lipides et du folate.	[12]
Poisson-zèbre	2% v/v EtOH (milieu)	2-24 hpf	6-7 jpf	Folate 75µM 2-24 hpf	Réduction des défauts morphologiques (cœur, yeux, inflation de la vessie natale). Rétablissement d'une inactivité plus constante pendant la nuit (moins de périodes d'éveil). Prévention des défauts induits par l'EtOH dans la thigmotaxie et la réponse optomotrice des larves.	[10]
Rat	6.7% v/v EtOH (Diète Liquide)	E7-E21	P60-65	Choline 642 mg/L E11-Naissance	Normalisation des niveaux des protéines altérées par l'EtOH et les niveaux d'ARNm de H3K4me3, Set7/9, H3K9me2, G9a, Setdb1, Dnmt1 et MeCP2. Normalisation des altérations de la méthylation du gène <i>Pomc</i> et de l'expression génique.	[9]
Enfants diagnostiqués avec TSAF	ND	ND	6-9 ans	Choline 513mg Chaque jour pendant 9 mois 2-5 ans	Intelligence non verbale plus élevée, meilleure aptitude visuo-spatiale, meilleure capacité de mémoire de travail, meilleure mémoire verbale et moins de symptômes comportementaux de troubles de l'attention avec hyperactivité que le groupe placebo.	[13]
Souris	1% v/v EtOH (milieu)	E0.5-E4.0	E4.0, E11.5	Bétaïne 50µg/mL E0.5-E4.0	Réduction du niveau de ROS causé par l'éthanol et amélioration du développement embryonnaire. Rétablissement du niveau global de méthylation de l'ADN génomique.	[14]
Caille	40 mM (0,179g/dL)	HH 4-5 (gastrulation)	HH 34	Bétaïne 1µM-3mM HH 4-5	Baisse des défauts morphologiques (tête, cœur). Normalisation de la méthylation de l'ADN.	[11]

1.4 Problématique, hypothèse et objectifs

1.4.1 Problématique

Dans le laboratoire, nous avons démontré à l'aide d'un modèle préclinique murin que l'exposition prénatale à l'alcool éthylique pendant la période préimplantatoire altère le développement du cerveau et entraîne divers phénotypes neurologiques reliés au TSAF [8]. Dans ce modèle, nous avons montré que l'exposition perturbe les profils de méthylation de l'ADN et augmente le pourcentage de défauts morphologiques aux stades E10.5 et E18.5. Ces résultats nous ont poussés à nous demander si en modifiant l'environnement maternel on serait capable d'empêcher l'effet de l'alcool.

Bien que les connaissances sur les mécanismes entourant l'effet d'une exposition prénatale à l'alcool se développent, beaucoup de mécanismes demeurent encore inconnus. Il est donc important d'investiguer comment les différents facteurs de l'environnement maternel interagissent avec l'exposition à l'alcool notamment l'alimentation de la mère. L'alimentation de la mère est importante pour le développement ainsi que pour les réactions épigénétiques, c'est donc un facteur qui peut grandement influencer l'effet d'une exposition prénatale à l'alcool soit en mitigeant ou en exacerbant les effets de celle-ci.

1.4.2 Hypothèse

Notre hypothèse de recherche est qu'une supplémentation nutritionnelle maternelle en donneurs de groupements méthyles va atténuer les phénotypes morphologiques et moléculaires associés à une exposition prénatale à l'alcool durant la préimplantation.

1.4.3 Objectifs

En utilisant notre modèle murin d'exposition prénatale à l'alcool éthylique de type *binge drinking* pendant la période préimplantatoire, mes objectifs étaient de :

1) Déterminer si une diète enrichie en donneurs de groupements méthyles donnée avant et pendant la gestation peut contrer les effets d'une exposition prénatale à l'alcool éthylique pendant la préimplantation.

Pour déterminer l'effet protecteur de la diète enrichie, j'observerai d'abord la morphologie générale des embryons afin de déceler des défauts causés par une exposition prénatale à l'alcool éthylique durant la période préimplantatoire. Je récolterai des embryons aux stades E10.5 et E18.5, puis je déterminerai les défauts morphologiques visibles en plus de prendre des mesures des embryons. Ces mesures seront notamment le poids, la taille des embryons et des mesures associées à certains aspects faciaux puisque les phénotypes observés chez les enfants TSAF sont la restriction de croissance et les malformations crâniofaciales. Nous ferons aussi des colorations de squelettes afin de déterminer s'il y a des défauts au niveau de la formation du crâne et des os.

2) Définir si une exposition à l'alcool éthylique pendant la préimplantation altère les profils de méthylation de l'ADN et l'expression génique des gènes à empreinte chez le cerveau embryonnaire, et investiguer si une diète maternelle enrichie peut normaliser ces profils.

Afin de déterminer si l'exposition prénatale à l'alcool éthylique lors de la préimplantation altère les profils de méthylation et, le cas échéant, savoir si la diète peut mitiger ses effets en normalisant les profils de méthylation, je comparerai ces derniers par la technique d'*Implicon* [233] que j'ai adapté pour le projet. Cette technique consiste à amplifier des régions d'intérêts et nous nous concentrerons plus particulièrement sur les gènes à empreinte au stade E18.5. Pour ce qui est des changements d'expression dans les gènes à empreintes, j'utiliserai la technique de PCR quantitatif. Je comparerai l'expression génique entre les embryons exposés à l'EtOH et les embryons contrôles pour chaque diète au stade E18.5. Nous corrélons aussi les résultats obtenus avec les profils de méthylation de l'ADN.

Chapitre 2 – Matériel et méthodes

2.1 Modèle murin d'exposition prénatale à l'alcool lors de la préimplantation avec diètes

Pour ce projet, nous avons utilisé le modèle murin d'exposition à l'alcool éthylique déjà établi dans le laboratoire [8], mais en y ajoutant un groupe avec une diète enrichie en donneurs de groupements méthyles (Figure 4). Nous avons donc utilisé des femelles C57BL/6 de 4 semaines auxquelles nous avons donné leur diète respective (standard ou enrichie) *ad libitum* durant 4 semaines avant la conception afin de stabiliser les niveaux de nutriments dans le sang et durant toute la grossesse. La **diète standard** est une diète NHI-31 (1,89g/kg choline, 2mg/kg acide folique, 0,06mg/kg B12) et la **diète enrichie** est sa version supplémentée (5,76g/kg choline, 5g/kg bétaïne, 5mg/kg acide folique, 0,5mg/kg B12). Pour garder l'équilibre des divers cycles impliqués dans le métabolisme du carbone (1C), différentes composantes menant à la production de groupements méthyles ont été augmentés. Les souris ont été maintenues sur des cycles de lumière de 12h. Après les 4 semaines de diète, une femelle d'environ 8 semaines était transférée dans la cage d'un mâle pour l'accouplement. La détection d'un bouchon vaginal est considérée comme le jour embryonnaire 0.5 (E0.5) et les femelles présumées enceintes étaient transférées dans de nouvelles cages.

À E2.5 (stade 8-cellules), les femelles ont subi deux injections sous-cutanées de 2,5g/kg d'éthanol 50% à 2 heures d'intervalle pour celles du groupe exposé et de 0,15M de solution saline pour celle du groupe contrôle. Nous avons confirmé que le taux d'alcool moyen observé sur une période de 4h est de 158,31 mg/dL avec un pic de 284,00 mg/dL 3h après la première injection [8]. Les embryons ont été récupérés aux stades E10.5 et E18.5. Les embryons ainsi que leur cerveau ont été pesés. Les photos ont été prises avec un microscope stéréo Leica et les mesures de différents aspects des embryons ont été réalisées à partir du logiciel LAS X de Leica. Les distances de la tête à la croupe, du nez à l'arrière de la tête, entre les yeux, la hauteur de la tête, la largeur de la tête ont été mesurées (Figure 5). Les cerveaux ont été retirés à l'aide de pinces à microdissection et le

cerveau antérieur a été séparé du reste du cerveau. Ces échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation pour des expériences ultérieures.

Stabilisation des niveaux maternels

- Diète standard
- Diète enrichie en méthyles (Acide folique, choline, bétaine and B12)

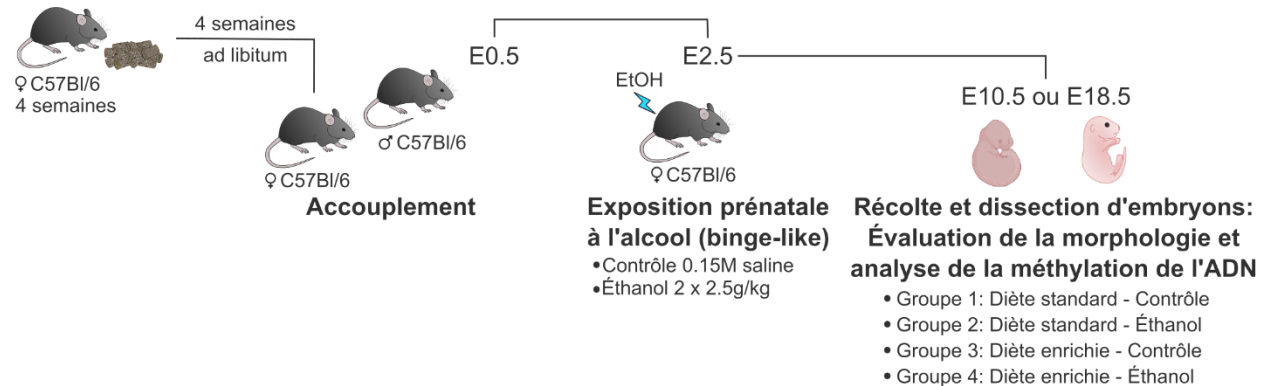


Figure 4. – **Schéma du modèle murin d'exposition prénatale à l'alcool éthylique avec une diète enrichie en donneurs de groupements méthyles.** Les souris à 4 semaines ont été nourries avec leurs diètes respectives avant l'accouplement et tout au long de la grossesse. À E2.5, les mères ont reçu une exposition à l'alcool éthylique de type *binge drinking* soit 2 injections sous-cutanées à deux heures d'intervalle de 2.5g/kg (158,31 mg/dL durant 4h) et les contrôles ont été injectés 2 fois 0.15M de solution saline. Les embryons ont été récoltés et disséqués pour observer la morphologie et faire l'analyse de la méthylation de l'ADN dans les cerveaux antérieurs. Les embryons ont été divisés en 4 groupes soient diète standard contrôle, diète standard EtOH, diète enrichie contrôle et diète enrichie EtOH.

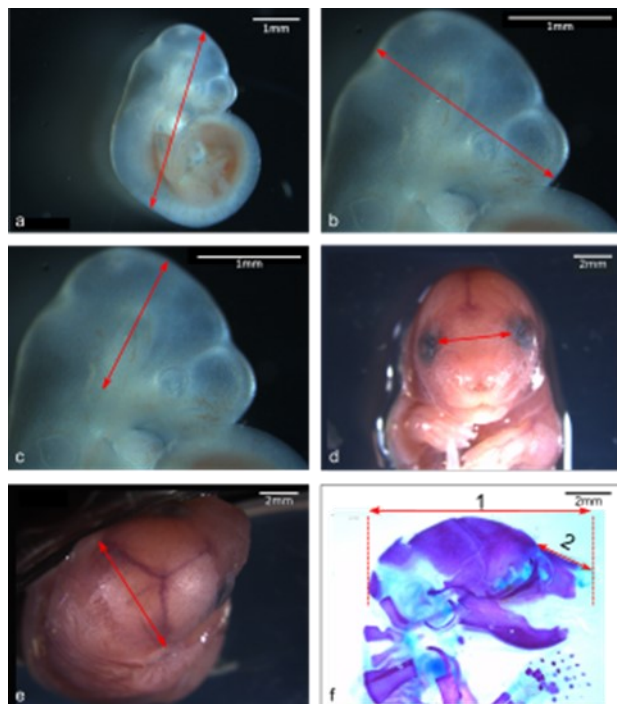


Figure 5. – **Exemples de mesures des embryons aux stades E10.5 et E18.5.** a) Taille de la tête à la croupe b) Distance nez à derrière de la tête c) Hauteur de la tête d) Distance entre les yeux e) Largeur de la tête f) 1-Longueur de la tête, 2-Longueur du museau.

2.2 Coloration du squelette

Notre protocole de coloration du squelette a été adapté de Lambrot *et al.* [234]. Les embryons récupérés à E18.5 ont été fixés pendant 24h dans une solution éthanol 80%. La peau et les viscères ont ensuite été retirés et les embryons ont été fixés à nouveau dans une solution éthanol 95% durant 24h. Le cartilage a été coloré avec une solution de bleu alcian pour une période de 24h et a ensuite subi un lavage de 5h à l'éthanol 95%. Pour éliminer les muscles, les embryons ont baignés dans une solution de KOH 2% durant 24h. Par la suite, les os ont été colorés dans une solution de KOH 1%/rouge alizirin S 0.012% toute une nuit. Les embryons ont ensuite été transférés dans une solution de KOH 1%/glycérol 20% pour enlever les restants de tissus durant 2 jours et ont été conservés dans une solution de glycérol 50%/éthanol 50%. Les images ont été prises avec un microscope stéréo Leica en champ clair et les mesures ont été faites à partir du logiciel LAS X de Leica.

2.3 Sexage des embryons

Pour le sexage des embryons, nous avons utilisé l'ADN provenant d'une portion du sac vitellin ou de queue des embryons. Nous avons digéré les tissus dans une solution de digestion composée de KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM à pH 8.3, gélatine 0,1mg/ml, NP-40 0,45%, Tween-20 0,45% et de protéinase K 0,2mg/ml. Le tissu est digéré dans 50 µl de solution de digestion pendant environ 1h à 55°C, puis est chauffé à 95°C pendant 10 min pour désactiver la protéinase K. Par la suite, l'ADN génomique de cette solution a été amplifié par PCR quantitatif à l'aide d'amorces couvrant des régions identiques de *Kdm5c/Kdm5d*, localisées sur le chromosome X ou le chromosome Y respectivement, à une concentration finale de 0.8µM (*forward* et *reverse*) (Tableau 4). La présence de 2 pics représentant de l'ADN mâle, tandis qu'un seul pic est présent pour l'ADN femelle.

Tableau 4. – Séquences des amorces utilisées pour le sexage.

Amorces	Séquences
<i>Kdm5c/Kdm5d forward</i>	CTGAAGCTTTTGGCTTTGAG
<i>Kdm5c/Kdm5d reverse</i>	CCACTGCCAAATTCTTTGG

2.4 Analyse des profils de méthylation

Les cerveaux antérieurs des embryons E18.5 congelés ont été réduits en poudre dans un mortier contenant de l'azote liquide et du *RNA later* (Thermo Fischer) pour préserver l'intégrité de l'ARN jusqu'à son extraction ultérieure. La moitié de la poudre a été utilisée pour faire l'extraction d'ADN tandis que l'autre moitié a été conservée pour faire de l'extraction d'ARN. L'ADN a été extrait à l'aide du kit QIAamp DNA Mini de Qiagen et élué dans 100 µl de tampon d'éluion selon le protocole recommandé. L'ADN génomique (1µg) a ensuite été converti avec le kit EZ DNA methylation Gold de Zymo Research et élué dans 100 µl de tampon d'éluion et dilué pour atteindre une concentration de 1ng/µl.

La méthylation dans les cerveaux E18.5 a été quantifiée par la technique *Implicon* adapté de Klobučar *et al.* (Figure 6, [233]). Premièrement, nous avons conçus les amorces de séquençage bisulfite en ajoutant la séquence «CTACACGACGCTCTCCGATCT» à l'amorce *forward* et la

séquence «TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNN» à l'amorce *reverse* où N correspond à un nucléotide aléatoire (Tableau 10, Annexe). Ces nucléotides aléatoires serviront en tant qu'identifiant moléculaire unique (IMU) pour discriminer les duplications lors de l'analyse bioinformatique. Pour la première réaction PCR, 1ng d'ADN de chaque échantillon traité au bisulfite a été amplifié avec 0,375µM du pool des amorces (*forward* et *reverse*) et l'enzyme KAPA Hifi Uracil+Ready 2X dans un volume final de 8 µl pour chaque échantillon et chaque région. Ensuite, les réactions des régions amplifiées ont été combinées pour chaque échantillon, les pools ont été purifiés avec un ratio 1,5X de billes magnétiques AMPure XP et élués dans 20 µl de tampon d'éluion. Pour le deuxième PCR, les pools PCR ont été quantifiés par Qubit et dilués à une concentration de 0,40ng/µl dans un volume final de 20µl de tampon d'éluion. Les amorces utilisées dans le deuxième PCR contiennent les adaptateurs d'Illumina avec des codes-barres pour que chaque échantillon amplifié ait un code-barre unique sur le brin inverse (Tableau 11, Annexe). Le pool PCR dilué (20µl) a été amplifié avec 0,2µM de l'amorce PE1.0 d'Illumina, 0,2µM de l'amorce PE2.0 customisé d'Illumina et le mix KAPA Hifi Uracil+Ready 2X dans un volume final de 50 µl. Après l'amplification, les réactions ont été purifiées avec un ratio 1X de billes magnétiques AMPure XP et éluées dans 20µl de tampon d'éluion. Pour séquencer les librairies, la plateforme Miseq d'Illumina a été utilisé pour générer des lectures de 250pb *paired-end*.

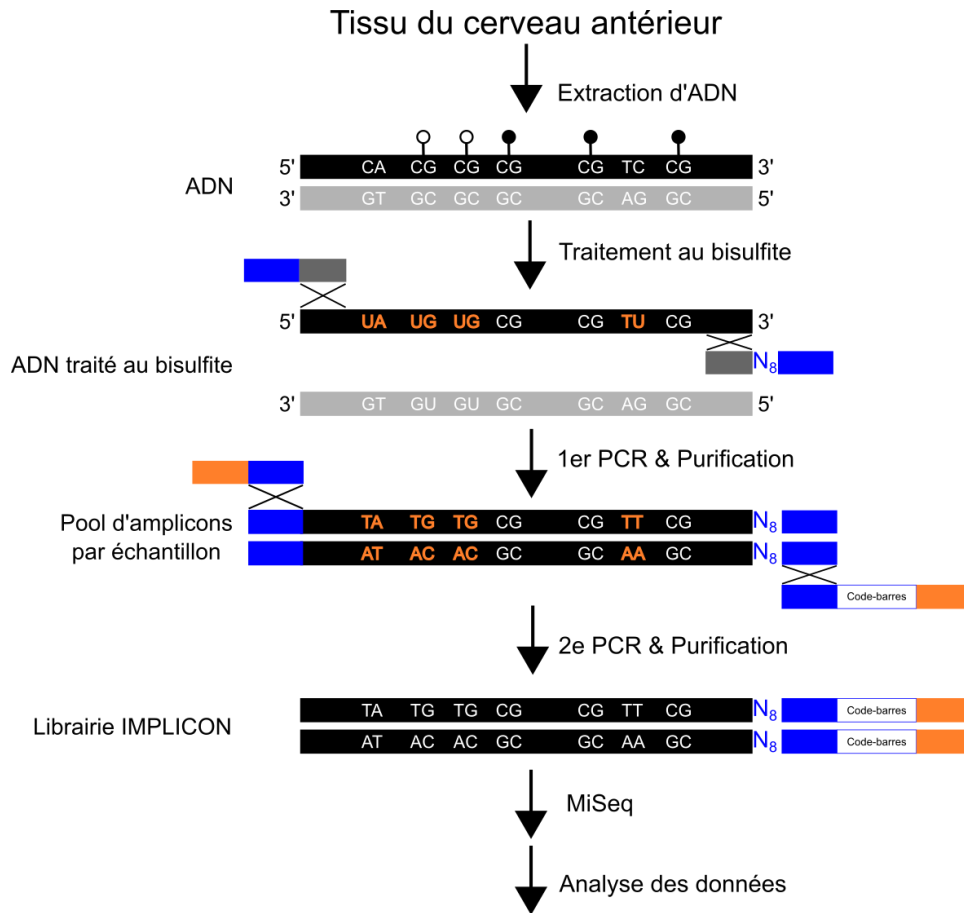


Figure 6. – **Schéma représentant la méthode *Implicon***. L'ADN extrait du tissu du cerveau antérieur est converti au bisulfite, puis amplifié par une première paire d'amorces contenant les séquences de la région d'intérêt, les séquences complémentaires pour la deuxième paire d'amorces et l'IMU (en bleu). Les réactions sont combinées par échantillon et purifiées avant le deuxième PCR. La deuxième paire d'amorces contient les adaptateurs d'Illumina (en orange) en plus d'un code-barre sur l'amorce du brin inverse. Le pool d'amplicons est amplifié par cette paire d'amorces, puis purifié afin d'être séquençé par MiSeq.

2.5 Analyse bioinformatique du séquençage

L'analyse de la méthylation de l'ADN de nos échantillons est basée sur le *pipeline* bioinformatique de la technique *Implicon* [233]. Premièrement, les 8 nucléotides aléatoires servant d'IMU ont été enlevés et remis dans le *readID* des deux lectures de séquençage afin de faire la déduplication plus tard. Nous avons ensuite retiré des lectures de séquençage brutes les parties de séquences

de moins bonne qualité ainsi que les séquences des adaptateurs. Ces deux étapes ont été accomplies avec l'outil Trim Galore (version 0.6.6). Pour faire l'alignement de nos séquences, nous avons utilisé les outils Bismark (version 0.22) qui est spécifique pour la méthylation de l'ADN. L'alignement a été fait avec le génome de référence de la souris mm10. Après l'alignement, les lectures ont été dédoublées, puis les CpGs ont été extraits à l'aide de Bismark. Seuls les CpGs ayant une couverture de séquençage minimum de 10X ont été retenus et la moyenne de méthylation des échantillons a ensuite été calculée en fonction de la couverture. Pour la comparaison de la moyenne de méthylation par CpG entre les différentes conditions, nous avons utilisé seulement les CpGs communs pour les différents gènes d'intérêts. Les figures ont ensuite été conçues à partir des logiciels R (version 3.9) et GraphPad Prism 9.

2.6 Analyse de l'expression génique

L'expression génique a été mesurée par PCR quantitatif avec l'ARN total extraite du cerveau antérieur des embryons à E18.5 avec le kit RNeasy Mini (Qiagen). Ensuite, 1,5µg d'ARN pour chaque échantillon a été converti en ADNc avec la SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher). Les amorces spécifiques aux régions d'intérêts ont été conçues avec Primer3 (version 0.4.0) pour obtenir des amplicons de 60-150pb (Tableau 9, annexe). Le PCR quantitatif a été effectué à l'aide du Kit SensiFAST™ SYBR® No-ROX sur un LightCycler 96 (Roche Life Science). L'expression a été calculé en fonction de la formule de $2^{-\Delta Cq}$ en utilisant le gène *Hprt1* comme gène de référence. Les valeurs d'expression ont ensuite été normalisées en rapportant par rapport à la valeur d'un échantillon du groupe contrôle se rapprochant de la moyenne des embryons contrôles. L'analyse statistique est une ANOVA avec une correction de Welch effectuée dans Graphpad Prism 9.

2.7 Analyse statistique

Les mesures de la morphologie des embryons ont été analysées avec un t-test non païré avec une correction de Welch. Ces analyses ont été faites à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9. Pour ce qui est des pourcentages d'embryons affectés, ceux-ci ont été analysé à l'aide d'un test chi carré. L'analyse statistique du pourcentage de type de défauts est un z-test à deux proportions effectuées dans le logiciel R (version 3.9). Finalement, les tests de la variabilité des valeurs des

échantillons de coloration de squelette est un test de Levene aussi effectué dans le logiciel R (version 3.9).

Chapitre 3 – Résultats

3.1 Atténuation des défauts morphologiques (E10.5) causées par une exposition prénatale à l'alcool par la prise d'une diète enrichie en donneurs de groupements méthyles.

Notre laboratoire a démontré à l'aide d'un modèle murin préclinique, qu'une exposition prénatale à l'alcool éthylique durant la période préimplantatoire peut avoir des conséquences négatives sur la morphologie et les profils de méthylation de l'ADN au jour E10.5 [8]. Cependant, on ne sait pas encore, suite à cette exposition, si les effets perdurent au cours du développement et s'ils peuvent être prévenus par une nutrition maternelle enrichie en donneurs de groupements méthyles. Afin de répondre à ces questionnements, nous avons combiné notre modèle murin de TSAF avec une diète enrichie en donneurs de groupements méthyles (e.g. folate, choline, bêtaïne, vitamine B₁₂) (Figure 4). Différentes études ont démontré que les valeurs des nutriments supplémentées étaient sécuritaires pour l'embryon et protégeait face à diverses expositions [9, 12, 208, 209, 235]. Cette diète a été donnée à des femelles 4 semaines avant l'exposition et jusqu'à la récupération des embryons. Afin de valider notre modèle, nous avons en premier lieu récupéré les embryons à la mi-gestation (E10.5) et les avons évalués selon un système d'évaluation dysmorphologique. Comme dans notre étude précédente, l'exposition à l'alcool éthylique pendant la période préimplantatoire n'a pas affecté le nombre d'embryons des portées ou autres mesures comparativement au groupe contrôle (Figure 7). Similairement, nous observons aucune différence lorsqu'on compare le nombre d'embryons par portées entre les contrôles (moyenne = 7,5 vs 8,4) et les embryons exposés (moyenne = 8,5 vs 9,2) pour la diète standard et la diète enrichie respectivement (Figure 7, Tableau 5). Pour ce qui est des mesures morphologiques (distance couronne-croupe, distance nez-derrrière de tête, hauteur de la tête), il n'y avait pas non plus de changement significatif dans les différentes mesures observées (Figure 7). Ceci démontre que l'exposition ou la diète ne changent pas les caractéristiques physiques des embryons exposés à E10.5.

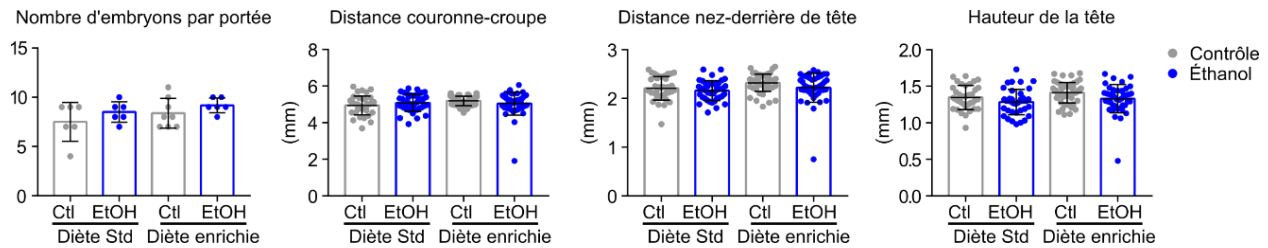


Figure 7. – **La diète enrichie en donneurs de groupements méthyles n’a pas d’effet sur le développement des embryons à la mi-gestation.** La grosseur de la portée (diète standard: Ctl (n=6) et EtOH (n=6), diète enrichie: Ctl (n=8) et EtOH (n=6)) et les mesures des caractéristiques physiques des embryons pour les 4 groupes (diète standard: contrôle (n=38) et embryons exposés à l’EtOH (n=43), diète enrichie: contrôle (n=56) et embryons exposés à l’EtOH (n=42)). L’analyse statistique a été mesurée par un t-test non-pairé avec une correction de Welch et les barres d’erreurs représentent la SD *p≤0.05, ** p≤0.01, ***p≤0.001 et ****p≤0.0001.

Tableau 5. – Aspects morphologiques des embryons à E10.5.

E10.5	Diète standard				Diète enrichie			
	Moyenne Ctl (n=6, n=38)	Moyenne EtOH (n=6, n=43)	p-value	ns	Moyenne Ctl (n=8, n=56)	Moyenne EtOH (n=6, n=42)	p-value	ns
Nombre d’embryons par portée	7,5 ± 2,0	8,5 ± 1,0	0,3068	ns	8,4 ± 1,5	9,2 ± 0,8	0,2248	ns
Distance couronne-croupe	4,94 ± 0,51	5,08 ± 0,47	0,2304	ns	5,11 ± 0,42	5,05 ± 0,63	0,1581	ns
Distance nez-derrrière de la tête	2,21 ± 0,24	2,16 ± 0,21	0,3500	ns	2,28 ± 0,25	2,22 ± 0,30	0,0559	ns
Hauteur de la tête	1,35 ± 0,16	1,28 ± 0,17	0,1102	ns	1,39 ± 0,17	1,33 ± 0,20	0,0582	ns

Bien qu’on ne voie pas de différence significative dans la taille moyenne des embryons à la suite d’une exposition prénatale à l’alcool éthylique, comme dans notre étude précédente, nous avons

observé des défauts morphologiques causés par l'exposition (Figure 8). Parmi les malformations notées, nous remarquons une augmentation significative de malformations aux cerveaux et de retards de croissance (exemples de défauts à la figure 8d). Plus précisément, pour la diète standard, nous avons observé une augmentation des défauts morphologiques chez les embryons exposés à l'EtOH comparativement aux contrôles (Ctl 5,3% vs EtOH 31,7%, $p \leq 0,0001$) (Figure 8a). Plus de défauts sont aussi observés chez les embryons exposés à l'EtOH de la diète enrichie comparativement aux embryons contrôles (Ctl 5,6% vs EtOH 16,7%, $p \leq 0,01$). Cependant, on détecte une baisse significative pour les embryons exposés à l'EtOH de la diète enrichie par rapport à ceux de la diète standard (diète standard-EtOH 31,7% vs diète enrichie-EtOH 16,7%, $p \leq 0,05$). Lorsqu'on compare les types de défauts de la diète standard et de la diète enrichie, deux catégories ressortent soient les malformations au cerveau (diète standard : Ctl 2,6% vs EtOH 17,1%, $p = 0,09$; diète enrichie : Ctl 0,0% vs EtOH 7,1%, $p = 0,2$) ainsi que les restrictions/retards de croissance (diète standard : Ctl 2,6% vs EtOH 14,6%, $p = 0,2$; diète enrichie : Ctl 5,6% vs EtOH 9,5%, $p = 0,7$). On a remarqué que la diète enrichie diminue de moitié les malformations de cerveau chez les embryons exposés comparativement à la diète standard ($p = 0,3$), mais diminue de façon moins importante les restrictions/retards de croissance ($p = 0,8$) (Figure 8a,b). Cependant, lorsque les défauts sont comparés un à un, on ne voit pas de différence significative contrairement à lorsqu'ils sont combinés. Nous avons observé des embryons avec des retards de croissance, des défauts du tube neural et des malformations crânielles, mais ceux-ci ne représentent pas la majorité des embryons observés et certains ont une apparence normale chez les embryons exposés de la diète standard (Figure 8a,c). Aucun défaut du tube neural n'a été observé chez les embryons exposés à l'EtOH de la diète enrichie, mais certains présentaient aussi des malformations crânielles et des retards de croissance. Ces résultats démontrent qu'une exposition à l'alcool éthylique lors de la préimplantation cause des défauts morphologiques qui peuvent être atténuées de façon significative par une diète maternelle enrichie en donneurs de groupements méthyles.

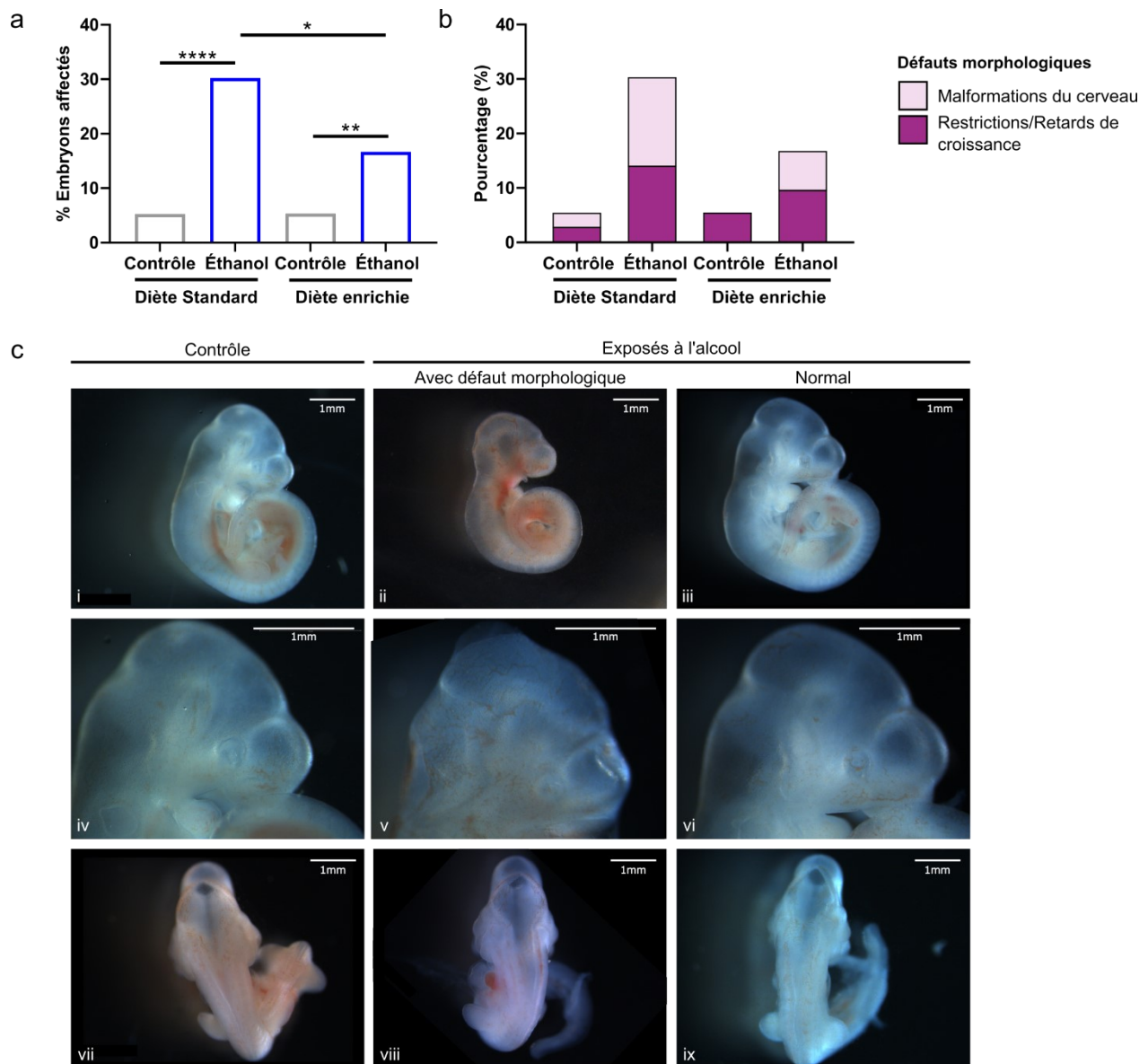


Figure 8. – La diète enrichie en donneurs de groupements méthyles réduit les effets d'une exposition à l'alcool éthylique de type *binge drinking* chez les embryons E10.5. a) Pourcentage d'embryons affectés par un défaut morphologique. b) Types de défauts observés chez les embryons affectés c) Image des différents défauts observés selon l'exposition et la diète (Contrôles : i, iv et vii; Retards de croissance : ii; Malformations du cerveau : v, viii; Normaux : iii, vi) (portées (n=6-8), diète standard: contrôle (n=38) et embryons exposés à l'EtOH (n=43), diète enrichie: contrôle (n=56) et embryons exposés à l'EtOH (n=42)). L'analyse statistique a été mesurée par un test chi-carré *p≤0.05, ** p≤0.01, ***p≤0.001 et ****p≤0.0001.

Bien que nous observions plus de défauts morphologiques chez les embryons exposés à l'alcool éthylique, nous voulions déterminer la répartition de ces embryons dans les différentes portées afin de s'assurer qu'il n'y avait pas un effet maternel. Après analyse, nous avons remarqué que dans la diète standard, 5 des 6 portées exposées à l'alcool éthylique avaient au moins un embryon affecté comparativement à 2 des 6 portées contrôles (p -value $< 10^{-5}$) (Tableau 6, Figure 9). Pour la diète enrichie, il y a aussi 5 des 6 portées exposées à l'alcool éthylique qui possèdent au moins un embryon affecté comparé à 3 des 8 portées contrôles (p -value $< 10^{-5}$). Bien que le nombre de portées exposées ayant au moins un embryon affecté est égal dans les deux diètes, la diète enrichie a rarement plus d'un embryon affecté par portée (Tableau 6, Figure 9). Ce qui démontre que la diète enrichie atténue l'impact de l'exposition à l'alcool éthylique au stade E10.5.

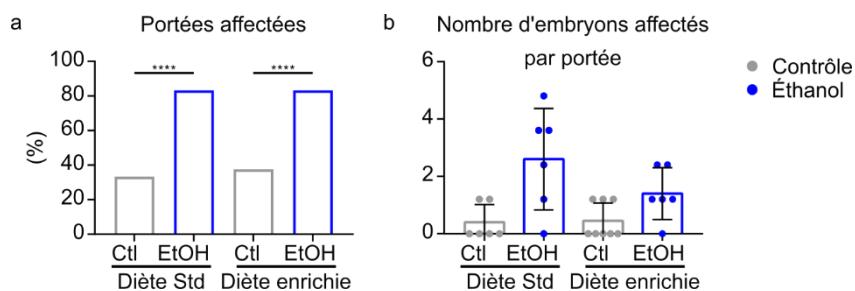


Figure 9. – **Effet de la diète contre l'exposition à l'alcool éthylique sur les portées au stade E10.5.** a) Pourcentage de portées affectées (n=6-8) b) Nombre d'embryons présentant un défaut morphologique par portée. L'analyse statistique pour le pourcentage de portées affectées a été mesurée par un test chi-carré * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$. L'analyse statistique a été mesurée par un test ANOVA avec correction de Welch * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ et **** $p \leq 0.0001$.

Tableau 6. – Embryons et portées présentant un défaut morphologique à E10.5.

E10.5	Diète standard				Diète enrichie			
	Ctl	EtOH	Valeur X ²	p-value*	Ctl	EtOH	Valeur X ²	p-value*
Embryons avec au moins un défaut morphologique	2/38	13/43	21,65	<0,00001	3/56	7/42	7,35	0,013
Mères avec au moins un embryon avec un défaut	2/6	5/6	51.31	<0,00001	3/8	5/6	42.37	<0,00001

*Chi carré

3.2 Atténuation des défauts morphologiques par la prise d'une diète enrichie en donneurs de groupements méthyles à E18.5.

Ayant démontré que la diète enrichie pouvait réduire les défauts morphologiques à mi-gestation (E10.5) suivant une exposition prénatale à l'alcool éthylique sur les embryons préimplantatoires, j'ai voulu déterminer l'effet de la diète pendant toute la période de gestation. Donc, suivant mon modèle d'exposition à l'alcool et diète maternelle (Figure 4), j'ai cette fois récupéré les embryons juste avant la naissance au jour E18.5 et effectué diverses analyses suivant notre système d'évaluation dysmorphologique. Premièrement, l'exposition à l'alcool éthylique ne diminue pas de manière significative le nombre d'embryons par portée à E18.5 (Diète standard : Ctl 8.5 vs EtOH 7.8; Diète enrichie : Ctl 8.8 vs EtOH 8.4; n=8-9 portées) (Tableau 7, Figure 10). Également, la diète enrichie n'affecte pas le nombre d'embryons par portée et ne cause pas de changements morphologiques lorsqu'on compare les embryons contrôles des deux diètes. Cependant, on peut voir que les embryons exposés à l'éthanol de la diète standard ont une augmentation significative pour divers aspects morphologiques soient le poids du cerveau (Ctl 0,0591g vs EtOH 0,0623g, $p \leq 0,01$), la taille de la tête (Ctl 5,47mm vs EtOH 5,70mm, $p \leq 0,01$), la largeur de la tête (Ctl 6,07mm vs EtOH 6,24mm, $p \leq 0,001$) ainsi que la distance entre les yeux (Ctl 3,68mm vs EtOH 3,74mm, $p \leq 0,05$) (Figure 10, Tableau 7). On observe aussi que la diète enrichie rectifie la plupart de ces

changements et que les embryons exposés à l'EtOH de la diète ont une augmentation significative seulement pour la taille de la tête (Ctl 5,34mm vs EtOH 5,55mm, $p \leq 0,01$) (Tableau 7, Figure 10).

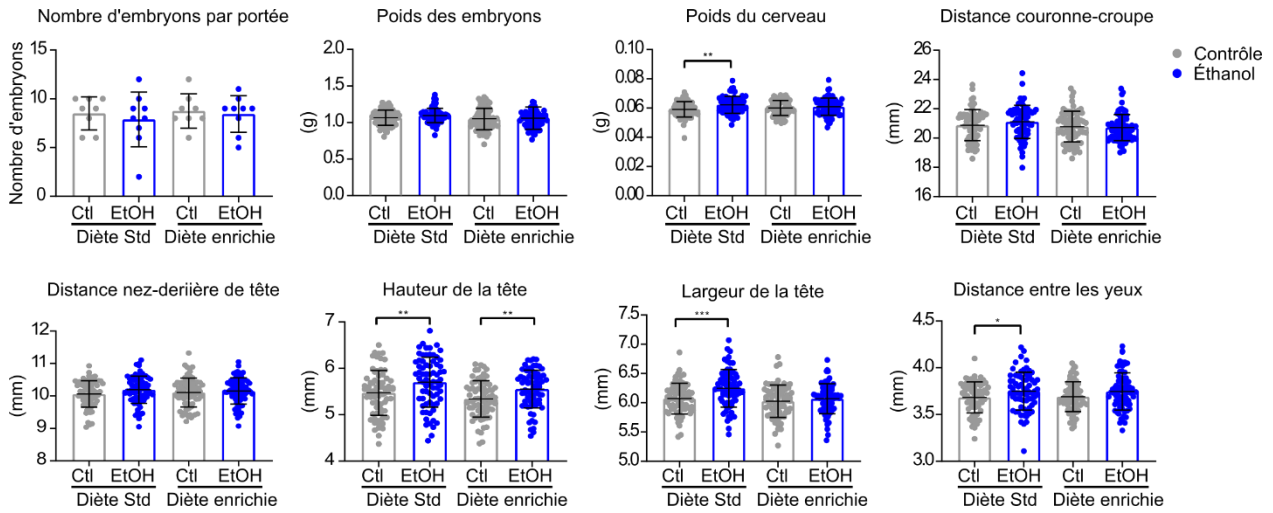


Figure 10. – **La diète enrichie en donneurs de groupements méthyles corrige certains changements morphologiques causés par l'alcool éthylique chez les embryons à E18.5.** La grosseur de la portée (diète standard: Ctl (n=8) et EtOH (n=9), diète enrichie: Ctl (n=9) et EtOH (n=9)) et les mesures des aspects morphologiques des embryons pour les 4 groupes (diète standard: contrôle (n=68) et embryons exposés à l'EtOH (n=70), diète enrichie: contrôle (n=69) et embryons exposés à l'EtOH (n=75)). L'analyse statistique a été mesurée par un t-test non-pairé avec une correction de Welch et les barres d'erreurs représentent la SD * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ et **** $p \leq 0.0001$

Tableau 7. – Aspects morphologiques des embryons E18.5.

E18.5	Diète standard				Diète enrichie			
	Moyenne Ctl (n=8, n=68)	Moyenne EtOH (n=9, n=70)	p-value		Moyenne Ctl (n=8, n=69)	Moyenne EtOH (n=9, n=75)	p-value	
Nombre d'embryons par portée	8,5 ± 1,7	7,8 ± 2,8	0,5908	ns	8,8 ± 1,8	8,4 ± 1,9	0,7335	ns
Poids embryon	1,07 ± 0,10	1,09 ± 0,97	0,0928	ns	1,04 ± 0,15	1,06 ± 0,15	0,6090	ns
Poids cerveau	0,0591 ± 0,0053	0,0623 ± 0,0096	0,0018	**	0,0600 ± 0,0052	0,0609 ± 0,0059	0,3354	ns
Distance couronne- croupe	20,88 ± 1,06	21,11 ± 1,13	0,2224	ns	20,78 ± 1,05	20,71 ± 0,89	0,6939	ns
Distance nez- derrière de la tête	10,06 ± 0,41	10,19 ± 0,42	0,0622	ns	10,10 ± 0,44	10,15 ± 0,40	0,4874	ns
Hauteur de la tête	5,47 ± 0,48	5,70 ± 0,53	0,0095	**	5,34 ± 0,39	5,55 ± 0,41	0,0017	**
Largeur de la tête	6,07 ± 0,26	6,24 ± 1,09	0,0007	***	6,03 ± 0,77	6,07 ± 0,75	0,3312	ns
Distance entre les yeux	3,68 ± 0,17	3,74 ± 0,49	0,0396	*	3,69 ± 0,76	3,75 ± 0,48	0,0668	ns

*t-test avec correction de Welch

Comme au stade E10.5, nous avons observé des défauts morphologiques chez les embryons E18.5 (Figure 11). Les embryons exposés à l'alcool éthylique de la diète standard ont une augmentation significative du nombre d'embryons affectés par rapport aux embryons contrôles (Ctl 4,4% vs EtOH 18,6%, $p \leq 0.01$) (Figure 11a). Les types de défauts que nous avons observé chez ces embryons sont des restrictions ou retards de croissance (diète standard : Ctl 3% vs EtOH 7%, $p=0,5$), des défauts aux yeux (diète standard : Ctl 1% vs EtOH 1%, $p=1,0$), des malformations au cerveau (diète standard : Ctl 0% vs EtOH 3%, $p=0,5$) ainsi que des défauts divers (diète standard :

Ctl 0% vs EtOH 7%, $p=0,07$). Ces autres défauts comprennent des défauts plus rares comme la polydactylie ou moins caractérisé comme une morphologie anormale du corps (Figure 11b,c). Bien que nous voyions une augmentation significative des défauts chez les embryons EtOH de la diète standard, il n'y pas de différence significative lorsqu'on compare les types de défauts un à un. Avec la diète enrichie, les embryons exposés à l'alcool éthylique ne présentaient pas de défauts aux yeux, de défauts divers et avait une légère diminution au niveau des restrictions/retards de croissance (diète standard : EtOH 7% vs diète enrichie EtOH 5%, $p=0,9$) et des malformations au cerveau (diète standard: EtOH 3% vs diète enrichie: EtOH 1%, $p=1,0$). Aussi, lorsqu'on compare le pourcentage total de défauts morphologiques des embryons exposés à l'EtOH entre les deux diètes, le pourcentage de la diète enrichie est presque trois fois plus petit que celui de la diète standard (diète standard: EtOH 18,6% vs diète enrichie : EtOH 6,7%, $p\leq 0,05$). Ce qui démontre que la diète enrichie a un effet protecteur au cours de la gestation face à une exposition à l'alcool éthylique comparativement à la diète standard et permet de réduire le nombre de défauts visibles.

Nous avons aussi vérifié la répartition des embryons affectés dans les portées. Pour la diète standard, nous avons remarqué qu'un peu plus de la moitié des portées sont affectées par l'exposition à l'alcool éthylique comparativement au contrôle qui ont 3 sur 8 portées d'affectées ($p\text{-value}=0,011$) (Tableau 8, Figure 12). Environ un cinquième des portées exposées à l'EtOH comportent au moins un embryon affecté et seulement un dixième pour les contrôles dans la diète enrichie en donneurs de groupements méthyles ($p\text{-value}=0,17$) (Tableau 8). Donc, on voit que ce n'est pas seulement une portée qui est affectée par l'alcool éthylique et que la diète réduit le nombre de portées affectées.

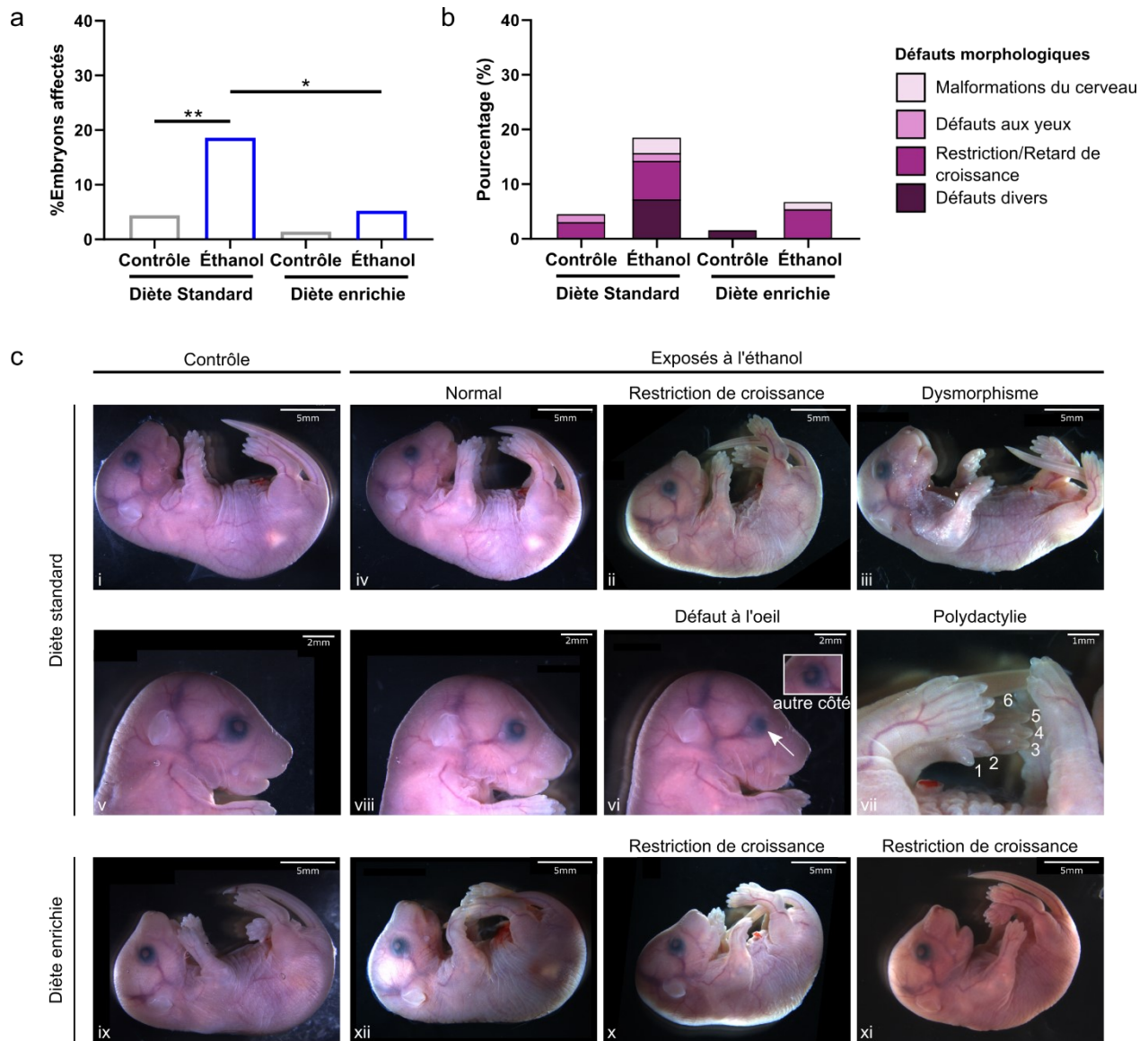


Figure 11. – La diète enrichie en donneurs de groupements méthyles réduit les défauts associés à une exposition prénatale à l'alcool de type *binge-drinking* à E18.5. a) Comparaison du pourcentage d'embryons affectés entre les embryons contrôles (n=68; n=70) et les embryons exposés à l'éthanol (n=69; n=75) à E18.5 pour les diètes standard et enrichie respectivement. L'analyse statistique a été mesurée avec un test chi-carré *p≤0.05, ** p≤0.01 et ***p≤0.001. b) Comparaison des types de défauts observés dans les embryons affectés par une exposition à l'éthanol entre les diètes standard et enrichie à E18.5. c) Images des divers défauts observés selon leurs expositions et leurs diètes

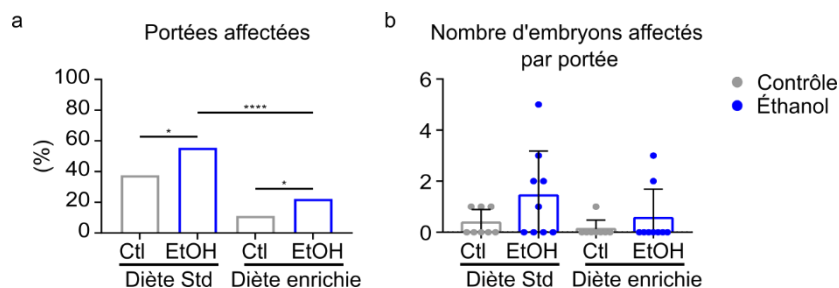


Figure 12. – **Effet de la diète contre l'exposition à l'alcool éthylique sur les portées au stade E18.5.** a) Pourcentage de portées affectées (n=8-9). b) Nombre d'embryons affectés par portée. L'analyse statistique pour le pourcentage de portées affectées a été mesurée par un test chi-carré * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA avec correction de Welch * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ et **** $p \leq 0.0001$.

Tableau 8. – Embryons et portées présentant un défaut morphologique à E18.5

E18.5	Diète standard				Diète enrichie			
	Ctl	EtOH	Valeur X ²	p-value*	Ctl	EtOH	Valeur X ²	p-value*
Embryons avec au moins un défaut morphologique	3/68	13/70	9,28	0,0047	1/69	5/75	2,91	0,17
Mères avec au moins un embryon avec un défaut	3/8	5/9	6,50	0,011	1/9	2/9	4,39	0,036

*Chi carré

3.3 Effet de la diète enrichie contre une exposition prénatale à l'alcool sur le squelette des embryons à E18.5.

Puisque les enfants TSAF peuvent avoir des malformations crâniocfaciales et que des études démontrent que les os peuvent être affectés par la prise d'alcool maternelle de façon chronique ou avec une dose aiguë [236, 237], nous avons voulu investiguer l'effet potentiel d'une exposition

prénatale lors de la préimplantation sur le développement du squelette. Nous avons donc effectué des colorations de squelette à l'*alizerin red* et l'*alcian blue* pour vérifier l'ossification des embryons ainsi que la formation du cartilage au stade E18.5. Nous avons observé chez certains embryons exposés à l'alcool éthylique des deux diètes de légers retards dans la formation des os comparativement aux embryons contrôles (Figure 13a). Ces retards sont retrouvés au niveau des sternèbres (diète standard n=4, diète enrichie n=1) et une perte d'ossification à certains endroits de l'os occipital est observé (diète standard n=1, diète enrichie n=1). Certains embryons présentaient les deux défauts (diète standard n=3, diète enrichie n=4) et parmi les embryons exposés de la diète standard, deux embryons avaient un retard dans la formation de la 4^e sternèbre comparativement aux contrôles et aux embryons exposés à l'EtOH sans défaut apparent du squelette (Figure 13d). De plus, les embryons affectés au niveau du squelette étaient majoritairement plus petits. Il n'y a pas de changement significatif dans la taille de la tête ou la longueur du museau, mais une plus grande variabilité est observée chez les embryons exposés à l'alcool éthylique des deux diètes lorsque comparés aux contrôles (Figure 13b,c). Cette variabilité est significative seulement pour la longueur du museau des embryons exposés à l'alcool éthylique comparativement aux contrôles de la diète standard. Ces résultats démontrent que de légers retards de croissance des os sont observables à la suite d'une exposition prénatale à l'alcool éthyliques dans les deux diètes.

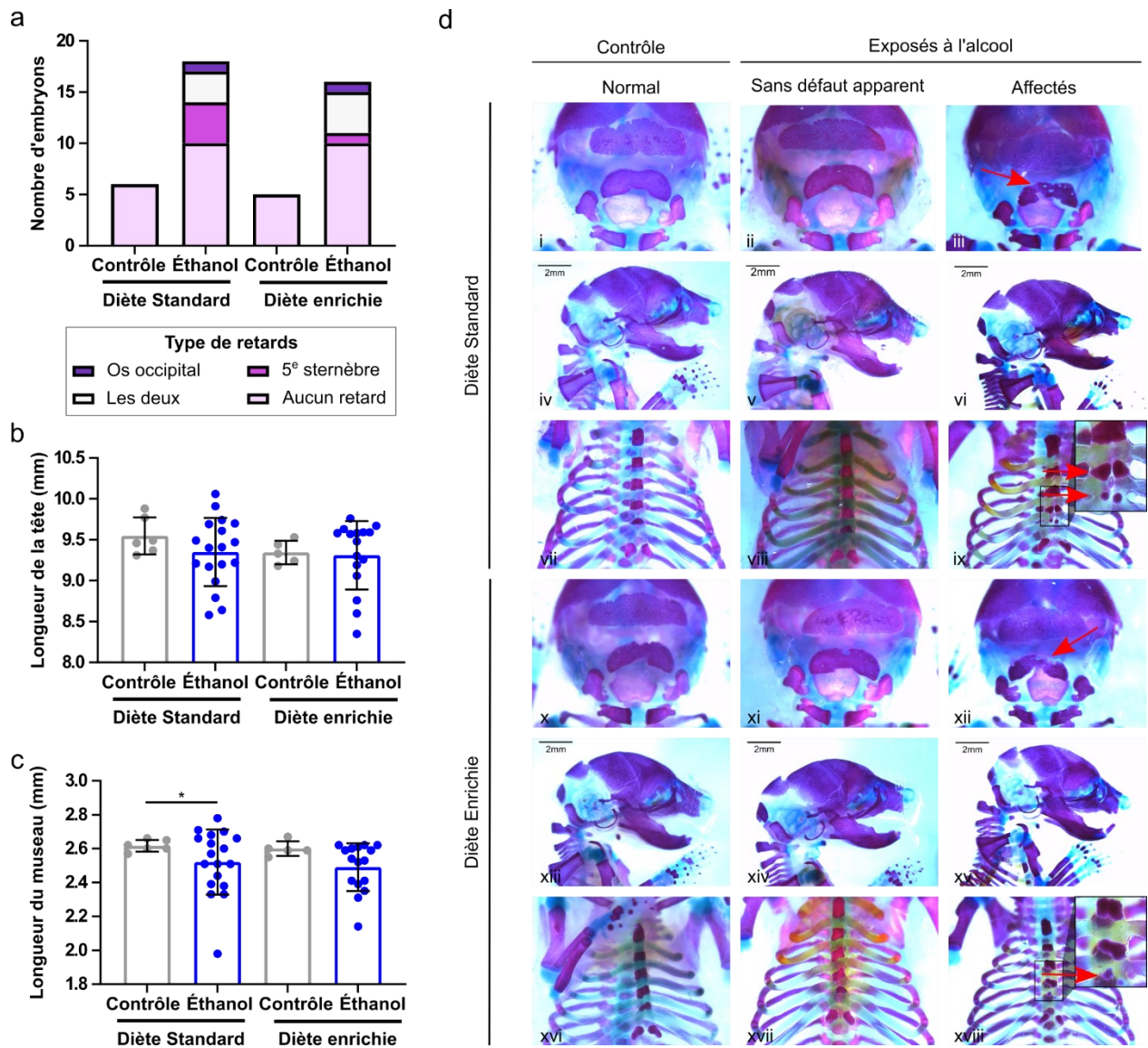


Figure 13. – La diète enrichie ne prévient pas les légers retards d'ossification causés par une exposition prénatale à l'alcool éthylique. a) Type de délais d'ossification observés b) Mesures de la taille de la tête c) Mesure de la taille du museau d) Exemples des délais d'ossification observés (Diète standard : contrôle n=6 et embryons exposés à l'éthanol n=18, Diète enrichie : contrôle n=5 et embryons exposés à l'EtOH n=16). Les tests statistiques ont été analysés avec un t-test non païré avec une correction de Welch et les barres d'erreurs représentent la SD *p≤0.05, ** p≤0.01, ***p≤0.001 et ****p≤0.0001.

3.4 Effet de la diète enrichie contre une exposition prénatale à l'alcool sur la méthylation et l'expression des gènes à empreintes

Pendant la période préimplantatoire, les profils de méthylation d'ADN doivent être maintenus sur les gènes à empreintes, et la perte de ces profils peut mener à divers problèmes développementaux. Pour déterminer si les défauts morphologiques qu'on observe étaient associés à une méthylation erronée des gènes à empreintes, nous avons utilisé une approche ciblée (*Implicon*) afin de séquencer les régions régulatrices (ICR) de divers gènes à empreinte. Cette méthode nous permet d'analyser la présence ou absence de méthylation d'ADN sur les CpGs retrouvés dans un segment d'ADN de 250-500pb des ICR. Une première vue d'ensemble nous fait constater que la moyenne de méthylation de ces régions est stable et que peu de changements sont apparents à travers les conditions (Figure 14). Par exemple, des gènes comme *Plagl1-Zac1*, *Meg3*, *Peg13* et *Igf2r*, démontrent des niveaux de méthylation constant dans les 4 conditions.

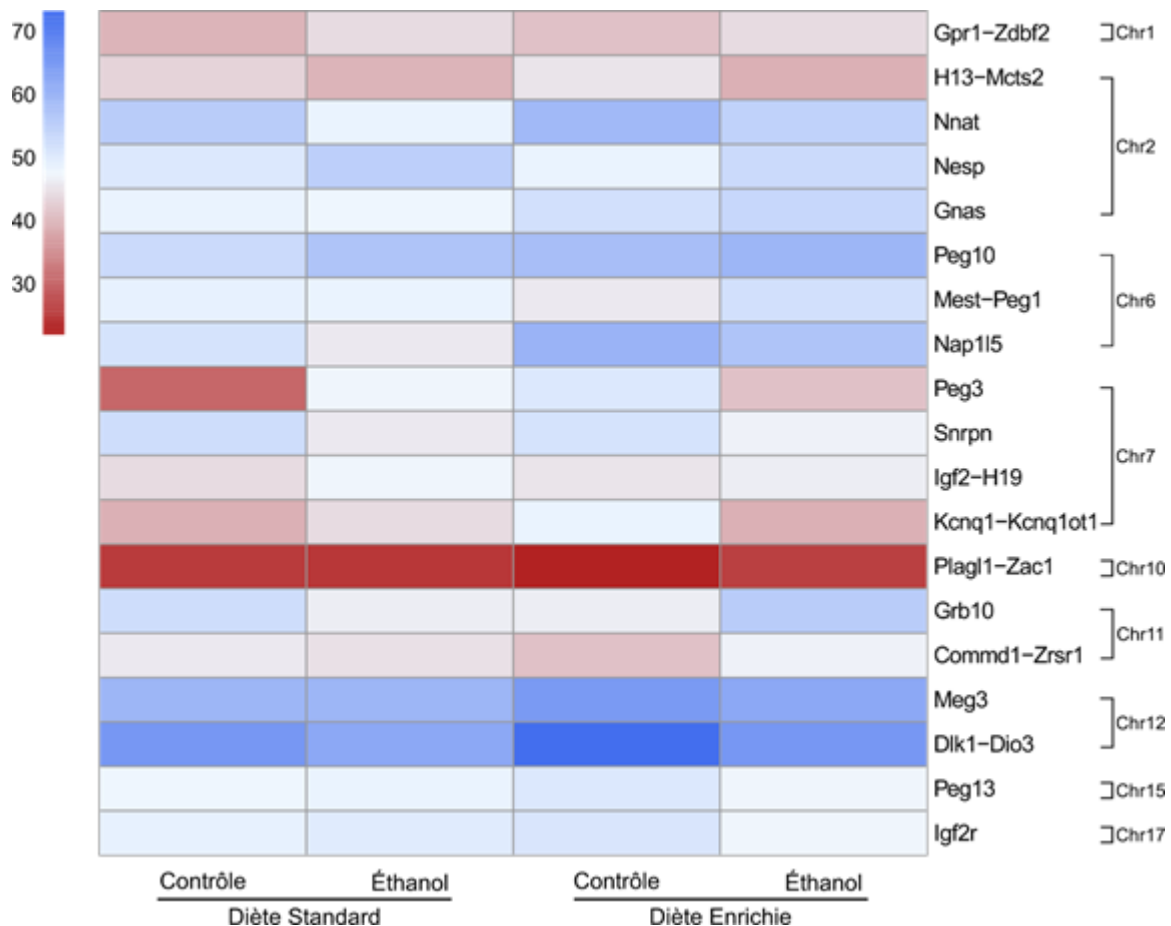


Figure 14. – **L'exposition prénatale à l'alcool éthylique causent de faibles changements au niveau de la moyenne de méthylation des gènes à empreinte.** *Heatmap* de la moyenne de méthylation pour chaque condition des gènes à empreinte classés selon leur ordre dans le génome. (Diète standard : contrôle n=6 et embryons exposés à l'EtOH n=10, diète enrichie : contrôle n=6 et embryons exposés à l'EtOH n=10)

Lorsqu'on regarde la moyenne de la méthylation pour les valeurs individuelles des échantillons, la plupart des gènes n'ont pas de différence significative de méthylation (Figure 15-17). De plus, ces gènes n'ont pas de changement d'expression significatif à l'exception de quelques-uns (*Peg10*, *Mest*, *Kcnq1*, *Plagl1*, *Grb10*) qui ont une légère augmentation d'expression chez les embryons exposés à l'alcool éthylique des diètes standard et enrichie, ce qui concorde généralement avec ce qui est observé pour la méthylation (Figure 15-17).

Bien que la plupart des gènes n'ont pas de changement significatif au niveau de la méthylation, certains gènes (e.g. *Nesp*, *Peg3*, *Dlk1-Dio3*, *Peg13*) ont de faibles changements significatifs particulièrement lorsqu'on regarde de manière sexe-spécifique (Figure 18-21). Par exemple, on voit que la méthylation du ICR de *Dlk1-Dio3* a une tendance vers une hypométhylation chez les embryons femelles exposés à l'EtOH de la diète standard alors que les embryons exposés à l'EtOH de la diète enrichie sont plus près des contrôles (Figure 20C). Lorsqu'on compare la méthylation avec l'expression du gène *Dlk1*, on peut voir que les changements d'expression concordent avec les changements de méthylation (Figure 20C.i). En effet, l'hypométhylation des embryons exposés à l'EtOH de la diète standard cause une augmentation de l'expression par rapport aux contrôles alors que les embryons exposés à l'EtOH de la diète enrichie ont des niveaux d'expression similaires aux contrôles. Ce qui indique que la diète a prévenu ce changement de méthylation et d'expression chez les femelles. Cependant, cet effet protecteur n'est pas observé chez les mâles. Pour ce qui est de *Dio3*, on ne voit pas de changement significatif au niveau de l'expression, mais il semble quand même y avoir une tendance similaire à *Dlk1* (Figure 20C.ii).

Donc, de manière générale, l'exposition prénatale à l'alcool éthylique a affecté peu la méthylation, dans les régions ciblées, et l'expression des gènes à empreintes. Cependant, la diète pourrait potentiellement avoir un effet protecteur sur la méthylation et l'expression de certains gènes.

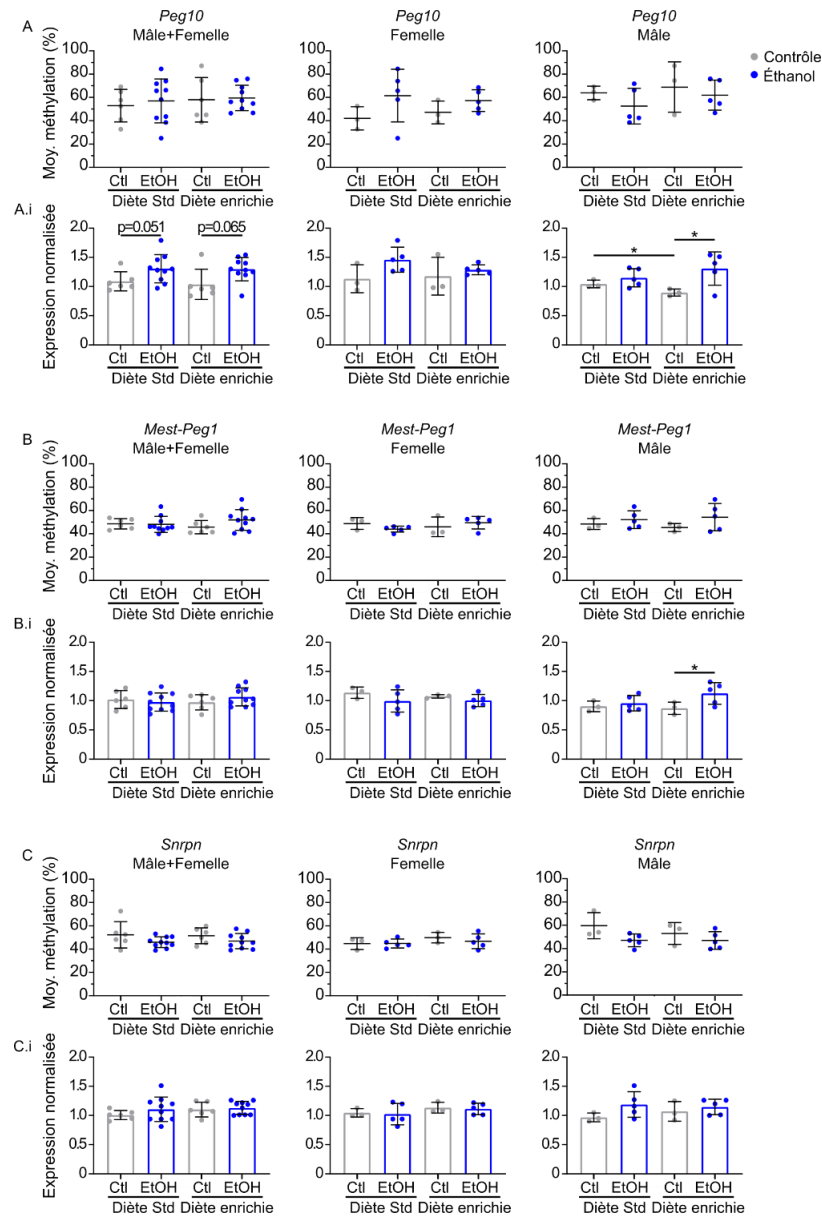


Figure 15. – Niveaux de méthylation et d’expression des gènes à empreinte *Peg10*, *Mest-Peg1* et *Snrpn* suivant une exposition prénatale à l’alcool éthylique. A-C) Valeurs de la moyenne de la méthylation des différents échantillons A.i-C.i) Valeurs d’expression normalisée des gènes correspondants en A-C (Diète standard : contrôle n=6 et éthanol n=10, Diète enrichie : contrôle n=6 et éthanol n=10). Les analyses statistiques de la moyenne de méthylation et de l’expression ont été effectuées avec des t-tests multiples avec correction de Welch et une ANOVA avec correction de Welch respectivement (barres d’erreurs : SD) *p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001 et ****p<0.0001.

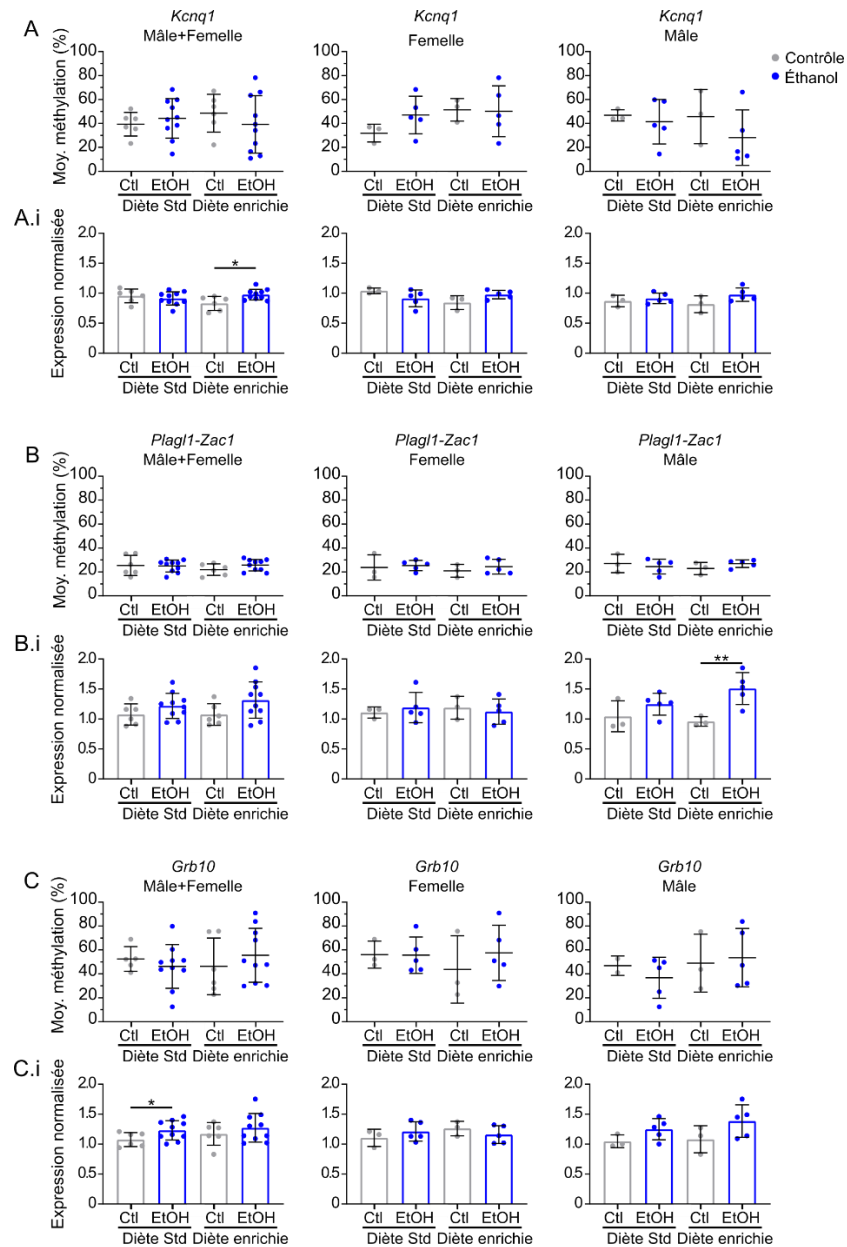


Figure 16. – Niveaux de méthylation et d’expression des gènes à empreinte *Kcnq1*, *Plagl1*, *Zac1* et *Grb10* suivant une exposition prénatale à l’alcool éthylique. A-C) Valeurs de la moyenne de la méthylation des différents échantillons A.i-C.i) Valeurs d’expression normalisée des gènes correspondants en A-C (Diète standard : contrôle n=6 et éthanol n=10, Diète enrichie : contrôle n=6 et éthanol n=10). Les analyses statistiques de la moyenne de méthylation et de l’expression ont été effectuées avec des t-tests multiples avec correction de Welch et une ANOVA avec correction de Welch respectivement (barres d’erreurs : SD) * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ et **** $p \leq 0.0001$.

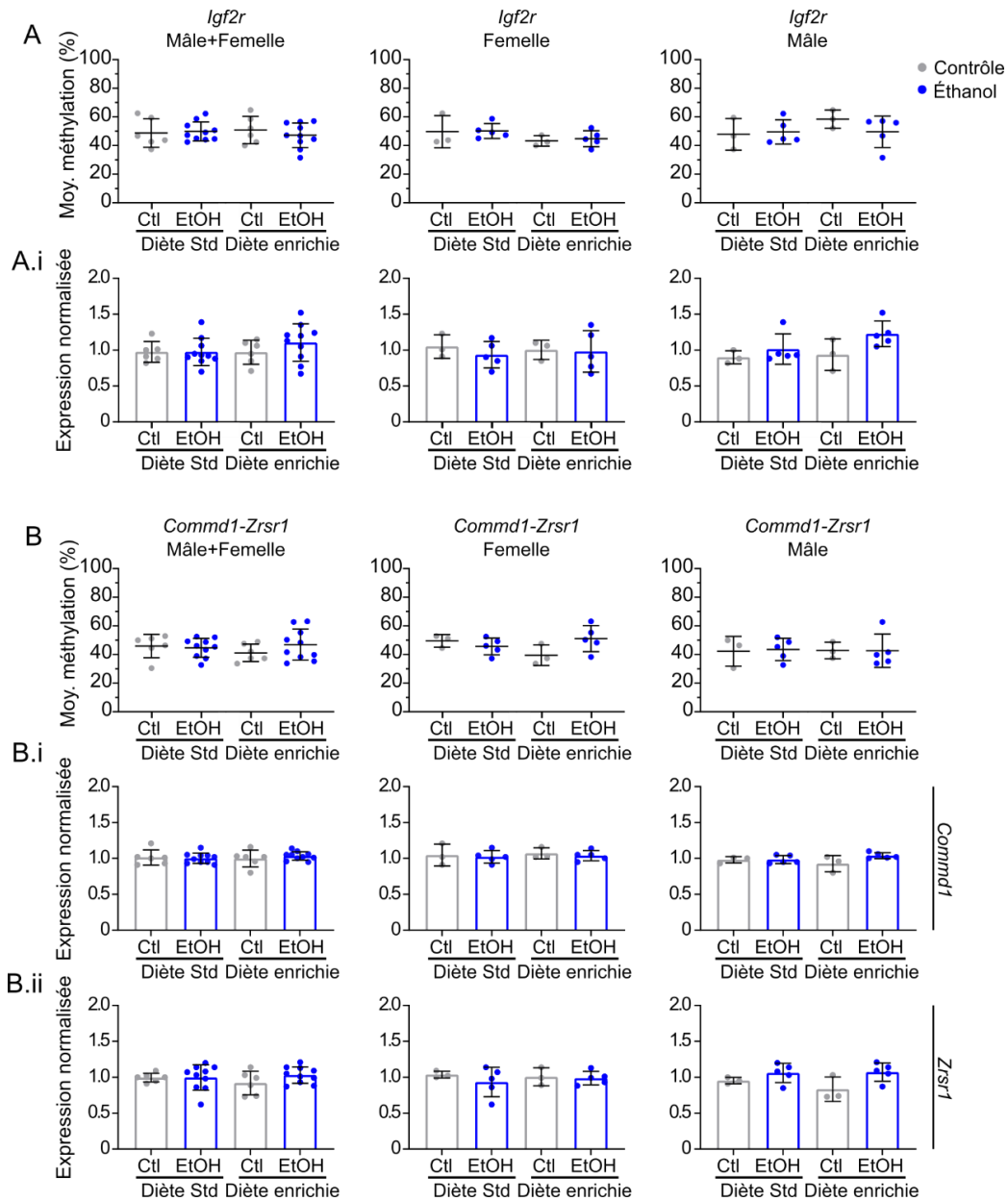


Figure 17. – **Niveaux de méthylation et d'expression des gènes à empreinte *Igf2r*, *Commd1* et *Zrsr1* suivant une exposition prénatale à l'alcool éthylique.** A-B) Valeurs de la moyenne de la méthylation des différents échantillons A.i-B.ii) Valeurs d'expression normalisée des gènes correspondants en A-C (Diète standard : contrôle n=6 et éthanol n=10, Diète enrichie : contrôle n=6 et éthanol n=10). Les analyses statistiques de la moyenne de méthylation et de l'expression ont été effectuées avec des t-tests multiples avec correction de Welch et une ANOVA avec correction de Welch respectivement (barres d'erreurs : SD) * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ et **** $p \leq 0.0001$.

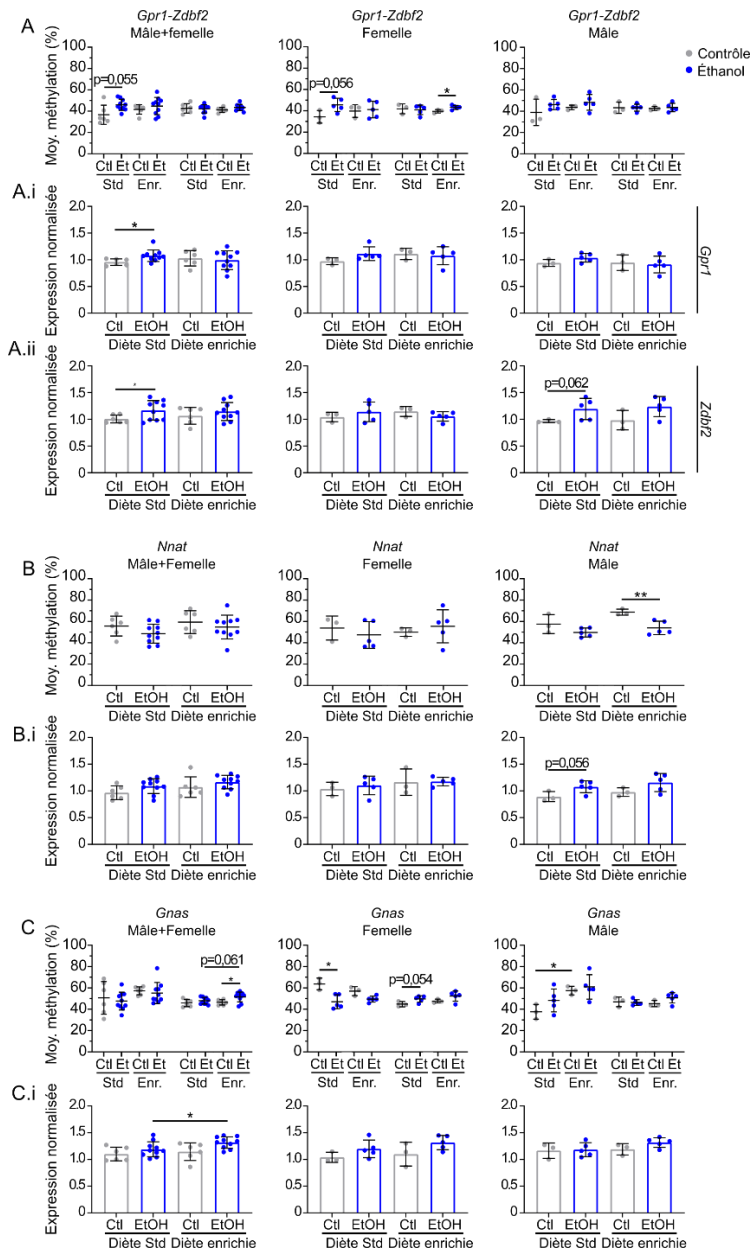


Figure 18. – Niveaux de méthylation et d'expression des gènes à empreinte *Gpr1*, *Zdbf2*, *Nnat* et *Gnas* suivant une exposition prénatale à l'alcool éthylique. A-C) Valeurs de la moyenne de la méthylation des différents échantillons A.i-C.i) Valeurs d'expression normalisée des gènes correspondants en A-C (Diète standard : contrôle n=6 et éthanol n=10, Diète enrichie : contrôle n=6 et éthanol n=10). Les analyses statistiques de la moyenne de méthylation et de l'expression ont été effectuées avec des t-tests multiples avec correction de Welch et une ANOVA avec correction de Welch respectivement (barres d'erreurs : SD) *p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001 et ****p<0.0001.

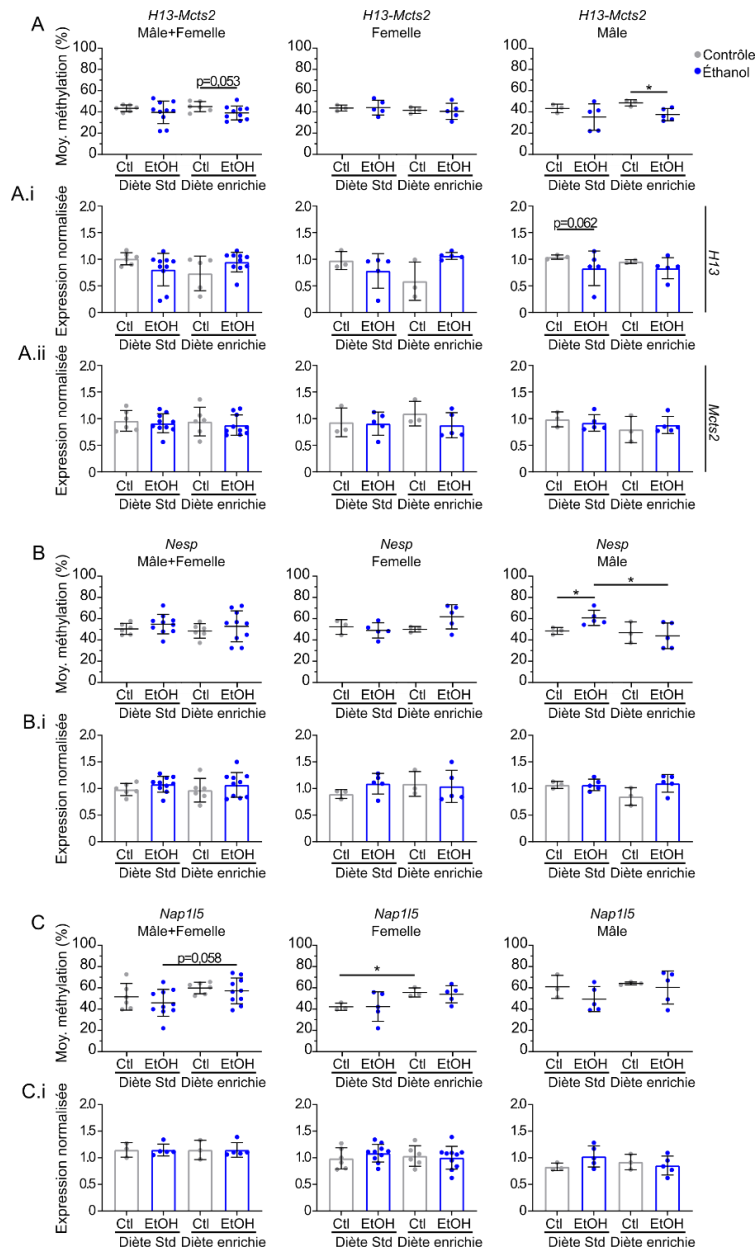


Figure 19. – Niveaux de méthylation et d'expression des gènes à empreinte *H13*, *Mcts2*, *Nesp* et *Nap15* suivant une exposition prénatale à l'alcool éthylique. A-C) Valeurs de la moyenne de la méthylation des différents échantillons A.i-C.i) Valeurs d'expression normalisée des gènes correspondants en A-C (Diète standard : contrôle n=6 et éthanol n=10, Diète enrichie : contrôle n=6 et éthanol n=10). Les analyses statistiques de la moyenne de méthylation et de l'expression ont été effectuées avec des t-tests multiples avec correction de Welch et une ANOVA avec correction de Welch respectivement (barres d'erreurs : SD) * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ et **** $p \leq 0.0001$.

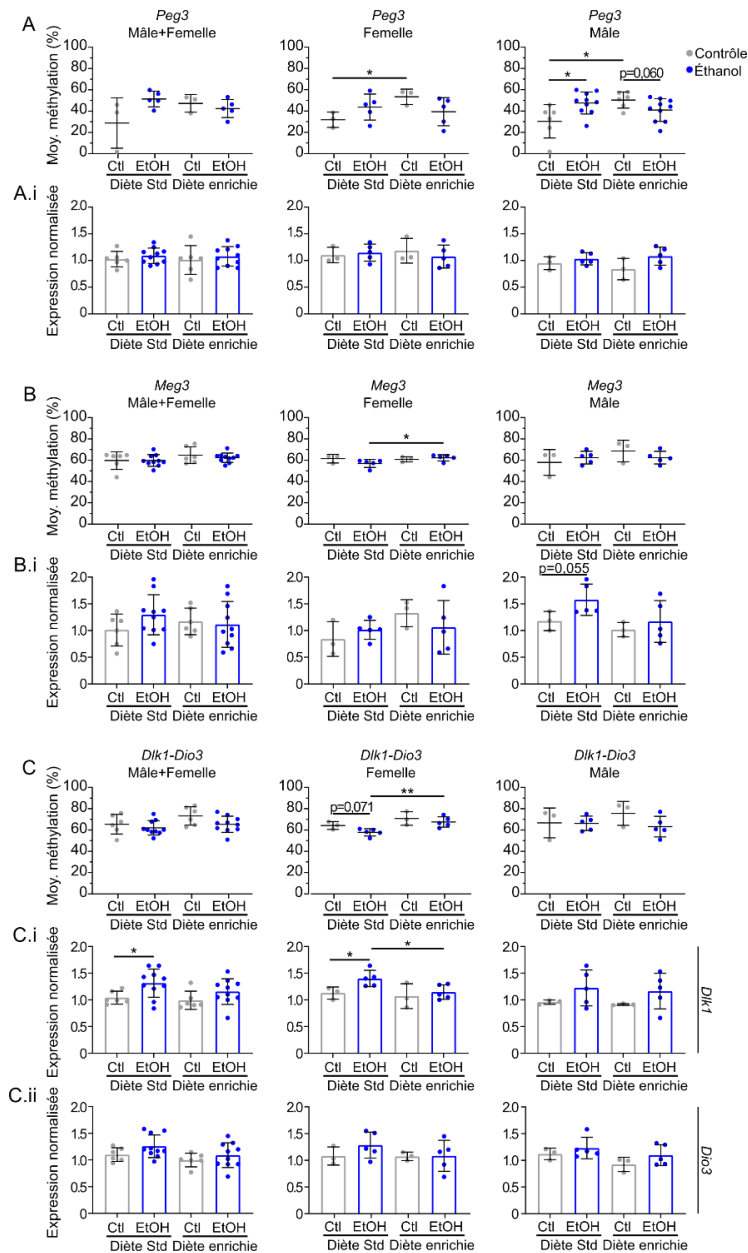


Figure 20. – **Niveaux de méthylation et d'expression des gènes à empreinte *Peg3*, *Meg3*, *Dlk1* et *Dio3* suivant une exposition prénatale à l'alcool éthylique.** A-C) Valeurs de la moyenne de la méthylation des différents échantillons A.i-C.ii) Valeurs d'expression normalisée des gènes correspondants en A-C (Diète standard : contrôle n=6 et éthanol n=10, Diète enrichie : contrôle n=6 et éthanol n=10). Les analyses statistiques de la moyenne de méthylation et de l'expression ont été effectuées avec des t-tests multiples avec correction de Welch et une ANOVA avec correction de Welch respectivement (barres d'erreurs : SD) * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ et **** $p \leq 0.0001$.

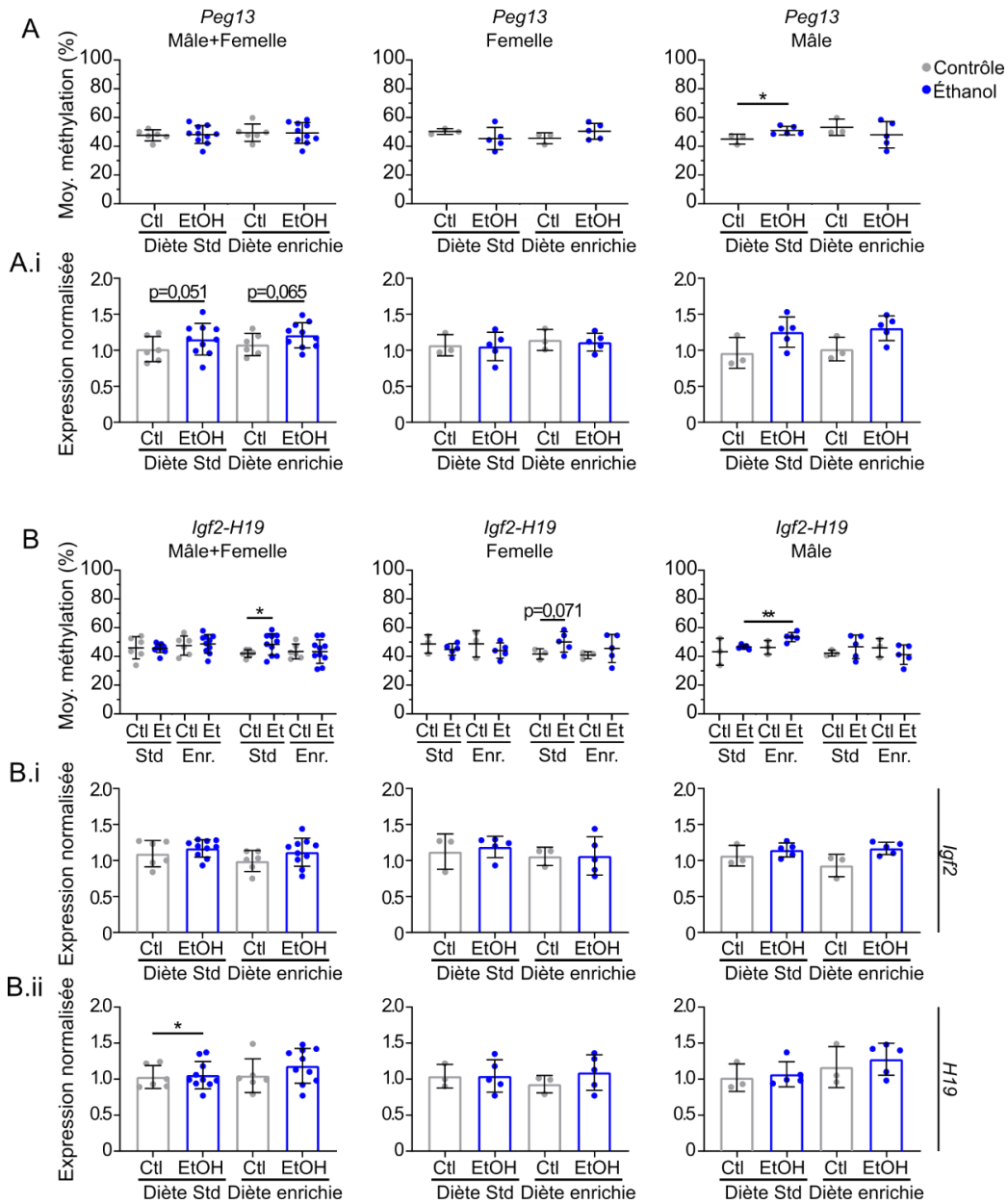


Figure 21. – **Niveaux de méthylation et d'expression des gènes à empreinte *Peg13*, *Igf2* et *H19* suivant une exposition prénatale à l'alcool éthylique.** A-B) Valeurs de la moyenne de la méthylation des différents échantillons A.i-B.ii) Valeurs d'expression normalisée des gènes correspondants en A-B (Diète standard : contrôle n=6 et éthanol n=10, Diète enrichie : contrôle n=6 et éthanol n=10). Les analyses statistiques de la moyenne de méthylation et de l'expression ont été effectuées avec des t-tests multiples avec correction de Welch et une ANOVA avec correction de Welch respectivement (barres d'erreurs : SD) * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ et **** $p \leq 0.0001$.

Chapitre 4 – Discussion

Il est maintenant reconnu qu'une exposition prénatale à l'alcool pendant la gestation peut avoir des conséquences graves sur le développement l'enfant et mener aux TSAF. Cependant, on connaît très peu les effets d'une telle exposition pendant la période préimplantatoire, et si nous pouvons protéger l'embryon des potentiels impacts négatifs via la diète. Puisqu'il n'y a pas de traitement post-natal possible pour les enfants atteints de TSAF, une des façons de mitiger ou contrer les effets d'une exposition à l'alcool pourrait être fait à travers la diète maternelle. À travers mes travaux de maîtrise, je démontre qu'une exposition à l'alcool éthylique durant la période préimplantatoire a un impact à long terme sur la morphologie embryonnaire durant toute la gestation, et que l'application d'une diète maternelle préconception et durant la gestation à un effet protecteur et permet de réduire le nombre de défauts morphologiques autant à la mi-gestation (E10.5) qu'à la fin de la gestation (E18.5) chez la souris.

Je démontre également que la moyenne de la méthylation de l'ADN sur une portion des régions régulant de nombreux gènes à empreinte, les ICRs, démontrent peu de changements au stade E18.5 suivant une exposition au jour E2.5, suggérant que les défauts observés pendant le développement ne sont pas dus à une défaillance majeure dans le processus de maintenance des profils de méthylation sur ces gènes. Corrélativement, même si on voit certaines irrégularités au niveau de l'expression associée à ces gènes, il n'y a pas d'impact majeur. Il est important de souligner que l'ajout de nutriments impliqués dans la production de groupements méthyles dans la diète maternelle n'a que très peu d'impact sur l'établissement et le maintien des profils de méthylation de l'ADN et l'expression des gènes à empreinte.

4.1 Impact de la diète sur la prévention de défauts morphologiques suivant une exposition prénatale à l'alcool chez l'embryon préimplantatoire.

J'ai observé que l'exposition prénatale à l'alcool éthylique durant la préimplantation cause des défauts morphologiques à E10.5 et que ces défauts persistent jusqu'à E18.5. Ce qui suggère que ces défauts pourraient aussi être présents à la naissance. Ces résultats concordent avec les autres modèles de TSAF qui ont observé qu'une exposition prénatale à l'alcool survenant au début du développement entraînent des défauts morphologiques qui perdurent dans le temps [8, 139, 161]. De plus, ces défauts sont similaires à ce qui est observé chez les enfants TSAF [99-102]. Lorsqu'on applique la diète riche en groupements méthyles à notre modèle, on voit que celle-ci est capable de protéger significativement les embryons contre les effets nocifs d'une exposition à l'alcool éthylique lors de la préimplantation. Ces résultats correspondent aux autres études employant des donneurs de groupements méthyles (e.g., folate, choline, bêtaïne) pour protéger contre une exposition prénatale à l'alcool, mais notre combinaison de nutriments semble être plus efficace pour prévenir les anomalies dues à l'alcool éthylique. En effet, celle-ci diminue, entre autres, les défauts morphologiques et permet de réduire l'impact de l'alcool éthylique sur le développement du cerveau [10-14]. Dans la plupart des études avec une diète enrichie en folate ou en bêtaïne, celle-ci n'arrive pas à protéger la totalité des embryons [10, 11, 14]. Il est possible que ce soit l'effet des ROS et que malgré la supplémentation avec de la bêtaïne qui a une activité antioxydante, ce ne soit pas suffisant pour balancer la quantité de ROS et leurs effets dommageables.

De plus, nous avons montré que la diète enrichie permettait de réduire certains types de défauts (E10.5, E18.5) et d'en éliminer dans les embryons exposés à l'EtOH à E18.5. Chez les embryons exposés à l'EtOH à E10.5, la diète a permis de réduire de moitié les malformations du cerveau. Ces effets pourraient être dû à la supplémentation en folate et en choline puisqu'il a été démontré que ces deux nutriments permettent de réduire les défauts du tube neural et sont importants pour le développement du cerveau [194, 204]. La diète enrichie a permis d'éliminer les défauts aux yeux (e.g., anophthalmie, microphthalmie) ainsi que les défauts autres (e.g. polydactylie,

dysmorphisme) chez les embryons exposés à l'EtOH. Dans une étude chez le poisson-zèbre, ils ont aussi observé une réduction des défauts aux yeux avec l'ajout de folate au milieu [10] . Cependant, on ne semble pas être capable de protéger les embryons des retards et restrictions de croissance avec la diète enrichie. Un lien causatif a été établi entre la production de ROS et les restrictions de croissance donc il est possible que la génération de ROS par l'alcool excède la capacité antioxydante de la diète et affecte d'autres voies métaboliques [238, 239]. D'ailleurs, dans une étude chez la souris, l'ajout de bêtaïne ne permettait pas de ramener les niveaux de ROS à une valeur similaire aux contrôles et ils continuaient d'observer des restrictions de croissance [14].

Ensuite, nous n'avons observé aucune différence significative peu importe le stade ou le groupe dans le nombre d'embryons par portée. Ce qui démontre que l'exposition ou la diète n'affectent pas la grosseur des portées. Nous n'observons pas de changements significatifs au niveau des mesures morphologiques des embryons à E10.5 comparativement à E18.5 où les embryons ont plusieurs augmentations significatives (poids du cerveau, hauteur de la tête, largeur de la tête et distance entre les yeux). Ce qui peut indiquer que ces altérations deviennent perceptibles plus tard dans le développement. Bien que dans les expositions survenant plus tard dans le développement on observe l'inverse, ces augmentations pourraient être associés au moment de l'exposition et à des changements de méthylation puisqu'un phénomène similaire survient chez les bovins lors de la reproduction assistée (période de préimplantation) avec le syndrome du gros veau (revu dans [24, 45]). Ce syndrome est associé notamment à une perte de méthylation dans les gènes à empreintes [240]. Aussi, on peut voir qu'à E18.5, la diète enrichie a prévenu la plupart de ces aspects physiques anormaux. Donc, on voit que la diète enrichie a un effet protecteur sur la morphologie similaire à ce qui est rapporté dans divers modèles.

4.2 Effets de la diète contre la prise d'alcool durant la préimplantation sur le squelette d'embryons E18.5

Nous avons regardé le squelette des embryons à E18.5 afin de voir s'il y avait des défauts dans l'ossification ou au niveau du crâne puisque l'exposition à l'alcool peut causer des malformations crâniofaciales. Comme mentionné précédemment nous n'avons pas vu de défauts majeurs dans

les os des embryons exposés à l'alcool éthylique. Cependant, il y avait de légers retards d'ossification au niveau de l'os occipital et des sternèbres chez les embryons exposés à l'EtOH dans les deux diètes avec un poids fœtal réduit. Pour ce qui est de l'os occipital, la légère réduction d'ossification qu'on observe va probablement être rattrapé après la naissance puisque ces parties sont formées un peu avant la naissance. Il est d'ailleurs possible d'observer de type de réduction si l'embryon est récupéré avant la naissance. Le retard observé pour les sternèbres est aussi un retard qui peut être rattrapé après la naissance puisque ce sont des os qui sont formés à la fin du développement de l'embryon. Ces délais d'ossifications sont très souvent associés à une réduction du poids fœtal et découlent d'un retard de croissance généralisé qui sera probablement rattrapé après la naissance. Ces retards n'ont pas de valeur prédictive de tératogénicité puisque leur ossification survient tard dans la gestation [241]. Il serait d'ailleurs intéressant d'observer à un stade plus avancé (e.g. P7) si les souriceaux n'ont plus ces délais d'ossification.

4.3 Implications chez l'embryon des altérations épigénétiques et géniques

Nous avons seulement observé de faibles changements dans la méthylation moyenne de certains gènes à empreinte. Ces résultats de méthylation démontrent la robustesse des gènes à empreinte, ce qui n'est pas surprenant puisque ces gènes sont essentiels au développement et sont nécessaires à la viabilité des embryons. De plus, seulement la moitié des embryons utilisés pour les analyses présentaient des défauts morphologiques (restrictions de croissance, polydactylie, dysmorphisme) donc on ne s'attendait pas à voir beaucoup de changements. Lorsqu'on compare avec le modèle de Haycock et Ramsay, bien qu'ils aient observé des restrictions de croissance, ils n'ont pas observé de changement de méthylation au ICR de *H19* (régulateur négatif de la croissance) dans les embryons [161]. Dans d'autres études, la méthylation des gènes à empreinte ciblés n'était pas changée ou sinon seulement quelques gènes avait des différences significatives [163, 232].

Les altérations de la méthylation que nous avons observées étaient généralement sexe-spécifiques. Parmi ces changements sexe-spécifiques, nous avons d'ailleurs observé une hypométhylation dans la région régulatrice de *Dlk1-Dio3* qui entraîne une augmentation de

l'expression du gène *Dlk1* chez les femelles exposées à l'EtOH de la diète standard qui est normalisée par la diète enrichie. Une autre étude d'exposition prénatale à l'alcool éthylique a aussi observé des changements de méthylation dans la ICR de *Dlk1-Dio3* [107]. Le locus *Dlk1-Dio* produit des ARN non codants qui sont exprimés durant le développement neural et qui sont impliqués, entres autres, dans le remodelage dendritique activité-dépendant, la méthylation et le remodelage de la chromatine. De plus, cette région a été associée avec des problèmes neurodéveloppementaux [242]. De façon générale, les changements de méthylation et d'expression des gènes à empreintes sont minimes et n'auront pas un impact énorme sur l'embryon.

Comme la plupart des gènes à empreinte ne sont pas significativement changés ou peu changés au niveau de la méthylation et de l'expression, il est difficile d'évaluer l'impact de notre diète sur la méthylation et de plus amples analyses seront nécessaires. Cependant, on voit que la diète a quand même un effet protecteur au niveau des défauts morphologiques, ce qui suggère fortement que les profils de méthylation de l'ADN ainsi que l'expression de certains gènes impliqués dans ses défauts pourraient être normalisés par la diète riche en donneurs de méthyles.

4.5 Limitations de l'étude

Une des limitations du projet est qu'on ne sait pas si au jour E2.5 tous les embryons sont bel et bien au stade 8-cellules. Le fait que certains embryons pourraient être encore au stade 4-cellules ou bien avoir plus de 8-cellules pourraient contribuer à l'hétérogénéité dans les phénotypes morphologiques. Il est probable qu'une exposition prénatale à l'alcool durant chaque stade préimplantatoire (e.g., 2-, 4-, 8-, 16-cellules, morula, blastocyste) pourrait avoir un effet différent, puisque chacun de ces embryons sont à des points différents dans la vague de reprogrammation de la méthylation et expriment des gènes différents. Il serait donc important que d'autres modèles soient établis afin d'observer différents jours de la préimplantation et faire la comparaison.

Le nombre d'embryons recueillis est aussi limitant si l'on veut faire des analyses sexe-spécifiques au niveau des analyses morphologiques, car cela réduit le nombre d'embryons par catégorie et la puissance statistique par le fait même. Il faudrait donc augmenter le nombre d'embryons pour

voir des différences entre les sexes et avoir une meilleure représentation des défauts dans chaque sexe étant donné qu'il n'y a pas beaucoup de défauts visibles dans nos embryons.

Une autre limitation est le moment où l'on débute la diète maternelle puisque certaines mères vont commencer à prendre des suppléments de vitamines avant la grossesse lorsque celle-ci est planifiée, mais d'autres mères commenceront seulement à prendre leurs suppléments lorsqu'elles apprendront leur grossesse. Donc, bien que la diète enrichie atténue les effets de l'exposition prénatale à l'alcool éthylique, pour transposer à l'humain une approche préventive, il faudrait commencer la diète à E6.5 ou 9.5 qui correspond au stade où les femmes avec des grossesses non-planifiées constatent leur grossesse. Cependant, l'effet protecteur risque d'être diminué.

La technique utilisée pour analyser la méthylation représente une limitation puisque celle-ci est restreinte aux gènes qu'on amplifie et permet seulement de séquencer des petites régions en dessous de 500pb (certains ICR peuvent s'étendre sur plusieurs kb [243]). Donc, nous n'avons pas une représentation de la méthylation à travers le génome et on ne peut pas savoir comment le reste de la méthylation du génome est affectée. Pour avoir une meilleure représentation de la méthylation, nous pourrions utiliser la technique de *Methyl-Seq Capture* afin d'avoir un aperçu de la méthylation à travers le génome, mais cette technique ne couvre pas tous les CpGs chez la souris (~3,7M sur 20M) et reste plus dispendieuse que la technique d'*Implicon*. Une autre technique possible serait le *Whole Genome Bisulfite Sequencing* pour couvrir tout le génome. Cependant, cette technique est très dispendieuse et génère beaucoup de résultats donc il est plus difficile de faire un grand nombre d'échantillons et elle requière une expertise en bioinformatique très avancée.

4.6 Perspectives

Bien que nous sachions que la diète permet de mitiger les effets de l'exposition prénatale à l'alcool éthylique durant la préimplantation, les mécanismes par lesquels celle-ci agit sont encore peu connus.

Pour étudier la méthylation, nous avons fait une approche par gènes cibles pour la méthylation qui a montré de petits changements aux ICR des gènes à empreintes. Cependant, nous savons que notre modèle d'exposition prénatale à l'alcool ainsi que d'autres modèles d'exposition durant la préimplantation sont capables d'induire des changements de méthylation dans différents gènes [8]. Avec les résultats concluants que j'ai obtenu en termes d'impact à long terme d'une exposition prénatale à l'alcool éthylique lors de la préimplantation et l'effet protecteur de la diète, je pense que l'utilisation de technique moléculaire plus poussée (*Methyl-seq*, *WBGS*) est maintenant justifiée afin de définir les mécanismes impliqués. Ceci nous permettrait d'identifier les régions altérées par l'exposition à l'alcool éthylique ainsi que celle rectifiées par la diète sur ces régions. Nous pourrions également faire du RNAseq pour avoir une meilleure représentation du transcriptome et mieux évaluer l'effet de notre diète enrichie sur l'expression des gènes du cerveau.

Comme mentionnée précédemment, il pourrait être intéressant de voir si l'effet protecteur observé avec la diète enrichie serait toujours présent si l'on débutait la diète à un stade (e.g. E6.5, E9.5) qui correspond au moment où les mères constatent leur grossesse. Cela correspondrait plus à la situation des femmes ayant des grossesses non-planifiées et pourraient prouver si la diète peut toujours diminuer l'effet d'une exposition prénatale à l'alcool durant la préimplantation.

Nous avons observé que la restriction de croissance n'était pas éliminée par la diète, ce qui suggère que ce type de défaut pourrait être associé à un mécanisme indépendant de la méthylation de l'ADN. Un autre facteur dommageable de l'exposition à l'alcool est la dégradation de celles-ci en ROS. Des niveaux élevés de ROS ont été associés à la restriction de croissance [238, 239]. Nous pourrions supplémentées notre diète avec un ou des antioxydants (e.g., vitamine E, vitamine C, sélénium) afin de voir s'il est possible de corriger ou d'atténuer la présence de restriction de croissance à la suite d'une exposition prénatale à l'alcool durant la préimplantation. Une étude chez le rat a d'ailleurs démontré qu'une supplémentation en sélénium augmentait le poids à la naissance des petits exposés à l'alcool [244]. De plus, dans un autre modèle animal, l'ajout de vitamine C permettait d'augmenter significativement la taille des embryons exposés à l'alcool comparativement à ceux sans le supplément [245].

À l'inverse, on pourrait aussi utiliser une diète pauvre en donneurs de groupements méthyles pour avoir une situation similaire aux femmes qui n'ont pas les apports recommandés dans ces nutriments durant leur grossesse. Comme mentionné précédemment, beaucoup de femmes n'atteignent pas les niveaux recommandés et des carences peuvent exacerber les effets de l'alcool [131-133, 192-194]. Dans les modèles animaux de carences en donneurs de groupements méthyles, ils observent notamment une réduction du poids foetal, une augmentation des malformations ainsi que des problèmes de comportement causés par l'alcool comparativement au groupe sans carences [129,130]. Il serait donc intéressant de voir l'impact d'une exposition à l'alcool pendant la préimplantation lors d'une carence nutritionnelle en donneurs de méthyles sur le nombre et le type de défauts morphologiques ainsi que sur les profils de méthylation et d'expression.

Nous avons récemment développé dans le laboratoire un modèle TSAF avec des souris *Nkx2.1^{Cre}-RCE^{EGFP}* qui nous permet de marquer tous les interneurons provenant de l'éminence ganglionnaire médiane (MGE). Ce modèle nous a permis d'observer une baisse significative de la densité des interneurons GABA (Legault *et al.*, Non publié) au stade E15.5 suite à une exposition à l'alcool éthylique chez l'embryon préimplantatoire. Pour mieux comprendre comment l'alcool éthylique affecte les interneurons GABA, des analyses supplémentaires au niveau moléculaire seront effectuées. Nous envisageons donc d'apposer notre modèle de diète afin de mieux caractériser son impact sur le développement du cerveau, et l'effet potentiel sur les interneurons GABA.

4.7 Conclusion

En conclusion, nous avons démontré que les effets d'une exposition à l'alcool éthylique durant la préimplantation causent des défauts morphologiques qui perdurent non seulement jusqu'à la migration (E10.5), mais aussi jusqu'à la fin de la gestation (E18.5). Ce qui démontre l'importance de sensibiliser les gens aux effets de l'alcool durant cette période. Nous sommes dans les premiers à démontrer qu'une diète enrichie en divers donneurs de groupements méthyles permet de protéger contre une exposition prénatale à l'alcool éthylique durant la préimplantation en diminuant ou en éliminant les défauts (e.g., malformations aux yeux, polydactylie,

dysmorphisme). Ce qui démontre l'importance de débiter tôt durant la grossesse la supplémentation pour prévenir les effets nocifs de l'alcool. Nos résultats indiquent que la diète enrichie en méthyle n'a pas d'impact négatif sur l'établissement et le maintien des profils de méthylation de l'ADN des gènes à empreintes, et leur expression. Finalement, les résultats présents et futurs pourraient mener à une meilleure compréhension des mécanismes entourant les TSAF et pourraient aider à trouver des moyens préventifs pour une exposition prénatale à l'alcool puisqu'il n'y a actuellement pas de traitement pour les enfants atteints.

Références bibliographiques

1. Dwyer-Lindgren, L., et al., *Drinking Patterns in US Counties From 2002 to 2012*. Am J Public Health, 2015. **105**(6): p. 1120-7.
2. Grucza, R.A., et al., *Correspondence between secular changes in alcohol dependence and age of drinking onset among women in the United States*. Alcohol Clin Exp Res, 2008. **32**(8): p. 1493-501.
3. Lim, S.S., et al., *A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2224-60.
4. Popova, S., et al., *Prevalence of alcohol consumption during pregnancy and Fetal Alcohol Spectrum Disorders among the general and Aboriginal populations in Canada and the United States*. Eur J Med Genet, 2017. **60**(1): p. 32-48.
5. Popova, S., et al., *Actual and predicted prevalence of alcohol consumption during pregnancy in the WHO African Region*. Trop Med Int Health, 2016. **21**(10): p. 1209-1239.
6. Tan, C.H., et al., *Alcohol use and binge drinking among women of childbearing age - United States, 2011-2013*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2015. **64**(37): p. 1042-6.
7. Wilsnack, S.C., R.W. Wilsnack, and L.W. Kantor, *Focus on: women and the costs of alcohol use*. Alcohol research: current reviews, 2014. **35**(2): p. 219.
8. Legault, L., et al., *Pre-Implantation Alcohol Exposure Induces Lasting Sex-Specific DNA Methylation Programming Errors in the Developing Forebrain*. bioRxiv, 2020: p. 2020.12.07.415208.
9. Bekdash, R.A., C. Zhang, and D.K. Sarkar, *Gestational choline supplementation normalized fetal alcohol-induced alterations in histone modifications, DNA methylation, and proopiomelanocortin (POMC) gene expression in beta-endorphin-producing POMC neurons of the hypothalamus*. Alcohol Clin Exp Res, 2013. **37**(7): p. 1133-42.
10. Cadena, P.G., et al., *Folic acid reduces the ethanol-induced morphological and behavioral defects in embryonic and larval zebrafish (Danio rerio) as a model for fetal alcohol spectrum disorder (FASD)*. Reprod Toxicol, 2020. **96**: p. 249-257.

11. Karunamuni, G., et al., *Supplementation with the Methyl Donor Betaine Prevents Congenital Defects Induced by Prenatal Alcohol Exposure*. *Alcohol Clin Exp Res*, 2017. **41**(11): p. 1917-1927.
12. Linask, K.K. and M. Han, *Acute alcohol exposure during mouse gastrulation alters lipid metabolism in placental and heart development: Folate prevention*. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2016. **106**(9): p. 749-60.
13. Wozniak, J.R., et al., *Four-year follow-up of a randomized controlled trial of choline for neurodevelopment in fetal alcohol spectrum disorder*. *J Neurodev Disord*, 2020. **12**(1): p. 9.
14. Zhang, D., et al., *Supplement of Betaine into Embryo Culture Medium Can Rescue Injury Effect of Ethanol on Mouse Embryo Development*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 1761.
15. Feuer, S. and P. Rinaudo, *Preimplantation stress and development*. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 2012. **96**(4): p. 299-314.
16. Fisher, D., *The unique endocrine milieu of the fetus*. *The Journal of clinical investigation*, 1986. **78**(3): p. 603-611.
17. Kaufman, M.H. and M.H. Kaufman, *The atlas of mouse development*. Vol. 428. 1992: Academic press London.
18. *NIH Stem Cell Information Home Page*. In *Stem Cell Information 2001* [cited 2021 April 30]; Available from: stemcells.nih.gov/info/2001report/appendixA.htm.
19. Ducibella, T., et al., *Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo*. *J Cell Biol*, 1977. **74**(1): p. 153-67.
20. Handyside, A.H., *Distribution of antibody- and lectin-binding sites on dissociated blastomeres from mouse morulae: evidence for polarization at compaction*. *J Embryol Exp Morphol*, 1980. **60**: p. 99-116.
21. Reeve, W.J. and C.A. Ziomek, *Distribution of microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos: evidence for surface polarization at compaction*. *J Embryol Exp Morphol*, 1981. **62**: p. 339-50.

22. Fleming, T.P. and M.H. Johnson, *From egg to epithelium*. Annual review of cell biology, 1988. **4**(1): p. 459-485.
23. Watkins, A.J., E.S. Lucas, and T.P. Fleming, *Impact of the periconceptional environment on the programming of adult disease*. J Dev Orig Health Dis, 2010. **1**(2): p. 87-95.
24. El Hajj, N. and T. Haaf, *Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction*. Fertil Steril, 2013. **99**(3): p. 632-41.
25. Legault, L.M., V. Bertrand-Lehouillier, and S. McGraw, *Pre-implantation alcohol exposure and developmental programming of FASD: an epigenetic perspective*. Biochem Cell Biol, 2018. **96**(2): p. 117-130.
26. Barker, D.J., et al., *Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life*. Lancet, 1993. **341**(8850): p. 938-41.
27. Barker, D.J. and C. Osmond, *Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales*. Lancet, 1986. **1**(8489): p. 1077-81.
28. Barker, D.J., et al., *Weight in infancy and death from ischaemic heart disease*. Lancet, 1989. **2**(8663): p. 577-80.
29. Adam, M.P., *The all-or-none phenomenon revisited*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2012. **94**(8): p. 664-9.
30. Xiao, S., et al., *Preimplantation exposure to bisphenol A (BPA) affects embryo transport, preimplantation embryo development, and uterine receptivity in mice*. Reprod Toxicol, 2011. **32**(4): p. 434-41.
31. Amstislavsky, S.Y., et al., *Preimplantation exposures of murine embryos to estradiol or methoxychlor change postnatal development*. Reprod Toxicol, 2004. **18**(1): p. 103-8.
32. Choufani, S., et al., *Impact of assisted reproduction, infertility, sex and paternal factors on the placental DNA methylome*. Hum Mol Genet, 2019. **28**(3): p. 372-385.
33. Choux, C., et al., *The epigenetic control of transposable elements and imprinted genes in newborns is affected by the mode of conception: ART versus spontaneous conception without underlying infertility*. Hum Reprod, 2018. **33**(2): p. 331-340.

34. Qin, J., et al., *Assisted reproductive technology and the risk of pregnancy-related complications and adverse pregnancy outcomes in singleton pregnancies: a meta-analysis of cohort studies*. Fertil Steril, 2016. **105**(1): p. 73-85.e1-6.
35. Zhu, L., et al., *Maternal and Live-birth Outcomes of Pregnancies following Assisted Reproductive Technology: A Retrospective Cohort Study*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 35141.
36. Market-Velker, B.A., A.D. Fernandes, and M.R. Mann, *Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal in vitro culture interferes with imprint maintenance*. Biol Reprod, 2010. **83**(6): p. 938-50.
37. White, C.R., et al., *High Frequency of Imprinted Methylation Errors in Human Preimplantation Embryos*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 17311.
38. Hattori, H., et al., *Association of four imprinting disorders and ART*. Clinical Epigenetics, 2019. **11**(1): p. 21.
39. Ng, K.Y.B., et al., *In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review*. Hum Reprod Update, 2018. **24**(1): p. 15-34.
40. Wale, P.L. and D.K. Gardner, *The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction*. Hum Reprod Update, 2016. **22**(1): p. 2-22.
41. Gardner, D.K. and M. Lane, *Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting*. Reproduction, Fertility and Development, 2005. **17**(3): p. 361-370.
42. Li, W., et al., *High oxygen tension increases global methylation in bovine 4-cell embryos and blastocysts but does not affect general retrotransposon expression*. Reprod Fertil Dev, 2016. **28**(7): p. 948-959.
43. Li, Z., et al., *Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study*. Human Reproduction, 2014. **29**(12): p. 2794-2801.
44. Rinaudo, P.F., et al., *Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos*. Fertility and sterility, 2006. **86**(4): p. 1265. e1-1265. e36.

45. Gardner, D.K., *Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support*. Cell Biol Int, 1994. **18**(12): p. 1163-79.
46. Canovas, S., et al., *DNA methylation and gene expression changes derived from assisted reproductive technologies can be decreased by reproductive fluids*. Elife, 2017. **6**.
47. Ma, Y., et al., *Changes in DNA methylation and imprinting disorders in E9.5 mouse fetuses and placentas derived from vitrified eight-cell embryos*. Mol Reprod Dev, 2019. **86**(4): p. 404-415.
48. Mann, M.R., et al., *Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture*. Development, 2004. **131**(15): p. 3727-3735.
49. Rivera, R.M., et al., *Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development*. Human molecular genetics, 2008. **17**(1): p. 1-14.
50. Auclair, G., et al., *Ontogeny of CpG island methylation and specificity of DNMT3 methyltransferases during embryonic development in the mouse*. Genome Biol, 2014. **15**(12): p. 545.
51. Canovas, S. and P.J. Ross, *Epigenetics in preimplantation mammalian development*. Theriogenology, 2016. **86**(1): p. 69-79.
52. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
53. Smith, Z.D. and A. Meissner, *DNA methylation: roles in mammalian development*. Nat Rev Genet, 2013. **14**(3): p. 204-20.
54. McGraw, S., et al., *Transient DNMT1 suppression reveals hidden heritable marks in the genome*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(3): p. 1485-97.
55. Ross, P.J. and S. Canovas, *Mechanisms of epigenetic remodelling during preimplantation development*. Reprod Fertil Dev, 2016. **28**(1-2): p. 25-40.
56. Bourc'his, D., et al., *Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints*. Science, 2001. **294**(5551): p. 2536-9.
57. Kagiwada, S., et al., *Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice*. Embo j, 2013. **32**(3): p. 340-53.

58. Wu, H. and Y. Zhang, *Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions*. Cell, 2014. **156**(1-2): p. 45-68.
59. Yin, X. and Y. Xu, *Structure and function of TET enzymes*, in *DNA Methyltransferases-Role and Function*. 2016, Springer. p. 275-302.
60. Ponnaluri, V.K., J.P. Maciejewski, and M. Mukherji, *A mechanistic overview of TET-mediated 5-methylcytosine oxidation*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **436**(2): p. 115-20.
61. Tahiliani, M., et al., *Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. Science, 2009. **324**(5929): p. 930-5.
62. He, Y.F., et al., *Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA*. Science, 2011. **333**(6047): p. 1303-7.
63. Ito, S., et al., *Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine*. Science, 2011. **333**(6047): p. 1300-3.
64. Goll, M.G. and T.H. Bestor, *Eukaryotic cytosine methyltransferases*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 481-514.
65. Jones, P.A., *Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(7): p. 484-92.
66. Antequera, F. and A. Bird, *Number of CpG islands and genes in human and mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11995-9.
67. Saxonov, S., P. Berg, and D.L. Brutlag, *A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1412-7.
68. Barski, A., et al., *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome*. Cell, 2007. **129**(4): p. 823-37.
69. Henikoff, S. and A. Shilatifard, *Histone modification: cause or cog?* Trends Genet, 2011. **27**(10): p. 389-96.
70. Koch, C.M., et al., *The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines*. Genome Res, 2007. **17**(6): p. 691-707.

71. Severin, P.M., et al., *Cytosine methylation alters DNA mechanical properties*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(20): p. 8740-51.
72. Seisenberger, S., et al., *Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013. **368**(1609): p. 20110330.
73. Abdalla, H., Y. Yoshizawa, and S. Hochi, *Active demethylation of paternal genome in mammalian zygotes*. J Reprod Dev, 2009. **55**(4): p. 356-60.
74. Breton-Larrivée, M., E. Elder, and S. McGraw, *DNA methylation, environmental exposures and early embryo development*. Animal Reproduction (AR), 2019. **16**(3): p. 465-474.
75. Guo, F., et al., *Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote*. Cell Stem Cell, 2014. **15**(4): p. 447-459.
76. Guo, H., et al., *The DNA methylation landscape of human early embryos*. Nature, 2014. **511**(7511): p. 606-10.
77. Shen, L., et al., *Tet3 and DNA replication mediate demethylation of both the maternal and paternal genomes in mouse zygotes*. Cell Stem Cell, 2014. **15**(4): p. 459-471.
78. Messerschmidt, D.M., B.B. Knowles, and D. Solter, *DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos*. Genes Dev, 2014. **28**(8): p. 812-28.
79. Robinson, W.P. and E.M. Price, *The human placental methylome*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2015. **5**(5): p. a023044.
80. Kobayashi, H., et al., *Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks*. PLoS Genet, 2012. **8**(1): p. e1002440.
81. Mayer, W., et al., *Embryogenesis: demethylation of the zygotic paternal genome*. Nature, 2000. **403**(6769): p. 501.
82. Ferguson-Smith, A.C., *Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(8): p. 565-75.
83. Haaf, T., *Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes*. Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine, 2006.

84. Kelsey, G., *Genomic imprinting--roles and regulation in development*. Endocr Dev, 2007. **12**: p. 99-112.
85. Reik, W., W. Dean, and J. Walter, *Epigenetic reprogramming in mammalian development*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1089-93.
86. Kent, L., et al., *Beckwith Weidemann syndrome: a behavioral phenotype-genotype study*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2008. **147b**(7): p. 1295-7.
87. Cirio, M.C., et al., *DNA methyltransferase 1o functions during preimplantation development to preclude a profound level of epigenetic variation*. Dev Biol, 2008. **324**(1): p. 139-50.
88. Hirasawa, R., et al., *Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development*. Genes Dev, 2008. **22**(12): p. 1607-16.
89. Howell, C.Y., et al., *Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene*. Cell, 2001. **104**(6): p. 829-38.
90. McGraw, S., et al., *Loss of DNMT1o disrupts imprinted X chromosome inactivation and accentuates placental defects in females*. PLoS Genet, 2013. **9**(11): p. e1003873.
91. Toppings, M., et al., *Profound phenotypic variation among mice deficient in the maintenance of genomic imprints*. Hum Reprod, 2008. **23**(4): p. 807-18.
92. Cui, S.J., et al., *Ethanol promotes cell death by inhibition of the insulin-like growth factor I receptor*. Alcohol Clin Exp Res, 1997. **21**(6): p. 1121-7.
93. Miller, M.W., *Limited ethanol exposure selectively alters the proliferation of precursor cells in the cerebral cortex*. Alcohol Clin Exp Res, 1996. **20**(1): p. 139-43.
94. Zhang, F.X., R. Rubin, and T.A. Rooney, *Ethanol induces apoptosis in cerebellar granule neurons by inhibiting insulin-like growth factor 1 signaling*. J Neurochem, 1998. **71**(1): p. 196-204.
95. Hong, M. and R.S. Krauss, *Ethanol itself is a holoprosencephaly-inducing teratogen*. PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0176440.
96. Garro, A.J., et al., *Ethanol consumption inhibits fetal DNA methylation in mice: implications for the fetal alcohol syndrome*. Alcohol Clin Exp Res, 1991. **15**(3): p. 395-8.

97. Varela-Rey, M., et al., *Alcohol, DNA methylation, and cancer*. Alcohol research: current reviews, 2013. **35**(1): p. 25.
98. Brust, J.C., *Ethanol and cognition: indirect effects, neurotoxicity and neuroprotection: a review*. Int J Environ Res Public Health, 2010. **7**(4): p. 1540-57.
99. Alati, R., 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): p. e74844.
100. Feldman, H.S., et al., *Prenatal alcohol exposure patterns and alcohol-related birth defects and growth deficiencies: a prospective study*. Alcohol Clin Exp Res, 2012. **36**(4): p. 670-6.
101. Larkby, C.A., et al., *Prenatal alcohol exposure is associated with conduct disorder in adolescence: findings from a birth cohort*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2011. **50**(3): p. 262-71.
102. Muggli, E., et al., *Association Between Prenatal Alcohol Exposure and Craniofacial Shape of Children at 12 Months of Age*. JAMA Pediatr, 2017. **171**(8): p. 771-780.
103. Roozen, S., et al., *Worldwide Prevalence of Fetal Alcohol Spectrum Disorders: A Systematic Literature Review Including Meta-Analysis*. Alcohol Clin Exp Res, 2016. **40**(1): p. 18-32.
104. Astley, S.J. and S.K. Clarren, *A case definition and photographic screening tool for the facial phenotype of fetal alcohol syndrome*. J Pediatr, 1996. **129**(1): p. 33-41.
105. Chudley, A.E., et al., *Fetal alcohol spectrum disorder: Canadian guidelines for diagnosis*. Cmaj, 2005. **172**(5 Suppl): p. S1-s21.
106. Kobor, M.S. and J. Weinberg, *Focus on: epigenetics and fetal alcohol spectrum disorders*. Alcohol Res Health, 2011. **34**(1): p. 29-37.
107. Laufer, B.I., et al., *Long-lasting alterations to DNA methylation and ncRNAs could underlie the effects of fetal alcohol exposure in mice*. Dis Model Mech, 2013. **6**(4): p. 977-92.
108. May, P.A., et al., *Prevalence and epidemiologic characteristics of FASD from various research methods with an emphasis on recent in-school studies*. Dev Disabil Res Rev, 2009. **15**(3): p. 176-92.

109. Temple, V.K., et al., *Mental Health and Affect Regulation Impairment in Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD): Results from the Canadian National FASD Database*. Alcohol Alcohol, 2019. **54**(5): p. 545-550.
110. Kaminen-Ahola, N., *Fetal alcohol spectrum disorders: Genetic and epigenetic mechanisms*. Prenat Diagn, 2020. **40**(9): p. 1185-1192.
111. Laufer, B.I., et al., *Associative DNA methylation changes in children with prenatal alcohol exposure*. Epigenomics, 2015. **7**(8): p. 1259-74.
112. Portales-Casamar, E., et al., *DNA methylation signature of human fetal alcohol spectrum disorder*. Epigenetics Chromatin, 2016. **9**: p. 25.
113. Nykjaer, C., et al., *Maternal alcohol intake prior to and during pregnancy and risk of adverse birth outcomes: evidence from a British cohort*. J Epidemiol Community Health, 2014. **68**(6): p. 542-9.
114. Valles, S., et al., *Ethanol exposure affects glial fibrillary acidic protein gene expression and transcription during rat brain development*. J Neurochem, 1997. **69**(6): p. 2484-93.
115. Clarren, S.K. and D.W. Smith, *The fetal alcohol syndrome*. New England Journal of Medicine, 1978. **298**(19): p. 1063-1067.
116. Gritti, I., et al., *Parvalbumin, calbindin, or calretinin in cortically projecting and GABAergic, cholinergic, or glutamatergic basal forebrain neurons of the rat*. J Comp Neurol, 2003. **458**(1): p. 11-31.
117. Manns, I.D., L. Mainville, and B.E. Jones, *Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex*. Neuroscience, 2001. **107**(2): p. 249-63.
118. Mesulam, M.M., *The cholinergic innervation of the human cerebral cortex*. Prog Brain Res, 2004. **145**: p. 67-78.
119. Zaborszky, L., *The modular organization of brain systems. Basal forebrain: the last frontier*. Prog Brain Res, 2002. **136**: p. 359-72.
120. Zaborszky, L., et al., *Three-dimensional chemoarchitecture of the basal forebrain: spatially specific association of cholinergic and calcium binding protein-containing neurons*. Neuroscience, 2005. **136**(3): p. 697-713.

121. Zaborszky, L., et al., *The basal forebrain corticopetal system revisited*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **877**: p. 339-67.
122. Ikonomidou, C., et al., *Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome*. Science, 2000. **287**(5455): p. 1056-60.
123. Judson, M.C., et al., *Dynamic gene and protein expression patterns of the autism-associated met receptor tyrosine kinase in the developing mouse forebrain*. J Comp Neurol, 2009. **513**(5): p. 511-31.
124. Sulik, K.K., *Fetal alcohol spectrum disorder: pathogenesis and mechanisms*. Handb Clin Neurol, 2014. **125**: p. 463-75.
125. Lunde, E.R., et al., *Alcohol-Induced Developmental Origins of Adult-Onset Diseases*. Alcohol Clin Exp Res, 2016. **40**(7): p. 1403-14.
126. Chen, M.M., et al., *Intoxication by intraperitoneal injection or oral gavage equally potentiates postburn organ damage and inflammation*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 971481.
127. Jacobson, J.L. and S.W. Jacobson, *Drinking moderately and pregnancy. Effects on child development*. Alcohol Res Health, 1999. **23**(1): p. 25-30.
128. Parnell, S.E., et al., *Magnetic resonance microscopy defines ethanol-induced brain abnormalities in prenatal mice: effects of acute insult on gestational day 8*. Alcohol Clin Exp Res, 2009. **33**(6): p. 1001-11.
129. Ieraci, A. and D.G. Herrera, *Single alcohol exposure in early life damages hippocampal stem/progenitor cells and reduces adult neurogenesis*. Neurobiol Dis, 2007. **26**(3): p. 597-605.
130. Jacobson, J.L., et al., *Relation of maternal age and pattern of pregnancy drinking to functionally significant cognitive deficit in infancy*. Alcohol Clin Exp Res, 1998. **22**(2): p. 345-51.
131. Idrus, N.M., K.R. Breit, and J.D. Thomas, *Dietary choline levels modify the effects of prenatal alcohol exposure in rats*. Neurotoxicol Teratol, 2017. **59**: p. 43-52.
132. Keppen, L.D., T. Pysher, and O.M. Rennert, *Zinc deficiency acts as a co-teratogen with alcohol in fetal alcohol syndrome*. Pediatr Res, 1985. **19**(9): p. 944-7.

133. Shankar, K., M.J. Ronis, and T.M. Badger, *Effects of pregnancy and nutritional status on alcohol metabolism*. *Alcohol Res Health*, 2007. **30**(1): p. 55-9.
134. Exeter Clinical Laboratory. *Blood Sciences Test-Alcohol*. [cited 2021 30 April] Available from: <https://www.exeterlaboratory.com/test/alcohol/>.
135. Éduc'Alcool. *C'est quoi le calage?* ; [cited 2021 30 April] Available from: <https://www.educalcool.qc.ca/faits-et-effets/alcool-et-jeunesse/le-calage-dalcool-dangereux-a-mort/>.
136. Leach, R.E., J.J. Stachecki, and D.R. Armant, *Development of in vitro fertilized mouse embryos exposed to ethanol during the preimplantation period: accelerated embryogenesis at subtoxic levels*. *Teratology*, 1993. **47**(1): p. 57-64.
137. Kowalczyk, C.L., et al., *Effects of alcohols on murine preimplantation development: relationship to relative membrane disordering potency*. *Alcohol Clin Exp Res*, 1996. **20**(3): p. 566-71.
138. Page-Lariviere, F., C. Campagna, and M.A. Sirard, *Mechanisms Involved in Porcine Early Embryo Survival following Ethanol Exposure*. *Toxicol Sci*, 2017. **156**(1): p. 289-299.
139. Padmanabhan, R. and M.S. Hameed, *Effects of acute doses of ethanol administered at pre-implantation stages on fetal development in the mouse*. *Drug Alcohol Depend*, 1988. **22**(1-2): p. 91-100.
140. Checiu, M. and S. Sandor, *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*. *Morphol Embryol (Bucur)*, 1982. **28**(2): p. 127-33.
141. Checiu, M. and S. Sandor, *The effect of ethanol upon early development in mice and rats. IX. Late effect of acute preimplantation intoxication in mice*. *Morphol Embryol (Bucur)*, 1986. **32**(1): p. 5-11.
142. Ayoola, A.B., M.D. Nettleman, and M. Stommel, *Time from pregnancy recognition to prenatal care and associated newborn outcomes*. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*, 2010. **39**(5): p. 550-6.

143. Stiles, J. and T.L. Jernigan, *The basics of brain development*. Neuropsychol Rev, 2010. **20**(4): p. 327-48.
144. Qian, X., et al., *Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells*. Neuron, 2000. **28**(1): p. 69-80.
145. O'Neil, E., *Developmental Timeline of Alcohol-Induced Birth Defects*. Embryo Project Encyclopedia, 2012.
146. Hill, M. *Embryology Carnegie Stage Comparison*. [cited 2021 30 April]; Available from: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie_Stage_Comparison.
147. Kaminen-Ahola, N., et al., *Maternal ethanol consumption alters the epigenotype and the phenotype of offspring in a mouse model*. PLoS Genet, 2010. **6**(1): p. e1000811.
148. Sulik, K.K., M.C. Johnston, and M.A. Webb, *Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model*. Science, 1981. **214**(4523): p. 936-8.
149. West, J.R., W.J. Chen, and N.J. Pantazis, *Fetal alcohol syndrome: the vulnerability of the developing brain and possible mechanisms of damage*. Metab Brain Dis, 1994. **9**(4): p. 291-322.
150. Godin, E.A., et al., *Magnetic resonance microscopy defines ethanol-induced brain abnormalities in prenatal mice: effects of acute insult on gestational day 7*. Alcohol Clin Exp Res, 2010. **34**(1): p. 98-111.
151. Cao, W., et al., *Prenatal alcohol exposure reduces magnetic susceptibility contrast and anisotropy in the white matter of mouse brains*. Neuroimage, 2014. **102 Pt 2**(0 2): p. 748-55.
152. Parnell, S.E., et al., *Magnetic resonance microscopy-based analyses of the neuroanatomical effects of gestational day 9 ethanol exposure in mice*. Neurotoxicol Teratol, 2013. **39**: p. 77-83.
153. El Shawa, H., C.W. Abbott, 3rd, and K.J. Huffman, *Prenatal ethanol exposure disrupts intraneocortical circuitry, cortical gene expression, and behavior in a mouse model of FASD*. J Neurosci, 2013. **33**(48): p. 18893-905.

154. Coleman, L.G., Jr., et al., *Postnatal day 7 ethanol treatment causes persistent reductions in adult mouse brain volume and cortical neurons with sex specific effects on neurogenesis*. Alcohol, 2012. **46**(6): p. 603-12.
155. Di Rocco, G., et al., *Stem cells under the influence of alcohol: effects of ethanol consumption on stem/progenitor cells*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(2): p. 231-244.
156. Ogony, J.W., et al., *Ethanol alters the balance of Sox2, Oct4, and Nanog expression in distinct subpopulations during differentiation of embryonic stem cells*. Stem Cells Dev, 2013. **22**(15): p. 2196-210.
157. Sánchez-Alvarez, R., et al., *Ethanol diverts early neuronal differentiation trajectory of embryonic stem cells by disrupting the balance of lineage specifiers*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63794.
158. Chater-Diehl, E.J., et al., *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): p. e0154836.
159. Dasmahapatra, A.K. and I.A. Khan, *DNA methyltransferase expressions in Japanese rice fish (*Oryzias latipes*) embryogenesis is developmentally regulated and modulated by ethanol and 5-azacytidine*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2015. **176-177**: p. 1-9.
160. Gangisetty, O., et al., *Fetal Alcohol Exposure Reduces Dopamine Receptor D2 and Increases Pituitary Weight and Prolactin Production via Epigenetic Mechanisms*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0140699.
161. Haycock, P.C. and M. Ramsay, *Exposure of mouse embryos to ethanol during preimplantation development: effect on DNA methylation in the h19 imprinting control region*. Biol Reprod, 2009. **81**(4): p. 618-27.
162. Lucia, D., et al., *Periconceptional maternal alcohol consumption leads to behavioural changes in adult and aged offspring and alters the expression of hippocampal genes associated with learning and memory and regulators of the epigenome*. Behav Brain Res, 2019. **362**: p. 249-257.

163. Masemola, M.L., et al., *Reduced DNA methylation at the PEG3 DMR and KvDMR1 loci in children exposed to alcohol in utero: a South African Fetal Alcohol Syndrome cohort study.* Front Genet, 2015. **6**: p. 85.
164. Nagre, N.N., et al., *CB1-receptor knockout neonatal mice are protected against ethanol-induced impairments of DNMT1, DNMT3A, and DNA methylation.* J Neurochem, 2015. **132**(4): p. 429-442.
165. Schaffner, S.L., et al., *Neonatal Alcohol Exposure in Mice Induces Select Differentiation- and Apoptosis-Related Chromatin Changes Both Independent of and Dependent on Sex.* Front Genet, 2020. **11**: p. 35.
166. Subbanna, S., et al., *Ethanol induced acetylation of histone at G9a exon1 and G9a-mediated histone H3 dimethylation leads to neurodegeneration in neonatal mice.* Neuroscience, 2014. **258**: p. 422-32.
167. Subbanna, S., et al., *G9a-mediated histone methylation regulates ethanol-induced neurodegeneration in the neonatal mouse brain.* Neurobiol Dis, 2013. **54**: p. 475-85.
168. Tal, T.L., et al., *MicroRNAs control neurobehavioral development and function in zebrafish.* Faseb j, 2012. **26**(4): p. 1452-61.
169. Veazey, K.J., et al., *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**: p. 39.
170. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code.* Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
171. Mews, P., et al., *Alcohol metabolism contributes to brain histone acetylation.* Nature, 2019. **574**(7780): p. 717-721.
172. Jambhekar, A., A. Dhall, and Y. Shi, *Roles and regulation of histone methylation in animal development.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(10): p. 625-641.
173. Mahnke, A.H., et al., *Nonprotein-coding RNAs in Fetal Alcohol Spectrum Disorders.* Prog Mol Biol Transl Sci, 2018. **157**: p. 299-342.
174. Sathyan, P., H.B. Golden, and R.C. Miranda, *Competing interactions between micro-RNAs determine neural progenitor survival and proliferation after ethanol exposure: evidence*

- from an ex vivo model of the fetal cerebral cortical neuroepithelium.* J Neurosci, 2007. **27**(32): p. 8546-57.
175. Pappalardo-Carter, D.L., et al., *Suppression and epigenetic regulation of MiR-9 contributes to ethanol teratology: evidence from zebrafish and murine fetal neural stem cell models.* Alcohol Clin Exp Res, 2013. **37**(10): p. 1657-67.
176. Shibata, M., et al., *MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by targeting multiple transcription factors.* J Neurosci, 2011. **31**(9): p. 3407-22.
177. Tsai, P.C., et al., *MiR-153 targets the nuclear factor-1 family and protects against teratogenic effects of ethanol exposure in fetal neural stem cells.* Biol Open, 2014. **3**(8): p. 741-58.
178. Deneen, B., et al., *The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord.* Neuron, 2006. **52**(6): p. 953-68.
179. Namihira, M., et al., *Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells.* Dev Cell, 2009. **16**(2): p. 245-55.
180. Shin, J., et al., *Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis.* Cell Stem Cell, 2015. **17**(3): p. 360-72.
181. Tsuyama, J., et al., *MicroRNA-153 Regulates the Acquisition of Gliogenic Competence by Neural Stem Cells.* Stem Cell Reports, 2015. **5**(3): p. 365-77.
182. Ehrlich, M. and M. Lacey, *DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression.* Epigenomics, 2013. **5**(5): p. 553-68.
183. Hahn, M.A., et al., *Relationship between gene body DNA methylation and intragenic H3K9me3 and H3K36me3 chromatin marks.* PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18844.
184. Mandal, C., et al., *Gestational Alcohol Exposure Altered DNA Methylation Status in the Developing Fetus.* Int J Mol Sci, 2017. **18**(7).
185. Miozzo, F., et al., *Alcohol exposure promotes DNA methyltransferase DNMT3A upregulation through reactive oxygen species-dependent mechanisms.* Cell Stress Chaperones, 2018. **23**(1): p. 115-126.
186. Wu, D. and A.I. Cederbaum, *Alcohol, oxidative stress, and free radical damage.* Alcohol Res Health, 2003. **27**(4): p. 277-84.

187. Chen, Y., N.C. Ozturk, and F.C. Zhou, *DNA methylation program in developing hippocampus and its alteration by alcohol*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e60503.
188. Liu, Y., et al., *Alcohol exposure alters DNA methylation profiles in mouse embryos at early neurulation*. Epigenetics, 2009. **4**(7): p. 500-11.
189. Imbard, A., J.F. Benoist, and H.J. Blom, *Neural tube defects, folic acid and methylation*. Int J Environ Res Public Health, 2013. **10**(9): p. 4352-89.
190. Blusztajn, J.K., B.E. Slack, and T.J. Mellott, *Neuroprotective Actions of Dietary Choline*. Nutrients, 2017. **9**(8).
191. Niculescu, M.D., C.N. Craciunescu, and S.H. Zeisel, *Dietary choline deficiency alters global and gene-specific DNA methylation in the developing hippocampus of mouse fetal brains*. Faseb j, 2006. **20**(1): p. 43-9.
192. Mygind, V.L., et al., *Estimation of usual intake and food sources of choline and betaine in New Zealand reproductive age women*. Asia Pac J Clin Nutr, 2013. **22**(2): p. 319-24.
193. Simpson, J.L., et al., *Micronutrients and women of reproductive potential: required dietary intake and consequences of dietary deficiency or excess. Part I--Folate, Vitamin B12, Vitamin B6*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2010. **23**(12): p. 1323-43.
194. Zeisel, S.H. and K.A. da Costa, *Choline: an essential nutrient for public health*. Nutr Rev, 2009. **67**(11): p. 615-23.
195. Hamid, A. and J. Kaur, *Kinetic characteristics of folate binding to rat renal brush border membrane in chronic alcoholism*. Mol Cell Biochem, 2005. **280**(1-2): p. 219-25.
196. Hamid, A., et al., *Down-regulation of reduced folate carrier may result in folate malabsorption across intestinal brush border membrane during experimental alcoholism*. Febs j, 2007. **274**(24): p. 6317-28.
197. Chandyo, R.K., et al., *The effects of vitamin B12 supplementation in pregnancy and postpartum on growth and neurodevelopment in early childhood: Study Protocol for a Randomized Placebo Controlled Trial*. BMJ Open, 2017. **7**(8): p. e016434.
198. Enderami, A., M. Zarghami, and H. Darvishi-Khezri, *The effects and potential mechanisms of folic acid on cognitive function: a comprehensive review*. Neurol Sci, 2018. **39**(10): p. 1667-1675.

199. Sable, P., et al., *Maternal micronutrients and brain global methylation patterns in the offspring*. Nutr Neurosci, 2015. **18**(1): p. 30-6.
200. Mikael, L.G., et al., *Moderately high intake of folic acid has a negative impact on mouse embryonic development*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2013. **97**(1): p. 47-52.
201. Harlan De Crescenzo, A., et al., *Deficient or Excess Folic Acid Supply During Pregnancy Alter Cortical Neurodevelopment in Mouse Offspring*. Cereb Cortex, 2021. **31**(1): p. 635-649.
202. Silva, C., E. Keating, and E. Pinto, *The impact of folic acid supplementation on gestational and long term health: Critical temporal windows, benefits and risks*. Porto Biomed J, 2017. **2**(6): p. 315-332.
203. Santé Canada. *Tableaux des ANREF*. 2006; Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/saine-alimentation/apports-nutritionnels-reference/tableaux.html>.
204. Korsmo, H.W., X. Jiang, and M.A. Caudill, *Choline: Exploring the Growing Science on Its Benefits for Moms and Babies*. Nutrients, 2019. **11**(8).
205. Wang, Y., et al., *Maternal dietary intake of choline in mice regulates development of the cerebral cortex in the offspring*. Faseb j, 2016. **30**(4): p. 1566-78.
206. Albright, C.D., et al., *Choline availability alters embryonic development of the hippocampus and septum in the rat*. Brain Res Dev Brain Res, 1999. **113**(1-2): p. 13-20.
207. Craciunescu, C.N., et al., *Choline availability during embryonic development alters progenitor cell mitosis in developing mouse hippocampus*. J Nutr, 2003. **133**(11): p. 3614-8.
208. Kelley, C.M., et al., *Maternal choline supplementation differentially alters the basal forebrain cholinergic system of young-adult Ts65Dn and disomic mice*. J Comp Neurol, 2014. **522**(6): p. 1390-410.
209. Schulz, K.M., et al., *Dietary choline supplementation to dams during pregnancy and lactation mitigates the effects of in utero stress exposure on adult anxiety-related behaviors*. Behav Brain Res, 2014. **268**: p. 104-10.

210. Bahnfleth, C., et al., *Prenatal choline supplementation improves child color-location memory task performance at 7 y of age (FS05-01-19)*. Current developments in nutrition, 2019. **3**(Supplement_1): p. nzz048. FS05-01-19.
211. Freedman, R., et al., *Higher Gestational Choline Levels in Maternal Infection Are Protective for Infant Brain Development*. J Pediatr, 2019. **208**: p. 198-206.e2.
212. Craig, S.A., *Betaine in human nutrition*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(3): p. 539-49.
213. Anas, M.K., et al., *The organic osmolytes betaine and proline are transported by a shared system in early preimplantation mouse embryos*. J Cell Physiol, 2007. **210**(1): p. 266-77.
214. Cai, D., et al., *Gestational betaine, liver metabolism, and epigenetics*. Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics. Springer, Cham, 2017.
215. Zhang, M., et al., *Antioxidant Mechanism of Betaine without Free Radical Scavenging Ability*. J Agric Food Chem, 2016. **64**(42): p. 7921-7930.
216. Ueland, P.M., *Choline and betaine in health and disease*. J Inherit Metab Dis, 2011. **34**(1): p. 3-15.
217. Pepper, M.R. and M.M. Black, *B12 in fetal development*. Semin Cell Dev Biol, 2011. **22**(6): p. 619-23.
218. Lövblad, K., et al., *Retardation of myelination due to dietary vitamin B12 deficiency: cranial MRI findings*. Pediatr Radiol, 1997. **27**(2): p. 155-8.
219. Wighton, M.C., et al., *Brain damage in infancy and dietary vitamin B12 deficiency*. Med J Aust, 1979. **2**(1): p. 1-3.
220. Srinivasan, K., et al., *Effects of maternal vitamin B12 supplementation on early infant neurocognitive outcomes: a randomized controlled clinical trial*. Matern Child Nutr, 2017. **13**(2).
221. Niculescu, M.D. and S.H. Zeisel, *Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline*. J Nutr, 2002. **132**(8 Suppl): p. 2333s-2335s.
222. Young, J.K., et al., *Nutrition implications for fetal alcohol spectrum disorder*. Adv Nutr, 2014. **5**(6): p. 675-92.

223. Barak, A.J., H.C. Beckenhauer, and D.J. Tuma, *Betaine effects on hepatic methionine metabolism elicited by short-term ethanol feeding*. Alcohol, 1996. **13**(5): p. 483-6.
224. Bönsch, D., et al., *Lowered DNA methyltransferase (DNMT-3b) mRNA expression is associated with genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism*. J Neural Transm (Vienna), 2006. **113**(9): p. 1299-304.
225. Cravo, M.L., et al., *Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status*. Am J Clin Nutr, 1996. **63**(2): p. 220-4.
226. Ngai, Y.F., et al., *Prenatal alcohol exposure alters methyl metabolism and programs serotonin transporter and glucocorticoid receptor expression in brain*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2015. **309**(5): p. R613-22.
227. Lin, G.W.-J., *Folate deficiency and acute ethanol treatment on pregnancy outcome in the rat*. Nutrition Research, 1988. **8**(10): p. 1151-1160.
228. Popova, S., et al., *Population-based prevalence of fetal alcohol spectrum disorder in Canada*. BMC Public Health, 2019. **19**(1): p. 845.
229. Thanh, N.X. and E. Jonsson, *Costs of Fetal Alcohol Spectrum Disorder in the Canadian Criminal Justice System*. J Popul Ther Clin Pharmacol, 2015. **22**(1): p. e125-31.
230. Black, A.Y., et al., *The Cost of Unintended Pregnancies in Canada: Estimating Direct Cost, Role of Imperfect Adherence, and the Potential Impact of Increased Use of Long-Acting Reversible Contraceptives*. J Obstet Gynaecol Can, 2015. **37**(12): p. 1086-97.
231. Carter, R.C., et al., *Alcohol-Related Alterations in Placental Imprinted Gene Expression in Humans Mediate Effects of Prenatal Alcohol Exposure on Postnatal Growth*. Alcohol Clin Exp Res, 2018.
232. Marjonen, H., et al., *Early prenatal alcohol exposure alters imprinted gene expression in placenta and embryo in a mouse model*. PLoS One, 2018. **13**(5): p. e0197461.
233. Klobučar, T., et al., *IMPLICON: an ultra-deep sequencing method to uncover DNA methylation at imprinted regions*. Nucleic Acids Res, 2020. **48**(16): p. e92.
234. Lambrot, R., et al., *Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2889.

235. Aleliunas, R.E., et al., *Folic Acid Supplementation of Female Mice, with or without Vitamin B-12, before and during Pregnancy and Lactation Programs Adiposity and Vascular Health in Adult Male Offspring*. J Nutr, 2015. **146**(4): p. 688-696.
236. Downing, C., et al., *Subtle decreases in DNA methylation and gene expression at the mouse Igf2 locus following prenatal alcohol exposure: effects of a methyl-supplemented diet*. Alcohol, 2011. **45**(1): p. 65-71.
237. Xu, Y., et al., *The maternal combined supplementation of folic acid and Vitamin B(12) suppresses ethanol-induced developmental toxicity in mouse fetuses*. Reprod Toxicol, 2006. **22**(1): p. 56-61.
238. Al-Gubory, K.H., P.A. Fowler, and C. Garrel, *The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(10): p. 1634-50.
239. Rashid, C.S., A. Bansal, and R.A. Simmons, *Oxidative Stress, Intrauterine Growth Restriction, and Developmental Programming of Type 2 Diabetes*. Physiology (Bethesda), 2018. **33**(5): p. 348-359.
240. Chen, Z., et al., *Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by assisted reproduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(15): p. 4618-23.
241. DeSesso, J.M. and A.R. Scialli, *Bone development in laboratory mammals used in developmental toxicity studies*. Birth Defects Res, 2018. **110**(15): p. 1157-1187.
242. Laufer, B.I. and S.M. Singh, *A macro role for imprinted clusters of microRNAs in the brain*. Microna, 2012. **1**(1): p. 59-64.
243. Bartolomei, M.S., *Genomic imprinting: employing and avoiding epigenetic processes*. Genes Dev, 2009. **23**(18): p. 2124-33.
244. Nogales, F., et al., *Effects of antioxidant supplementation on duodenal Se-Met absorption in ethanol-exposed rat offspring in vivo*. J Reprod Dev, 2011. **57**(6): p. 708-14.
245. Peng, Y., et al., *Ascorbic acid inhibits ROS production, NF-kappa B activation and prevents ethanol-induced growth retardation and microencephaly*. Neuropharmacology, 2005. **48**(3): p. 426-34.

Annexes

Tableau 9. – Séquences des amorces des gènes utilisés pour le qPCR

Gène	Produit du gène	Amorce Forward	Amorce Reverse	Longueur du produit PCR (pb)	Température (°C)
<i>Commd1</i>	COMM domain-containing protein 1	CTTCCTGGCGAAGATGAGAG	CCTTGCTTTTTGGTTGAGC	101	60
<i>Dio3</i>	Thyroxine 5-deiodinase	CTCGAAACAGCGCTAAAGT	TCCAAAAAGTTCTCGCATCC	176	60
<i>Dlk1</i>	Protein delta homolog 1	TGGCTGTGTCAATGGAGTCT	TTCTCCAGGTCCACGCAAGT	121	60
<i>Gnas</i>	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha	CATTCTGAGCGTGATGAACG	ATCCTCCACAGAGCCTTG	79	60
<i>Gpr1</i>	G-protein coupled receptor 1	CCATTTCACTCTGGAGTTGGA	TCCTTTGAGACTTCCATGATGA	117	60
<i>Grb10</i>	Growth factor receptor-bound protein 10	GCTTCTCCATCTGTGAAGTGG	AAGACCACTGCGAGATTTTCA	100	65
<i>H13</i>	Histocompatibility 13	TGTCAGCGATCCGCACAAC	TCTGGCATGTCCGAAGAGC	192	60
<i>H19</i>	Long non-coding RNA	TTGTCGTAGAAGCCGCTGTGT	TGGTTCTGATTGCAGCATCT	199	60
<i>Hprt1</i>	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	CTGGTGAAAAGGACCTCTCGAA	CTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT	108	60
<i>Igf2</i>	Insulin-like growth factor II	GTCGATGTTGGTGCTTTCAT	CAAACGAAGCGTGCAACAA	110	57
<i>Igf2r</i>	Insulin-like growth factor II receptor	AGGGTCTTCCACACAGAAAT	TCACTCTGGAATTCAACACC	95	65
<i>Kcnq1</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 1	TCCTGGGCTCTGTAGTCTTCA	GTTCAACGCATTTTCTCAGC	117	63
<i>Mcts2</i>	Malignant T-cell-amplified sequence 2	GAAAATCAACAAGGGGATCG	ATGTCTTCATGTGCCACAGC	71	60

Tableau 9. – Séquences des amorces des gènes utilisés pour le qPCR (suite)

Gène	Produit du gène	Amorce <i>Forward</i>	Amorce <i>Reverse</i>	Longueur du produit PCR (pb)	Température (°C)
<i>Meg3</i>	Long non-coding RNA	GGACTTCACGCACAACACGTT	GTCCCACGCAGGATTCCA	80	63
<i>Mest</i>	Mesoderm-specific transcript protein	CATCGTCCTCCTCTCTCC	GTCCCACAGCTCACTCTC	149	60
<i>Nap115</i>	Nucleosome assembly protein 1-like 5	CACACTACACCAGAACATCCAA	AACAAACACTACCAAGAAAACACG	372	63
<i>Nesp</i>	Neuroendo-crine secretory protein 55	AGAAAGTTCGCAGTGGTTTGA	TTAGGTGCTCACCGAGAAGC	175	63
<i>Nnat</i>	Neuronatin	GCTCATCATCGCTGGTACA	CTTGGCAAGTGCTCCTCTGA	262	63
<i>Peg10</i>	Retrotransposon-derived protein PEG10	GGACCCCTCATCCTTCGT	GTTGGCGTCTTTTGGTTCTT	79	60
<i>Peg13</i>	Long non-coding RNA	TAAAGTGCCTGATCCGAAC	ATTTCAAACCTGCCAACCTG	60	60
<i>Peg3</i>	Paternally-expressed gene 3 protein	GCCTCAGAATCCAATTCAGG	TCATGTGAGAGTGTCGGTCA	95	60
<i>Plagl1</i>	Zinc finger protein PLAGL1	AATGTGGCAAGTCCTTCGTAC	TGTTTCTTCAGGTGGTCTTCC	217	63
<i>Snrpn</i>	Small nuclear ribonucleo-protein-associated protein N	GCCTCCAACCTCTGACAG	CATTGCTCGTGTGCCTCTTG	136	65
<i>Zdbf2</i>	DBF4-type zinc finger-containing protein 2 homolog	CTGCGACACCACCCATATAA	AAAACCACCACCACTTCAGG	125	65
<i>Zrsr1</i>	U2 small nuclear ribonucleo-protein auxiliary factor 35 kDa subunit-related protein 1	ACCATCCGTACCTCCGAAA	TCCAGTTATCCCACGCAGTT	77	60

Tableau 10. – Séquences des amorces des gènes utilisés pour le PCR1 de la technique *Implicon*

Gène	Amorces Forward/Reverse	Longueur du produit PCR1 (pb)	Température (°C)	Nombre de CpGs
<i>Commd1-Zrsr1</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTTAGGAGTATTTTTATTGTAGGGGG TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNCTAAAACAATAATTATCTACCTTACC	282	60	14
<i>Dlk1-Dio3</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTGTTATGGATTGGTGTAAAGGTT TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNCCATCCCCTATACTCAAAACATTCTC	313	60	23
<i>Gnas_1</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTATTTTGGATTAAAGTTTAAAGTGTT TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNACAATTATACACCATACAAATAAATATATT	323	60	10
<i>Gnas_2</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTGGGTAATGTGATTGTATAAATTTTTGTAGT TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNATCCCCTCCTTCTATTATAAAC	218	60	9
<i>Gpr1-Zdbf2_1</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTATTTATTGATAGGAGAGGAAAGAGTTAAGT TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNCCCCAAACCATAATATAAAAACAAA	326	55	5
<i>Gpr1-Zdbf2_2</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTTTTGTATGTGGGATTTTTGTGTA TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNNTAATAATACCCTACTTTCCCAACCC	221	60	5
<i>Grb10</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTTTTTAAGGAGAAAAAAGGTT TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNCCAAATAATAAACAACCTCCT	427	50	31
<i>H13-Mcts2</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTAGTATTAGAATATTGGGGGATTTT TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNNAATTAATAAATAAACAACCACTTC	248	55	17
<i>Igf2-H19_1</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTTGGGGTATTTAAAGTTTTGTTATAG TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNNTTCTTAATAACTCCTTCAATCTTAC	235	60	12
<i>Igf2-H19_2</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTGGGGAGAAAATTTAATTAGTTGTAATT TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNCCAAATTCAATACCTCAAAAAAATC	275	60	9
<i>Igf2r</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTGATATTTGGGGAATTGAGGTAAGT TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNATAACCCAAAATCTTACCCTAAC	327	60	18
<i>Kcnq1-Kcnq1ot1</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTTAAGGTGAGTGGTTTAGGAT TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNNAATCCCCACACCTAAATTC	472	57	23
<i>Meg3_1</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTTTGGTTTGGTATATATGGATGTATT TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNCCCTAAATTTATACCTCAAAACACT	376	55	17

Tableau 10. – Séquences des amorces des gènes utilisés pour le PCR1 de la technique *Implicon* (suite)

Gène	Amorces Forward/Reverse	Longueur du produit PCR1 (pb)	Température (°C)	Nombre de CpGs
<i>Meg3_2</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTGGTTTATTTGTAGTATTTGTGTA TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNAACCTTAACACCAATCCATAAC	462	60	11
<i>Mest/Peg1</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTGGTTTATATAAGTATTTGTTTTTG TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNNTAACTTTACAATATCCAAACCCAAC	292	55	9
<i>Nap115</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTGAATTAAGATGGGAGGGGGAGTATATA TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNCAATAAAACTAATCCAAAAAATCCTACAA	417	60	18
<i>Nesp_1</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTTTTTTTGTAGAGTTAGAGGGTGAGT TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNAATAAAACAAAAAACCAAAAAAA	220	57	12
<i>Nesp_2</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTGGTTTTTTGTTTTATTGTTTTTTT TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNACCAACTCAAACCTCAACCTCCT	248	60	15
<i>Nnat</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTTTGTTTTAGAGAGATTTTGTAAATTT TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNTACCTTAAATACCCTCTTACCACCTAAATA	425	55	19
<i>Peg10</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTTTTTTTTAGGATTTTTTATATAAGGTAA TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNTCTCAAAATCTAACCCTAAAACTTAACA	468	55	30
<i>Peg13_1</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTTATTTGGGTTTTTTTTGTGTTTTT TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNCCCATCTTATTAATTTTAAACCTTATAT	285	55	14
<i>Peg13_2</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTAGATTTGGAATGTAGGTAGTTGTGA TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNCCAACCTCAATAAAACACCCTTAAAC	325	60	15
<i>Peg3</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTTTTTGTAGAGGATTTGATAAGGAG TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNCAACCTTATCAATTACCCTTAAAA	404	57	23
<i>Plagl1/Zac1</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTTTGTAGTTAGAGATGTAGTAAAAG TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNTCCCAAAAAACACAAAT	240	55	12
<i>Snrpn</i>	CTACACGACGCTCTCCGATCTTTAGAATGTTTTGGTTAAATAGGATGTAT TGCTGAACCGCTCTCCGATCTNNNNNNNAAAAACAAAAACCCTACATTAC	302	57	13

Tableau 11. – Amorces avec les index pour le PCR2 de la technique *Implicon*.

Nom de l'oligo	Séquence obtenue	Amorce
PE 1.0*		AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T
Index 1**	ATCACGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGATGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
Index 2	CGATGTTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACATCGGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
Index 3	TTAGGCAT	CAAGCAGAAGACGGCATAATGCCTAAGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
Index 4	TGACCACT	CAAGCAGAAGACGGCATAAGTGGTCAGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
Index 5	ACAGTGGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACCACTGTGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
Index 6	GCCAATGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACATTGGCGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
Index 7	CAGATCTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGATCTGGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
Index 8	ACTTGATG	CAAGCAGAAGACGGCATAACATCAAGTGAAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
Index 9	GATCAGCG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGCTGATCGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
Index 10	TAGCTTGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACAAGCTAGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
Index 11	GGCTACAG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGATCTGTAGCCGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
Index 12	CTTGACT	CAAGCAGAAGACGGCATAAGTACAAGGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
Index 13	TGGTTGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACAACAGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
Index 14	TCTCGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAAACCGAGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
Index 15	TAAGCGTT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGCTTAGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
Index 16	TCCGTCTT	CAAGCAGAAGACGGCATAAAGACGGAGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATC*T
IndexSeq***		AAGAGCGTTTCAGCAGGAATGCCGAGACCGATCTC

*Amorce *forward*

**Amorce *reverse*

***Amorce pour lire l'index lors du séquençage

