



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Génétique Cellulaire

Présentée et soutenue par :

Katia JULIAN

le : mardi 21 décembre 2010

Titre :

Caractérisation moléculaire d'inversions péri- et paracentriques et analyse de leurs effets sur la méiose d'individus porteurs hétérozygotes

JURY

M. Patrick Calvas (CHU Purpan, faculté de médecine), M. Edmond Cribiu (INRA, unité GABI),
M. François Vialard (CHI Poissy St Germain), Mme Sylvie Chastant (ENVT, pathologie de la
reproduction), M. Michel Sourdioux (Société GENE +), M. Alain Ducos (UMR 444 INRA-ENVT)

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

UMR 444 INRA-ENVT Génétique Cellulaire

Directeur(s) de Thèse :

M. Alain Ducos et M. Alain Pinton

Rapporteurs :

M. Edmond Cribiu (INRA, unité GABI)
M. François Vialard (CHI Poissy St Germain)

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre 1 – Données bibliographiques 3

I. Première partie - La méiose 3

I.1 La méiose : définition et présentation générale 3

I.2 : La prophase de première division méiotique : une étape primordiale 4

 I.2.1 L'appariement des chromosomes homologues : un processus complexe 4

 I.2.1.1 Reconnaissance de l'homologie des chromosomes 5

 I.2.1.2 Juxtaposition et appariement des chromosomes homologues 6

 I.2.1.3 Effet du genre sur l'appariement méiotique des chromosomes 8

 I.2.2 La recombinaison méiotique 9

 I.2.2.1 Formation de cassures double-brins 9

 I.2.2.2 Invasion d'une chromatide homologue 10

 I.2.2.3 Résolution des cassures double-brins : mécanismes de formation des crossing overs 12

 I.2.2.4 Distribution des événements de recombinaison : « hot spots » et interférence 15

 I.2.2.5 Impact du genre sur la recombinaison méiotique 18

 I.2.3 Liens entre synapsis et recombinaison 18

I.3 Fin de la méiose I et déroulement de la méiose II 19

I.4 Les différents points de contrôle méiotique 21

 I.4.1 Points de contrôle en prophase I 22

 I.4.2 Point de contrôle du fuseau méiotique (Spindle assembly checkpoint) 23

 I.4.3 Les points de contrôle méiotique sont plus permissifs chez la femelle 24

I.5 Méiose mâle et femelle : si proches et pourtant si différentes 25

 I.5.1 La spermatogénèse 25

 I.5.2 L'ovogénèse 26

 I.5.3 Considérations méiotiques spécifiques à chaque sexe 28

II. Deuxième partie - Les anomalies chromosomiques et leurs conséquences sur la reproduction 30

 II.1 Les anomalies chromosomiques de nombre 30

 II.1.1 Anomalies impliquant les chromosomes sexuels 30

 II.1.2 Anomalies impliquant les autosomes 31

 II.1.3 Une gamétogénèse perturbée 32

 II.2 Les anomalies chromosomiques de structure 33

 II.2.1 Les translocations réciproques 33

 II.2.2 Les translocations robertsoniennes 34

 II.2.3 Conséquences des translocations sur la méiose 34

 II.2.3.1 Les troubles de la gamétogénèse 35

 II.2.3.2 La production de gamètes génétiquement déséquilibrés 36

III. Troisième partie - Les inversions, des anomalies de structure particulières 41

 III.1. Présentation générale des inversions 41

 III.1.1 Chez l'Homme 41

 III.1.2 Chez le porc 43

 III.2 Impact des inversions sur le processus méiotique 43

 III.2.1 Comportement méiotique des inversions 43

 III.2.1.1 La taille du fragment inversé, un facteur important modifiant le comportement méiotique des chromosomes 43

 III.2.1.2 La localisation des points de cassure joue-t-elle un rôle sur le comportement méiotique des chromosomes ? 47

 III.2.1.3 Impact des inversions sur la ségrégation méiotique : présence d'un effet inter chromosomique ? 49

III.2.2 Production de gamètes génétiquement déséquilibrés.....	49
III.2.2.1 Inversions péricentriques et gamètes déséquilibrés.....	50
III.2.2.2 Inversions paracentriques et gamètes déséquilibrés.....	50
III.2.2.3 Autres mécanismes de ségrégation.....	52
III.3 Conséquences cliniques des inversions chez l'Homme.....	53
III.3.1 Quelles conséquences pour les enfants d'individus porteurs d'inversion ?.....	53
III.3.2 Les inversions, cause d'infertilité.....	54
III.3.2.1 Inversions et défauts d'appariement des chromosomes.....	54
III.3.2.2 Inversions et production de gamètes génétiquement déséquilibrés.....	55
III.3.3 Analyse des risques et solutions proposées aux patients porteurs d'inversion.....	57
III.3.3.1 Risques de naissance d'enfants présentant des anomalies phénotypiques.....	57
III.3.3.2 Le conseil génétique : un outil personnalisé au service des patients porteurs d'anomalies chromosomiques.....	58
III. 4 Conséquences zootechniques des inversions chez le porc.....	62
Chapitre 2 – Données expérimentales.....	64
I. Introduction : objectifs de la thèse.....	64
II. Etude de l'effet de différents facteurs influençant la production de gamètes déséquilibrés dans le cas des inversions.....	66
II.1. Présentation de l'article.....	66
II.2 Article.....	67
III. Analyse du processus méiotique et comparaison des ségrégations méiotiques mâle et femelle.....	76
III.I. Présentation de l'article.....	76
III.2 Article.....	77
IV: Etude du processus méiotique pour des porteurs de trois inversions du chromosome 8.....	92
IV.1 Analyse des ségrégations méiotiques.....	92
IV.2 Analyse de l'appariement des chromosomes de deux individus porteurs d'inversions du chromosome 8.....	94
V. Discussion générale et perspectives.....	95
V.1 Recherche appliquée : Estimation de l'effet des inversions sur la reproduction d'individus mâle et femelle porteurs.....	95
V.2 Recherche fondamentale : apport de nouvelles connaissances sur le processus méiotique en présence d'inversions.....	97
V.2.1. Quels sont les mécanismes d'appariements des chromosomes chez le porc ?.....	97
V.2.2. Quel est l'impact des inversions sur la recombinaison chez le porc ?.....	99
V.3. Autres perspectives.....	100
V.3.1 Affiner l'analyse des produits de ségrégations méiotiques d'inversion.....	100
V.3.2 Analyser dans son intégralité le processus méiotique en présence d'inversions.....	100
III.3.2.1. Chez le mâle.....	100
III.3.2.2. Chez la femelle.....	102
V.3.3 Identifier d'autres conséquences possibles des inversions.....	102
V.3.3.1. Micro-déséquilibres chromosomiques associés aux inversions.....	102
V.3.3.2 Impact des anomalies chromosomiques sur les phénomènes épigénétiques se déroulant dans les gamètes.....	103
Conclusion.....	105
Annexes.....	139
A-I : Article paru dans Theriogenology.....	139
A-II: Méthodes cytogénétiques d'étude de la méiose : appariement, recombinaison et ségrégations méiotiques.....	147
A-III. Protocole détaillé des différentes techniques utilisées.....	158

Liste des abréviations

ADN : Acide Desoxyribo Nucléique

ARN : Acide Ribo Nucléique

ATM : Ataxia Telangiectasia mutated

ATR: AT-Rad3 related

AZF : Azoospermia Factor region

BAC : Bacterial Artificial Chromosome - Chromosome artificiel de Bactérie

BRCA : Breast cancer (proteins)

BSRC : Barrier to sister chromatid repair - Barrière à la réparation des cassures par la chromatide sœur

BUB: Budding Uninhibited by Bezimidazole)

CGH : Comparative Genomic Hybridisation

cM: centi Morgan

CO : Crossing Over

DAPI : 4',6'-Diamidino-2-phenilindol

dHJ : Double Holliday junctions – Double jonction de Holliday

DPC : Diagnostic Pré-Conceptionnel

DPI : Diagnostic Pré-Implantatoire

DSB : Double Strand Breaks –cassures double-brins

EC : Elément Central

EGF : Epidemial Growth Factor

EL : Eléments Latéraux

FISH : Fluorescent In Situ Hybridization – Hybridation In Situ en Fluorescence

FIV : Fécondation In Vitro

FT : Filaments Transverses

GTTT : Gestion Technique des Troupeaux de Truies

HORMAD : HORMA domain-containing

ICE : Inter Chromosomic Effect – Effet Inter-chromosomique

ICSI : Intra Cytoplasmic Sperm Injection – Injection de Sperme Intra Cytoplasmique

IFIP : Institut français du porc

INRA :Institut National de la Recherche Agronomique

Inv : Inversion

Kb :KiloBases

MAD : Mitotic Arrest Deficient

MLH1 : *MutL* Homolog 1

MLH3: *MutL* Homolog 3

MMR : Mismatch repair proteins

MPLA : Multiplex ligation-dependent probe amplification

MSUC : Meiotic Silencing of Unsynapsed Chromatin

NCO : Non Crossing Over

PMA : Procréation Médicalement Assistée

OSP : Organisme de Sélection Porcine

SAC : Spindle assembly checkpoint- Point de contrôle du fuseau méiotique

SCO : Sertoli Cell-only Syndrome

SDSA : Synthesis Dependant Strand Annealing

SEI: Single End Invasion- Invasion simple-brin

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SPCS : Séparation Prématuration des Chromatides Sœurs

SpermFISH : Hybridation In Situ en Fluorescence sur noyaux de spermatozoïdes décondensés

SSC : *Sus SCrofa Domestica*, nom taxonomique du porc

SYCP1 ou SCP1 : Synaptonemal Complex Protein 1 – Protéine du complexes synaptonemal 1

SYCP3 ou SCP3 : Synaptonemal Complex Protein 3 – Protéine du complexes synaptonemal 3

TR : Translocation Réciproque

TRob : Translocation Robertsonienne

Liste des figures

<u>Figure I-1</u> : Présentation schématique de la méiose.....	3
<u>Figure I-2</u> : Représentation schématique des différentes phases de la prophase de première division méiotique	4
<u>Figure I-3</u> : Représentation schématique de la formation du bouquet télomérique	6
<u>Figure I-4</u> : Représentation schématique d'un complexe synaptonémal et de certaines cohésines qui y sont associées.....	7
<u>Figure I-5</u> : Représentation schématique de la formation du complexe synaptonemal et localisation des nodules méiotiques précoces et tardifs	8
<u>Figure I-6</u> : Représentation schématique de l'initiation des cassures double-brins.....	10
<u>Figure I-7</u> : Représentation schématique du complexe MRE11-RAD50-XRS2	10
<u>Figure I-8</u> : Représentation schématique de la formation d'une invasion simple brin	11
<u>Figure I-9</u> : Représentation schématique du modèle de Szostak concernant la réparation des cassures double-brins	12
<u>Figure I-10</u> : Représentation schématique du rôle de MSH4 et MSH5 durant la recombinaison méiotique : Stabilisation et conservation des doubles jonctions de Holliday..	13
<u>Figure I-11</u> : Représentation schématique des trois modèles permettant la résolution des cassures double brins.....	14
<u>Figure I-12</u> : Représentation schématique des différents modèles de mise en place de l'interférence	17
<u>Figure I-13</u> : Représentation schématique des principales étapes de la prophase de première division méiotique	18
<u>Figure I-14</u> : Représentation schématique de l'arrangement des kinétochores, comparaison entre mitose et méiose	20
<u>Figure I-15</u> : Représentation schématique du mécanisme de ségrégation des chromosomes et de son contrôle	23
<u>Figure I-16</u> : Représentation schématique de différents phénotypes mutants de souris mâles et femelles : la méiose femelle est plus permissive.....	24
<u>Figure I-17</u> : Représentation de la spermatogénèse	26
<u>Figure I-18</u> : Coupe d'un tube séminifère de verrat adulte : organisation des cellules germinales	26
<u>Figure I-19</u> : Représentation schématique de l'ovogénèse	27
<u>Figure I-20</u> : Représentation schématique des événements majeurs de la méiose	29

<u>Figure I-21:</u> Représentation schématique d'une translocation réciproque.	33
<u>Figure I-22 :</u> Représentation schématique d'une translocation Robertsonienne impliquant les chromosomes 14 et 21 (d'après Berger, 1998).	33
<u>Figure I-23 :</u> Représentation schématique d'un quadrivalent	34
<u>Figure I-24 :</u> Image en microscopie électronique d'un quadrivalent dans un spermatocyte de porc porteur d'une translocation réciproque (1;6).....	34
<u>Figure I-25 :</u> Représentation schématique d'un trivalent dans le cadre d'une translocation robertsonienne	35
<u>Figure I-26 :</u> Image d'un spermatocyte par immunohistochimie chez un porc porteur d'une translocation robertsonienne trob (13 ;17)	35
<u>Figure I-27 :</u> Quadrivalent présentant des défauts d'appariement des chromosomes dans le cas de translocations réciproques chez l'homme	36
<u>Figure I-28 :</u> Représentation schématique des différents types de ségrégation.	36
<u>Figure I-29 :</u> Différents diagrammes présentant les produits de première et seconde division méiotique en fonction du type de ségrégation chez l'Homme	37
<u>Figure I-30 :</u> Représentation schématique des produits de première et de seconde division méiotique dans le cas d'une translocation robertsonienne 14/21 chez l'homme	38
<u>Figure I-31:</u> Représentation des différentes anomalies chromosomiques de nombre et de structure trouvées chez des hommes et des femmes infertiles	40
<u>Figure I-32 :</u> Bilan des anomalies chromosomiques décelées chez le porc	40
<u>Figure I-33 :</u> Représentation schématique d'inversions péri et paracentriques	41
<u>Figure I-34 :</u> Représentation schématique des différents comportements méiotiques possibles des chromosomes normaux et inversés	44
<u>Figure I-35 :</u> Représentation schématique du phénomène d'ajustement synaptique.....	45
<u>Figure I-36 :</u> Images issues d'analyses en microscopie électronique permettant la visualisation de différentes boucles d'inversions illustrant le phénomène d'ajustement synaptique (spermatocytes de souris porteurs hétérozygotes d'une inversion du chromosome 1).....	45
<u>Figure I-37 :</u> Représentation schématique des différents types de chromosomes pouvant être produits en présence d'une inversion péricentrique	50
<u>Figure I-38:</u> Représentation schématique des différents crossing overs pouvant se produire dans une boucle d'inversion et du type de gamètes étant produits dans chaque cas.....	50
<u>Figure I-39 :</u> Représentation schématique de différents types de chromosomes pouvant être produits en présence d'une inversion paracentrique	51

<u>Figure I-40</u> : Représentation schématique d'une séparation précoce des chromatides sœurs et formation d'un « pont anaphasique », suivies par la ségrégation des chromosomes et chromatides durant la méiose d'une souris femelle porteur hétérozygote d'une inversion paracentrique.	51
<u>Figure I-41</u> : Représentation schématique d'un échange en « U »	52
<u>Figure I-42</u> : Illustration des mécanismes « U-type » et cassure et réunion des chromatides sœurs et produits de ségrégation méiotique associés.	52
<u>Figure I-43</u> : Relation entre la taille relative du fragment inversé et le pourcentage de gamètes déséquilibrés produit (inversions péri et paracentriques).....	55
<u>Figure I-44</u> : Arbre décisionnel ; représentation schématique du processus de prise en charge des azoospermies et oligo-asthéo-tératospermies chez l'homme.....	58
<u>Figure I-45</u> : Image CGH d'un globule polaire issu d'une patiente porteuse d'une translocation robertsonienne (13;14).....	61
<u>Figure II-1</u> : Schéma représentant l'organisation pyramidale de la sélection porcine en France	64
<u>Figure II-2</u> : Caractérisation cytogénétique des trois inversions du chromosome 8 étudiées	92
<u>Figure II-3</u> : Caractérisation de l'inversion inv(8)(p1.1;q2.5) par des sondes de BAC télomériques.	92
<u>Figure II-4</u> : Noyaux de spermatozoïdes présentant des signaux inattendus : deux signaux verts et un rouge (a) et deux signaux rouges et un vert (b).	93
<u>Figure II-5</u> : Localisation des nouvelles sondes utilisées sur des chromosomes 8 normaux et inversés.....	94
<u>Figure II-6</u> : Spermatoocytes issus d'un échantillon testiculaire du porteur de l'inversion inv(8)(p1.1 ;q2.5) et dont le bivalent 8 présente des défauts d'appariement	95

Liste des tableaux

<u>Tableau I-1 :</u> Comparaison par espèce de la durée des étapes pré méiotiques, méiotiques et post méiotiques de la spermatogénèse, de sa durée totale et du nombre de spermatozoïdes produits.....	27
<u>Tableau I-2 :</u> Bilan des inversions documentées dans l'espèce porcine.....	43
<u>Tableau I-3 :</u> Paramètres séminaux normaux et anormaux de l'homme.....	59
<u>Tableau II-1 :</u> Proportion des gamètes déséquilibrés et inattendus trouvés lors de l'étude des ségrégations méiotiques des inversions $inv(8)(p1.2;q2.1)$ et $inv(8)(p2.1;q1.1)$	93
<u>Tableau II-2 :</u> Proportion des gamètes déséquilibrés et inattendus trouvés lors de l'étude des ségrégations méiotiques de l'inversion $inv(8)(p1.2 ;q2.1)$ en utilisant des sondes de BACs localisées sur différentes régions chromosomiques	94

Introduction

On appelle anomalie ou remaniement chromosomique toute anomalie du nombre ou de la structure des chromosomes. Ces anomalies sont dites « constitutionnelles » si elles sont présentes dès la conception d'un individu.

Les remaniements chromosomiques dits constitutionnels sont relativement fréquents dans les espèces animales d'élevage, dont l'espèce porcine, mais aussi chez l'Homme où leur incidence dans la population générale est de 0,7 % (Berger, 1998). Parmi ces derniers, on peut distinguer des anomalies chromosomiques de structure impliquant plusieurs chromosomes, comme les translocations par exemple, et des anomalies impliquant un seul chromosome, incluant les inversions.

Les inversions sont des anomalies chromosomiques de structure résultant d'une double cassure sur un même chromosome et d'un retournement à 180° du segment chromosomique ainsi généré. Ces inversions sont dites péricentriques si les points de cassure sont localisés de part et d'autre du centromère, ou paracentriques dans le cas contraire. Chez l'Homme, la fréquence estimée des inversions péricentriques est de 0,012% à 0,07% et de 0,01% à 0,05% pour les inversions paracentriques (McKinlay-Gardner et Sutherland, 2004).

Les remaniements chromosomiques, à l'état équilibré (pas de matériel chromosomique en excès ou en défaut), n'entraînent généralement chez l'individu porteur aucune modification du développement. Cependant, les porteurs hétérozygotes de certaines de ces anomalies, dont les inversions, sont susceptibles de rencontrer des problèmes de reproduction en raison de perturbations du processus méiotique conduisant à des troubles de la spermatogenèse et/ou à la production de gamètes génétiquement déséquilibrés (pour revue, Anton et al., 2005). La production de ce type de gamètes a deux conséquences importantes : ils peuvent d'une part induire des mortalités embryonnaires ou des avortements spontanés précoces lorsque les déséquilibres génétiques sont importants. Ces déséquilibres, s'ils sont mineurs, peuvent aussi être compatibles avec un développement embryonnaire et fœtal allant jusqu'au terme de la gestation, mais sont généralement associés, dans ce cas, à d'importantes anomalies congénitales (malformations et/ou retards mentaux). Concernant les espèces d'élevage, et notamment le porc, ces anomalies constitutionnelles de structure peuvent être responsables d'une dégradation importante de certaines aptitudes de reproduction (fertilité, prolificité) des individus porteurs et /ou de leurs conjointes, pouvant se traduire par un coût économique non négligeable pour les filières concernées.

Parmi ces anomalies de structure, certaines sont relativement fréquentes et donc bien documentées chez l'Homme et dans les espèces d'élevage. C'est le cas des translocations réciproques et robertsoniennes. Les inversions, en revanche, constituent un groupe d'anomalies beaucoup moins fréquemment décrites, et de ce fait beaucoup moins étudiées.

L'objectif premier de ma thèse était donc d'analyser, pour la première fois dans l'espèce porcine, le déroulement et les produits de la méiose dans le cas d'inversions péri- et paracentriques variées, et d'inférer l'impact de ces remaniements sur la fertilité des individus porteurs et/ou de leurs conjointes. L'utilisation de l'espèce porcine a également permis de réaliser certaines études très difficiles, voire impossibles à mettre en œuvre chez l'Homme. En effet, des accouplements raisonnés ont permis la production de descendants mâles et femelles porteurs hétérozygotes d'une inversion et ainsi d'estimer l'effet du sexe sur la production de gamètes génétiquement déséquilibrés. Pour certaines inversions, pour lesquelles nous disposions d'échantillons testiculaires, nous avons aussi pu étudier l'ensemble du processus méiotique, des phases précoces de la méiose jusqu'aux produits de ségrégation.

Ces expériences étant inédites dans l'espèce porcine mais aussi chez l'Homme, les données obtenues apportent un éclairage nouveau concernant le déroulement de la méiose en présence d'inversions dans une espèce de mammifères.

La suite de mon manuscrit est structurée de la façon suivante :

Le premier chapitre sera consacré à une étude bibliographique de la méiose, des anomalies chromosomiques de structure et plus particulièrement des inversions.

Après une présentation des objectifs de ma thèse au début du second chapitre, les principaux résultats obtenus, correspondant à deux articles dont le premier est publié dans *Cytogenetics and Genome Research* (Massip et al., 2009) et le second publié dans *Chromosome Research* (Massip et al., 2010) seront présentés. Le premier concerne l'analyse des profils de ségrégation chez des verrats porteurs de six inversions différentes. Les principaux résultats obtenus lors de la comparaison du taux de gamètes anormaux produit entre mâles et femelles porteurs de la même anomalie, ainsi qu'une étude plus globale du processus méiotique chez le mâle grâce à l'analyse des phases précoces de la méiose chez un individu porteur sont eux détaillés dans le second article.

Enfin, la dernière partie de la ma thèse sera consacrée à une discussion plus générale des résultats obtenus. Certaines perspectives ouvertes par mes travaux seront aussi présentées.

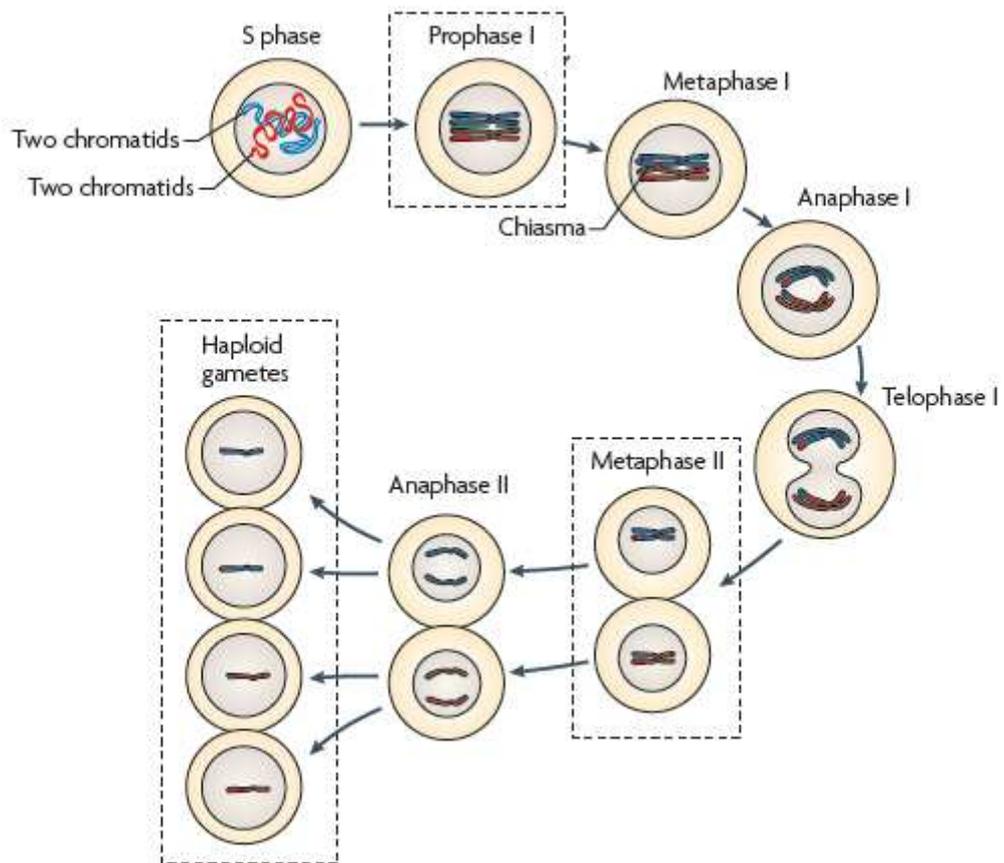


Figure I-1 : Présentation schématique de la méiose (d'après Handel et Schimenti, 2010).

Chapitre 1 – Données bibliographiques

I. Première partie - La méiose

Avant de présenter en détail ce que sont les inversions et quels sont leurs effets, quelques rappels plus généraux sont nécessaires. En effet, les remaniements chromosomiques peuvent perturber le processus de méiose de différentes façons et ainsi être responsables de baisses de fertilité des individus porteurs. La première partie de ce chapitre est donc consacrée à une présentation rapide de la méiose (mâle et femelle) et de ses particularités dans les deux sexes.

I.1 La méiose : définition et présentation générale

La méiose est à l'origine de la genèse des cellules sexuelles, appelées gamètes. Contrairement à la mitose, qui permet un maintien de la diploïdie ($2n$ chromosomes) entre chaque cycle de division, le mécanisme de méiose induit la formation de cellules haploïdes (n) possédant une seule copie de chaque chromosome.

La méiose est une étape essentielle du processus de gamétogénèse, conduisant à la production de spermatozoïdes chez le mâle et d'ovocytes chez la femelle.

Elle assure également une fonction primordiale de brassage génétique entre chromosomes maternels et paternels grâce aux recombinaisons méiotiques d'une part et à la ségrégation aléatoire des chromosomes dans les cellules filles d'autre part.

La première phase, appelée méiose I ou méiose réductionnelle, permet la ségrégation des deux chromosomes homologues paternels et maternels. La ségrégation des chromatides sœurs dans chaque cellule fille est quant à elle appelée méiose II ou méiose équationnelle, et s'apparente à une mitose classique (Figure I-1).

Dans chaque cas, les méioses I et II sont divisées en quatre étapes importantes : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.

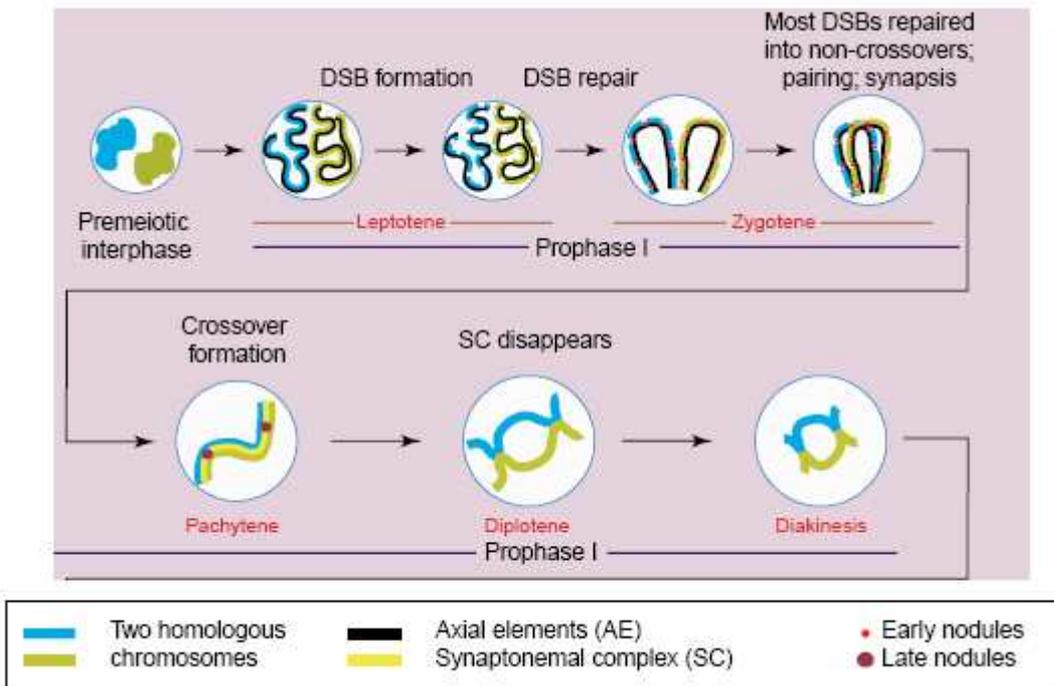


Figure I-2 : Représentation schématique des différentes phases de la prophase de première division méiotique (d'après Pawlowski et al., 2005).

I.2 : La prophase de première division méiotique : une étape primordiale

La prophase de première division méiotique est une étape cruciale du processus méiotique. Trois phénomènes « clefs » s'y produisent (Jordan, 2006; Pawlowski and Cande, 2005):

- Un rapprochement des chromosomes et l'identification de l'homologie des partenaires,
- L'appariement des homologues,
- La recombinaison méiotique.

La prophase est elle-même divisée en 5 stades distincts : le leptotène, le zygotène, le pachytène, le diplotène et la diacinèse (Figure I-2).

De ces étapes « clefs » dépend le bon déroulement de la méiose. C'est pourquoi elles sont spécifiquement détaillées dans les paragraphes suivants.

I.2.1 L'appariement des chromosomes homologues : un processus complexe

Contrairement aux organismes *Caenorabditis elegans* et *Drosophila melanogaster* femelle pour lesquels l'appariement des chromosomes est indépendant du phénomène de recombinaison méiotique (Dernburg et al., 1998; McKim et al., 1998), l'appariement des homologues est en partie dépendant des cassures double-brins (Double Strand Breaks-DSB), chez de nombreuses espèces dont la souris (Baudat et al., 2000; Celerin et al., 2000; Grelon et al., 2001; Romanienko and Camerini-Otero, 2000; Storlazzi et al., 2003).

En effet, la manière dont les chromosomes homologues s'apparient peut se diviser en trois étapes séquentielles (Zickler, 2006) :

- une phase précoce de reconnaissance des chromosomes, indépendante des mécanismes de recombinaison,
- une juxtaposition des axes de chaque chromosome homologue (appariement)
- la formation d'un complexe protéique à partir des appariements précédemment induits (synapse).

Chez les mammifères, les deux dernières étapes ont lieu simultanément (Zickler and Kleckner, 1999).

Afin de comprendre plus facilement les mécanismes permettant l'appariement des chromosomes et la recombinaison entre les homologues, les deux phénomènes seront présentés séparément dans un premier temps. Les liens entre synapsis et recombinaison seront abordés ultérieurement dans un paragraphe particulier.

1.2.1.1 Reconnaissance de l'homologie des chromosomes

Après une phase de réplication pré-méiotique, les chromosomes sont chacun composés de deux chromatides identiques, reliés par le centromère. Dès le premier stade de la prophase (leptotène), les chromosomes homologues débutent leur rapprochement.

Les mécanismes permettant d'expliquer comment les homologues peuvent se reconnaître lors de la phase précoce d'appariement sont encore très mal connus. Plusieurs hypothèses ont cependant été avancées : des mouvements de chromosomes ayant lieu au hasard pourraient permettre aux homologues de se rencontrer par des contacts directs ADN-ADN ou grâce à des protéines servant d'intermédiaires (Fung et al., 1998). Une reconnaissance spécifique des chromosomes homologues pourrait aussi avoir lieu grâce à des molécules d'ARN spécifiques de séquences (Zickler and Kleckner, 1999).

De façon surprenante, de nombreuses espèces, dont certaines levures, ont montré une association non homologue des centromères lors des phases précoces de la méiose, afin de favoriser une reconnaissance d'homologie entre les chromosomes (Obeso and Dawson, 2010; Tsubouchi and Roeder, 2005). D'autres auteurs ont par ailleurs suggéré que cette association non homologue des centromères avait plus vraisemblablement pour but d'éviter la formation d'échanges de chromatides trop près des centromères, ce qui pourrait être délétère pour la cellule (Obeso and Dawson, 2010).

Des études ont aussi montré qu'il existait chez certaines espèces telles que *D. melanogaster*, *A. thaliana* et *S. pombe* un appariement des chromosomes avant même leur entrée en méiose, souvent près des centromères (Fransz et al., 2002; Scherthan et al., 1994; Vazquez et al., 2002). Bien que le mécanisme soit encore inconnu, cette association pré-méiotique pourrait favoriser l'appariement des chromosomes par la suite (Vazquez et al., 2002). Cependant, ce phénomène n'a pas été observé chez les mammifères (Scherthan et al., 1996).

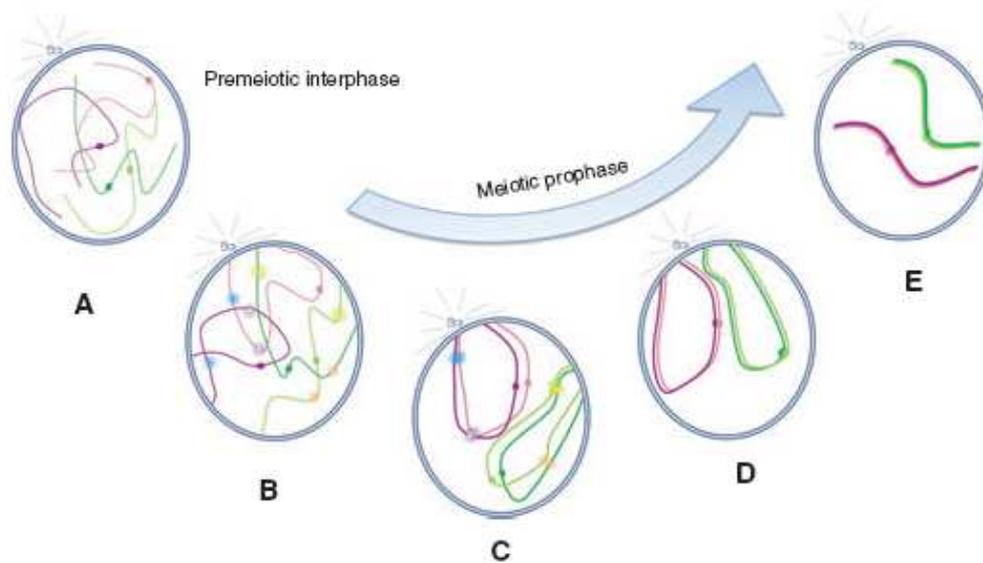


Figure I-3 : Représentation schématique de la formation du bouquet télomérique (Ding et al., 2010).

A : Durant l'interphase pré-méiotique, les chromosomes homologues, non appariés, sont distribués uniformément dans le noyau.

B : Les chromosomes commencent la recherche d'homologie au début de la méiose.

C et D : Formation du bouquet télomérique, reconnaissance des homologues aux stades leptotène et zygotène et appariement.

E : La synapse des chromosomes homologues est complète à la fin de la prophase de première division méiotique.

Pour un grand nombre d'espèces, la fin du stade leptotène et le début du zygotène est marqué par la formation d'une structure particulière, nommée « bouquet », où les télomères des chromosomes attachés à l'enveloppe nucléaire se regroupent tous dans une petite région du noyau (Figure I-3). Cette étape très brève (Storlazzi et al., 2003) est en partie contrôlée par la protéine UNC84A (ou SUN1) chez les mammifères, induisant un mouvement des chromosomes grâce au cytosquelette lié à l'enveloppe nucléaire (Ding et al., 2007).

Il a été suggéré dans plusieurs études que cette disposition spécifique des télomères pouvait jouer un rôle dans l'appariement des chromosomes en permettant de les rapprocher les uns des autres (Harper et al., 2004; Scherthan, 2001; Yamamoto et al., 1999). Il a en effet été montré que l'initiation de l'appariement aux extrémités télomériques était concomitante avec la formation du bouquet (Scherthan, 2001; Zickler and Kleckner, 1998).

Bien que cette disposition particulière des télomères ne soit pas liée à la formation des cassures double brins, il semble que la dissolution du bouquet soit par contre dépendante de la bonne résolution de ces mêmes cassures (Liebe et al., 2006). Ainsi, des acteurs importants de la recombinaison méiotique tels que l'histone H2AX et la protéine ATM (cf. paragraphes suivants) jouent un rôle important dans le maintien du bouquet télomérique (Fernandez-Capetillo et al., 2003b; Pandita et al., 1999).

1.2.1.2 Juxtaposition et appariement des chromosomes homologues

Dès le début du stade leptotène, une structure protéique appelée élément axial (EA) commence à s'accumuler le long de chaque paire de chromatides sœurs jusqu'à former une structure continue le long des chromosomes. La chromatine se compacte et forme des boucles s'étendant hors du squelette protéique.

Durant le stade zygotène, lorsque les chromosomes homologues sont effectivement alignés, une autre structure protéique, appelée élément central (EC), se met en place et est reliée aux structures axiales, nommées alors éléments latéraux (EL) par des structures intermédiaires appelées filaments transverses (FT). Ces trois complexes protéiques forment alors le Complexe Synaptonémal (CS). Les chromosomes ainsi liés sont appelés « bivalents ».

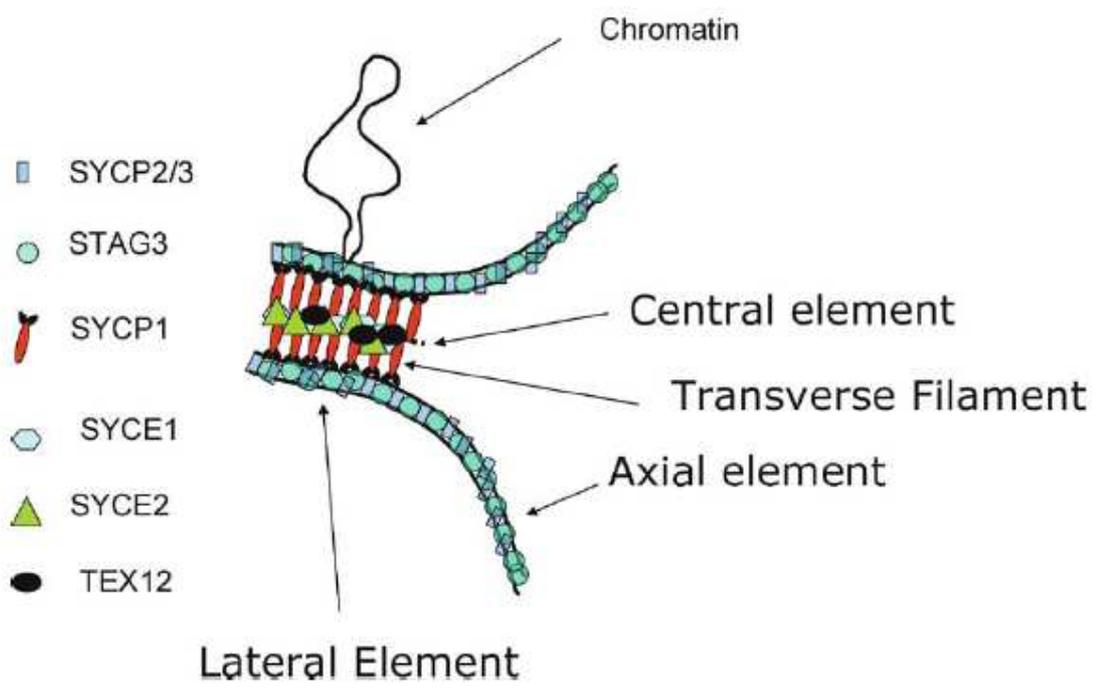


Figure I-4 : Représentation schématique d'un complexe synaptonémal et de certaines cohésines qui y sont associées (Costa et al., 2007).

Grâce à des études réalisées sur des espèces modèles telles que *C. elegans*, *D. melanogaster* et surtout *S. cerevisiae*, les protéines composant les différents éléments du complexe synaptonémal ont pu être étudiées (Dernburg et al., 1998; Kerrebrock et al., 1992; Kleckner, 1996; MacQueen et al., 2002; Pasierbek et al., 2001; Roeder, 1995; Siomos et al., 2001; Solari, 2002; Sym et al., 1993). Ces structures étant hautement conservées dans l'évolution (Gerton and Hawley, 2005), leurs homologues chez les mammifères ont été facilement identifiés.

Les éléments latéraux du complexe synaptonémal chez les mammifères sont composés principalement des protéines SYCP2 et SYCP3 (Synaptonemal Complex Protein 2 et 3) (Figure I-4) (Lammers et al., 1994; Offenberg et al., 1998; Schalk et al., 1998) et associés aux cohésines méiotiques REC8 (Parisi et al., 1999), STAG3 (Prieto et al., 2001), et SMC1 β (Revenkova et al., 2001). Les cohésines mitotiques SMC1 α , RAD21 et SSC3 sont aussi présentes, au moins lors des premières phases de la méiose (Revenkova and Jessberger, 2005).

Plusieurs études ont permis de montrer que ces différentes cohésines formaient plusieurs complexes (Eijpe et al., 2003; Revenkova et al., 2001; Revenkova et al., 2004) : ceux incluant la protéine REC8 se situent sur les chromatides, ceux formés avec SMC1 β au niveau des éléments axiaux ou latéraux (Jessberger, 2002) (Figure I-5).

Le rôle principal de ces cohésines, notamment REC8 et SMC1 β , est de permettre un appariement adéquat des chromosomes homologues (Bannister et al., 2004; Revenkova et al., 2004), mais aussi de maintenir leur structure, et notamment d'éviter la séparation prématurée des chromatides lors des premiers stades de la méiose I. En effet, il a été montré chez des souris mutées pour les protéines SMC1 β ou REC8 une diminution drastique de la taille des éléments axiaux, conduisant à un allongement des boucles de chromatine (Klein et al., 1999; Nasmyth, 2002). Ces cohésines ont aussi un rôle déterminant en permettant une formation correcte des complexes synaptonémaux et un appariement entre les homologues. En effet, les mêmes individus porteurs des mutations de SMC1 β ou REC8 présentent aussi un nombre plus important de chromosomes s'appariant avec leur chromatide sœur plutôt qu'avec leur homologue (Bannister et al., 2004; Revenkova et al., 2004; Xu et al., 2005).

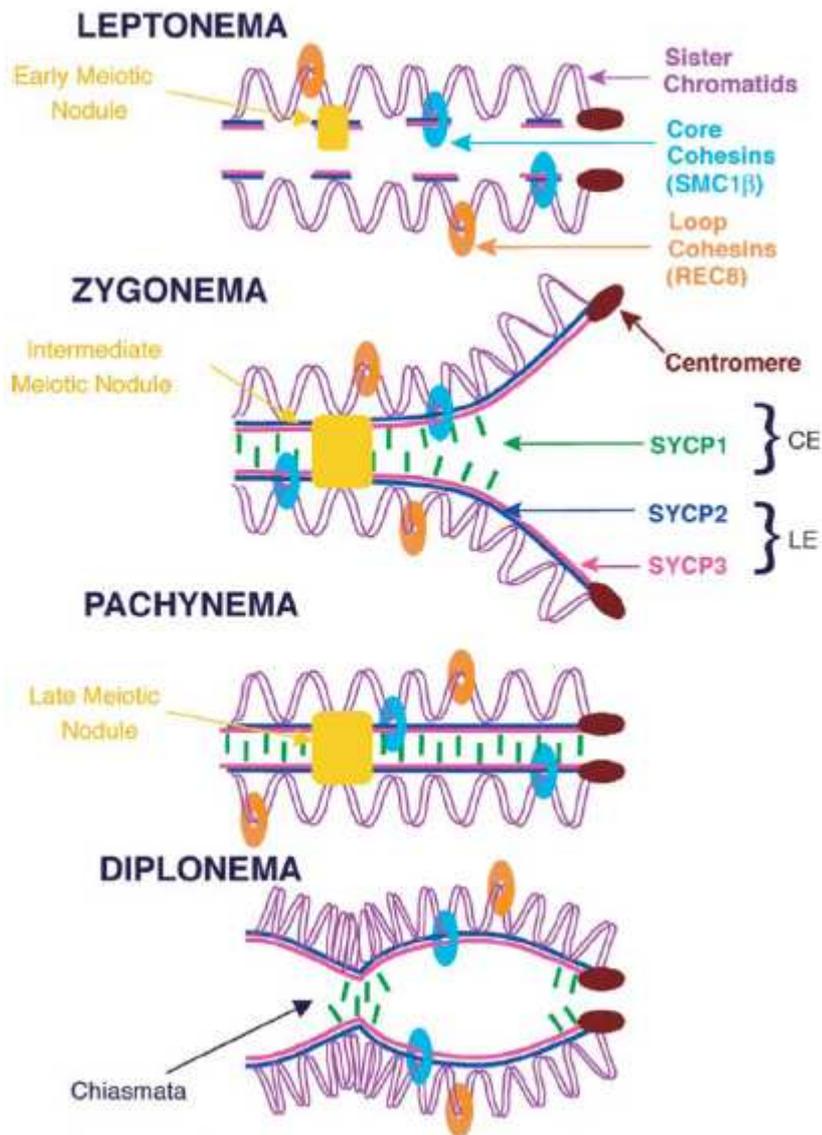


Figure I-5 : Représentation schématique de la formation du complexe synaptonemal et localisation des nodules méiotiques précoces et tardifs (Morelli et al., 2006).

CE : Central Element (Element central).

LE : Lateral Element (Element latéral).

Cependant, des études ont montré que les complexes de cohésines étaient présents sur les chromosomes même en l'absence de SYCP3, suggérant une indépendance, au moins partielle, entre la formation du complexe synaptonémal et celle des complexes protéiques permettant la cohésion des chromosomes (de Vries et al., 2005; Kouznetsova et al., 2005).

La protéine SYCP1 est elle un composant des filaments transverses qui sont attachés de part et d'autre aux éléments centraux et latéraux par ses extrémités N et C terminales, respectivement (Meuwissen et al., 1992; Offenbergh et al., 1998; Schmekel et al., 1996) (Figures I-4 et I-5). Située à l'interface entre éléments centraux et latéraux, la présence de cette protéine est souvent utilisée comme un marqueur de l'appariement complet des chromosomes. Plus récemment, une étude a aussi montré que la protéine FKBP6 jouait un rôle dans le processus d'appariement, en interagissant avec SYCP1 par son extrémité N terminale (Crackower et al., 2003).

Les protéines composant l'élément central du complexe synaptonémal sont principalement SYCE1, SYCE2 et TEX2 (Costa et al., 2005; Hamer et al., 2006) (Figure I-4). Il semble que ces trois protéines interagissent entre elles et avec la partie N terminale SYCP1 (Costa et al., 2005; Hamer et al., 2006).

1.2.1.3 Effet du genre sur l'appariement méiotique des chromosomes

Plusieurs études ont montré que l'appariement débutait préférentiellement aux extrémités télomériques chez le mâle (Martinez-Flores et al., 2003; Pfeifer et al., 2001; Scherthan et al., 1998). Chez la femelle par contre, l'appariement des chromosomes homologues peut débiter de façon plus centrale (Bojko, 1983; Hulten, 2006; Pfeifer et al., 2003).

La dynamique des chromosomes au début de la méiose est elle aussi différente selon les sexes. En effet, si le bouquet télomérique marque la transition des stades leptotène et zygotène chez le mâle (Pfeifer et al., 2001), il est présent jusqu'au milieu du pachytène chez la femelle (Pfeifer et al., 2003; Roig et al., 2004).

Le bouquet télomérique jouant un rôle dans l'appariement des chromosomes, il pourrait être prolongé chez la femelle à cause de la longueur de leurs complexes synaptonémaux, qui sont jusqu'à deux fois plus longs (Barlow and Hulten, 1998; Martinez-Flores et al., 2003).

Un retard dans la résolution des DSBs pourrait aussi expliquer pourquoi le bouquet est résolu plus tardivement chez la femelle (Pandita et al., 1999; Trelles-Sticken et al., 1999).

De plus, contrairement à la méiose mâle pour laquelle la protéine SCP3 est encore présente au niveau des centromères à l'anaphase de seconde division méiotique, ce n'est plus le cas dans les cellules méiotiques femelles dès la méiose I. Il semble donc que cette protéine ne soit pas essentielle à la cohésion des chromatides sœurs durant cette étape (Hodges et al., 2001).

I.2.2 La recombinaison méiotique

La formation d'échanges chromosomiques, autrement appelés crossing-overs, est un processus crucial dans la méiose. En effet, la recombinaison méiotique est primordiale en permettant la création de la diversité génétique grâce au brassage des allèles paternels et maternel et en établissant des connexions physiques (les chiasmas) entre les chromosomes homologues afin de maintenir leur attachement jusqu'à leur ségrégation, et ainsi permettre une séparation correcte des bivalents (pour revue, voir Roeder, 1997).

Les mécanismes de recombinaison méiotique ont eux aussi été décrits principalement chez *S. cerevisiae*, mais sont très largement conservés chez tous les eucaryotes (Cromie et al., 2006).

La formation des crossing-overs est composée de plusieurs étapes importantes, incluant la formation de cassures double-brins (DSBs), la résection de nucléotides à l'extrémité 5' des cassures, l'invasion d'un brin au niveau d'une chromatide du chromosome homologue et la résolution de la cassure selon différents modes. Ces différentes étapes, détaillées dans les paragraphes suivants, ont lieu aux stades zygotène et pachytène de la prophase I.

I.2.2.1 Formation de cassures double-brins

Chez de très nombreuses espèces y compris les mammifères, les cassures double-brins sont induites par l'enzyme SPO11 (voir: Bergerat et al., 1997; Keeney et al., 1997; Mahadevaiah et al., 2001; Romanienko and Camerini-Otero, 2000, et pour revue Baudat and Keeney, 2001). Cette protéine appartenant à la famille des topoisomérases induit le clivage des brins d'ADN en produisant une liaison covalente (un complexe) entre l'enzyme et l'extrémité 5' nouvellement créée de la molécule d'ADN (pour revue, Keeney, 2001) (Figure I-6).

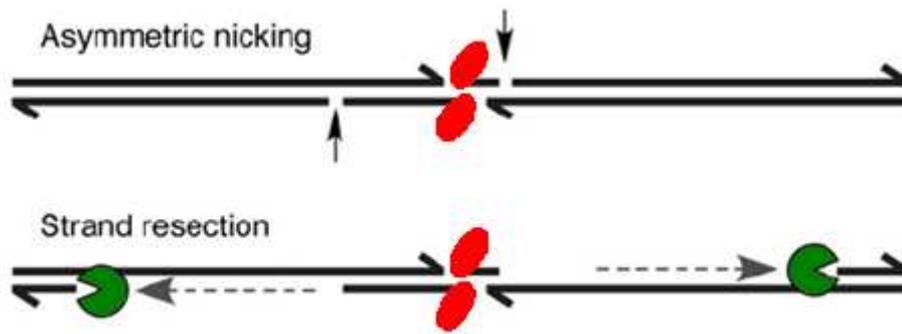


Figure I-6 : Représentation schématique de l'initiation des cassures double-brins (d'après Keeney et Neale, 2006).

Ellipses rouges : Spo11

Cercles verts : complexe protéique réalisant la résection des cassures formées précédemment par Spo11

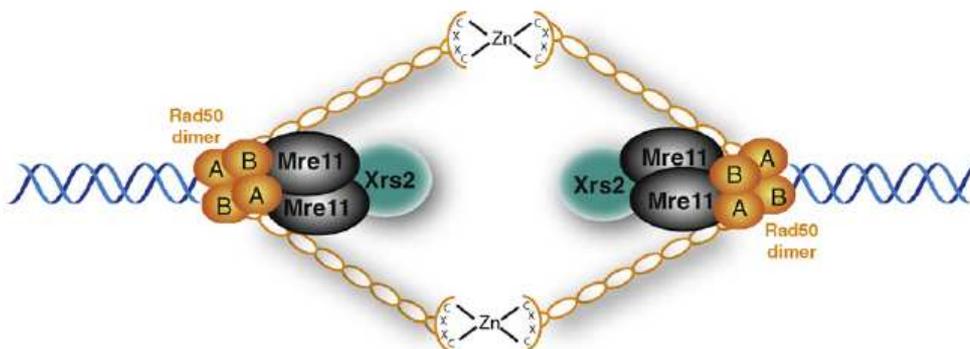


Figure I-7 : Représentation schématique du complexe MRE11-RAD50-XRS2 (Mimitou and Symington, 2009).

Chaque complexe est composé d'un dimère RAD50 et MRE11 et d'un monomère XRS2. MRE11 est rattachée à RAD50 près de la région où cette dernière se lie à l'ADN. XRS2 se fixe au complexe uniquement par MRE11. Deux complexes sont ensuite liés par des interactions entre des cystéines de RAD50 et des ions Zinc. La structure ainsi formée rattache les deux extrémités de la cassure double-brin.

Chez *S.cerevisiae*, neuf autres protéines sont aussi impliquées dans la formation des cassures double-brins en interagissant avec SPO11 (Maleki et al., 2007; Murakami and Keeney, 2008), et il est très probable que de nombreuses protéines jouent aussi un rôle dans la formation des DSBs chez les mammifères. Des études ont d'ailleurs montré que la forme phosphorylée de H2AX était associée à SPO11 chez la souris (Mahadevaiah et al., 2001). Cette histone pourrait alors en partie moduler le recrutement de facteurs permettant la réparation des cassures double-brins (Fernandez-Capetillo et al., 2003a).

Très rapidement, SPO11 est éliminée, ainsi qu'une courte séquence nucléotidique liée à la protéine (12-26 nucléotides ou 28-34 nucléotides chez la souris), formant au niveau de la cassure deux « queues » simple-brin (Neale et al., 2005).

Les extrémités ainsi formées sont ensuite dégradées par des exonucléases fonctionnant à contre-sens, afin de produire des fragments recombinés simple-brin 3' d'environ 100 nucléotides (Figure I-6). Cette résection est réalisée par un complexe protéique spécifique, MRE11-RAD50-XRS2, aussi impliqué dans la formation des cassures double-brins (Borde and Cobb, 2009; Mimitou and Symington, 2009) (Figure I-7).

1.2.2.2 Invasion d'une chromatide homologue

Une fois les extrémités 3' formées, la réparation de la cassure double-brins peut être initiée grâce à un échange de fragments chromosomiques homologues. Elle est catalysée par la protéine RAD51 (présente aussi lors de la mitose) et la recombinase spécifique de la méiose DMC1 (Bishop et al., 1992; Neale and Keeney, 2006). Ces protéines, très conservées, sont aussi présentes chez la souris et l'Homme (e.g. Lenzi et al., 2005; Tarsounas et al., 1999).

La résolution d'une cassure double-brins débute toujours par la formation intermédiaire d'une invasion simple-brin (Single End Invasion, SEI - Hunter and Kleckner, 2001), sous le contrôle des protéines RAD51 et DMC1 : une extrémité simple brin générée par une DSB « envahit » le chromosome homologue, écartant l'un des brins et se liant à l'autre (Figure I-8). Cette chromatide servira alors de matrice pour synthétiser la suite du brin « envahisseur ». La structure asymétrique particulière ainsi formée est appelée « D-loop », pour « displacement loop » (pour revue, Shinohara and Shinohara, 2004; Thacker, 2005).

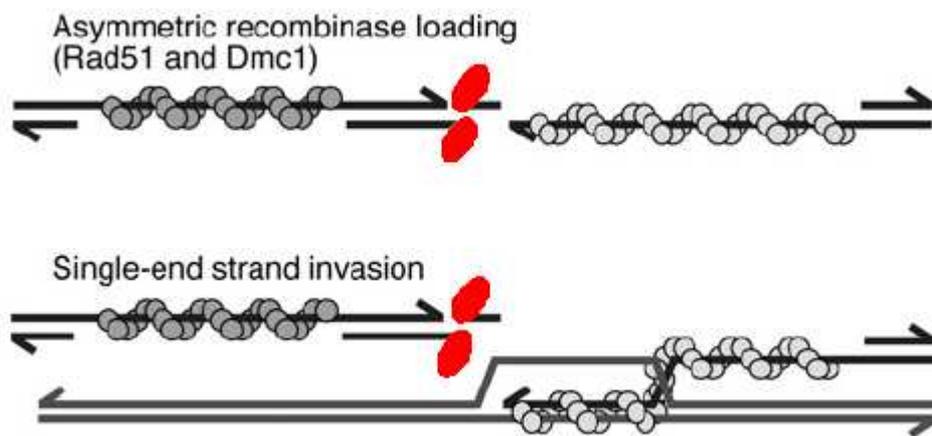


Figure I-8 : Représentation schématique de la formation d'une invasion simple brin (d'après Keeney et Neale, 2006).

Ellipses rouges : SPO11

En gris foncé et gris clair : structures nucléoprotéiques hélicoïdales formées par RAD51 et DMC1 situées de chaque côté de la cassure double-brin.

Un des deux brins asymétrique « envahit » le chromosome homologue et forme une structure intermédiaire stable.

La chromatide non homologue étant la matrice permettant l'élongation du brin impliqué dans la SEI, tout polymorphisme existant dans cette région est copié, permettant un transfert d'information génétique entre les deux chromosomes appelé « conversion génique » (Handel and Schimenti, 2010; Sun et al., 1991; Szostak et al., 1983).

Afin de favoriser un échange entre chromosomes homologues et non pas avec une chromatide sœur, différents mécanismes appelés « barrière à la réparation des cassures par la chromatide sœur » (« barrier to sister chromatid repair », BSRC) sont mis en place. Chez la levure, les protéines clefs régulant ces mécanismes sont des phosphoprotéines des éléments axiaux du complexe synaptonémal, RED1 et HOP1 (Carballo et al., 2008; Niu et al., 2005). Chez les mammifères, des orthologues potentiels de ces protéines, HORMAD 1 et 2 (HORMA domain-containing 1 et 2) sont aussi localisés au niveau des éléments axiaux (Fukuda et al., 2010; Wojtasz et al., 2009), mais il n'a pas été prouvé qu'elles jouaient un rôle dans le choix de la chromatide impliquée dans les phénomènes de recombinaison.

Les protéines RAD51 et DMC1 sont contenues dans une structure cytotologique particulière appelée nodule méiotique précoce, visible par microscopie électronique (précédemment nommés nodule de recombinaison - Anderson et al., 2003; Carpenter, 1975) (Figure I-4).

Chez l'homme, RAD51 est présente dès le début du stade zygotène jusqu'au stade pachytène (Lenzi et al., 2005). Co-localisée avec les éléments latéraux du complexe synaptonémal, elle apparaît sous forme de petits foyers (environ 350 - Cohen et al., 2006) sur les spermatocytes et ovocytes et marque les régions où des cassures double brin se sont produites.

Des études réalisées sur des souris porteuses de formes mutées de RAD51 et DMC1 ont montré qu'elles ne possédaient pas les mêmes fonctions (Shinohara et al., 2008). Cependant, de nombreuses questions restent encore en suspens concernant la façon dont RAD51 et DMC1 agissent de manière coordonnée ou concernant leur rôle éventuel sur d'autres étapes de la recombinaison.

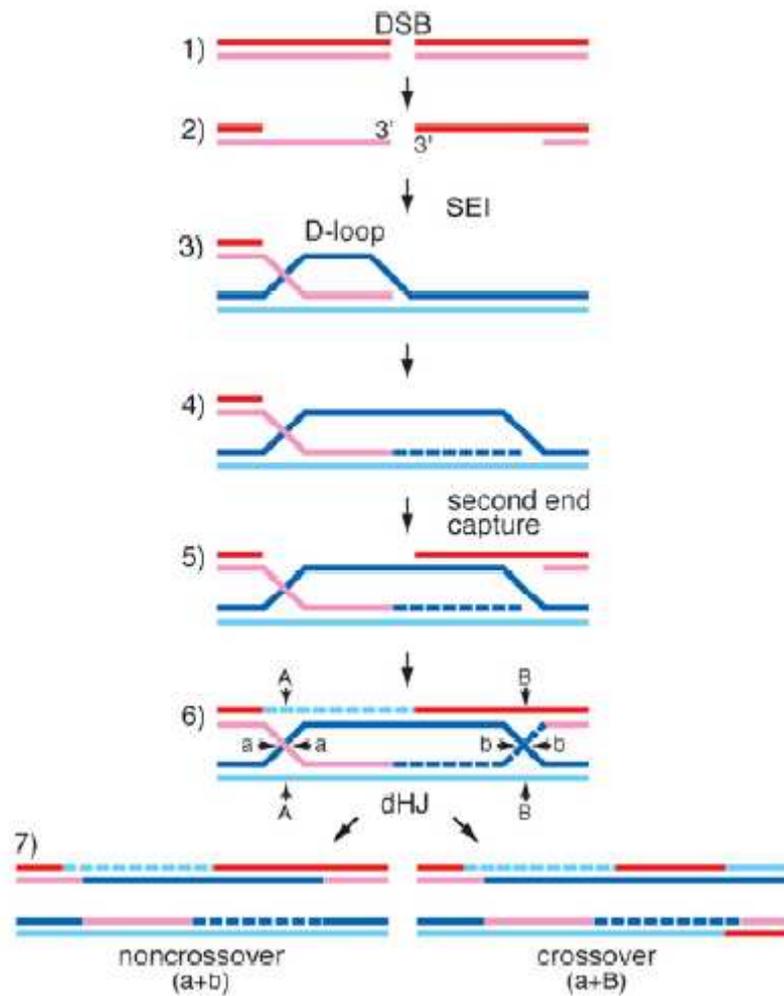


Figure I-9 : Représentation schématique du modèle de Szostak concernant la réparation des cassures double-brins (Whitby, 2005).

1.2.2.3 Résolution des cassures double-brins : mécanismes de formation des crossing overs

Pendant de nombreuses années, le mécanisme de formation des crossing overs avancé par Szostak (1983) a été le modèle de référence expliquant la recombinaison méiotique (Figure I-9). Ce modèle évoquait une seule voie de formation à la fois des crossing overs et de la résolution des cassures double-brins sans échange chromosomique, autrement nommés non crossing-overs (NCO). Ce modèle postule qu'après la mise en place du « D-loop » l'extrémité simple brin de la chromatide non engagée dans la SEI est capturée par la boucle et le brin est réparé en utilisant son homologue comme matrice. La ligation des extrémités 3' et 5' des quatre brins induit la formation de ponts intermédiaires où les chromatides se croisent, appelés doubles jonctions de Holliday (dHJ, pour double Holliday junctions - Holliday, 1964). Le clivage de ces ponts, en fonction de leur orientation, produit alors des COs et des NCOs.

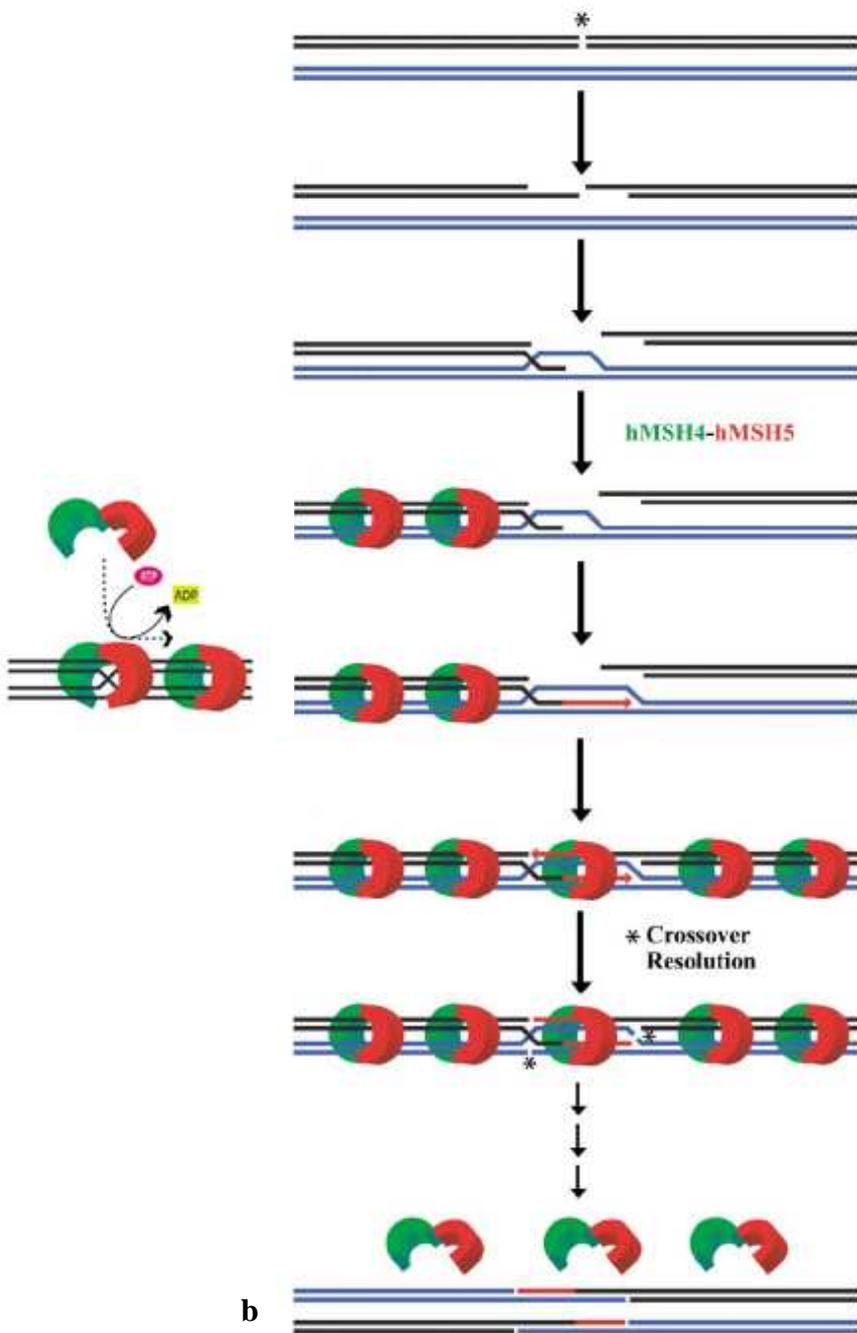
Il a cependant été montré que, contrairement à ce qui était avancé dans le modèle de Szostak, les crossing overs avaient lieu plus tardivement que les NCOs (Allers and Lichten, 2001; Terasawa et al., 2007).

D'autres études réalisées sur des souches de *Saccharomyces cerevisiae* mutées pour des protéines impliquées dans les mécanismes de recombinaison ont permis de montrer que la formation des CO était altérée sans que la proportion de NCO soit diminuée (Bishop and Zickler, 2004), et que COs et NCOs étaient formés selon deux mécanismes différents (Allers and Lichten, 2001; Guillon et al., 2005; Terasawa et al., 2007).

La décision d'induire un CO ou un NCO apparaît donc très tôt dans le processus de recombinaison méiotique, avant la formation des dHJs (Allers and Lichten, 2001).

Trois mécanismes permettent d'expliquer la formation des crossing et des non crossing overs par le biais de la réparation des cassures double-brins :

1)- Contrairement à ce qu'avancait le modèle de Szostak, les doubles jonctions de Holliday sont toutes résolues en crossing-overs (Allers and Lichten, 2001; Borner et al., 2004) (Figure I-11a), sous le contrôle de protéines spécifiques nommées « Mismatch repair proteins » (protéines MMR), qui détectent les bases mal appariées pendant la réplication et la recombinaison (pour revue, Borts et al., 2000; Evans and Alani, 2000; Surtees et al., 2004).



a : Mécanisme de reconnaissance des jonctions de Holliday par MSH4 et MSH5.

La liaison de ces protéines avec une jonction provoque un échange de l'ATP en ADP et la formation d'une « pince » entourant les deux brins d'ADN de chaque homologue.

La dissociation d'une pince entraîne immédiatement la formation d'un autre complexe MSH4-MSH5.

b : Les DSBs sont formées par l'action de SPO11 (astérisque). Après l'apparition d'une invasion simple brin, MSH4 et MSH5 sont recrutées au niveau du « D-loop » et forment des pinces (cf. a) pour stabiliser la structure. La formation d'une dHJ entraîne la liaison d'un nombre plus important de complexes MSH4-MSH5 sur les homologues, rendant plus facile la résolution des jonctions de Holliday.

La dissociation du complexe protéique a lieu après la résolution des cassures double-brins.

Figure I-10 : Représentation schématique du rôle de MSH4 et MSH5 durant la recombinaison méiotique : Stabilisation et conservation des doubles jonctions de Holliday (Snowden, 2004).

En rouge : MSH4

En vert : MSH5

Parmi ces dernières, MSH4 et MSH5 ont été les premières à avoir été découvertes (Hollingsworth et al., 1995; Ross-Macdonald and Roeder, 1994), et jouent un rôle primordial dans la formation des chiasmas et dans la stabilisation des SEIs.

Contrairement à leurs noms, ces protéines associées en hétérodimère ne se fixent pas sur les régions d'ADN mal appariées, mais sur les doubles jonctions de Holliday (Oblomova et al., 2000; Snowden et al., 2004). Une fois fixées à ces structures, l'hydrolyse de molécules ATP est activée par le complexe (Figure I-10a). MSH4 et MSH5 changent alors de configuration et forment un clamp autour des bras chromosomiques (Snowden et al., 2004). Elles stabilisent les SEIs et les dHJs et permettent alors de générer un biais dans la résolution des jonctions de Holliday afin que seuls des crossing overs soient générés (Hoffmann and Borts, 2004; Kunz and Schar, 2004) (Figure I-10b).

Les protéines MLH1 et MLH3 interviennent elles plus tardivement dans la formation des crossing-overs (après la synapsis des chromosomes - Anderson et al., 1999; Baker et al., 1996), et forment aussi un hétérodimère (Wang et al., 1999; Wang and Kung, 2002).

Le rôle principal de ces protéines, appartenant à la famille des orthologues de MLL, est de faciliter les communications entre les différents acteurs responsables de la résolution des DSBs. Ainsi, MLH1 et MLH3, en interagissant avec MSH4 et MSH5 (Hunter and Kleckner, 2001), favorisent la formation des crossing overs (Abdullah et al., 2004; Wang et al., 1999; Wang and Kung, 2002). Des études menées chez des souris mutantes pour MLH1 et MLH3 ont par ailleurs montré une réduction du nombre de crossing overs d'un facteur 10 chez ces individus (Baker et al., 1996; Woods et al., 1999), voire une absence totale de recombinaison (Lipkin et al., 2002).

MSH4, MSH5, MLH1 et MLH3 sont présentes dans les nodules méiotiques tardifs, qui marquent les sites des crossing over (Zickler and Kleckner, 1999) (cf. Figure I-5). Leur nombre est d'ailleurs très largement inférieur à celui des nodules méiotiques précoces (environ 10 fois moins - Morelli and Cohen, 2005) et atteint un plateau au milieu du pachytène (pour revue, Kolas and Cohen, 2004). Chez la souris, le nombre final de crossing overs par cellule est d'environ 25 (40 chromosomes) (Koehler et al., 2002a), et entre 50 et 70 chez l'homme (46 chromosomes) (pour revue, Vallente et al., 2006).

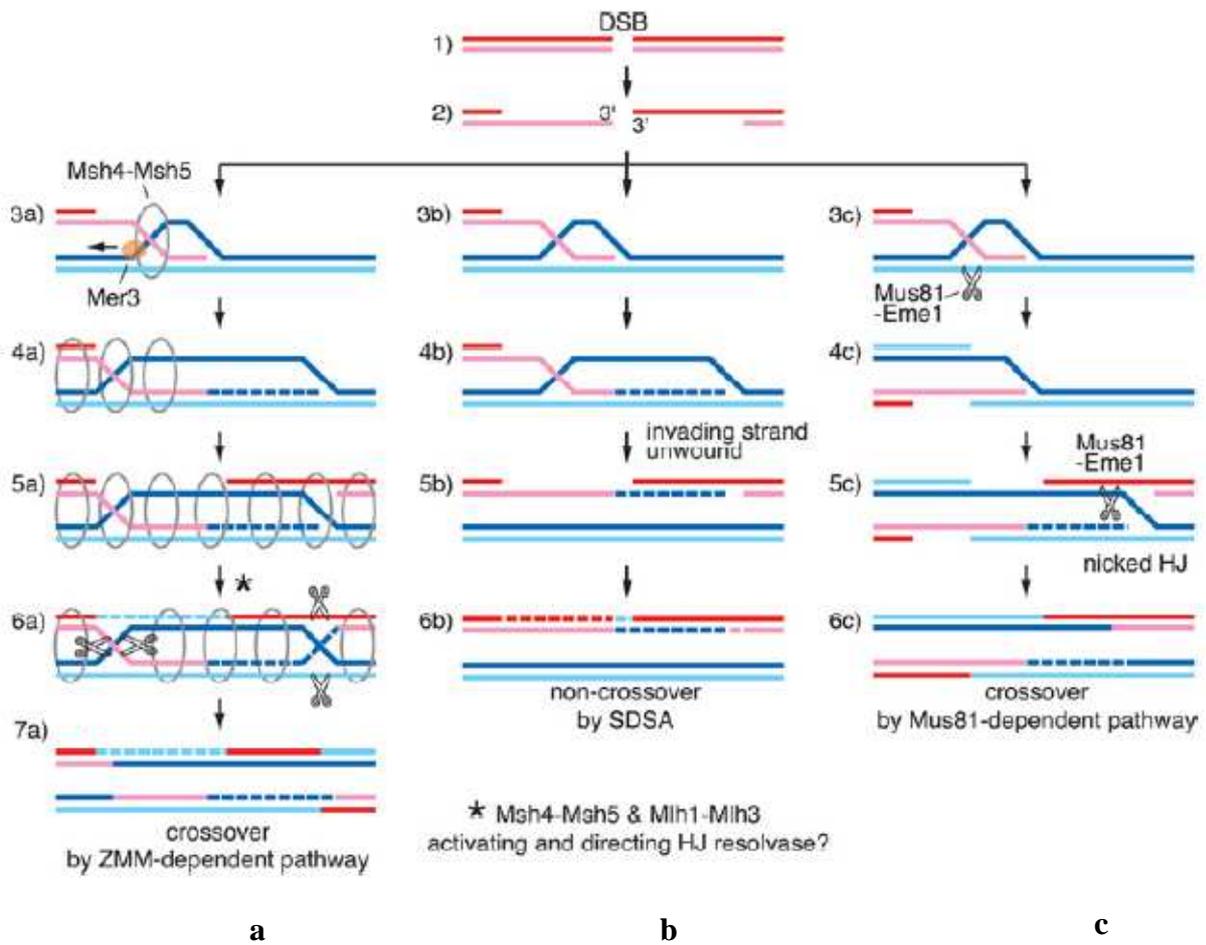


Figure I-11 : Représentation schématique des trois modèles permettant la résolution des cassures double brins (Whitby, 2005).

2)- La résolution des DSBs en NCO implique un processus particulier appelé « synthesis dependant strand annealing » (SDSA - Paques and Haber, 1999) (Figure I-11b). De manière concrète, après la formation d'une SEI, l'extrémité libre 3' du brin impliqué est utilisée comme substrat par les ADN polymérase afin de synthétiser la suite du brin. Cependant, au lieu d'être associée dans une jonction de Holliday, la chromatide nouvellement synthétisée est « rejetée » hors de l'hétéroduplex formé par le chromosome homologue. Elle s'associe alors avec l'autre extrémité de la cassure. Après une nouvelle phase de synthèse et la liaison des extrémités, le DSB est alors réparée sans qu'un crossing over ne se soit produit.

Bien qu'il n'y ait pas d'échange de chromatides, le phénomène de conversion génique a pu permettre un transfert d'information génétique d'un chromosome parental à l'autre.

3)- Une troisième voie de réparation des DSBs fait intervenir une endonucléase, MUS81, associée aux protéines MMS4/EME1 qui peuvent cliver de nombreux fragments d'ADN (Bastin-Shanower et al., 2003; Ciccia et al., 2003; Kaliraman et al., 2001; Whitby et al., 2003) dont les doubles jonctions de Holliday (Whitby, 2004). Cependant, leur activité est beaucoup plus importante au niveau des « D-loop » et des jonctions de Holliday endommagées (Gaillard et al., 2003; Osman et al., 2003). Le complexe formé par ces trois protéines agit donc préférentiellement en amont des dHJs, et clive l'ADN au moment de la formation du « D-loop » et avant que le second simple brin généré par les cassures ne soit capturé (Osman et al., 2003). La résolution des doubles jonctions de Holliday par MUS81-MMS4/EME1 induit elle aussi toujours la formation de crossing overs (Smith et al., 2003) (Figure I-11c).

Pour la majorité des espèces, la voie de prédilection pour la formation des crossing overs passe par la formation de doubles jonctions de Holliday (Hollingsworth and Brill, 2004). Certaines, comme des levures et *Arabidopsis* utilisent cependant la voie dépendante de Mus81 pour former une partie non négligeable de leurs crossing overs (20 à 40 % de la totalité des CO formés - Higgins et al., 2004; Higgins et al., 2008; Mercier et al., 2005). En effet, chez la levure, la voie Mus81 est probablement utilisée lorsque la voie « classique », dépendante de MSH4 et MSH5 n'est pas opérationnelle. La mise en place des protéines MMR, comme MLH2 serait d'ailleurs un élément important empêchant le complexe MUS81 d'avoir accès à l'ADN (Abdullah et al., 2004).

S. pombe utilise même en très grande majorité la voie MUS81 comme mécanisme de recombinaison (Cromie et al., 2006; Smith et al., 2003).

Pour d'autres, comme *C. elegans*, les crossing overs sont exclusivement formés par la voie des protéines MMR (Whitby, 2004).

Des études sur des souris mutantes pour les protéines MUS81, MSH4 et MSH5 tendent à montrer que les crossing overs chez les mammifères seraient aussi formés en grande majorité par la voie des mismatch repair protéines, mais que des événements de recombinaison contrôlés par MUS81 peuvent aussi être observés (Baudat and de Massy, 2007; Holloway et al., 2008).

1.2.2.4 Distribution des événements de recombinaison : « hot spots » et interférence

La distribution des crossing-overs sur le génome n'est pas entièrement aléatoire.

En effet, certaines régions sont préférentiellement concernées par les événements de recombinaison, plus rarement pour d'autres : on les appelle des « points chauds » (hot spots) et « points froids » (cold spots) de recombinaison.

Les « points chauds » présentent une plus grande fréquence de cassures double-brins que la moyenne, sûrement influencée par une structure particulière de la chromatine (Fukuda et al., 2008; Mets and Meyer, 2009). De manière générale, les DSBs sont très rares à proximité du centromère et des extrémités télomériques des chromosomes (Baudat and Nicolas, 1997; Chen et al., 2008; Mancera et al., 2008).

Récemment, Borde et al (2009) chez la levure et Buard et al (2009) chez la souris ont montré que les « hot spots » étaient aussi caractérisés par des méthylations des histones H3, démontrant ainsi que la sélection des points chauds de recombinaison est en partie gouvernée par des mécanismes épigénétiques.

Les crossing overs sont aussi soumis à des mécanismes de contrôle spécifiques permettant de prévenir d'éventuelles défaillances dans le processus de recombinaison méiotique, et ainsi assurer la poursuite de la méiose et la survie de la cellule.

Le premier est appelé « homéostasie » des crossing overs. Elle implique que le nombre total de CO par cellule est maintenu même lorsque le nombre initial de cassures double-brins est réduit (McPeck and Speed, 1995).

Un autre exemple de ce contrôle est le fait qu'au moins un crossing over soit formé par paire de chromosome, souvent appelé « CO obligatoire » (Jones and Franklin, 2006).

Ces deux mécanismes sont intimement liés au phénomène contrôlant la position des crossing-overs en elle-même : celle-ci, en effet, n'est pas aléatoire et des COs proches les uns des autres sont très rarement observés. Ce phénomène, appelé « interférence », est connu depuis longtemps (Sturtevant, 1913).

Des études chez la levure ont cependant montré que l'interférence observée entre les crossing-overs pourrait en partie être expliquée en amont par une interférence directement au niveau des cassures double brins. En effet, la présence d'un point chaud de formation de DSB inhibe de manière compétitive la présence d'autres points chauds dans les régions avoisinantes (Ohta et al., 1999; Wu and Lichten, 1995).

L'interférence ne touche pas tous les crossing-overs : en effet, ceux formés par la voie dépendante de MUS81 ne sont pas soumis à ce phénomène (De Boer et al., 2006; de los Santos et al., 2003). Bien que les deux mécanismes permettant la formation des crossing-overs coexistent dans la même cellule, la raison pour laquelle seulement un des deux types de CO est soumis au phénomène d'interférence reste inconnue.

Des études sur la levure ont montré que la mise en place de la voie dépendante à MUS81 était plus tardive que celle de MSH4/MSH5, et qu'elle permettait la résolution de jonctions aberrantes qui ne pouvaient pas l'être par la voie principale des protéines MMR (Jessop and Lichten, 2008; Oh et al., 2008).

Bien qu'il soit difficile de déterminer à quel moment l'interférence se met en place, l'hypothèse la plus probable est qu'elle se déroule lorsque le complexe MSH4/MSH5 stabilise les invasions simple brins (Shinohara et al., 2008), avant la formation complète du complexe synaptonémal (Fung et al., 2004; Zickler and Kleckner, 1998), et avant que la voie MUS81 de formation des CO ne soit active. Cela pourrait alors expliquer pourquoi les crossing-overs formés grâce au complexe MUS81 ne seraient pas concernés par l'interférence.

Cependant, la question centrale à laquelle de nombreuses études ont essayé de répondre est surtout « comment l'interférence est-elle mise en place ? ».

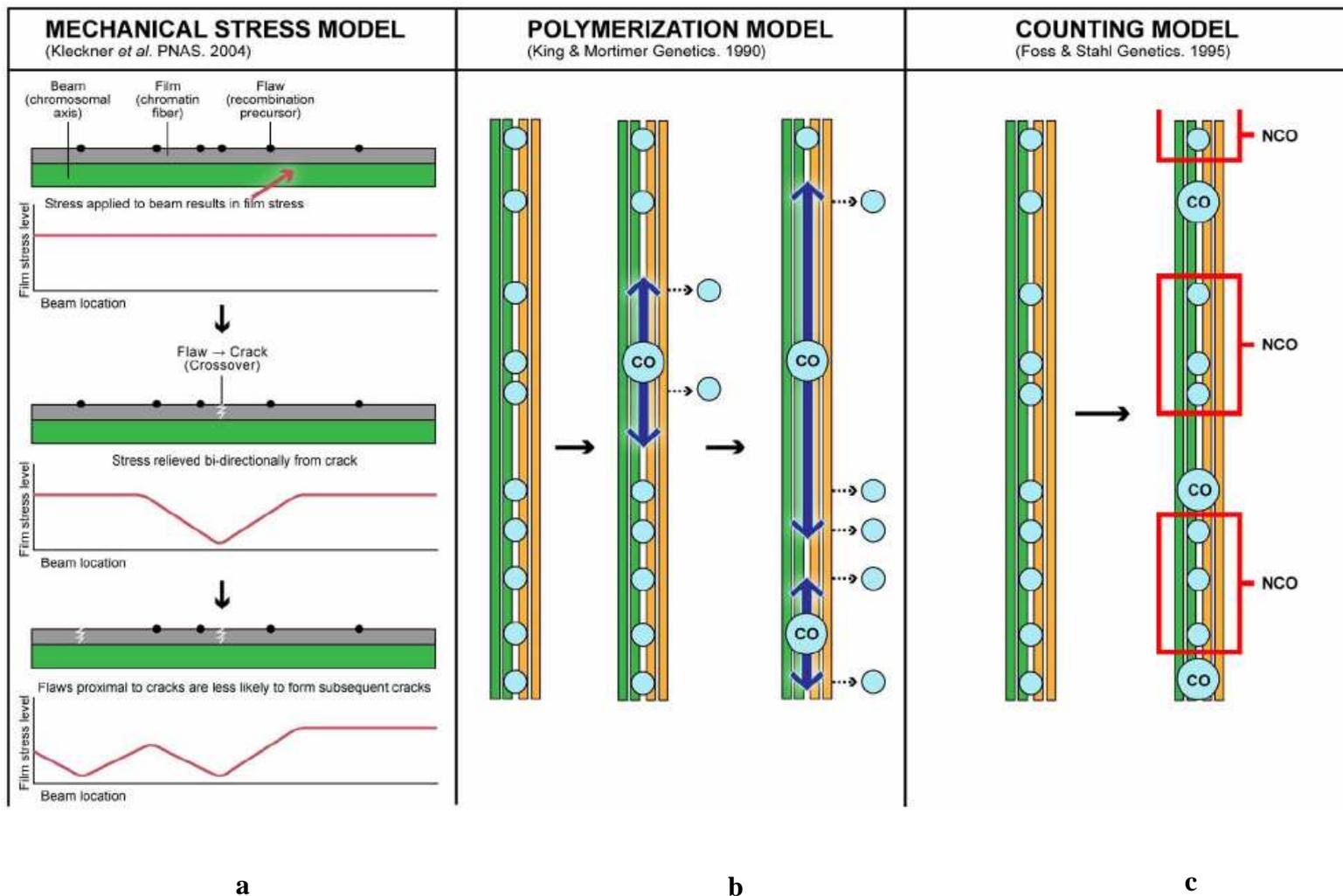


Figure I-12 : Représentation schématique des différents modèles de mise en place de l'interférence (d'après Berchowitz, 2010).

a : Modèle de stress mécanique

Le niveau de stress est représenté en ordonnée par la ligne rouge. La partie grisée correspond au chromosome, la partie verte à son axe. Les CO sont représentés comme des cassures libérant un stress (la courbe se creuse), qui se propage de chaque côté du chromosome, empêchant ainsi une autre cassure d'avoir lieu à proximité de la première.

b : Modèle de polymérisation

Les chromatides de chaque homologue sont présentées en vert et en jaune. Les petits cercles bleus représentent les précurseurs de la recombinaison. Lorsqu'un CO (grand cercle bleu) se produit, un polymère (flèches) se propage le long des chromosomes, et élimine les précurseurs de la recombinaison à proximité, empêchant la création d'un nouveau crossing over.

c : Modèle mathématique

Les événements de NCO sont ici fixés au nombre de 3 (carrés rouges). Un crossing over ne peut donc se produire que si trois réparations de DSB sans CO ont eu lieu précédemment.

Trois modèles principaux tentent d'y répondre :

- Le premier est appelé modèle de stress mécanique. Proposé par Kleckner et ses collaborateurs (2004), il repose sur le principe qu'une augmentation ou diminution de stress à un locus donné se propage dans les régions voisines à partir de ce point. Un crossing over peut donc être considéré comme un événement permettant de réduire localement un stress sur les chromosomes, qui subissent des compactions et décompactions d'ADN importantes au cours de la méiose. La libération de ce stress le long des complexes synaptonémaux pourrait alors inhiber la formation d'autres COs à proximité.

Si ce modèle permet d'expliquer différentes propriétés de l'interférence, comme la formation d'un crossing over obligatoire, il ne permet pas de comprendre pourquoi certaines espèces présentent des crossing overs non soumis à l'interférence.

- Le modèle de polymérisation part du postulat que chaque événement de recombinaison a au départ une chance égale de se produire, indépendamment des autres, et d'initier une polymérisation bidirectionnelle depuis son site d'initiation (King and Mortimer, 1990). La polymérisation des brins d'ADN empêche alors d'autres événements de recombinaison d'avoir lieu à proximité. Ce modèle permet d'expliquer pourquoi un CO obligatoire est formé et pourquoi le phénomène d'interférence est plus important près des sites d'initiation des crossing overs, et diminue ensuite. Cependant, le polymère en lui-même n'a jamais été identifié ou observé.

Il n'est pas exclu cependant que ce que l'on appelle polymérisation corresponde en fait à une modification de la structure de l'ADN, telle qu'une méthylation ou une acétylation d'une cohésine ou d'une histone.

- Le troisième modèle permettant d'expliquer l'interférence est basé sur l'idée que l'interférence est une « machine » comptant les événements de recombinaisons. L'hypothèse suggérée est que les événements de recombinaison sont tous distribués de façon aléatoire, mais qu'un CO ne peut avoir lieu ensuite que si un certain nombre d'événements à son voisinage est résolu par un NCO (noté m) (Foss et al., 1993). Le facteur m est ensuite déterminé grâce à la fraction de conversion génique issue d'un CO pour une espèce particulière, et intégré dans un modèle mathématique prédisant l'interférence. Dans ce modèle, cette dernière est liée à la carte génétique de l'individu et calculée en cM.

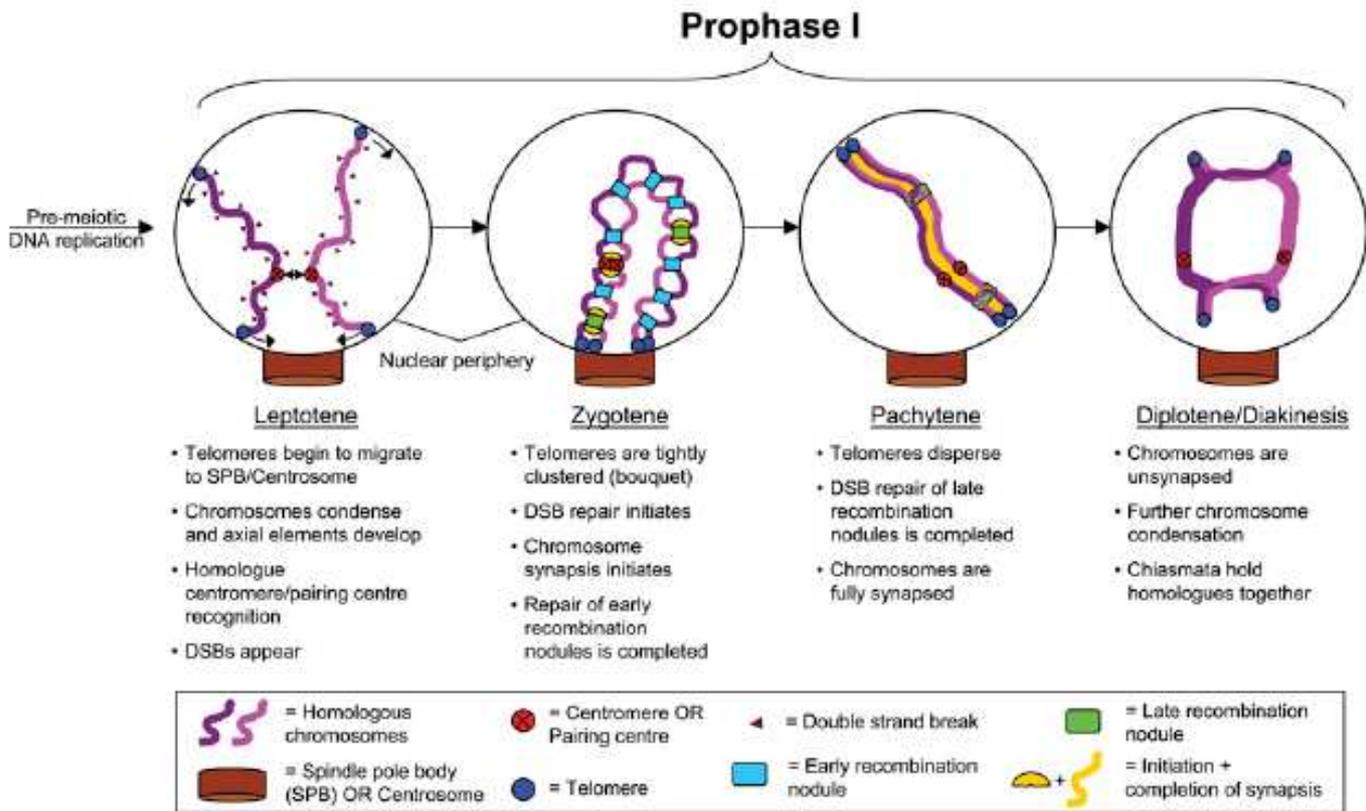


Figure I-13 : Représentation schématique des principales étapes de la prophase de première division méiotique (Jordan, 2006).

Afin d'être applicable à plusieurs espèces, le modèle mathématique suppose que la force de l'interférence varie en fonction de l'organisme concerné (Foss and Stahl, 1995). Cependant, les premières simulations n'étant pas satisfaisantes dans certaines espèces, et notamment chez l'Homme (Foss and Stahl, 1995), une version modifiée intégrant dans le modèle mathématique le nombre de CO non soumis à l'interférence (noté ν) a été mise au point. Cette nouvelle évolution a permis au modèle d'être cohérent avec des données de position des crossing overs chez *S. cerevisiae* (Stahl et al., 2004), *A. thaliana* (Copenhaver et al., 2002; Lam et al., 2005) et l'Homme (Housworth and Stahl, 2003). Cependant, utiliser les DSBs comme étant les précurseurs des CO, et donc les événements « comptés » suppose que le nombre de DSBs soit proportionnel au nombre de CO formés. Or, cela n'est pas cohérent avec le phénomène d'homéostasie, qui représente l'obstacle majeur du modèle. De plus, aucune expérimentation *in vivo* n'a testé la pertinence du modèle, et aucun mécanisme moléculaire ne permet encore de l'expliquer.

1.2.2.5 Impact du genre sur la recombinaison méiotique

Comme évoqué précédemment, la résolution des cassures double-brins semble plus rapide chez le mâle que chez la femelle (Roig et al., 2004).

De même, il a été montré qu'il existait un nombre global de crossing overs plus important et qu'ils étaient situés en position plus centrale chez la femelle (Barlow and Hulten, 1998; Cheng et al., 2009; Robles et al., 2007; Roig et al., 2005). De plus, leur nombre est plus variable : des études réalisées chez la femme ont ainsi montré un nombre de crossing over par cellule variant de 42 à 95 (entre 50 et 70 chez le mâle) (Barlow and Hulten, 1998; Lenzi et al., 2005; Lynn et al., 2002; Tease et al., 2002). Par ailleurs, Lenzi et ses collaborateurs (2005) ont mis en évidence que près de 30% des ovocytes ne possédaient pas un nombre adéquat de crossing over pour assurer le CO obligatoire par chromosome.

1.2.3 Liens entre synapsis et recombinaison

Les phénomènes d'appariement des chromosomes ont été présentés dans des chapitres indépendants pour des raisons « éditoriales », mais n'en demeurent pas moins indissociables d'un point de vue biologique (Figure I-13).

Des études chez la levure et la souris ont montré que la recherche d'homologie entre les chromosomes homologues et leur appariement était dépendante de protéines impliquées dans la recombinaison (Baudat et al., 2000; Peoples-Holst and Burgess, 2005).

C'est le cas de RAD51 et DMC1 : outre leur rôle important dans les processus de recombinaison méiotique, elles sont indispensables pour la recherche d'homologie entre les chromosomes. Associées à deux autres protéines, HOP2 et MDN1 (Enomoto et al., 2004; Petukhova et al., 2005) elles permettent d'initier la recherche d'homologie de séquence en réorganisant et capturant la chromatine du chromosome homologue au niveau des DSBs. Elles stabilisent aussi le lien formé (Higgins et al., 2004; Moens et al., 2002).

L'utilisation de mutants pour HOP2 a par ailleurs montré que cette dernière était indispensable à un appariement homologue des chromosomes (Henderson and Keeney, 2004; Leu et al., 1998).

De même, les protéines SPO11, RAD51 et DMC1 sont aussi indispensables à la formation du complexe synaptonémal (Baudat et al., 2000; Li et al., 2004; Pittman et al., 1998; Rockmill et al., 1995; Romanienko and Camerini-Otero, 2000; Yoshida et al., 1998), et plusieurs études ont par ailleurs suggéré que les nodules méiotiques tardifs pouvaient correspondre aux sites d'initiation de ce dernier (Agarwal and Roeder, 2000; Anderson et al., 1999; Henderson and Keeney, 2004). Ces observations sont étayées par le fait que des mutants pour les protéines MSH4 et MSH5 semblent aussi présenter des défauts d'appariement des chromosomes (Cohen et al., 2006).

De manière réciproque, les cohésines impliquées dans l'appariement des chromosomes, dont REC8, jouent aussi un rôle important dans le maintien des chiasmas jusqu'à la fin de la prophase de première division méiotique (Hodges et al., 2005; Klein et al., 1999).

I.3 Fin de la méiose I et déroulement de la méiose II

Après la synapse des chromosomes homologues et la mise en place d'échanges chromosomiques, la ségrégation est une autre étape clef du processus méiotique. En effet, de très nombreuses anomalies chromosomiques de nombre (ou aneuploïdies) chez l'homme sont dues à une mauvaise séparation des chromosomes lors de la méiose (Hassold et al., 2007).

Suite à la mise en place des chiasmas, le complexe synaptonémal disparaît au cours du stade diplotène.

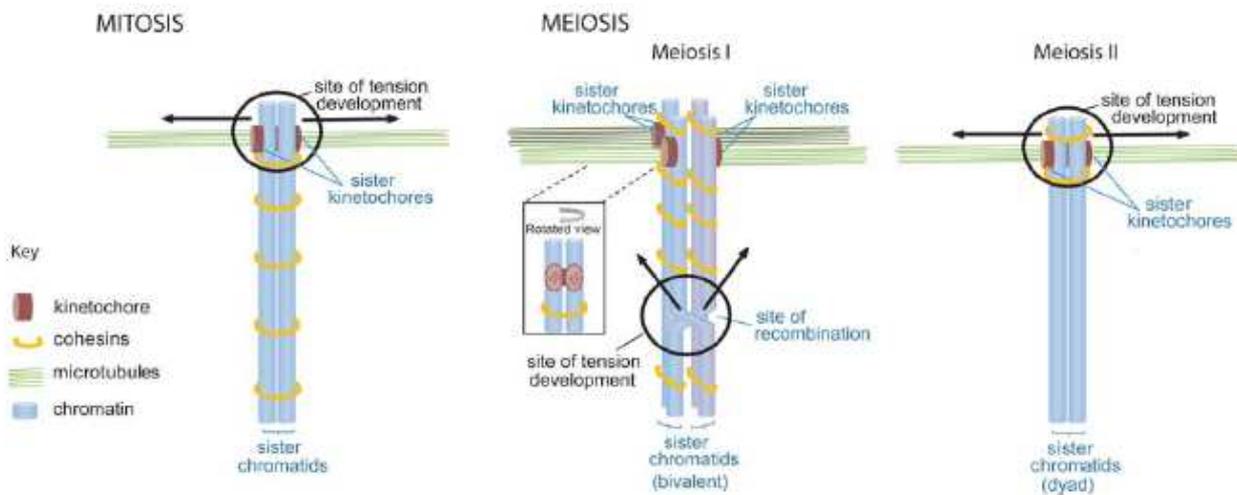


Figure I-14 : Représentation schématique de l'arrangement des kinétochores, comparaison entre mitose et méiose (Holt, 2009).

Chez les mammifères, la séparation (ou désynapsis) des chromosomes a lieu sous le contrôle de plusieurs protéines dont HSPA2 (Heat shock-related protein 2) ainsi que des kinases (Dix et al., 1996; Dix et al., 1997; Sun and Handel, 2008).

Les chromosomes se déplacent et l'enveloppe nucléaire disparaît au stade diacinèse.

Les chromosomes homologues sont alors maintenus ensemble par les crossing overs, stabilisés aux sites d'échanges grâce aux cohésines permettant de maintenir l'appariement des chromatides sœurs (Figure I-13).

En métaphase I, les chromosomes se déplacent vers le plan équatorial de la cellule et le fuseau méiotique se forme. La mise en place correcte de ce dernier, organisée par des structures spécifiques (centres d'organisation des microtubules) est une étape essentielle à la ségrégation future des chromosomes.

Grâce à des structures particulières, les kinétochores, les microtubules vont pouvoir se fixer sur les chromosomes. Situées au niveau des centromères, à l'opposé de leurs régions hétérochromatiques, ils sont constitués de trois « étages » protéiques les uns sur les autres (Brinkley and Stubblefield, 1966). La partie extérieure de cette structure tri-laminaire contient la majorité des protéines interagissant avec les microtubules (Cooke et al., 1997; Jablonski et al., 1998).

Les kinétochores des chromatides sœurs, contrairement aux cellules mitotiques et aux cellules en métaphase II, ne sont pas situés « dos à dos », mais « côte à côte », afin que les deux chromatides d'un chromosome soient attachées au même pôle par les microtubules (Figure I-14).

Les deux structures protéiques agissent alors comme une seule entité et sont toutes deux reliées au fuseau méiotique (attachement synthétique - Hauf et al., 2007; Parra et al., 2004).

Chez la levure, certaines kinases et les protéines REC 8 et MOA1 semblent jouer un rôle dans le contrôle de l'orientation des kinétochores (Watanabe, 2004; Yokobayashi and Watanabe, 2005)

Lors de l'entrée en anaphase I, les chiasmas sont résolus et la cohésion entre les bras chromosomique des homologues est levée, excepté au niveau des centromères où les protéines Shugoshin (SGO1 et SGO2) et les kinétochores protègent la cohésion des chromosomes (Gomez et al., 2007; Ishiguro and Watanabe, 2007; Watanabe, 2005).

Le clivage des cohésines, en particulier REC8, est réalisé par une endopeptidase spécifique appelée séparase (Kudo et al., 2006; Nasmyth, 2002). Afin que la séparation des chromosomes n'ait pas lieu trop précocement, l'activité de la séparase est inhibée par une protéine chaperonne (sécurine) jusqu'à la transition métaphase/anaphase, sous le contrôle de très nombreuses protéines formant le complexe « promoteur de l'anaphase » (anaphase-promoting complex/cyclosome, APC/C) (Peters, 2006) (cf. Figure I-15).

En fin d'anaphase I, les chromosomes migrent vers un des pôles de la cellule. Chaque groupe est composé de chromosomes en unique exemplaire, mais avec deux chromatides sœurs. La cellule commence à s'allonger pour préparer la division cellulaire suivante (méiose II).

En télophase I, le fuseau méiotique disparaît, chaque groupe de chromosomes est maintenant arrivé près d'un pôle. Une nouvelle membrane cellulaire se forme et deux cellules filles apparaissent.

Avant d'entamer la deuxième division méiotique ou méiose équationnelle, les cellules peuvent rester à cette étape quelques instants (intercinèse).

Cette dernière est similaire à une mitose classique, les chromatides de chaque chromosome migrant chacune dans une cellule fille. Constituée des mêmes quatre grandes étapes, elle se déroule cependant beaucoup plus rapidement.

I.4 Les différents points de contrôle méiotique

La prophase I constitue la phase la plus critique du processus méiotique. L'appariement et la synapse des chromosomes, tout comme la mise en place d'un brassage génétique par le biais des crossing overs sont autant de mécanismes cruciaux pour la formation des futures cellules sexuelles. Ces différentes étapes sont donc soumises à différents points de contrôle durant la prophase de première division méiotique.

En cas d'anomalies, ces points de contrôle peuvent stopper ou retarder le cycle cellulaire afin d'éviter la production de gamètes anormaux.

On dénombre principalement trois points de contrôle : deux situés lors de la prophase de première division méiotique, le troisième durant le stade métaphase I, au moment de la formation du fuseau méiotique.

I.4.1 Points de contrôle en prophase I

A la suite du stade pachytène de première division méiotique, toutes les cassures double-brins générées doivent être complètement résolues. Un mécanisme de contrôle spécifique permet de détecter d'éventuelles erreurs dans la réparation des cassures, et empêche alors l'entrée de la cellule en métaphase I. Bien que ce checkpoint soit relativement sensible, il semble qu'il faille une vingtaine de cassures double-brins non réparées pour amorcer le blocage de la division cellulaire (Deckbar et al., 2007).

Ce point de contrôle est régulé par les protéines kinases ATM (Ataxia Telangiectasia mutated - Barlow et al., 1998; Meyn, 1999) et ATR (AT-Rad3 related - Iliakis et al., 2003; Moens et al., 1999). Ces dernières ont très probablement pour fonction la phosphorylation de protéines formant un complexe localisé sur les régions endommagées de l'ADN (Cortez et al., 1999). Les protéines BRCA1 et BRCA2 (Breast cancer), impliquées dans plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN, sont notamment des substrats d'ATM et ATR (Welch et al., 2000).

La recombinaison étant intrinsèquement liée à l'appariement des chromosomes, les problèmes de synapsis sont aussi contrôlés par ce checkpoint. En effet, les régions qui durant le stade zygotène n'ont pas réussi à s'apparier correctement n'ont pas non plus été capables de réparer leurs cassures double-brin, et possèdent encore au stade pachytène les complexes protéiques recrutés pour la résolution des DSBs (de Vries et al., 2005; Plug et al., 1998).

Le checkpoint permet alors d'alerter la cellule sur la présence de DSB persistants sur les segments non appariés.

Les protéines BRCA1 et ATR s'accumulent alors le long du chromosome comme cela est le cas normalement sur les chromosomes X et Y chez le mâle (Moens et al., 1999; Turner et al., 2004), plutôt que de former des foci. Des études chez la souris ont par ailleurs permis de montrer que l'accumulation de ces protéines était corrélée à la présence de la forme phosphorylée de H2AX et que les chromosomes impliqués étaient totalement ou en partie génétiquement réprimés (Baarends et al., 2005; Turner et al., 2005).

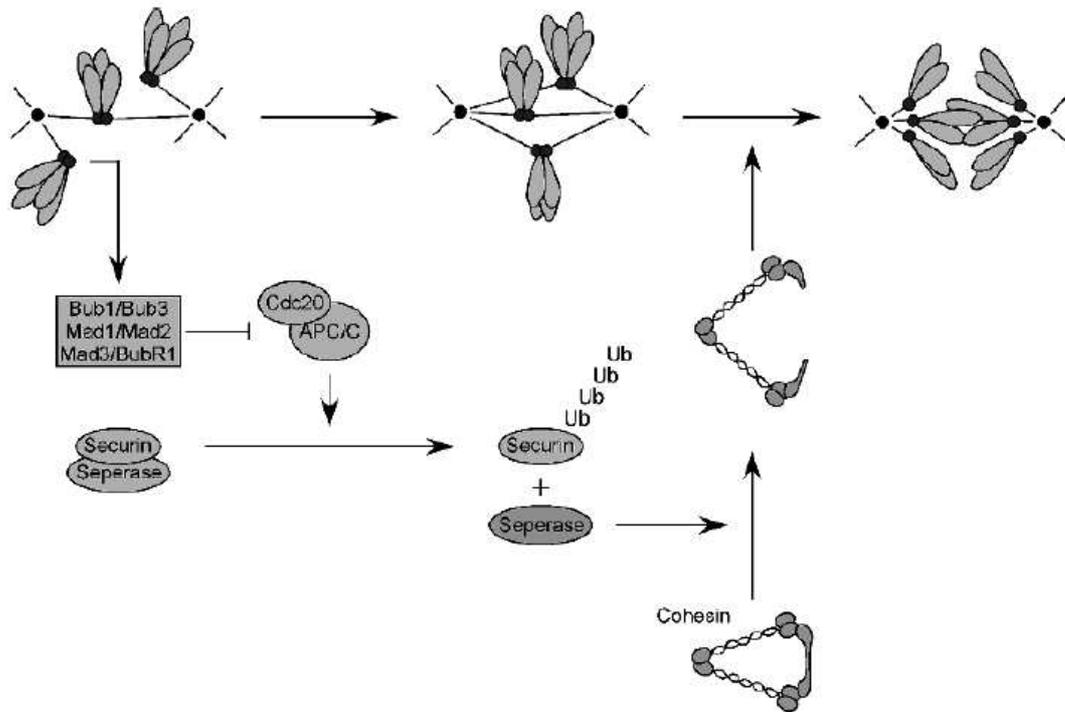


Figure I-15 : Représentation schématique du mécanisme de ségrégation des chromosomes et de son contrôle (Taylor et al., 2004).

Les kinétochores non attachés activent le point de contrôle MAD/BUD inhibant l'APC/C par le biais de CDC20.
 Quand les chromosomes sont correctement alignés, le point de contrôle est désactivé et le complexe APC/C peut permettre la polyubiquitination de la sécurine. La séparase est alors activée et clive la sous unité SCC1 des cohésines.
 L'ouverture de ces dernières permet alors aux chromosomes de ségréger.

Cependant, si la réponse du point de contrôle est dépendante de la formation de cassures double-brins, l'inactivation méiotique des régions non appariées (meiotic silencing of unsynapsed chromatin, MSUC) n'est pas liée à la présence de DSBs (Mahadevaiah et al., 2008).

Le second point de contrôle présent durant la prophase de première division méiotique empêche quant à lui l'entrée en métaphase I par apoptose des cellules ne présentant pas un nombre de chiasmas appropriés (Baker et al., 1996; Eaker et al., 2002; Edelman et al., 1996).

I.4.2 Point de contrôle du fuseau méiotique (Spindle assembly checkpoint)

Le point de contrôle du fuseau méiotique (SAC pour Spindle assembly checkpoint) est essentiel pour assurer une ségrégation correcte des chromosomes lors de l'anaphase. Grâce à de nombreuses protéines jouant le rôle de sentinelles, messenger ou effecteurs, le SAC permet d'empêcher la résolution de l'anaphase I tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement attachés au fuseau méiotique (Taylor et al., 2004).

Ce mécanisme de contrôle permet ainsi de prévenir la formation de cellules aneuploïdes (notamment des cellules disomiques) en empêchant une ségrégation incorrecte des chromosomes (Nicklas, 1997).

Deux facteurs importants régulent l'activité du SAC : l'attachement des microtubules aux kinétochores et la tension qu'ils exercent sur les chromosomes (pour revue, Malmanche et al., 2006; May and Hardwick, 2006). Dans le cas de la méiose, la tension n'est pas directement générée par les kinétochores, mais plutôt par les chiasmas présents sur les homologues.

De nombreux composants du point de contrôle méiotique sont les mêmes que ceux présents lors de la mitose, et ont été caractérisés par ce biais (pour revue, May et Hardwick, 2006).

Les principales protéines impliquées font cependant partie de deux familles seulement, les BUB (budding uninhibited by bezimidazole) et les MAD (mitotic arrest deficient) (pour revue, Decordier et al., 2008; Vogt et al., 2008) (Figure I-15).

Ces protéines sont recrutées sur les kinétochores libres, c'est-à-dire non liés au fuseau méiotique, et permettent la synthèse d'un signal « stop » (ou « wait ») (e.g. Brunet et al., 2003) inhibiteur du complexe APC/C.

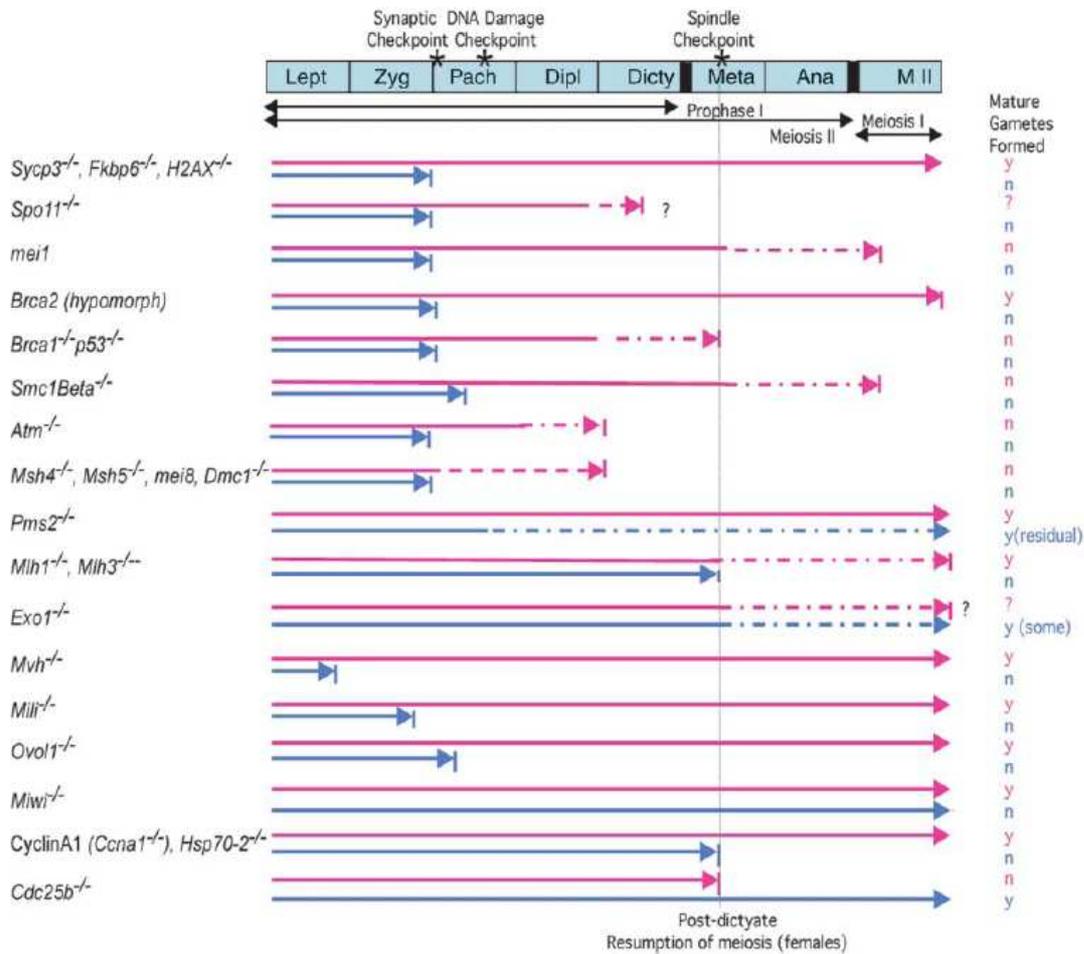


Figure I-16 : Représentation schématique de différents phénotypes mutants de souris mâles et femelles : la méiose femelle est plus permissive (Morelli et Cohen, 2006).

I.4.3 Les points de contrôle méiotique sont plus permissifs chez la femelle

Contrairement à celui du mâle, le processus méiotique femelle est particulièrement permissif aux erreurs.

En effet, plusieurs études ont montré que des anomalies durant la spermatogénèse amenaient inévitablement à l'apoptose de la cellule, alors que des ovocytes parvenaient à maturité suite à des problèmes lors de l'appariement ou de la ségrégation des chromosomes (Ashley et al., 2004; Cohen et al., 2006; Cohen and Pollard, 2001; Hunt and Hassold, 2002; Pacchierotti and Ranaldi, 2007) (Figure I-16).

Des études sur des souris mutantes ont par exemple permis de montrer que si les mâles mutants pour la protéine SCP3 étaient stériles, (arrêt de la spermatogénèse au stade zygotène) les femelles au contraire ne l'étaient pas, mais présentaient quand même une baisse de leur fertilité (Yuan et al., 2002).

De même, si la présence de la protéine mutée SMC1 entraîne une infertilité à la fois chez les mâles et les femelles, certains ovocytes peuvent achever leur première division méiotique, alors que les spermatocytes sont éliminés avant la fin de la prophase I (Revenkova et al., 2004; Revenkova and Jessberger, 2005).

De la même manière, le checkpoint au niveau des crossing over est plus permissif chez les femelles. Par exemple, si l'absence effective de crossing overs due à des mutations dans les protéines MLH1 et MLH3 chez la souris entraîne une apoptose précoce des cellules germinales masculines, certains ovocytes ne présentant pas de chiasmas peuvent continuer leur développement normalement jusqu'à la fin de la méiose I (Eaker et al., 2002; Edelmann et al., 1996; Lipkin et al., 2002).

De la même manière, les mâles mutants pour le gène *Pms2*, un partenaire de MLH1, sont stériles suite à l'arrêt de la méiose en prophase I. Au contraire, les femelles porteuses de la même mutation sont fertiles (Baker et al., 1995).

Cette différence de stringence des points de contrôle entre mâles et femelles a aussi été démontrée chez l'homme (Lynn et al., 2004) et le porc (Mikawa et al., 1999).

Bien que le taux d'aneuploïdie des ovocytes dû à des non-disjonctions chromosomiques soit très élevé chez la femme (de l'ordre de 15 à 20% - Hassold and Hunt, 2001; Pacchierotti and Ranaldi, 2007; Vialard and Pellestor, 2008), il n'a pas encore été prouvé qu'il existait un effet du genre sur l'efficacité du point de contrôle du fuseau méiotique au moment de la ségrégation des chromosomes (Pacchierotti and Ranaldi, 2007).

Cependant, la mise en évidence d'un mécanisme spécifique à la femelle, appelée séparation prématurée des chromatides sœurs (SPCS - Angell, 1991; Angell et al., 1994), pourrait expliquer le fort taux d'aneuploïdies observé chez la femme.

Bien que peu d'études aient été réalisées dans l'espèce porcine, il semble y avoir aussi un effet important du genre sur l'efficacité des points de contrôle méiotique. En effet, si très peu de gamètes aneuploïdes sont identifiés chez des verrats normaux (de l'ordre de 0.05 à 0.07 % - Massip et al., 2009), ce taux est relativement élevé chez la femelle et équivalent aux données trouvées chez la Femme (entre 12.5% et 26 % - Lechniak et al., 2007; Sosnowski et al., 2003).

On peut donc penser que chez le porc, la méiose femelle est également plus susceptible aux erreurs que la méiose mâle.

I.5 Méiose mâle et femelle : si proches et pourtant si différentes

Bien que mettant en œuvre intrinsèquement les mêmes mécanismes, les processus méiotiques mâle et femelle sont différents, tant dans la façon dont les gamètes sont produits que dans la manière dont la gamétogénèse est régulée.

Après une brève description du processus méiotique pour les deux genres, les principales différences observées pour les méioses mâle et femelle seront détaillées.

I.5.1 La spermatogénèse

La spermatogénèse est définie comme le processus par lequel les cellules germinales se développent, se différencient (étape comprenant la méiose) et deviennent des spermatozoïdes matures (spermiogénèse) grâce aux cellules de Sertoli (Hermo et al., 2010; Russell et al., 1990) (Figure I-17).

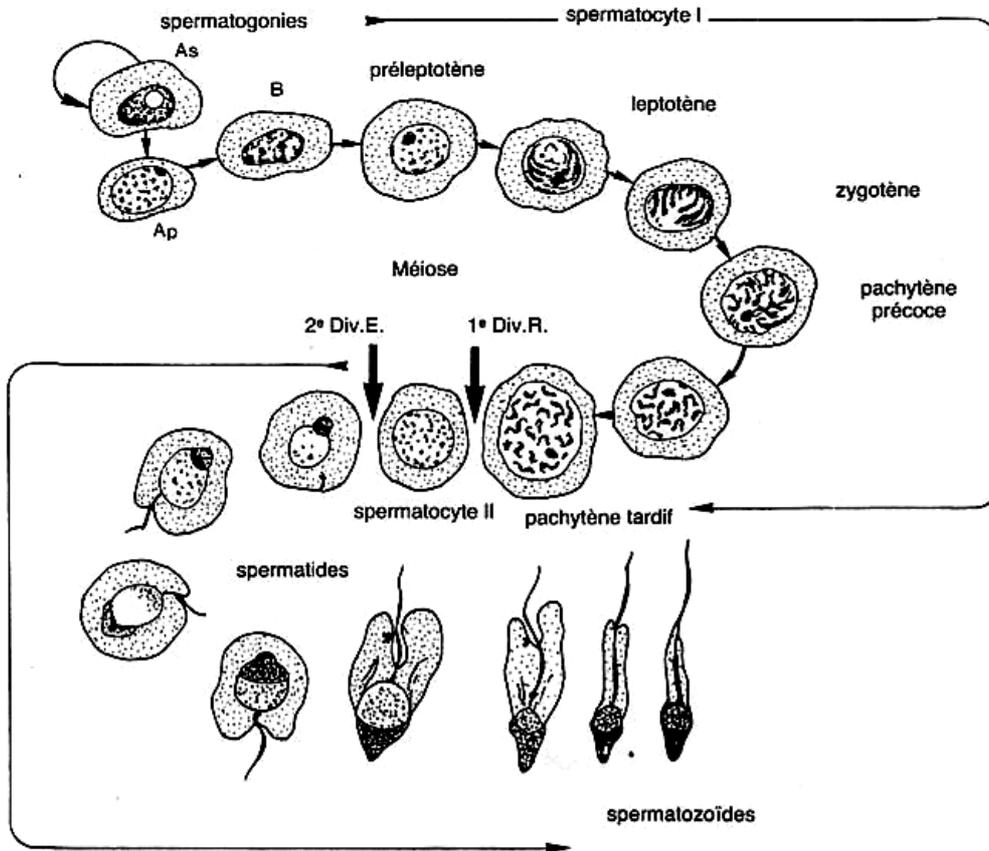


Figure I-17 : Représentation de la spermatogénèse (d’après Dadoune et Démoulin, 1991).

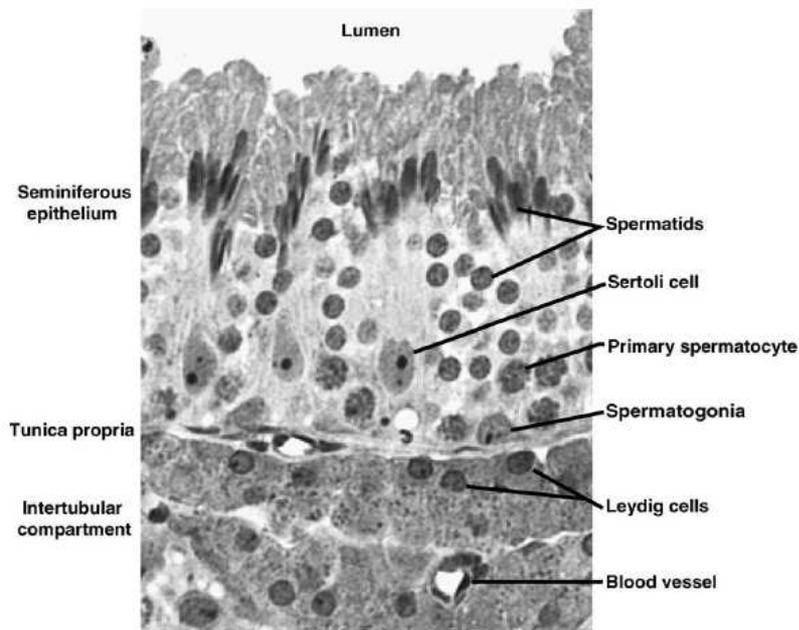


Figure I-18 : Coupe d’un tube séminifère de verrat adulte : organisation des cellules germinales (França et al., 2005).

Dans le tube séminifère, les différentes cellules sont organisées de manière concentrique : les cellules primordiales sont situées à la base du tube, les autres occupant plusieurs « niveaux » successifs se rapprochant de la lumière du tube (França and Russell, 1998; Sharpe, 1994). On parle ainsi de la spermatogénèse comme d'un processus « centripète » (Figure I-18).

La spermatogonie, cellule diploïde, est la cellule gamétique primordiale à l'origine de la formation des cellules germinales. Le stock de spermatogonies est renouvelé sans cesse par de nombreuses mitoses, ce qui fait de la spermatogénèse un processus continu.

Au moment de la puberté, des spermatogonies donnent chacune naissance à deux cellules intermédiaires, les spermatocytes I. Ce sont ces dernières qui, après réplication de leur ADN, entrent en méiose.

A la fin de la méiose I, les deux cellules haploïdes créées sont appelées spermatocytes II. Ces cellules entrent alors rapidement en méiose II et créent les spermatides, cellules haploïdes à une seule chromatide.

Les spermatides débutent alors la spermiogénèse, processus complexe de maturation où elles vont acquérir les outils nécessaires afin de devenir des spermatozoïdes fonctionnels capables de féconder un ovule.

Le temps nécessaire à la formation d'un spermatozoïde à partir d'une spermatogonie, soit un cycle, est variable selon les espèces. De même, la durée totale de la spermatogénèse, correspondant à environ 4 cycles et demi, varie entre 30 et 75 jours suivant les espèces (França and Russell, 1998; Russell et al., 1990; Sharpe, 1994) (Tableau I-1).

Ainsi, entre 4 et 40 millions de spermatozoïdes sont produits par jour et par gramme de tissu en fonction des espèces (Tableau I-1), ce qui représente, par exemple, une production journalière de 150 millions de gamètes pour un homme (Cheng and Mruk, 2002; Franca et al., 2005).

I.5.2 L'ovogénèse

Contrairement au mâle, la formation des gamètes femelles commence dès la vie intra-utérine. Les cellules primordiales ou ovogonies débutent de nombreuses divisions mitotiques dans l'embryon vers la 8^{ème} semaine de grossesse chez la femme (Gondos et al., 1971; Oktem and Oktay, 2008). A la 20^{ème} semaine, le stock d'ovogonies chez les fœtus atteint environ sept millions de cellules.

Espèce	pré méiotique(%)	méiotique(%)	post méiotique(%)	durée d'un cycle (jours)	durée totale de la spermatogénèse (jours)	nb de spermatozoïdes produits /jour / gramme de testicule (millions)
Taureau	60	12,8	27,2	14	61	11-13
Bison	64,8	9,2	26	9	39	
Chèvre	49,1	10,7	40,2	11	48	30
Porc	28,3	11,7	60	9	39	24
	31,4	12,1	56,5	9	40	27
Etalon	35	15,8	49,2	12	55	16-21
Ane	33	19,3	47,7	11	47	42
Lapin	48,4	11	40,6	11	49	25
Chien	37,4	11,5	51,1	14	61	
Chat	45,5	17,6	36,9	10	47	16
Rat	23,7	5,7	70,6	13	58	17-24
Souris	21,8	10,5	67,7	9	39	47
Hamster	25,8	7,5	66,7	9	39	
Homme	51,8	6,8	41,5	16	72	4-4,5

Tableau I-1 : Comparaison par espèce de la durée des étapes pré méiotiques, méiotiques et post méiotiques de la spermatogénèse, de sa durée totale et du nombre de spermatozoïdes produits (d'après França et al., 2005). Les deux valeurs chez le porc correspondent aux moyennes observées pour différents types génétiques.

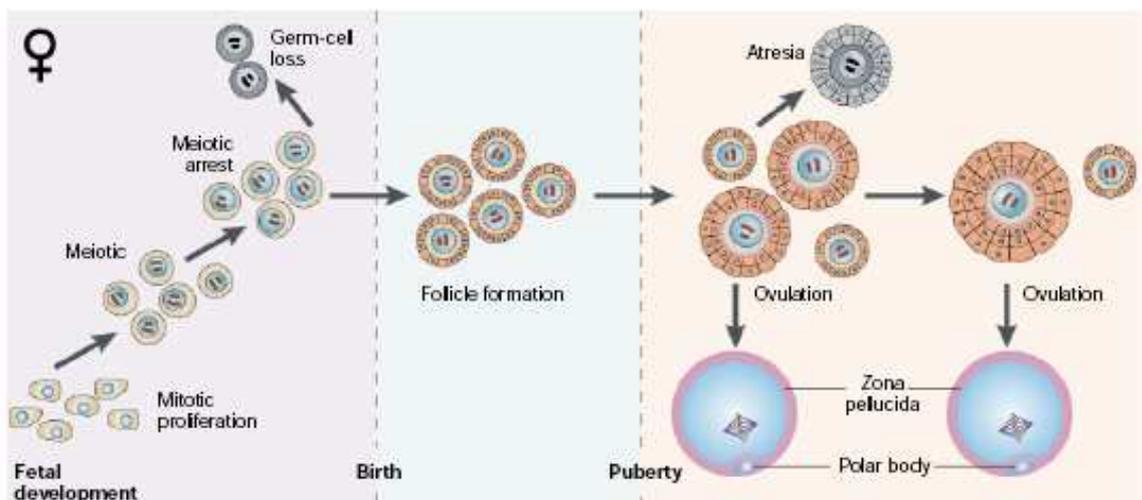


Figure I-19 : Représentation schématique de l'ovogénèse (Hassold and Hunt, 2001).

Les divisions mitotiques diminuent alors et s'arrêtent complètement à la 28^{ème} semaine de grossesse. Durant cette période de temps, de très nombreuses ovogonies sont éliminées (atrésie), et les autres commencent leur entrée en méiose (Hirshfield, 1991). Vers la 26^{ème} semaine de grossesse, le maximum de cellules au stade pachytène est atteint chez le fœtus (Motta et al., 1997). Le processus méiotique est ensuite stoppé au stade diplotène (diapose), et ne reprendra qu'au moment de la puberté.

A la naissance, le pool de cellules gamétiques d'une fillette est d'environ 1 million, seulement 300 000 à 400 000 à l'adolescence (Oktem and Oktay, 2008).

Seuls quelques ovocytes I par cycles menstruels poursuivront ensuite leur méiose. En règle générale, un seul d'entre eux terminera la méiose I et débutera la méiose II, avant d'être bloqué une nouvelle fois au stade métaphase II.

Contrairement au mâle, la division cellulaire de méiose I n'induit pas la formation de deux cellules identiques : au contraire, l'une (ovocyte II) contient la majorité du cytoplasme et des organites et l'autre, beaucoup plus petite, est appelée globule polaire (Handel and Eppig, 1998).

A ce stade, l'ovocyte est expulsé dans les trompes de Fallope, et l'ovule ne terminera sa seconde division méiotique que s'il est fécondé par un spermatozoïde. On aura alors émission d'un second globule polaire.

Chez la femme, seuls 300 à 400 ovocytes seront effectivement libérés durant sa vie, soit moins d'1% des millions de cellules germinales présentes au départ dans le fœtus (Oktem and Oktay, 2008) (Figure I-19).

Chez la truie, les cellules primordiales sont aussi présentes très tôt chez les fœtus, dès la troisième semaine de gestation. Au nombre de 5000 à ce stade, elles atteignent le nombre d' 1 million lors de leur entrée en méiose, vers la 7^{ème} semaine *post coitum*. La totalité des ovocytes I sont quant à eux en diapause trois semaines avant la mise-bas (13^{ème} semaine de gestation). L'atrésie des cellules est aussi très importante chez cette espèce, et le stock d'ovocytes est d'environ 500 000 à la naissance des animaux (Bielanska-Osuchowska, 2006; Black and Erickson, 1968).

I.5.3 Considérations méiotiques spécifiques à chaque sexe

Les processus méiotiques mâle et femelle étant différents, certains problèmes sont rencontrés par un seul des deux sexes :

Chez les mammifères mâles, les chromosomes X et Y ne s'apparient que par une petite région d'homologie, connue sous le nom de région pseudoautosomale. Les événements de recombinaison entre ces chromosomes ne peuvent avoir lieu que dans cette région.

Dès le stade pachytène, la paire formée par les chromosomes X et Y, appelée « vésicule sexuelle » (XY body en anglais), est génétiquement réprimée. La protéine γ H2AX est ainsi fortement accumulée sur ces régions chromosomiques (pour revue, Handel, 2004). La formation de la vésicule sexuelle est donc un élément important permettant la progression de la cellule mâle en méiose. En effet, la présence d'une mutation de H2AX induit des problèmes d'appariements des chromosomes au stade pachytène, l'absence de formation de la vésicule sexuelle et la stérilité des porteurs (Celeste et al., 2002).

Les ovocytes, notamment chez la femme, doivent quant à eux rester en diapause pendant de très nombreuses années. Se pose alors la question de l'effet de l'âge sur la qualité des cellules germinales. En effet, de nombreuses études ont montré l'existence d'un effet « âge maternel » sur la fertilité : un accroissement des problèmes de cohésion et de ségrégation des chromosomes notamment est positivement corrélé à l'âge des individus (Liu and Keefe, 2002; Pellestor, 2004; Prieto et al., 2004; Yin et al., 1998).

Cependant, il a été suggéré que ces anomalies de cohésion ou de ségrégation seraient dues à des dommages de l'ADN ou des chromosomes au cours du temps, plus qu'à un réel effet de l'âge (Liu and Keefe, 2004).

Des facteurs environnementaux, comme l'exposition à des toxines, peuvent ainsi expliquer une partie des dommages causés (Hunt et al., 2003; Yin et al., 1998).

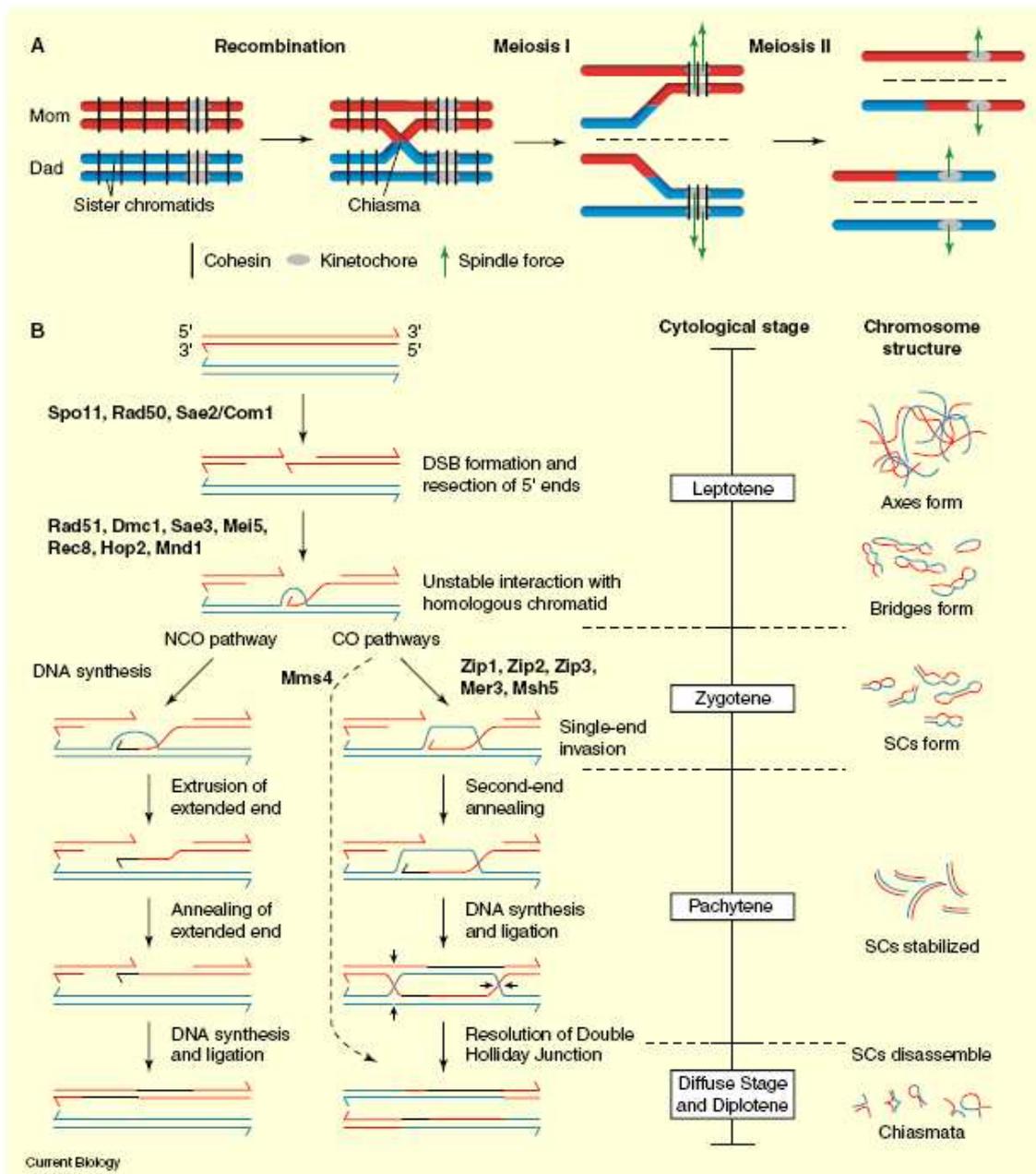


Figure I-20 : Représentation schématique des événements majeurs de la méiose (Hochwagen et Amon, 2006).

En résumé (Figure I-20)

La méiose permet la formation de cellules germinales haploïdes, grâce à deux divisions cellulaires successives.

Durant la prophase de première division méiotique, des événements « clefs » se produisent :

- l'appariement et la synapsis des chromosomes homologues, grâce au complexe synaptonémal associé aux cohésines,*
- la recombinaison méiotique permettant le brassage de l'information génétique. Grâce aux protéines SPO11 et MMR, les crossing overs induisent la formation des chiasmats permettant les échanges chromosomiques homologues et le maintien de l'appariement des chromosomes.*

Le bon déroulement de la méiose est contrôlé par des mécanismes (checkpoints) plus ou moins stringents selon le genre.

Des points de contrôle plus ou moins stricts selon le genre permettent de coordonner les étapes cruciales du processus méiotique.

Chez le mâle comme chez la femelle, la méiose fait partie intégrante de la gamétogénèse.

La spermatogénèse est un processus continu dès la puberté et des millions de spermatozoïdes sont créés. Au contraire, l'ovogénèse débute dès la vie embryonnaire et subit plusieurs arrêts avant la production effective d'un ovule. Sur les millions de cellules primordiales, seules quelques unes arriveront à compléter les différentes phases de la méiose.

II. Deuxième partie - Les anomalies chromosomiques et leurs conséquences sur la reproduction

Sur la totalité des couples cherchant à concevoir, 15 % sont touchés par des problèmes de fertilité, dont la moitié environ seraient d'origine masculine (de Kretser, 1997; Lipshultz and Howards, 1997). Pour 15 % des hommes et 10% des femmes, cette infertilité s'explique par des anomalies génétiques (remaniements chromosomiques constitutionnels, mutations géniques...).

Les anomalies chromosomiques constitutionnelles expliquent à elles seules environ 5 % des infertilités chez le mâle, voire 15 % pour des hommes azoospermiques (Ferlin et al., 2006).

On distingue les anomalies dites « de nombre », impliquant des chromosomes surnuméraires ou manquants, et les anomalies « de structure », où le nombre de chromosome est normal mais où des remaniements chromosomiques ont lieu.

Les anomalies chromosomiques « acquises » apparaissent *de novo* dans une population cellulaire et peuvent être responsables de l'apparition d'un cancer chez le porteur. Elles n'ont cependant pas d'effet sur la reproduction et ne seront donc pas évoquées dans ce chapitre.

II.1 Les anomalies chromosomiques de nombre

Ces anomalies, appelées aussi aneuploïdies, concernent à fois les chromosomes sexuels et les autosomes.

II.1.1 Anomalies impliquant les chromosomes sexuels

L'aneuploïdie des chromosomes sexuels la plus fréquente chez l'homme est la constitution chromosomique (47, XXY), responsable du syndrome de Klinefelter (Robinson et al., 1990), avec une prévalence d'environ 1 ou 2 pour 1000 naissances (Bojesen et al., 2003; Morris et al., 2008). Les porteurs présentent souvent une atrophie testiculaire associée à une infertilité sévère. D'autres anomalies beaucoup plus rares mais causant aussi une infertilité ont été décrites, telles que des mâles (47, XYY), (48, XXYY) ou (48, XXXY) (Martin, 2008; Visoosak and Graham, 2006).

Le syndrome de Turner (45, XO) est l'anomalie des chromosomes sexuels la plus fréquente chez la femme, avec environ 50 cas sur 100 000 naissances. Les femmes atteintes de ce syndrome présentent de graves troubles de la reproduction (Hjerrild et al., 2008). La présence d'un chromosome X surnuméraire (47, XXX) chez des patientes est aussi bien documentée. Bien qu'il n'y ai pas de signes phénotypiques évidents de cette anomalie, une étude récente suggère qu'elle peut être responsable de ménopause précoce (Tartaglia et al., 2010).

Chez le porc, très peu de cas d'anomalies concernant les chromosomes sexuels ont été décrits dans la littérature (pour revue, Villagomez et al., 2009). Quelques cas d'individus à caryotype (39, XXY) ont été identifiés (Breeuwsma, 1968; Hancock and Daker, 1981; Makinen et al., 1998), et une étude fait état de la présence d'un caryotype (37, XO) chez quatre truies (Nes, 1969). Récemment, un verrat présentant une anomalie en mosaïque des chromosomes sexuels (38, XY/39, XXY) a été détecté dans le cadre du programme de contrôle chromosomique mis en place dans notre laboratoire. Des travaux ont été réalisés dans le but d'évaluer la manière dont cette anomalie pouvait affecter la fertilité du porteur (Pinton et al., 2010).

Néanmoins, les anomalies des chromosomes sexuels les plus fréquemment décrites chez le porc sont des chimérismes/mosaïcismes (XX/XY ou XY/XXY) (Ducos et al., 2008). Un cas atypique de mosaïcisme X/XY/XYY a aussi été publié (Quilter et al., 2003).

II.1.2 Anomalies impliquant les autosomes

Avec un cas sur 700 naissances, le syndrome de Down (ou trisomie 21) est l'anomalie de nombre la plus fréquente dans l'espèce humaine. Les femmes, bien que présentant une fertilité réduite, (Hojager et al., 1978) peuvent concevoir. En revanche, les hommes porteurs d'une trisomie 21 sont dans la majorité des cas infertiles (Pradhan et al., 2006).

D'autres trisomies ont aussi été documentées, telles que des trisomies des chromosomes 18 et 13. Cependant, les anomalies de développement sévères engendrées par ces chromosomes surnuméraires sont la cause de décès précoces (avant la première année de l'enfant - Lin et al., 2006).

Chez le porc, très peu de cas sont documentés. Les chromosomes les plus sujets à une trisomie (généralement en mosaïque) dans cette espèce sont les chromosomes 14 et 18 (Gustavsson, 1990).

II.1.3 Une gamétogénèse perturbée

Les aneuploïdies induisent généralement d'importantes perturbations de la gamétogénèse.

Chez les mâles à caryotype (47, XXY), les cellules germinales sont en règle général perdues petit à petit au cours du développement testiculaire (Ferguson-Smith, 1959; Lue et al., 2001) mais des études ont montré que quelques rares tubes séminifères pouvaient encore produire des spermatozoïdes (Lanfranco et al., 2004; Lue et al., 2001).

Ces cellules spermatiques proviennent de spermatogonies au contenu chromosomique normal, formées après perte d'un chromosome X au cours des nombreuses mitoses subies (Hall et al., 2006). Quelques rares spermatocytes présentant deux chromosomes X ont pu être observés, mais ces cellules sont précocement éliminées au cours de la spermatogénèse (Gonsalves et al., 2005).

Chez les femmes à caryotype (45, XO), la fonction ovarienne est perdue, les tissus ovariens ne produisent plus de gamètes. Il semble que cela soit dû à un arrêt très précoce de l'ovogénèse, juste après l'entrée en méiose (Speed, 1986).

Cependant, quelques rares cas de femmes atteintes du syndrome de Turner ont pu mener à bien une grossesse, très probablement parce qu'elles présentaient l'anomalie en mosaïque (45, XO/46, XX - Hall et al., 2006).

Chez les porteurs de trisomie 21, une réduction de la taille des testicules chez des hommes porteurs a pu être documentée, la principale cause avancée expliquant une hypofertilité étant une diminution de la production spermatique (Pradhan et al., 2006). Une étude a en effet montré un arrêt de la spermatogénèse en prophase de première division méiotique, due à un appariement probable du chromosome 21 excédentaire avec le bivalent XY (Johannisson et al., 1983).

Les anomalies de nombre ne sont pas les seules à avoir un fort impact sur la fertilité. Les anomalies de structure expliquent elles aussi une partie des problèmes reproductifs chez l'Homme et le porc.

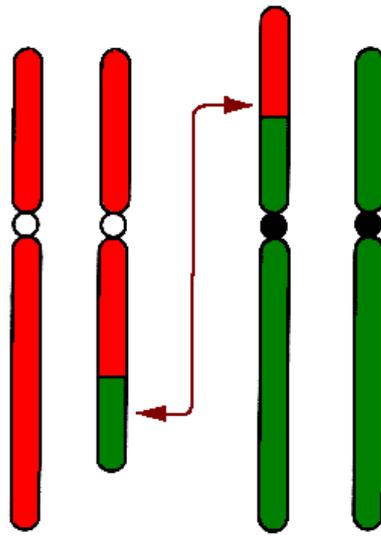


Figure I-21: Représentation schématique d'une translocation réciproque (d'après Berger, 1998).

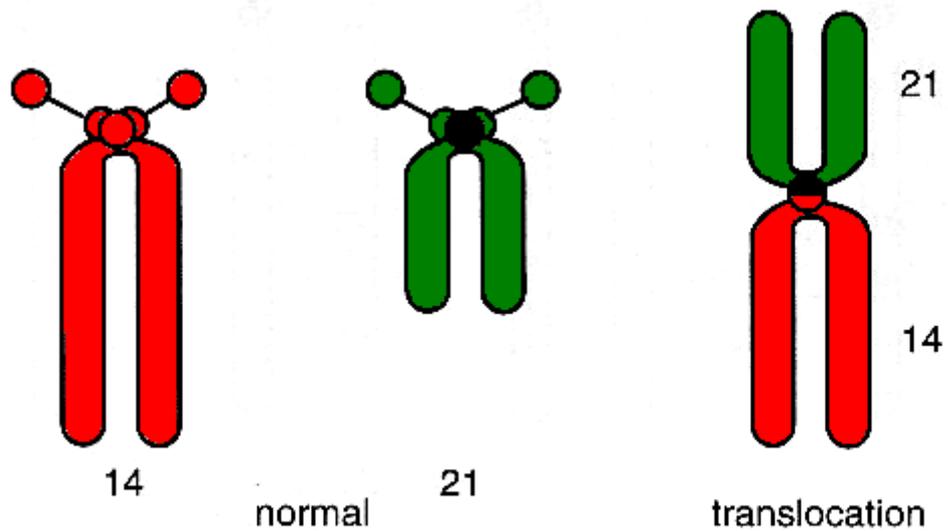


Figure I-22 : Représentation schématique d'une translocation Robertsonienne impliquant les chromosomes 14 et 21 (d'après Berger, 1998).

II.2 Les anomalies chromosomiques de structure

Comme les anomalies de nombre, les anomalies de structure peuvent aussi bien concerner les autosomes que les chromosomes sexuels. Certaines anomalies sont dites « déséquilibrés » car elles induisent la perte ou le gain de matériel chromosomique. C'est le cas des duplications et des délétions. Des microdélétions du chromosome Y sont par exemple une des plus grande cause d'infertilité masculine : elles sont retrouvées chez 10 à 15 % des hommes azoospermiques et dans 5 à 10 % des patients oligospermiques (Dohle et al., 2002; Foresta et al., 2001). Ces microdélétions se produisent préférentiellement sur le bras q du chromosome, dans une région appelée AZF (Azoospermia Factor region) contenant des gènes importants pour le développement du spermatozoïde (pour revue, O'Flynn O'Brien et al., 2010).

Nous nous intéresserons plus spécifiquement aux réarrangements « équilibrés » c'est-à-dire n'induisant *a priori* pas de perte ou de gain de matériel chromosomiques. Des études récentes utilisant des techniques d'amplification du génome entier (CGH array - cf. Annexe II) ont en effet montré que certaines de ces anomalies entraînaient l'apparition de microdélétions aux régions des points de cassure, responsables d'anomalies du développement. Des cas ont été documentés pour des translocations (par exemple Buysse et al., 2008; Haldeman-Englert et al., 2009) et des inversions (e.g. Brown et al., 2009; Jiang et al., 2008).

Ces cas restants rares, nous parlerons dans la suite de ce manuscrit d'anomalies chromosomiques de structure « équilibrées ». Dans un premier temps, les translocations réciproques et robertsoniennes seront évoquées. Les inversions, qui sont les réarrangements étudiés dans mes travaux de thèse, seront présentées de façon plus détaillée dans le chapitre suivant.

II.2.1 Les translocations réciproques

Les translocations réciproques résultent d'échanges de matériel chromosomique entre deux chromosomes non homologues (Figure I-21).

Chez l'Homme, près de 3000 translocations « réciproques » ont été identifiées, parmi lesquelles une seule est récurrente (translocation impliquant les chromosomes 11 et 22) (Cohen et al., 2001). Leur prévalence estimée varie entre 1/673 et 1/1000 (Kaiser-Rogers and Rao, 1999).

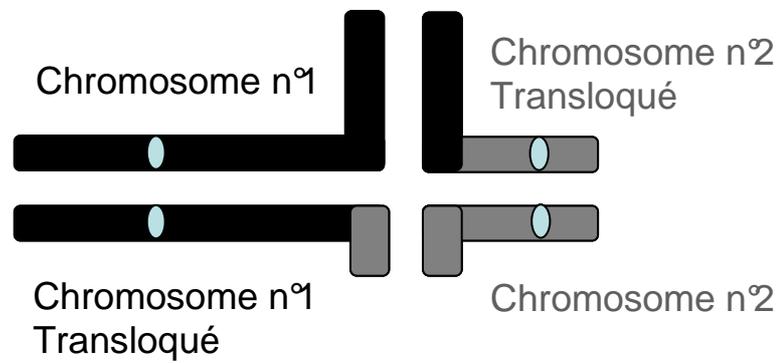


Figure I-23 : Représentation schématique d'un quadrivalent.

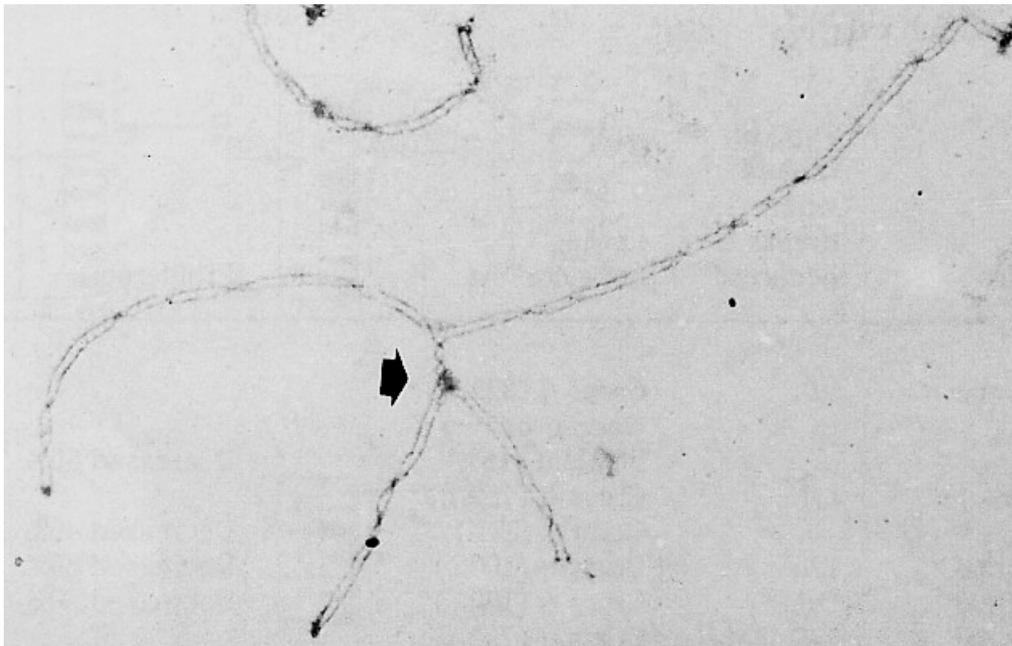


Figure I-24 : Image en microscopie électronique d'un quadrivalent dans un spermatocyte de porc porteur d'une translocation réciproque (1;6) (d'après Switonski and Stranzinger, 1998).

Chez le porc, plus d'une centaine de translocations réciproques équilibrées ont été identifiées à ce jour, et un grand nombre de races sont concernées. Dans les populations porcines françaises, la prévalence de ces anomalies est globalement de 4/1000 (Ducos et al., 2007).

II.2.2 Les translocations robertsoniennes

Ces translocations, aussi appelées fusions centriques, résultent de la fusion de deux chromosomes acrocentriques par leur centromère, conduisant à la formation d'un chromosome métacentrique (Figure I-22).

Chez L'Homme, ces anomalies sont, avec les translocations réciproques, les remaniements les plus communs avec une fréquence de 0.8/1000 (De Braekeleer and Dao, 1991). Elles concernent préférentiellement les chromosomes 13 et 14 ainsi que les chromosomes 14 et 21.

Ce type de remaniement est par contre peu fréquent dans l'espèce porcine puisqu'à ce jour moins d'une dizaine de cas ont fait l'objet de publication. Il s'agit notamment des translocations impliquant les chromosomes 13 et 17 et 16 et 17 (Astachova et al., 1991; Miyake et al., 1977; Pinton, 2004; Pinton et al., 2009; Shan et al., 1994) .

II.2.3 Conséquences des translocations sur la méiose

D'un point de vue clinique, les porteurs de remaniements génétiquement équilibrés, quels qu'ils soient, présentent souvent un développement normal.

Cependant les translocations, quel que soit leur type, peuvent perturber le processus normal de méiose, et ainsi être responsables de troubles de la gamétogénèse. Elles peuvent aussi être à l'origine d'une production de gamètes génétiquement déséquilibrés, c'est-à-dire présentant des duplications et des délétions de chromosomes ou fragments chromosomiques.

Ce type de gamètes est à l'origine de la production d'individus (embryons, fœtus) génétiquement déséquilibrés non viables ou présentant des anomalies de développement.

II.2.3.1 Les troubles de la gamétogénèse

En présence d'une translocation réciproque hétérozygote, les chromosomes normaux et remaniés s'associent en prophase de première division méiotique grâce au complexe synaptonemal pour former une structure complexe appelée « quadrivalent » (Figure I-23 et I-24) ou « trivalent » (Figure I-25) pour les translocations robertsoniennes.

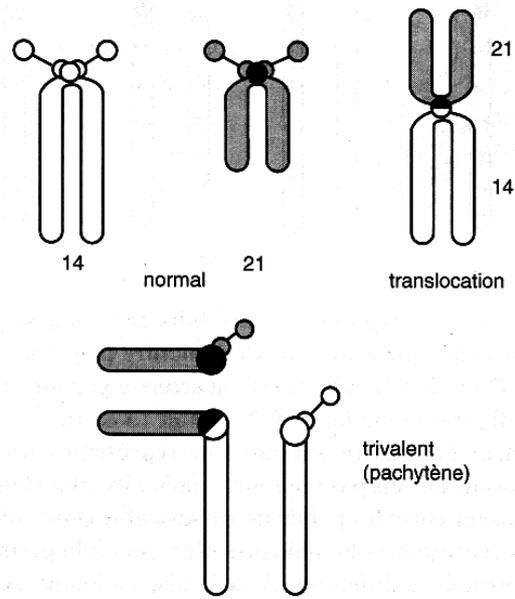


Figure I-25 : Représentation schématique d'un trivalent dans le cadre d'une translocation robertsonienne (d'après Berger, 1998).

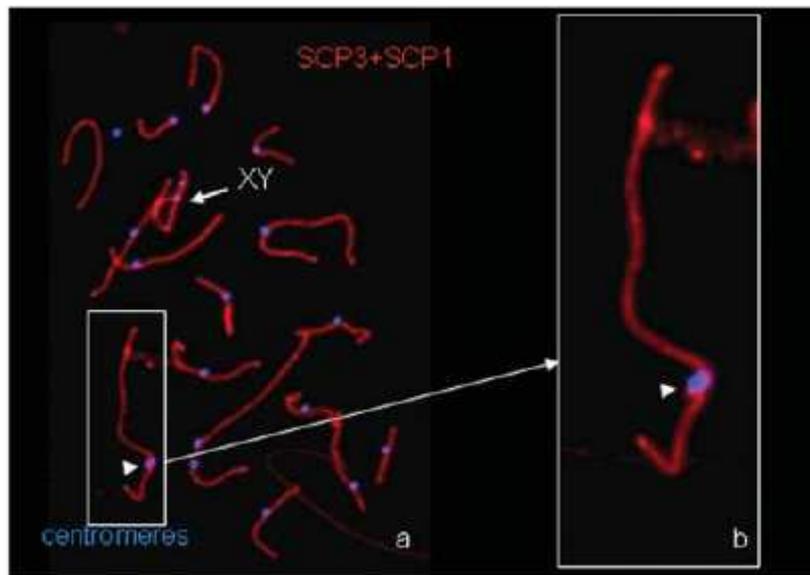


Figure I-26 : Image d'un spermatocyte par immunohistochimie chez un porc porteur d'une translocation robertsonienne trob (13 ;17).

a : Spermatocyte complet. Le bivalent XY est indiqué. Les centromères sont révélés en bleu.

b : Image agrandie du trivalent formé par les chromosomes 13 et 17.

Des défauts d'appariement méiotique des chromosomes du quadrivalent ou trivalent peuvent apparaître notamment dans la région des points de cassure (Figures I-26 et I-27a), entraînant un arrêt précoce de la méiose et une mort cellulaire. Des études réalisées chez l'homme ont montré que ces défauts d'appariement pouvaient être à l'origine d'une baisse de fertilité, voire même de stérilité (Guichaoua et al., 1992; Leng et al., 2009; Oliver-Bonet et al., 2005).

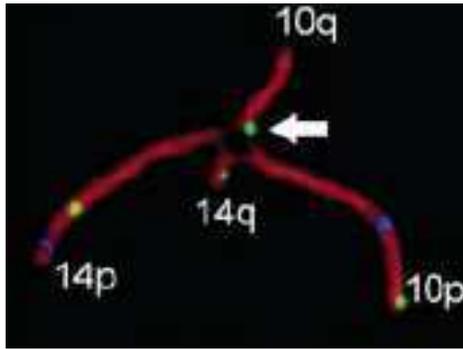
Il existe plusieurs hypothèses permettant d'expliquer les effets des défauts d'appariement sur la gamétogénèse.

La première est qu'une transcription anormale des gènes présents sur les segments non appariés induirait une destruction sélective des spermatocytes (Forejt and Gregorova, 1977). En effet, des études réalisées chez la souris ont mis en évidence une répression de la transcription des régions non appariées chez des individus présentant un arrêt partiel ou total de la spermatogénèse (Turner et al., 2005). L'hypothèse proposée à partir de ces observations est que l'inactivation de gènes nécessaires au bon déroulement de la méiose pourrait être responsable de l'arrêt de la division méiotique des cellules concernées qui sont alors détruites par apoptose.

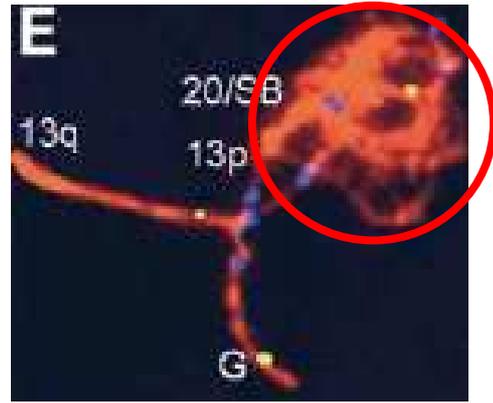
Des associations du quadrivalent avec le bivalent XY (chromosomes X et Y appariés et génétiquement inactifs en prophase de première division méiotique) ont aussi été observées chez des individus à qualités de semence dégradées (azoospermiques ou oligospermiques) (Oliver-Bonet et al., 2005) (Figure I-27b).

L'hypothèse formulée dans ce cas est que cette association pourrait être responsable d'une réactivation de certains gènes du chromosome X ou une désactivation de gènes des segments autosomiques non appariés (extension de l'inactivation génique du bivalent sexuel XY aux segments autosomiques associés) (Guichaoua et al., 1992; Homolka et al., 2007).

Chez le porc, très peu de verrats infertiles (à qualité de semence dégradée) ont été étudiés et il n'existe à ce jour aucune donnée montrant une corrélation directe entre un arrêt précoce de la spermatogénèse chez des individus porteurs hétérozygotes de translocations d'autosomes et des défauts d'appariement des chromosomes au stade pachytène (Villagomez and Pinton, 2008). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les chromosomes formant le quadrivalent s'apparient dès le stade précoce du pachytène de manière non homologue (phénomène appelé hétérosynapsis), et empêchent ainsi la formation de zones non appariées et donc un arrêt du processus méiotique (Gabriel-Robez et al., 1988a; Jaafar et al., 1992; Jaafar et al., 1993).



a



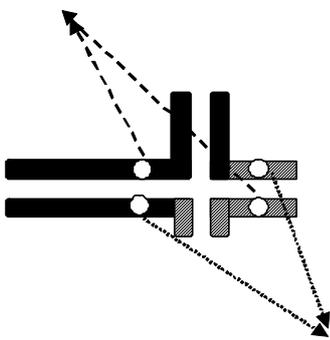
b

Figure I-27 : Quadrivalent présentant des défauts d'appariement des chromosomes dans le cas de translocations réciproques chez l'homme (Oliver-Bonet et al., 2005).

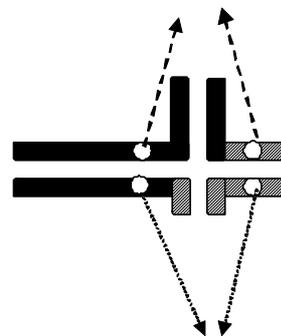
a : Chromosomes 10 et 14 non appariés au niveau des points de cassure (flèche).

b : Association d'un quadrivalent avec la vésicule sexuelle (SB-cercle rouge) chez un homme azoospermique porteur d'une translocation (13;20).

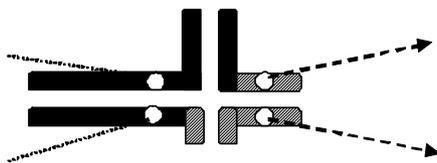
a) ségrégation alterne



b) ségrégation adjacente-1



c) ségrégation adjacente-2



d) ségrégation 3:1

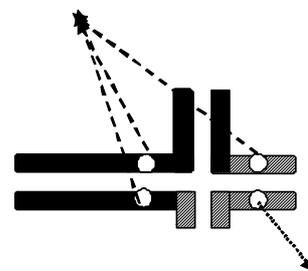


Figure I-28 : Représentation schématique des différents types de ségrégation.

II.2.3.2 La production de gamètes génétiquement déséquilibrés

Un individu porteur hétérozygote de translocation réciproque ou robertsonienne produit des gamètes équilibrés et déséquilibrés suite à différents mécanismes de ségrégation méiotique.

En fonction du type de ségrégation, les gamètes produits seront porteurs de différentes duplications ou délétions de fragments chromosomiques, ou de chromosomes entiers dans le cas des translocations robertsoniennes (Benet et al., 2005; Roux et al., 2005).

Les mécanismes conduisant à la production de ces différents types de gamètes déséquilibrés sont complexes.

Dans le cas de translocations réciproques, les chromosomes normaux et transloqués associés sous forme d'un quadrivalent peuvent ségréger selon quatre configurations différentes :

- Lors d'une ségrégation alterne, les chromosomes du quadrivalent migrent alternativement vers un pôle ou l'autre de la cellule (Figure I-28a).

La ségrégation alterne conduit généralement à la formation de gamètes génétiquement équilibrés, « normaux » ou « transloqués » (Figure I-29a). Ces derniers sont à l'origine d'individus normaux, soit non porteurs, soit porteurs hétérozygotes de la translocation.

Toutefois un crossing over peut avoir lieu dans les régions interstitielles des chromosomes du quadrivalent (régions localisées entre les centromères et les points de cassure). Ces crossing over interstitiels sont responsables de l'échange d'une chromatide « normale » d'un chromosome par une chromatide « transloquée » du chromosome homologue.

Les produits de première division résultant de ce phénomène sont des chromosomes hybrides constitués d'une chromatide transloquée et d'une chromatide normale.

Les produits finaux de ségrégation alterne de ce type de chromosomes hybrides seront pour moitié « équilibrés » (identiques à ceux obtenus après ségrégation alterne sans crossing over interstitiel) et pour moitié « déséquilibrés » (identiques à ceux obtenus après ségrégation adjacente 1 sans crossing over interstitiel, voir plus loin).

- Lors de ségrégation adjacente 1, les chromosomes adjacents sur le quadrivalent et ayant des centromères différents, migrent vers le même pôle de la cellule (Figure I-28b). La ségrégation adjacente 1 produit des gamètes génétiquement déséquilibrés, dont le déséquilibre concerne les segments transloqués (Figure I-29)

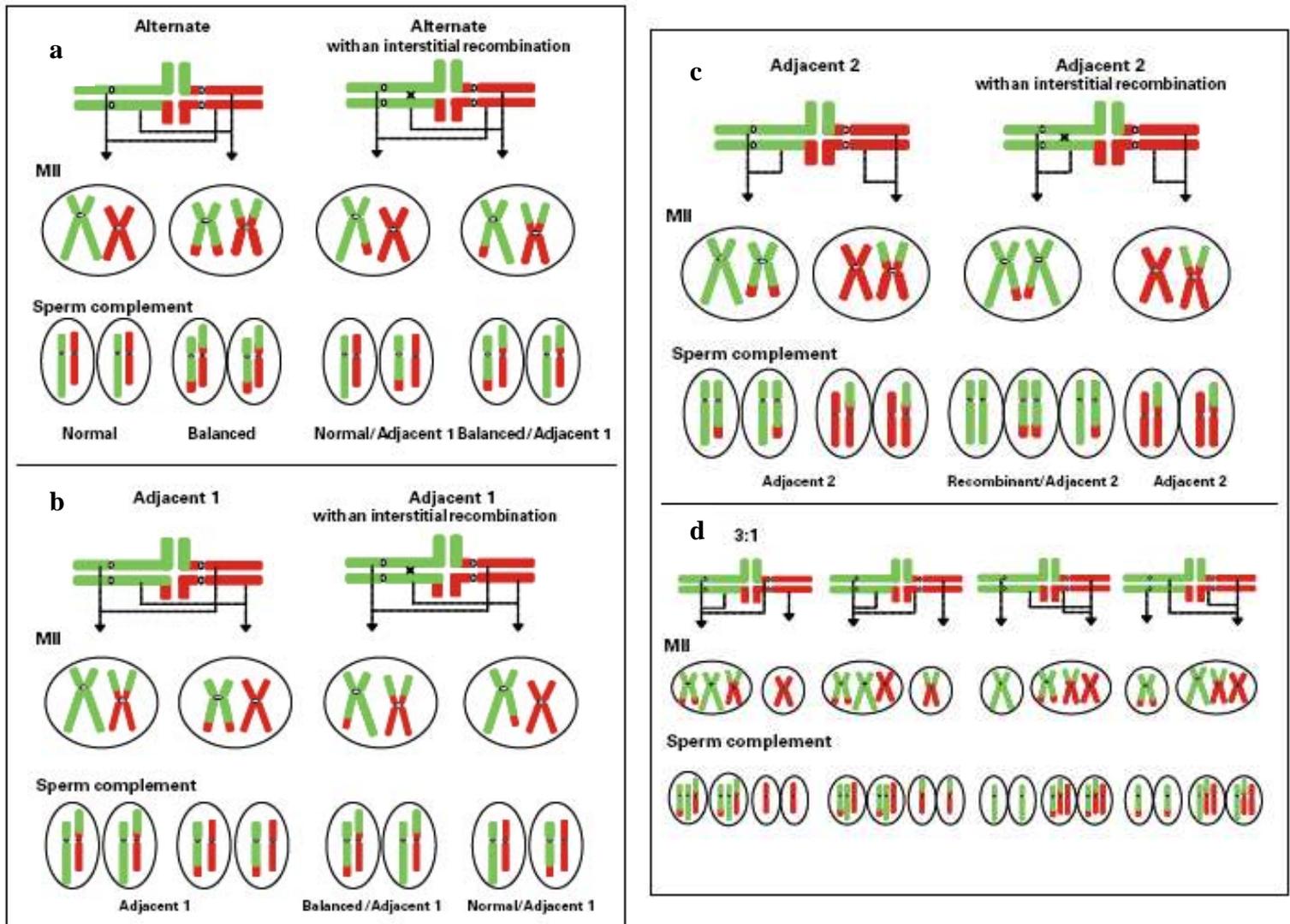


Figure I-29 : Différents diagrammes présentant les produits de première et seconde division méiotique en fonction du type de ségrégation chez l'Homme (Benet et al., 2005).

Ces gamètes sont disomiques pour un segment chromosomique et nullisomiques pour l'autre. Cependant, à la suite d'un crossing over interstitiel, les produits issus de ce type de ségrégation seront pour moitié déséquilibrés (comme ceux issus de ségrégation adjacente 1 sans crossing over interstitiel) et pour moitié équilibrés (identiques à ceux obtenus après ségrégation alterne sans crossing over interstitiel).

-Lors de ségrégation adjacente 2, les chromosomes adjacents sur le quadrivalent et ayant les mêmes centromères, migrent vers le même pôle de la cellule (Figure I-28c). La ségrégation adjacente 2 produit des gamètes déséquilibrés dont le déséquilibre concerne les segments centriques (fragments de l'extrémité télomérique du bras chromosomique non impliqué dans le remaniement jusqu'au point de cassure (Figure I-29c). La présence d'un crossing over interstitiel induit, en plus des déséquilibres des segments centriques, des déséquilibres des segments transloqués.

- Lors de ségrégation 3:1 ou 4:0, trois ou les quatre chromosomes du quadrivalent migrent vers un seul pôle de la cellule conduisant à la production de gamètes génétiquement déséquilibrés (Figure I-28d).

Pour la ségrégation 3 :1, on obtient des gamètes portant trois chromosomes tandis que les autres en ont un seul, normal ou remanié. De la même manière, on obtient des gamètes porteurs des 4 chromosomes du quadrivalent et d'autres d'aucun pour la ségrégation 4:0 (Figure I-29d).

Dans le cas des translocations robertsoniennes, les chromosomes ségrégent aussi selon différents modes.

- Lors d'une ségrégation alterne, les deux chromosomes non transloqués migrent vers un pôle tandis que le transloqué migre vers l'autre. Les gamètes créés seront tous équilibrés, les uns portant deux chromosomes normaux, les autres le chromosome transloqué (Figure I-30).

Lors de ségrégations adjacentes 1 ou 2, l'un des chromosomes normaux migre avec le transloqué, tandis que le second chromosome normal migre vers le pôle opposé. Les gamètes produits seront alors tous génétiquement déséquilibrés, disomiques pour un chromosome et nullisomiques pour l'autre (Figure I-30).

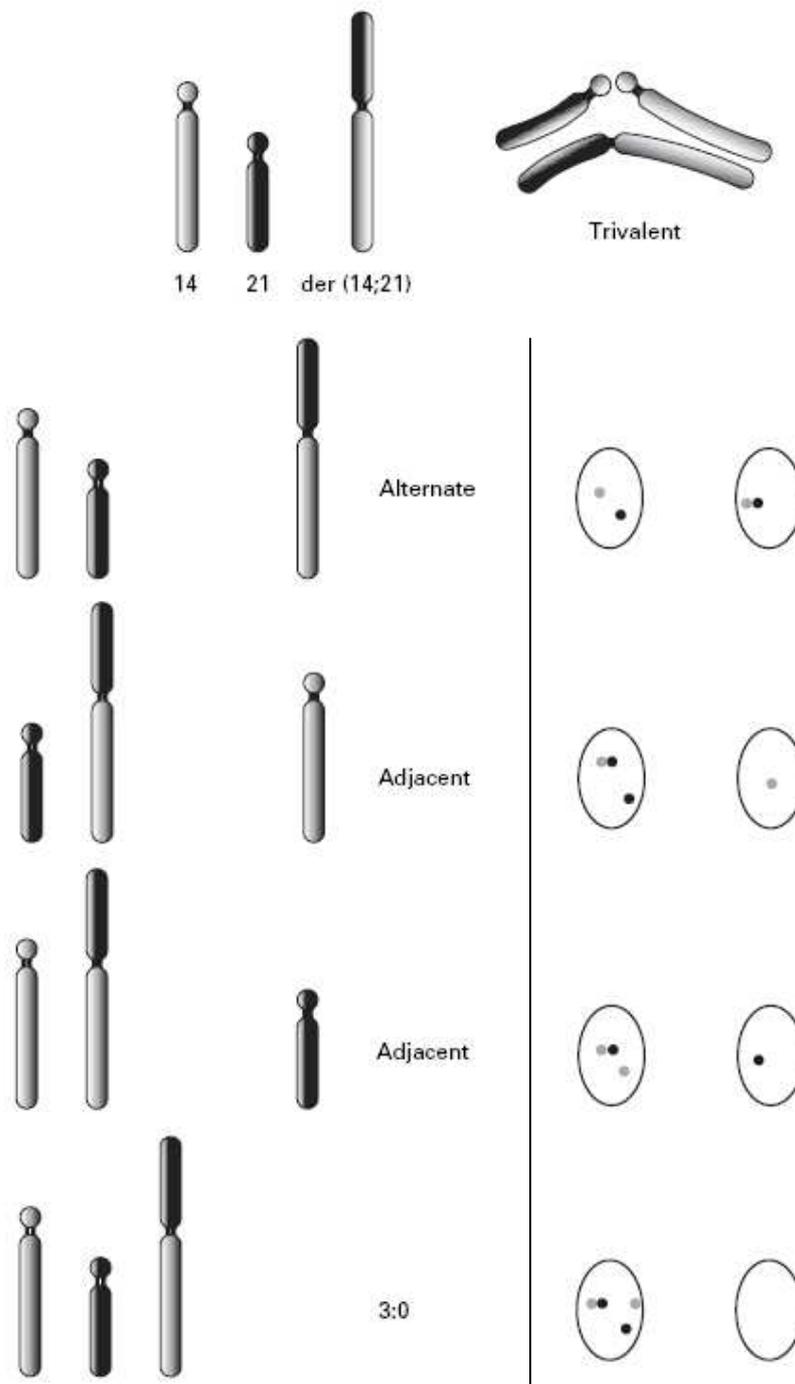


Figure I-30 : Représentation schématique des produits de première et de seconde division méiotique dans le cas d'une translocation robertsonienne 14/21 chez l'homme (Roux et al., 2005).

A gauche : constitution chromosomique des cellules méiotiques.

A droite : types de gamètes produits (les cercles de couleurs différentes représentent les chromosomes 14 et 21).

Les proportions de gamètes équilibrés et déséquilibrés produits par un individu porteur hétérozygote d'une translocation réciproque varient d'un remaniement à l'autre. La nature des chromosomes impliqués (métacentrique, acrocentrique...) la taille des segments chromosomiques transloqués influencent la ségrégation méiotique des chromosomes du quadrivalent. Ainsi, des profils de ségrégation méiotique différents sont observés pour des translocations réciproques différentes. Chez l'homme par exemple, la proportion de gamètes équilibrés varie de 18,6% à 62,8% en fonction des études (pour revue Benet et al., 2005; Midro et al., 2006; Wiland et al., 2007; Yakut et al., 2006).

Pour ce qui est des translocations robertsoniennes, il a été montré que les profils de ségrégation méiotique de différentes translocations variaient peu, suggérant ainsi un effet négligeable des chromosomes impliqués dans la translocation sur le profil de ségrégation obtenu. Ainsi, les pourcentages de gamètes équilibrés observés dans différentes études sont compris entre 60% et 90% (Anton et al., 2004; Moradkhani et al., 2006a; Moradkhani et al., 2006b; Ogur et al., 2006; Rousseaux et al., 1995; Roux et al., 2005). Ces translocations, contrairement aux réciproques, induisent donc des effets plus homogènes et globalement plus faibles sur la fertilité des porteurs (Anton et al., 2007).

Des études menées dans l'espèce porcine ont aussi montré que le pourcentage de gamètes génétiquement déséquilibré produit par des verrats porteurs de translocations réciproques est également corrélé à la taille des fragments impliqués dans la translocation et aux chromosomes concernés. Des proportions de gamètes déséquilibrés très différentes ont été estimées dans le cas des translocations 3/15 et 12/14 notamment (48% et 24%, respectivement) (Massip et al., 2008 – Annexe I; Pinton et al., 2004).

La production de gamètes génétiquement déséquilibrés pouvant donner lieu à des embryons non viables (par exemple Gustavsson, 1980; Gustavsson and Jonsson, 1992; Rodriguez et al., 2010; Villagomez et al., 1995, et pour revue Villagomez and Pinton, 2008), la présence d'une translocation chez un individu peut entraîner une baisse de prolificité chez les porteurs de remaniements chromosomiques (ou leurs conjointes). Des études montrant l'impact de certaines translocations sur les performances de l'élevage furent par exemple publiées (Ducos et al., 1998a; Ducos et al., 1998b).

Récemment, une étude portant sur l'analyse des ségrégations méiotiques de verrats porteurs d'une translocation robertsonienne entre les chromosomes 13 et 17 a été réalisée. Au contraire des précédentes études réalisées sur des porteurs de translocations réciproques, la faible proportion de gamètes génétiquement déséquilibrés estimée (3,22% en moyenne) a permis de montrer que cette anomalie particulière n'induisait pas d'impact important sur la fertilité des porteurs (Pinton et al., 2009).

Si peu de cas de malformations congénitales dues à des anomalies chromosomiques ont été recensés à ce jour pour l'espèce porcine, cela est dû principalement au fait que peu de demandes d'analyses chromosomiques sont faites lors de la constatation d'anomalies en élevage. En effet, les individus présentant des anomalies phénotypiques sont généralement rapidement écartés des schémas de sélection ou de l'élevage et ne font pas l'objet de contrôle chromosomique. En France, seul le cas de porcelets porteurs de remaniements chromosomiques (duplications et délétions) dus à la présence d'une translocation réciproque chez leur père et présentant des malformations congénitales (fente palatine notamment) a été documenté de façon précise (Ducos et al., 2004). Deux autres études ont aussi montré que la présence de chromosomes remaniés chez des porcelets pouvaient être la cause de malformations diverses (Gustavsson and Jonsson, 1992; Villagomez et al., 1995).

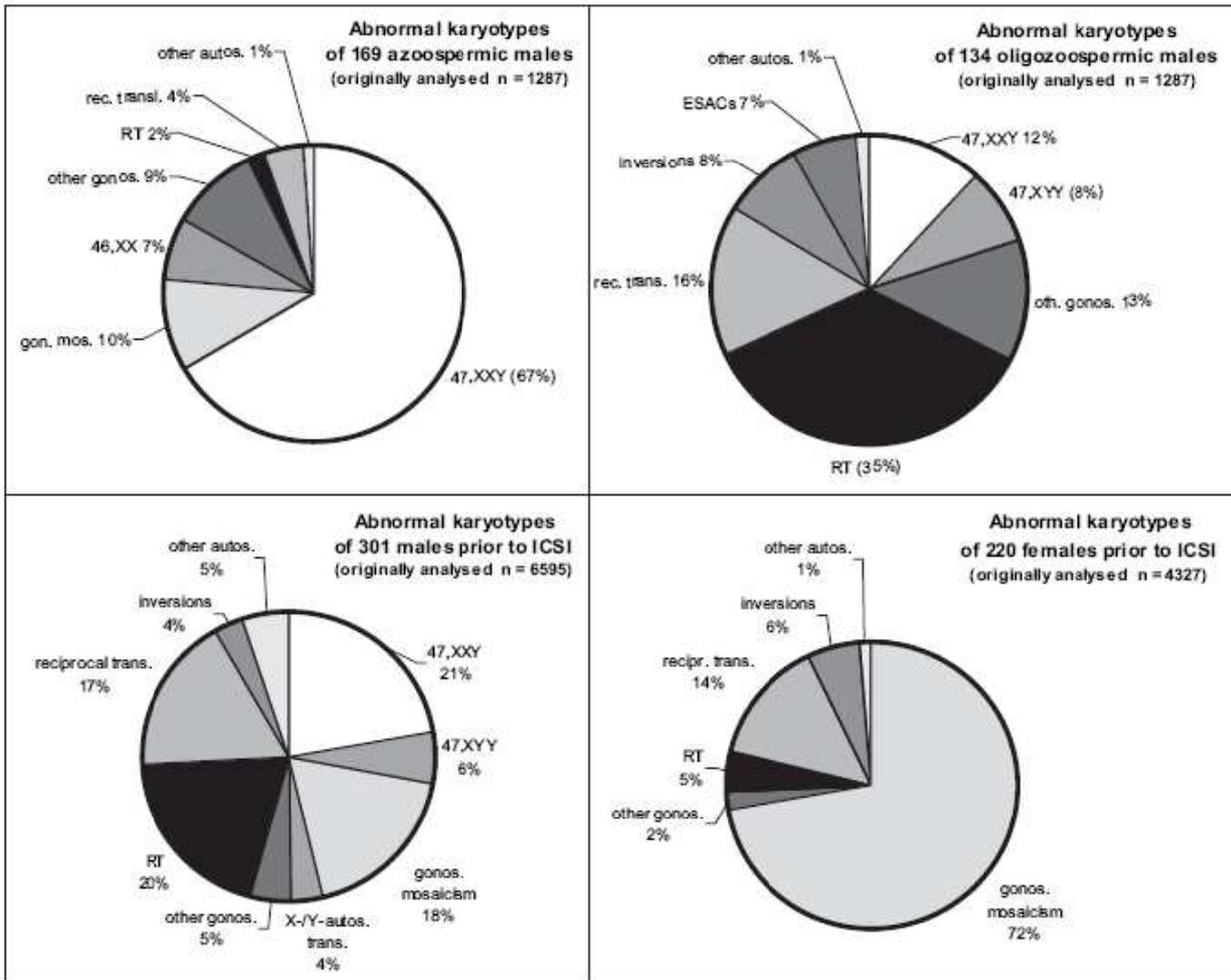


Figure I-31: Représentation des différentes anomalies chromosomiques de nombre et de structure trouvées chez des hommes et des femmes infertiles (Mau-Holzmann, 2005).

Bilan des anomalies chromosomiques chez le porc (données du laboratoire)

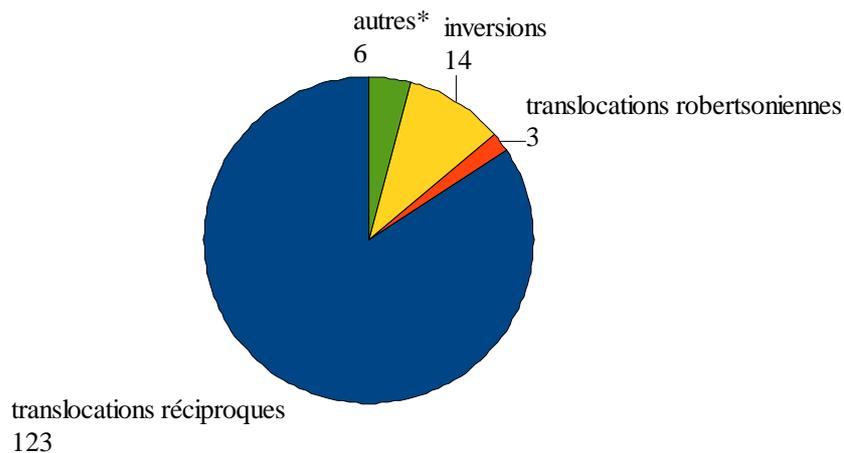


Figure I-32 : Bilan des anomalies chromosomiques décelées chez le porc (données du laboratoire).

* : Anomalies de nombre et duplications.

En résumé (Figures I-31 et I-32)

Chez l'Homme, la prévalence des anomalies chromosomiques de nombre est plus élevée que celle des anomalies de structure.

Les translocations réciproques sont les anomalies de structure les plus fréquentes dans la population humaine, devant les translocations robertsoniennes.

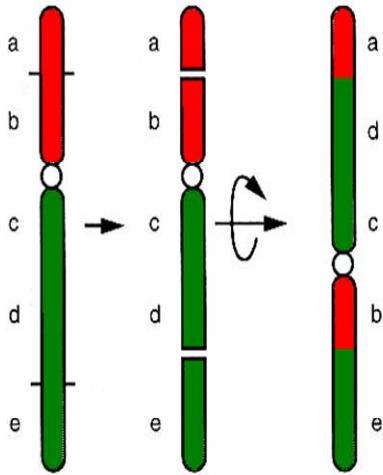
Les mécanismes complexes mis en jeu lors de la ségrégation des chromosomes impliqués dans le remaniement entraînent la formation de gamètes présentant du matériel chromosomique en plus ou en moins, et donc génétiquement déséquilibrés.

Dans tous les cas, les conséquences des anomalies chromosomiques sur la reproduction peuvent être importantes :

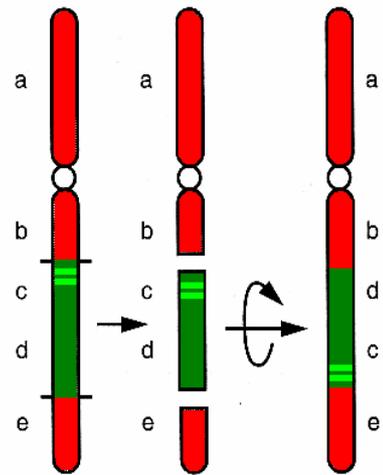
- en entraînant des anomalies de développement et de fonctionnement des organes reproducteurs*
- en empêchant un processus méiotique correct et en étant responsable de la production de gamètes génétiquement déséquilibrés.*

La production de ces gamètes anormaux est par ailleurs dépendante de plusieurs paramètres (exemple : nature des chromosomes impliqués et localisation des points de cassure dans le cas de translocations).

Dans l'espèce porcine, les anomalies de structure semblent sensiblement plus fréquentes que les anomalies de nombre. Leurs conséquences sont similaires à celles mises en évidence chez l'homme, à savoir une production plus ou moins importante de gamètes déséquilibrés.



Inversion péricentrique



Inversion paracentrique

Figure I-33 : Représentation schématique d'inversions péri et paracentriques (d'après Berger, 1998).

III. Troisième partie - Les inversions, des anomalies de structure particulières

Les inversions étant les réarrangements chromosomiques considérés dans la partie expérimentale de ma thèse, elles sont présentées de manière beaucoup plus détaillée que les anomalies précédentes (aneuploïdie et translocations) dans ce chapitre.

III.1. Présentation générale des inversions

III.1.1 Chez l'Homme

Contrairement aux translocations, les inversions sont des anomalies de structure qui n'impliquent qu'un seul chromosome. Elles sont le résultat d'une double cassure sur le chromosome, et d'un retournement à 180° du fragment généré.

On parle d'inversions péricentriques lorsque les points de cassure se situent de part et d'autre du centromère du chromosome concerné (Figure I-33). Ce sont les inversions les plus fréquentes, avec une incidence chez l'Homme de 0.1/1000 à 0.7/1000 (McKinlay-Gardner and Sutherland 2004). Lorsque les cassures surviennent sur un même bras chromosomique, on parle alors d'inversions paracentriques (Figure I-33). Leur incidence est de 0.1/1000 à 0.5/1000 dans la population humaine (McKinlay-Gardner and Sutherland 2004).

Les inversions, tant péricentriques que paracentriques, concernent tous les chromosomes, y compris les gonosomes X et Y. Cependant, certains chromosomes sont plus fréquemment associés à des inversions que d'autres : en effet, la plupart des inversions péricentriques chez l'Homme concernent les régions hétérochromatiques des chromosomes 1, 3, 4, 9, 16 et Y. Elles sont toutes considérées comme des polymorphismes non pathologiques, avec des fréquences variables en fonction de la population étudiée (Kaiser, 1988; Kalz and Schwanitz, 2004; Toth et al., 1984; Wyandt and Tonk, 2004).

Cependant, d'autres inversions situées en dehors des régions hétérochromatiques ont aussi été détectées de manière récurrente : elles concernent d'abord le chromosome 2 (l'inversion $inv(2)(p11.2;q13)$ est la plus communément identifiée), puis les chromosomes 10, 5 et 7 (pour revue, Borgaonkar, 1997; McKinlay-Gardner and Sutherland 2004; Muss and Schwanitz, 2007).

De la même manière, les inversions apparaissent préférentiellement au niveau de certaines régions chromosomiques. Certains points de cassure sont préférentiellement localisés dans des « hotspots », riches en bases G-C, notamment sur les chromosomes 2, 5, 6, 10 et 12 (Kleczkowska et al., 1987).

Les inversions paracentriques les plus fréquentes concernent quant à elles les chromosomes 1, 3, 5, 6, 7, 11, et 14 (pour revue, Madan, 1995; Pettenati et al., 1995) . Elles sont souvent sans risque pour le porteur, et sont ainsi pour la plupart considérées comme des polymorphismes. On retrouve là aussi des régions où les points de cassures surviennent de manière préférentielle : 3(p13p25), 6(p12p23), 6(p12p25), 7(q11q22), et 11(q21q23) par exemple (Pettenati et al., 1995).

Péricentriques ou paracentriques, les inversions le plus fréquemment identifiées sont très souvent familiales, et sont propagées par transmission à la descendance. Seules 10% des inversions diagnostiquées seraient apparues *de novo* (pour revue, Borgaonkar, 1997; Muss and Schwanitz, 2007). Bien qu'elles ne représentent qu'une faible proportion des cas, les inversions apparues *de novo* sont très nombreuses à avoir été documentées (pour revue, Madan, 1995; McKinlay-Gardner and Sutherland 2004; Pettenati et al., 1995).

Il est aussi connu depuis longtemps (Dobzhansky, 1970) que les inversions considérées comme des polymorphismes ont joué un grand rôle dans l'évolution des espèces (Lyon, 2003; Stefansson et al., 2005). Par exemple, pas moins de 66 inversions ont été détectées en comparant les génomes humains et chimpanzés (Feuk et al., 2005).

La création de gamètes recombinants chez des porteurs d'inversions pouvant induire une diminution de leur fertilité (cet aspect sera développé dans les paragraphes suivants), il a d'abord été suggéré que cette diminution d'efficacité à se reproduire pouvait créer une barrière entre plusieurs populations et conduire à la formation d'une nouvelle espèce (King, 1993; White, 1978). Cependant, il semble peu probable qu'une inversion impliquant une forte baisse de la fertilité des hétérozygotes puisse se fixer dans une population. Ainsi, un modèle plus récent explique que les phénomènes de spéciation associés à la présence d'une inversion sont dus à une baisse de la recombinaison entre les régions génomiques inversées et normales. Ainsi, les flux géniques dans cette région sont largement réduits, facilitant une accumulation d'allèles dans une population par rapport à une autre, créant alors une barrière reproductive (pour revue, Hoffmann and Rieseberg, 2008; Kirkpatrick and Barton, 2006).

Chromosome impliqué	Intitulé	Type	Points de cassure	Année	Publications
1	inv (1)(p2.1;q1.1)	péricentrique	1p2.1;1q1.1	1994b	MIYAKE et al.
1	inv (1)(p2.2;q1.1)	péricentrique	1p2.2;1q1.1	1996	DANIELAK-CZECH et al.
1	inv (1)(q1.2;q2.4)	paracentrique	1q1.2;1q2.4	1997	MASSIP et al.
1	inv (1)(p2.1;q2.10)	péricentrique	1p2.1;1q2.10	2000	MASSIP et al.
1	inv (1)(p24;q29)	péricentrique	1p24;1q29	2002	MASSIP et al.
2	inv (2)(p1.1;q1.1)	péricentrique	2p1.1 ;2q1.1	1998	MASSIP et al.
2	inv(2)(p1.3;q1.2)	péricentrique	2p1.3;2q1.2	2005	UMR 898 non publié
2	inv(2)(q1.3;q2.5)	paracentrique	2q1.3;2q2.5	2006	MASSIP et al.
2	inv (2)(p1.1;q2.1)	péricentrique	2p1.1 ;2q2.1	2002	MASSIP et al.
6	inv(6)(p1.4;q1.2)	péricentrique	6p1.4;6q1.2	2004	UMR 898 non publié
4	inv (4)(p1.4;q2.3)	péricentrique	4p1.4;4q2.3	1994	DUCOS et al.
8	inv (8) (p2.1;q1.1)	péricentrique	8p2.1;8q1.1	2004	UMR 898 non publié
8	inv(8)(p1.2;q2.1)	péricentrique	8p1.2;8q2.1	2008	UMR 444 non publié
8	inv (8)(p1.1;p1.2)	paracentrique	8p1.1;8p1.2	1991	SWITONSKI
8	inv (8)(p1.1;q2.5)	péricentrique	8p1.1;8q2.5	2002	UMR 898 non publié
9	inv (9)(p1.2;p2.2)	paracentrique	9p1.2;9p2.2	1999	PiNTON et al.
16	inv16(q1.3;q2.3)	paracentrique	16q1.3;16q2.3	1999	UMR 898 non publié

Tableau I-2 : Bilan des inversions documentées dans l'espèce porcine.

III.1.2 Chez le porc

Dix-sept inversions différentes seulement, dont celles étudiées dans le cadre de cette thèse, ont pu être recensées dans l'espèce porcine (Tableau I-2).

Seulement 5 d'entre elles sont des inversions paracentriques. La grande majorité a été détectée au laboratoire d'accueil grâce au contrôle chromosomique effectué. Très peu ont fait l'objet d'une publication (Danielak-Czech et al., 1996; Ducos et al., 1997b; Miyake et al., 1994; Pinton, 2004; Switonski et al., 1998).

D'après les données du laboratoire, on estime leur prévalence à 0.06% et 0.03% pour les inversions péri et paracentriques, respectivement.

Bien qu'à ce jour des inversions n'aient pas été décelées sur tous les chromosomes porcins (18 paires plus les chromosomes sexuels), il semble que les chromosomes 2 et 8 soient particulièrement prédisposés à subir ce type de remaniement.

Etant donné le faible nombre de cas identifiés, il n'est pas non plus possible de mettre en évidence des zones préférentielles de cassures sur les chromosomes.

III.2 Impact des inversions sur le processus méiotique

La présence d'une inversion équilibrée n'a généralement pas de conséquences sur le développement du porteur. En effet, le contenu génétique des cellules n'est pas modifié, à moins bien sûr qu'une cassure survienne dans un gène majeur impactant la physiologie de l'individu (e.g. Concolino et al., 2002; Saito-Ohara et al., 2002).

Cependant, tout comme pour les translocations, la présence d'une inversion à l'état hétérozygote est susceptible d'avoir un impact non négligeable sur la méiose.

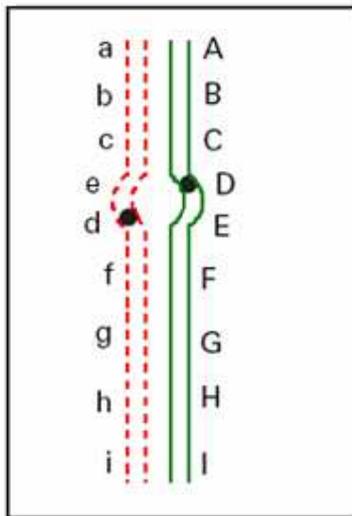
III.2.1 Comportement méiotique des inversions

III.2.1.1 La taille du fragment inversé, un facteur important modifiant le comportement méiotique des chromosomes

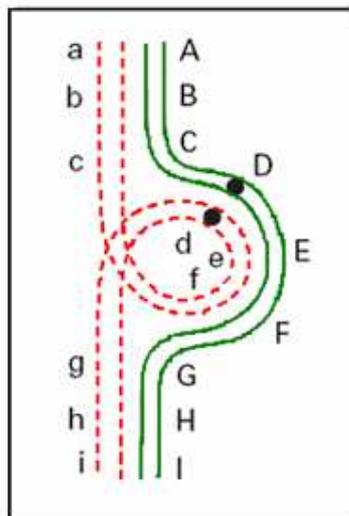
Aux premiers stades de la méiose, les chromosomes homologues se rapprochent grâce à la reconnaissance de leur homologie de séquences.

Lorsqu'un des homologues présente une région inversée, il n'est pas possible pour le fragment inversé et son partenaire normal de s'apparier correctement.

a) Ballon asynaptique



b) Boucle d'inversion



c) Appariement antiparallèle

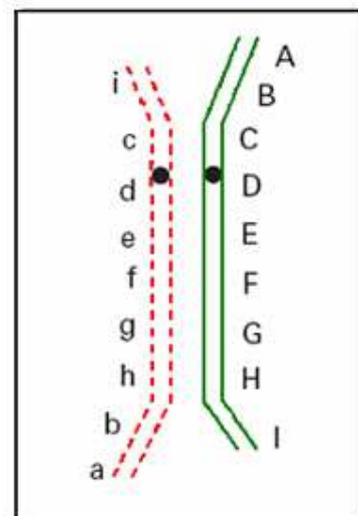


Figure I-34 : Représentation schématique des différents comportements méiotiques possibles des chromosomes normaux et inversés (d'après Anton et al., 2005).

Le comportement méiotique des chromosomes est donc modifié afin de permettre le meilleur appariement possible. C'est aussi un facteur crucial de la présence ou de l'absence de recombinaison méiotique dans la région inversée. En effet, un crossing over ne peut avoir lieu que lorsque les chromosomes sont appariés de façon homologue. Or, la production de gamètes déséquilibrés est due à la présence de crossing overs dans la région inversée. C'est pourquoi la taille du fragment remanié est le facteur majeur conduisant ou non à la production de gamètes déséquilibrés (Kaiser, 1984; Winsor et al., 1978).

En effet, si la taille du fragment inversé est inférieure à 30 % de la taille totale du chromosome, alors les régions non inversées s'apparient normalement, tandis que la région inversée reste le plus souvent asynapsiée, formant un « ballon asynaptique » (Figure I-34a) au niveau de la région non homologue du bivalent (Guichaoua et al., 1986b; Saadallah and Hulten, 1986).

Il arrive cependant que cette petite région s'apparie tout de même de façon non homologue : c'est le phénomène d'hétérosynapsis (Ashley et al., 1993; Bardhan and Sharma, 2000; Gabriel-Robez et al., 1988b; Greenbaum and Reed, 1984; Hale, 1986; Rumpler et al., 1995; Switonski et al., 1998). La présence de chromosomes non appariés pouvant induire un arrêt précoce de la spermatogénèse grâce aux points de contrôle méiotique (Burgoyne and Baker, 1984), il a été suggéré que l'hétérosynapsis des chromosomes homologues permettait d'empêcher l'arrêt du processus méiotique et ainsi de « sauver » les cellules germinales de l'apoptose (Saadallah and Hulten, 1986).

Lorsque la taille du fragment inversé est plus importante, (comprise entre 30 et 50 % environ de la taille totale du chromosome), les contraintes topologiques liées aux petits fragments inversés sont levées et la région inversée, plus grande, devient aussi plus flexible (Gabriel-Robez et al., 1988b; Guichaoua et al., 1986a). L'un des deux chromosomes peut alors former une boucle afin que la totalité du bivalent soit associée de façon homologue. On appelle cette structure particulière une boucle d'inversion (Batanian and Hulten, 1987; Cheng et al., 1999; Davisson et al., 1981; Gabriel-Robez et al., 1986; Guichaoua et al., 1986b; Martinez-Flores et al., 2001)(Figure I-34b).

Cependant, cette structure, bien qu'elle permette une homologie parfaite, ne semble pas stable.

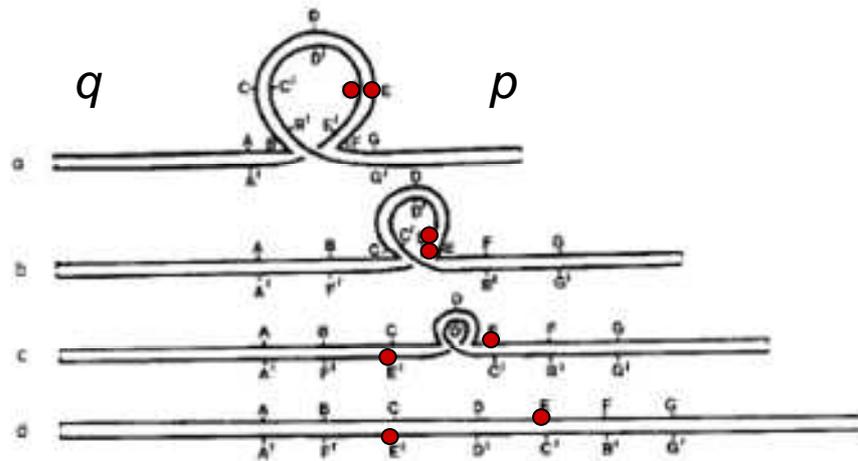


Figure I-35 : Représentation schématique du phénomène d'ajustement synaptique (d'après Moses et al., 1982). Les centromères sont représentés par des cercles rouges.

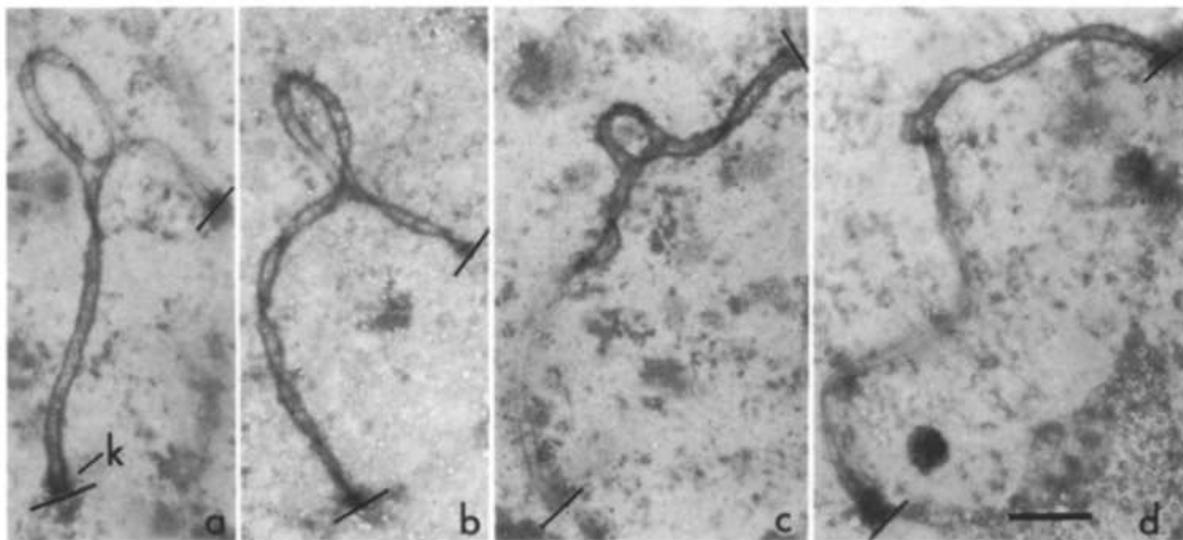


Figure I-36 : Images issues d'analyses en microscopie électronique permettant la visualisation de différentes boucles d'inversions illustrant le phénomène d'ajustement synaptique (spermatocytes de souris porteurs hétérozygotes d'une inversion du chromosome 1) (Moses et al., 1982).

C'est pourquoi cette configuration est souvent éphémère, la boucle étant résolue assez rapidement dans la plupart des cas étudiés : on appelle ce phénomène « ajustement synaptique » (Moses, 1980; Poorman et al., 1981; Moses et al., 1982) (Figures I-35 et I-36). Ce mécanisme est encore mal connu, mais il semble que les chromatides homologues se séparent, pour s'apparier ensuite de manière non homologue aux chromatides non engagées dans la boucle. Lorsque la résolution de la boucle est totale, le bivalent retrouve une forme linéaire et est apparié de manière non homologue le long du fragment inversé (Moses et al., 1982).

Quand la taille du fragment inversé est très importante (plus de 80 % de la taille totale du chromosome), alors un des deux chromosomes peut effectuer un retournement à 180° pour obtenir une synapsis homologue de la plus grande partie du chromosome, c'est-à-dire dans ce cas la région inversée. Les extrémités télomériques non homologues ne s'apparient pas ou forment une hétérosynapsis. Le bivalent est dans une configuration dite « antiparallèle » (Faed et al., 1982; Kaiser-Rogers and Rao, 1999; Koehler et al., 2004; McKinlay-Gardner and Sutherland 2004; Winsor et al., 1978)(Figure I-34c).

Chez le mâle

Les études réalisées chez l'homme et d'autres espèces (souris et rat) montrent que ces différents phénomènes peuvent avoir lieu dans différentes cellules au sein d'un même individu (Ashley et al., 1981; Chandley et al., 1987; Faed et al., 1982; Moses et al., 1982; Saadallah and Hulten, 1986) et suggèrent ainsi que la taille du fragment inversé n'influence pas le comportement des chromosomes de manière absolue. Ainsi, des boucles d'inversions (Figure I-36) ont pu être observées alors que la taille du fragment inversé était très faible (16 % de la taille totale du chromosome - Guichaoua et al., 1986a) ou très importante (70 % de la taille du chromosome - Batanian and Hulten, 1987).

Chez la femelle

Du fait de la complexité des analyses à mettre en œuvre, très peu de résultats ont pu être obtenus concernant le comportement des chromosomes homologues normaux et inversés lors de l'appariement méiotique chez la femme. Une seule étude, en effet, fait référence à l'analyse du comportement méiotique chez une porteuse d'une petite inversion paracentrique du chromosome 7 (environ 10% de la taille totale du chromosome).

Les résultats obtenus sont cohérents avec les données chez l'homme, puisque la majorité des cellules montraient une hétérosynapsis, tandis que seulement 10 % des ovocytes présentaient une boucle d'inversion (Cheng et al., 1999).

Deux autres études ont été menées chez la souris, montrant des résultats plus contradictoires (Tease and Fisher, 1986) : 36 % des ovocytes analysés présentaient une boucle d'inversion, alors que l'anomalie du chromosome X étudiée dans ce cas représentait environ 80% de la taille totale du chromosome. L'analyse d'une autre inversion du chromosome 2 montrait que seulement 26 % des cellules s'appariaient de façon homologue par une boucle alors que le fragment inversé dépassait 40% de la taille totale du chromosome. Dans les deux cas, les deux homologues s'appariaient préférentiellement par hétérosynapsis. La présence d'ajustement synaptique des boucles d'inversion a cependant été montrée.

Au contraire, une majorité de boucles d'inversion a bien été observée dans des cellules de souris porteuses d'une inversion du chromosome 1 représentant environ 46 % de la taille totale du chromosome (Moses and Poorman, 1984).

Ces résultats semblent montrer que, tout comme chez le mâle, le comportement méiotique des homologues semble conditionné par la taille du fragment inversé, sans pour autant que cela puisse être considéré comme une généralité.

Recombinaison méiotique

Par ailleurs, la recombinaison méiotique des chromosomes est aussi influencée par leur comportement méiotique. En effet, bien que l'occurrence et la répartition des crossing overs sur le bivalent porteur de l'inversion n'aient été que très peu analysées, les études menées chez l'homme et la souris s'accordent à dire que les crossing overs ne se produisent dans la région inversée que lorsque il y a homosynapsis, c'est-à-dire formation d'une boucle d'inversion ou appariement antiparallèle (Ashley et al., 1993; De Perdigo et al., 1989). Lors d'une hétérosynapsis ou asynapsis, les crossing overs se situent toujours à l'extérieur de la région inversée (par exemple Reed et al., 1992; Shashi et al., 1996).

De plus, plusieurs études ont mis en évidence que, bien que présents, les crossing overs semblent réduits dans la boucle d'inversion (Chandley et al., 1987; Moses et al., 1982). La présence d'une inversion a donc un impact important sur la qualité de la recombinaison des chromosomes impliqués.

Une seule étude, chez la souris, a analysé la position et la fréquence des crossing overs pour des femelles porteuses d'inversions des chromosomes 2, 19 et X (Koehler et al., 2004). De manière générale, la fréquence des crossing overs n'a pas été altérée par les inversions.

Une augmentation de la recombinaison a même été mise en évidence pour une inversion du chromosome 2. Par contre, la position des chiasmas est elle très grandement modifiée par les inversions : les crossing overs, plutôt centraux chez des individus normaux, sont situés de façon plus distales chez les porteurs hétérozygotes. Dans les rares cas où le bivalent montrait un appariement antiparallèle, les chiasmas étaient au contraire situés dans la région centrale des chromosomes. Comme pour le mâle, les crossing overs semblent être supprimés lorsqu'il y a asynapsis ou hétérosynapsis des chromosomes homologues.

III.2.1.2 La localisation des points de cassure joue-t-elle un rôle sur le comportement méiotique des chromosomes ?

La taille du fragment inversé ne serait pas le seul facteur jouant un rôle dans la manière dont les chromosomes homologues s'apparient en présence d'une inversion.

En effet, certaines études soulignent que la localisation des points de cassure est aussi un élément important expliquant le comportement méiotique des chromosomes normaux et inversés. Dès la fin des années 1980, Ashley et son groupe ont émis l'hypothèse que l'appariement des deux homologues chez la souris était affecté par la position des points de cassure, selon qu'ils se produisent dans les bandes G « claires » ou « sombres » du bivalent (Ashley, 1988, 1990). Par la suite, cette hypothèse a été confirmée par des études réalisées chez l'homme (De Perdigo et al., 1989; Martin, 1991).

Par ailleurs, l'étude du comportement méiotique de chromosomes porteurs de différentes inversions a permis de montrer que si les deux points de cassure ont lieu dans des bandes « claires » (G-light ou bandes R), alors le manque d'homologie de séquence d'ADN entre les deux chromosomes est décelé et les homologues répondent en formant (par exemple) une boucle pour réaliser une synapsis correcte. Si, au contraire, un des deux points de cassure survient dans une bande G « sombre » (G-dark), une non-homologie de séquence pourrait ne pas être reconnue, et les chromosomes pourraient s'apparier alors de manière préférentielle par des mécanismes d'hétérosynapsis des régions inversées. De manière plus précise, ce n'est pas seulement la localisation des points de cassure, mais aussi la façon dont les différentes bandes sont juxtaposées au niveau des cassures de la région inversée qui déterminent le comportement méiotique des chromosomes.

En effet, il a été montré que si un point de cassure se trouvait à la limite entre une bande claire et sombre, il pouvait y avoir suppression de l'appariement homologue car une partie de la bande G claire sur un chromosome serait juxtaposée à une bande sombre sur son homologue (Ashley, 1988). De la même manière, si deux bandes claires se superposent à nouveau dans la région inversée, alors la reconnaissance de l'homologie pourrait débiter à cet endroit précis. C'est pourquoi le modèle d'Ashley ne répond pas à la loi du « tout ou rien », et qu'il est possible d'observer la formation de boucles d'inversions partielles (Ashley, 1988, 1990; De Perdigo et al., 1989).

Bien que le ou les mécanismes permettant la détection de ces homologies ou non-homologies de séquence ne soient pas connus, la composition même des bandes claires et sombres semble jouer un rôle.

En effet, il a été montré que les bandes G claires et sombres n'avaient ni la même composition, ni le même comportement mitotique : les régions G claires débutent leur réplication de l'ADN au début de la phase S, contrairement aux régions G sombres (Ganner and Evans, 1971). De même, les bandes claires sont moins compactées (Luciani et al., 1988; Solari, 1980; Stack, 1984) et plus riches en bases G et C et en gènes que les sombres (Chandley, 1986; Holmquist et al., 1982). Ainsi, il est possible que des contraintes physiques de compaction des bandes G sombres ne permettent pas aux complexes protéiques catalysant l'appariement des chromosomes d'avoir accès aux sites d'initiation. Chandley (1986) a par ailleurs émis l'hypothèse que les bandes G claires pouvaient représenter les sites d'initiation de l'appariement et de la recombinaison des chromosomes, à cause de leur réplication précoce. En effet, elle suppose qu'une recombinaison tardive peut amener à des défauts d'appariement localisés et ainsi diminuer les CO dans ces régions. Couplé à l'hypothèse que les bandes G claires sont moins compactées et ainsi plus disponibles aux facteurs protéiques catalysant l'appariement, cela pourrait expliquer pourquoi l'homologie de séquences ne serait pas reconnue si au moins un des points de cassure a lieu dans des régions G sombres.

Malheureusement, une seule autre étude, datant de la fin des années 90, se réfère au modèle d'Ashley pour expliquer ses résultats : en effet, le faible taux de gamètes déséquilibrés identifié dans le cadre de l'étude des ségrégations méiotiques de deux inversions (chromosomes 1 et 8) a été expliqué par la présence d'un point de cassure dans une bande G sombre (Jaarola et al., 1998). Aucune autre donnée plus récente ne permet de tester la validité de l'hypothèse d'Ashley sur le comportement méiotique de chromosomes porteurs d'inversions.

III.2.1.3 Impact des inversions sur la ségrégation méiotique : présence d'un effet inter chromosomique ?

La présence de remaniements peut aussi, dans certains cas, avoir un impact négatif sur la ségrégation d'autres chromosomes non impliqués dans l'anomalie. Ce phénomène, appelé effet interchromosomique, a d'abord été décrit par Lejeune (1963).

Son étude a montré que la présence de régions non appariées dans des bivalents remaniés pouvaient interférer avec d'autres chromosomes, empêchant une ségrégation adéquate des chromosomes et conduisant ainsi à la production de gamètes aneusomiques (disomies ou monosomies pour des chromosomes appartenant à des paires non impliquées dans le remaniement).

La présence d'un effet interchromosomique (ICE) a pu être démontrée dans le cadre de translocations réciproques (e.g. Baccetti et al., 2003; Vozdova et al., 2008) et robertsoniennes (e.g. Anton et al., 2004; Juchniuk de Vozzi et al., 2009). Cependant, d'autres équipes étudiant un potentiel ICE sur le même type de réarrangement ont obtenu un résultat contraire (e.g. Acar et al., 2002; Baccetti et al., 2003; Rives et al., 2003).

Les données connues pour les inversions semblent moins contradictoires : en effet la majorité des cas étudiés n'ont pas montré d'effet interchromosomique sur la ségrégation des chromosomes (e.g. Ferfour et al., 2009; Martin, 1999; Mikhaail-Philips et al., 2004; Vialard et al., 2007). Néanmoins, un cas concernant une inversion du chromosome 9 a montré l'existence d'un ICE chez un porteur de cette anomalie (Amiel et al., 2001).

III.2.2 Production de gamètes génétiquement déséquilibrés

Les chromosomes porteurs d'inversions péri et paracentriques présentent le même comportement méiotique. Dans les deux cas, il n'y aura production de gamètes anormaux que si il y a homosynapsis de la région normale et inversée du bivalent (soit grâce à une boucle, soit par une configuration antiparallèle), et recombinaison(s) dans cette région. Cependant, le type de gamètes génétiquement déséquilibrés produit est totalement différent dans les deux cas.

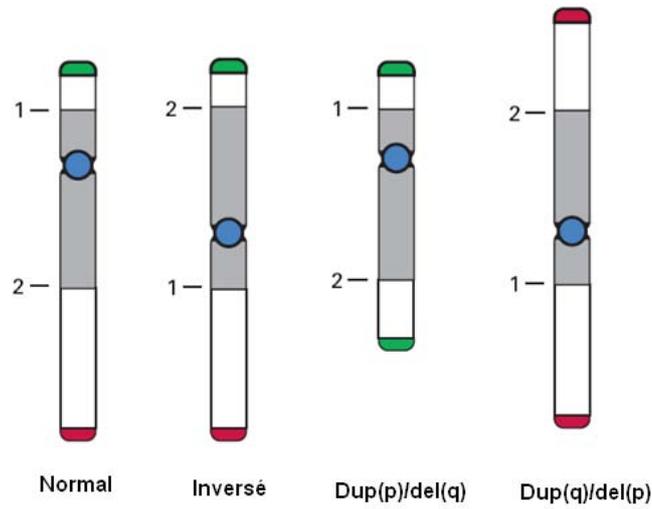


Figure I-37 : Représentation schématique des différents types de chromosomes pouvant être produits en présence d'une inversion péricentrique (d'après Anton et al., 2005).

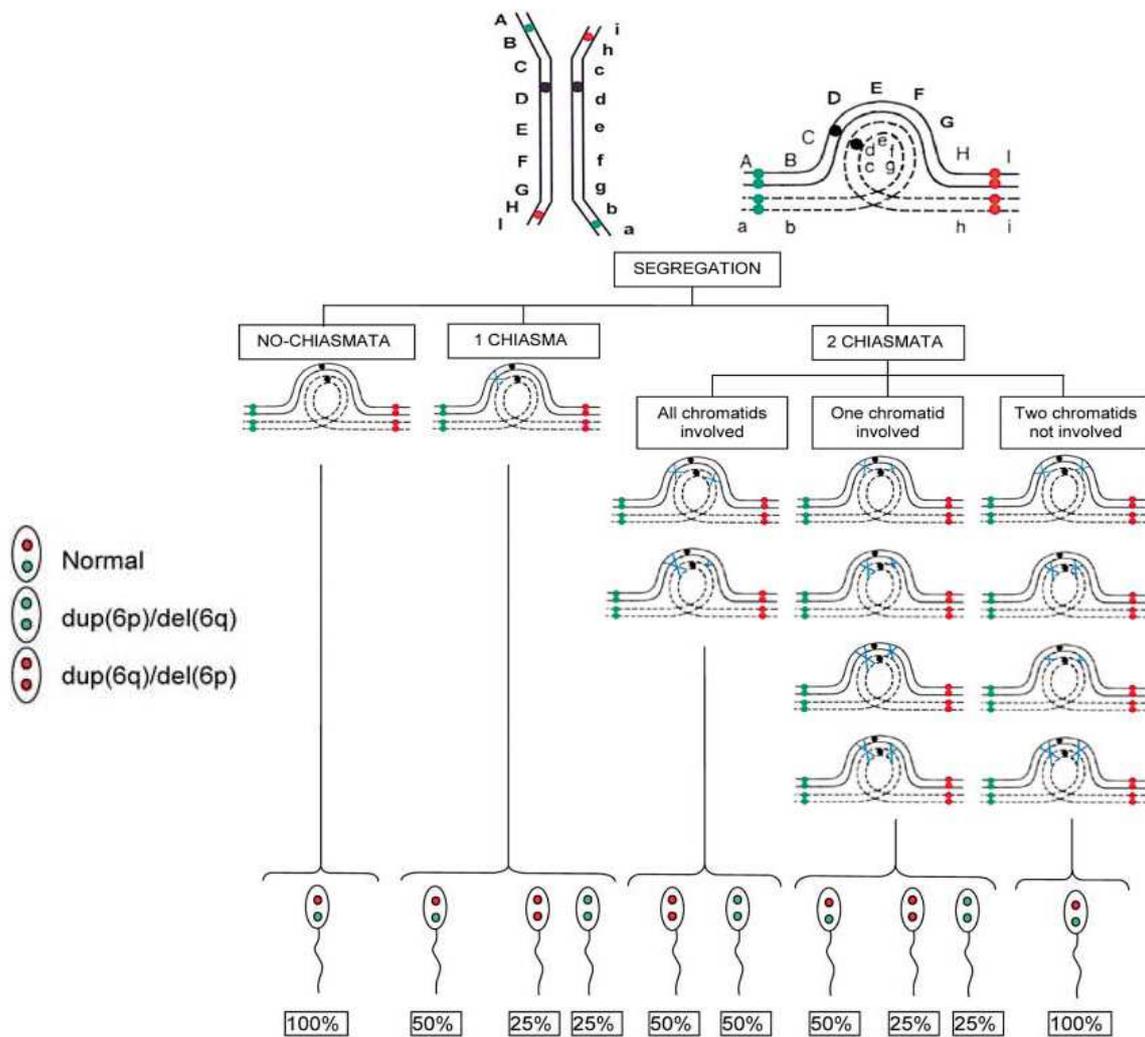


Figure I-38: Représentation schématique des différents crossing overs pouvant se produire dans une boucle d'inversion et du type de gamètes étant produits dans chaque cas. Les proportions obtenues sont aussi indiquées (exemple dans le cas d'une inversion péricentrique du chromosome 6 chez l'homme - d'après Anton et al., 2002).

III.2.2.1 Inversions péricentriques et gamètes déséquilibrés

Dans le cas des inversions péricentriques, les gamètes déséquilibrés présentent des duplications et délétions des fragments chromosomiques ne faisant pas partie de la région inversée.

La présence d'un tel réarrangement peut donc induire la formation de quatre types de gamètes différents : un normal, un porteur d'une chromatide inversée mais qui est équilibré, un présentant une duplication d'une partie du bras p et une délétion d'une partie du bras q, et le dernier présentant une délétion d'une partie du bras p et une duplication d'une partie du bras q (e.g. Chantot-Bastaraud et al., 2007; Morel et al., 2007) (Figure I-37).

S'il suffit d'un crossing over dans la région inversée pour former des gamètes anormaux, la proportion de gamètes déséquilibrés produits varie en fonction du nombre et de la position des chiasmas (e.g. Anton et al., 2002, 2005; Kaiser-Rogers and Rao, 1999) (Figures I-38).

Dans le cas où un nombre impair de chiasmas (un le plus souvent) se produit dans la zone inversée, la moitié des gamètes seront déséquilibrés, les autres posséderont une chromatide normale ou inversée et auront un contenu génétique normal (Chantot-Bastaraud et al., 2007; Jaarola et al., 1998; Morel et al., 2007). Lorsque deux crossing over se produisent, la position des chiasmas sur les quatre différentes chromatides influe sur le nombre de gamètes déséquilibrés produits : tous les gamètes, la moitié ou aucun peuvent être déséquilibrés (Anton et al., 2002; Kaiser-Rogers and Rao, 1999). Il en est de même pour toute autre combinaison de crossing overs, quel que soit leur nombre.

III.2.2.2 Inversions paracentriques et gamètes déséquilibrés

Lorsqu'il y a échange de matériel chromosomique en présence d'inversions paracentriques, des chromosomes acentriques (sans centromère) et dicentriques (avec deux centromères) peuvent être formés (Bhatt et al., 2008; Kaiser-Rogers and Rao, 1999; Madan, 1995; McKinlay-Gardner and Sutherland 2004).

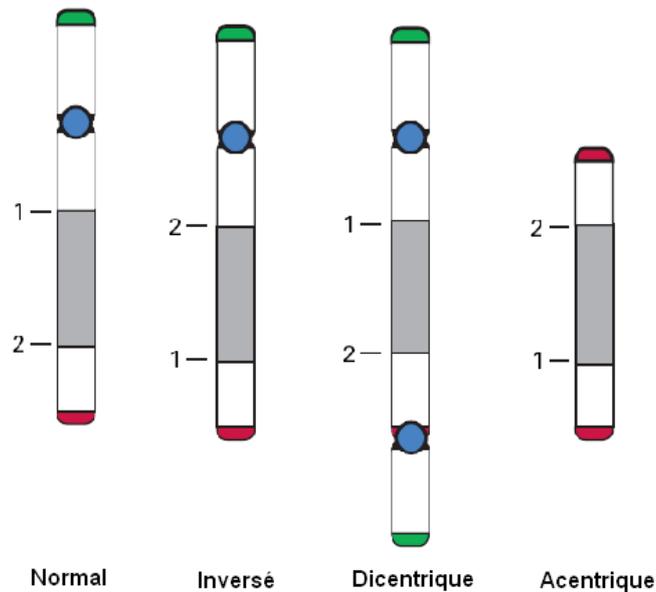


Figure I-39 : Représentation schématique de différents types de chromosomes pouvant être produits en présence d'une inversion paracentrique (d'après Anton et al., 2005).

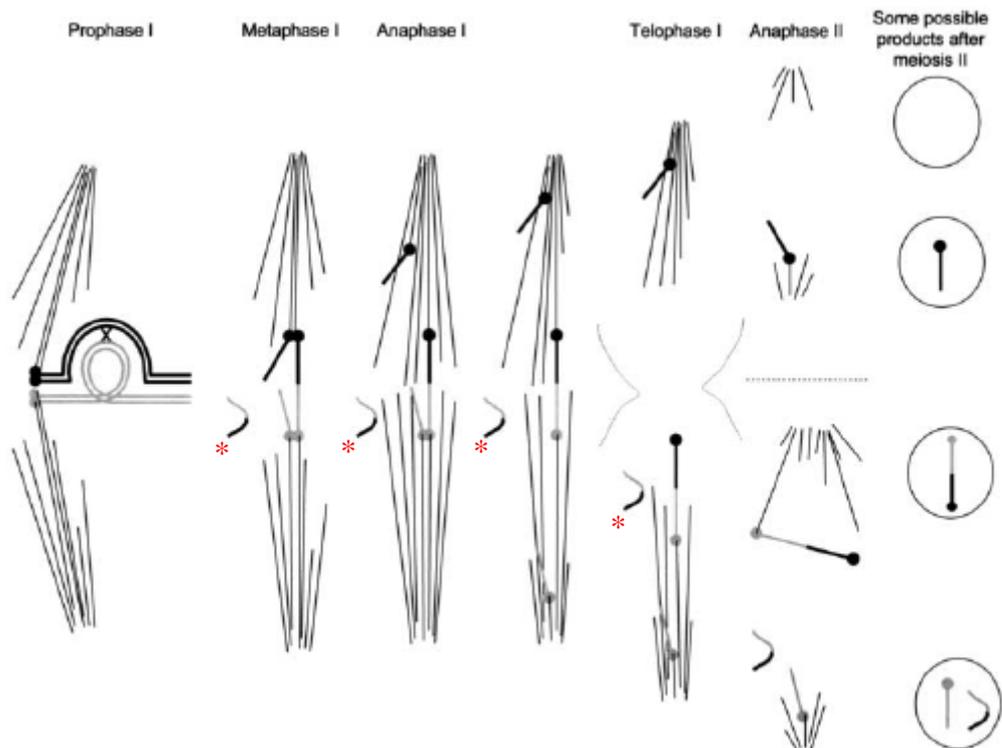


Figure I-40 : Représentation schématique d'une séparation précoce des chromatides sœurs et formation d'un « pont anaphasique », suivies par la ségrégation des chromosomes et chromatides durant la méiose d'une souris femelle porteur hétérozygote d'une inversion paracentrique. Plusieurs types de gamètes possibles sont présentés. (d'après Koehler et al, 2002).

* : fragments acentriques.

Ces chromosomes présentent aussi des duplications et délétions de fragments chromosomiques : duplication du bras ne portant pas l'inversion et délétion du fragment chromosomique extérieur à la région inversée pour les chromosomes dicentriques, l'inverse pour les chromosomes acentriques (Anton et al., 2005)(Figure I-39).

Lors de la ségrégation des chromosomes en anaphase I, la présence de deux centromères sur la chromatide remaniée induit la formation d'un « pont anaphasique » (e.g. Koehler et al., 2002b), empêchant une ségrégation normale du chromosome. En effet, des microtubules s'attachent à chaque kinétochore et exercent une tension sur la chromatide, dans deux sens opposés (Figure I-40). Quatre cas de figure sont alors possibles (pour revue Koehler et al., 2002b; Madan, 1995):

- La tension exercée par les microtubules conduit à la cassure de la chromatide, dont chaque fragment migre dans une cellule fille. Selon l'endroit où la cassure se produit, les gamètes créés seront porteurs de duplications ou délétions plus ou moins importantes.
- La ségrégation de tous les chromosomes est stoppée, donnant naissance à une cellule diploïde.
- Un des deux centromères s'inactive, et la chromatide est incorporée dans son ensemble dans une cellule. Là aussi, les gamètes créés seront porteurs de duplications et délétions.
- La chromatide dicentrique est perdue au cours de la méiose et ne ségrège dans aucune cellule fille. Les gamètes produits ont aussi un contenu génétique déséquilibré.

Les chromosomes acentriques sont quant à eux en grande majorité perdus lors de la ségrégation des chromosomes (Kaiser-Rogers and Rao, 1999; Madan, 1995; McKinlay-Gardner and Sutherland 2004). En effet, ils ne possèdent pas de kinétochores et ne peuvent donc pas migrer dans l'une ou l'autre des cellules filles. Il arrive cependant qu'ils soient incorporés par hasard dans une cellule (Figure I-40). Dans tous les cas, les gamètes formés sont génétiquement déséquilibrés.

Contrairement aux inversions péricentriques, les types de gamètes formés lors de la présence d'un remaniement paracentrique sont plus nombreux et plus complexes du fait de la présence des chromatides dicentriques et acentriques: gamètes portant une chromatide dicentrique ou acentrique, différentes duplications et délétions de la chromatide inversée, voire gamètes portant à la fois une chromatide dicentrique et sa correspondante acentrique (Bhatt et al., 2008; Koehler et al., 2002b; Koehler et al., 2004; Massip et al., 2009).

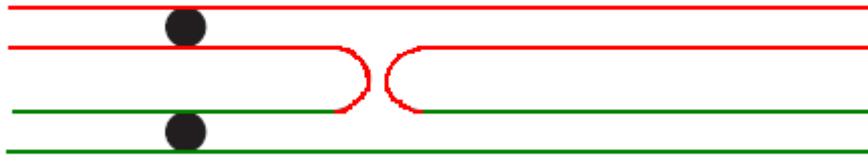


Figure I-41 : Représentation schématique d'un échange en « U » (d'après Anton et al., 2005).

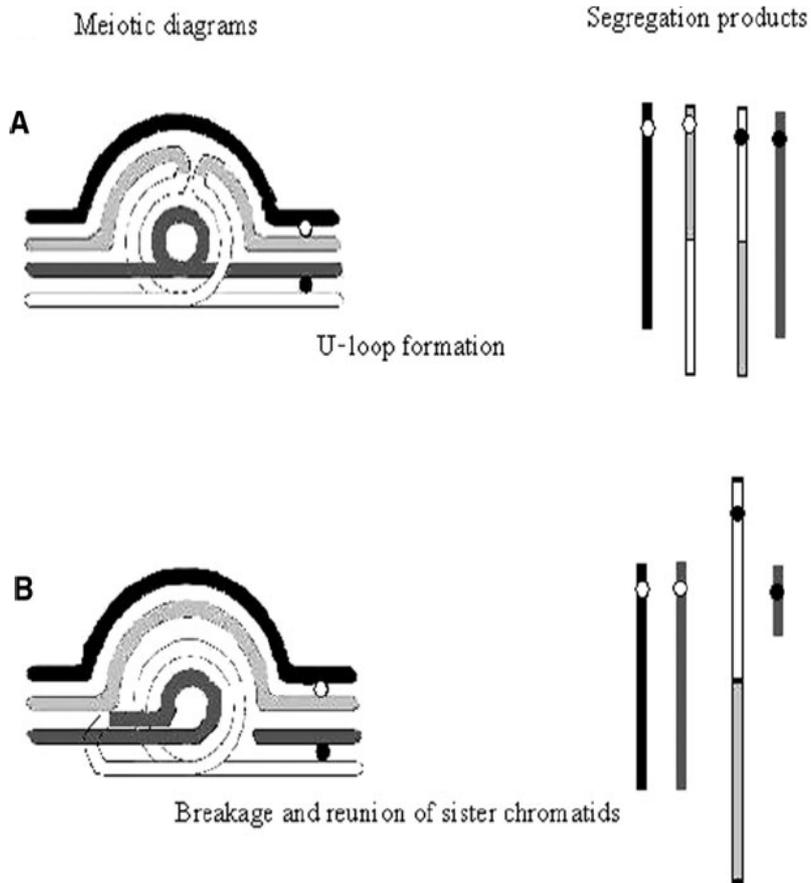


Figure I-42 : Illustration des mécanismes « U-type » et cassure et réunion des chromatides sœurs et produits de ségrégation méiotique associés. (D'après Bhatt et al., 2007).

III.2.2.3 Autres mécanismes de ségrégation

Dans de rares cas, il est possible que des cassures surviennent sur deux chromatides homologues et que leur réunion soit anormale. Deux études d'inversions paracentriques ont ainsi montré la production de chromosomes déséquilibrés inhabituels, comme des duplications en tandem inversées de régions chromosomiques (Feldman et al., 1993; Mitchell et al., 1994). La formation de ces chromosomes particuliers est due à une résolution atypique des cassures doubles brins survenues dans la région inversée : au lieu de se réunir, les fragments appartenant à la même chromatide changent d'orientation et s'unissent à leur homologue, formant une structure « en U » (U-type exchange) (pour revue, Rowe et al., 2009) (Figure I-41). Il ne faut ainsi pas confondre ce mécanisme avec celui d'un crossing over. Outre la formation des types de gamètes précédemment cités, la présence d'un échange en U pour une inversion paracentrique a aussi pour conséquence la création de chromosomes dont une région est dupliquée ou délétée, mais sans formation de fragments acentriques et dicentriques (Figure I-42a) (Bhatt et al., 2007; Bhatt et al., 2008).

Il semble que le mécanisme de formation d'un « U-type exchange » concerne aussi les inversions péricentriques. En effet, au vu du faible taux d'homosynapsis mis en évidence dans l'étude de l'appariement chromosomique chez un homme porteur d'une inversion 13, Saadallah et Hulten (1986) expliquent la présence d'un chromosome 13 remanié dans la descendance du porteur par la mise en place d'un mécanisme d'échange en U plutôt que par la présence de crossing overs dans la région inversée.

Bien que la fréquence de ce phénomène soit inconnue, le très petit nombre d'études ayant mis en évidence la présence de ce mécanisme dans le cas d'inversions permet de penser que l'occurrence d'un échange chromosomique en « U » est très faible.

La présence d'un chromosome 9 recombiné dans la descendance d'un porteur d'une inversion paracentrique a aussi permis de montrer qu'un autre type de recombinaison atypique pouvait avoir lieu. En effet, la duplication partielle du chromosome 9 détectée après l'analyse du caryotype de cet enfant ne pouvait être expliquée ni par les mécanismes « classiques » de ségrégation des chromosomes en présence d'une inversion paracentrique, ni par la formation d'un échange « U-type ».

Ainsi, les auteurs ont proposé un mécanisme nouveau, appelé « cassure et réunion des chromatides sœurs », pouvant expliquer leurs observations phénotypiques (Phelan et al., 1993) (Figure I-42b). Ce cas étant le seul décrit dans la littérature à notre connaissance, il semble que le phénomène de cassure et réunion des chromatides sœurs ne se produise que très rarement dans le cadre des inversions.

III.3 Conséquences cliniques des inversions chez l'Homme

III.3.1 Quelles conséquences pour les enfants d'individus porteurs d'inversion ?

La présence d'une inversion chez un individu entraîne la production de gamètes génétiquement déséquilibrés, présentant des duplications et délétions de fragments chromosomiques plus ou moins importants. En cas de conception impliquant de tels gamètes, la formation d'embryons viables peut conduire à la naissance d'enfants présentant des problèmes de développement ou des troubles physiques et psychologiques plus ou moins sévères. Ainsi, plusieurs cas de descendance présentant différents troubles dus à un déséquilibre chromosomique dérivé d'une inversion ont été recensés dans la littérature : par exemple, deux individus apparentés porteurs de duplication et délétion du chromosome 12 présentaient des signes de sévère retard mental et des anomalies cardiovasculaires (Lagier-Tourenne et al., 2004). De même, la présence d'une duplication partielle du chromosome 18 a été associée à des défauts phénotypiques tels qu'une taille plus petite que la normale, mais aussi à des défauts de l'apprentissage du langage chez un des porteurs (Prontera et al., 2010). Des individus porteurs de remaniements issus d'une inversion paracentrique ont aussi été étudiés. Par exemple, le syndrome du « cri du chat » chez une fillette était dû à la présence chez cette dernière d'un chromosome 5 remanié transmis par sa mère porteuse d'une inversion paracentrique de ce chromosome (South et al., 2006).

Etant donné la grande diversité des inversions, le risque de concevoir un individu viable porteur d'un remaniement est variable. L'évaluation correcte de ce risque est donc l'enjeu majeur du conseil génétique proposé aux patients, et sera détaillée dans un des paragraphes suivants.

III.3.2 Les inversions, cause d'infertilité

Outre le risque de procréation de descendants anormaux, évoqué dans le paragraphe précédent, les inversions ont aussi pour conséquence de diminuer la fertilité des porteurs : leur fréquence est ainsi 13 fois plus élevée dans la sous population d'hommes infertiles que dans la population générale (De Braekeleer and Dao, 1991).

Une étude plus récente a par ailleurs mis en évidence que 8 % d'hommes présentant une oligozoospermie et 6 % de femmes consultant pour des problèmes de fertilité étaient porteurs d'une inversion (Mau-Holzmann, 2005).

La production de gamètes génétiquement déséquilibrés, mais aussi des défauts d'appariement des chromosomes lors de la méiose sont à l'origine des baisses de fertilité observées chez des individus porteurs d'inversion.

III.3.2.1 Inversions et défauts d'appariement des chromosomes

Comme pour les autres anomalies chromosomiques de structure, il a été montré dans de rares cas que la présence d'une inversion pouvait être responsable d'un arrêt précoce de la spermatogénèse. Contrairement aux études menées sur les translocations, les défauts du processus méiotique ne sont pas dus à un appariement du bivalent anormal avec le bivalent sexuel XY (Batanian and Hulten, 1987; Chandley et al., 1987; Gabriel-Robez et al., 1986). Les perturbations de la spermatogénèse seraient au contraire liées au bivalent lui-même : des études menées sur des porteurs d'inversions péricentriques du chromosome 9 ont suggéré que des défauts d'appariement du bivalent (asynapsis) pouvaient être responsables des baisses de fertilité observées chez les porteurs (Croquette et al., 1979; Davalos et al., 2000). Par ailleurs, des études menées chez des porteurs d'une inversion du chromosome 1 ont aussi suggéré que les problèmes de fertilité rencontrés chez ces patients étaient dus à une asynapsis du bivalent pouvant aussi altérer l'appariement des autres chromosomes, conduisant ainsi à un arrêt précoce de la spermatogénèse (Chandley et al., 1987; Gabriel-Robez et al., 1986). Ces résultats semblent être confirmés par une étude menée chez un porteur d'une autre inversion du chromosome 1, où un arrêt précoce de la spermatogénèse au stade spermatocytes I a été observé chez ce patient (Meschede et al., 1994). Ces données laissent penser que, comme dans le cas des translocations, les régions non appariées sont génétiquement réprimées, ce qui entraînerait l'arrêt de la méiose si des gènes importants étaient situés dans ces régions. Cependant, ce mécanisme n'a pas été prouvé dans le cadre des inversions.

**Relation entre la taille relative du fragment inversé (%)
et la proportion de gamètes génétiquement déséquilibrés (%) chez l'homme**

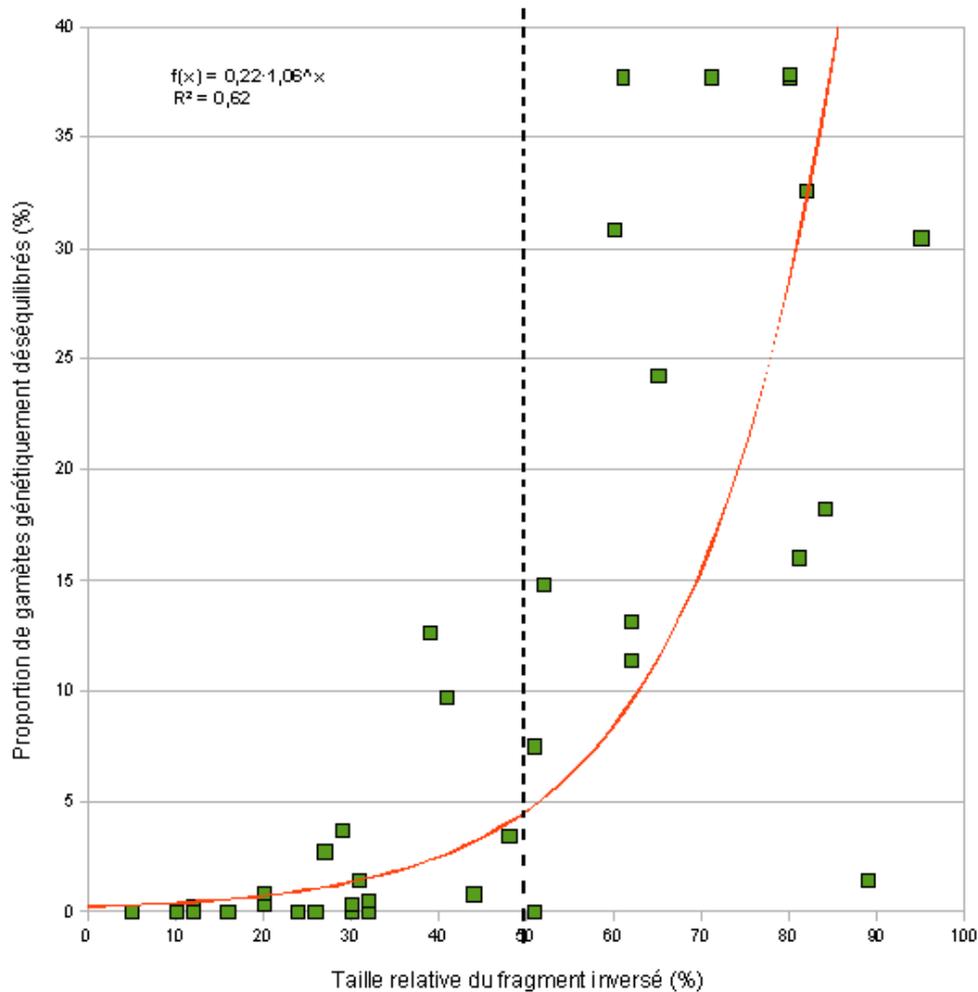


Figure I-43 : Relation entre la taille relative du fragment inversé et le pourcentage de gamètes déséquilibrés produit (inversions péri et paracentriques). Graphique établi à partir des données de la littérature humaine (Anton et al., 2005; Bernicot et al., 2010; Bhatt et al., 2008; Caer et al., 2008; Ferfour et al., 2009; Morel et al., 2007). Lorsque la taille du fragment inversé est inférieure à 50 % de la taille totale du chromosome (ligne de démarcation en pointillés), peu de gamètes anormaux sont produits. Dans le cas inverse, la proportion de gamètes génétiquement déséquilibrés est d'autant plus grande que le fragment inversé est important.

Plus récemment, une étude menée sur plusieurs patients porteurs d'inversions du chromosome 9 a montré que ces dernières pouvaient aussi être à l'origine d'altérations plus ou moins sévères de la morphologie et de la motilité des spermatozoïdes, entraînant ainsi des problèmes de fertilité, sans que cela puisse être expliqué (Collodel et al., 2006).

III.3.2.2 Inversions et production de gamètes génétiquement déséquilibrés

Chez l'homme

Chaque inversion induisant un comportement méiotique particulier, il est difficile de connaître à priori l'impact d'une inversion sur la production de gamètes génétiquement déséquilibrés. Les inversions étant des anomalies de structure relativement peu fréquentes, seulement une vingtaine d'études ont analysé les ségrégations méiotiques en présence d'inversions péri ou paracentriques chez l'homme. Trente inversions péricentriques et dix inversions paracentriques différentes ont ainsi été étudiées (pour revue, Anton et al., 2005; Bernicot et al., 2010; Bhatt et al., 2008; Caer et al., 2008; Ferfour et al., 2009; Morel et al., 2007).

Malgré le nombre réduit de cas documentés, il est possible de tirer quelques conclusions relativement générales des différentes études réalisées. La première est que les proportions de gamètes dupliqués pour la région p et délétés pour la région q ($\text{dup}(p)/\text{del}(q)$) et son contraire ($\text{dup}(q)/\text{del}(p)$) ne diffèrent généralement pas du ratio 1 :1 attendu (par exemple Morel et al., 2007).

La seconde, et la plus importante, concerne l'impact de la taille du fragment inversé sur la production de gamètes génétiquement déséquilibrés : ce paramètre jouant un rôle majeur sur le comportement méiotique des chromosomes, il n'est pas surprenant d'observer qu'il joue aussi un rôle crucial dans la production de gamètes anormaux. Deux études regroupant la majorité des résultats obtenus chez l'homme s'accordent ainsi à montrer qu'il existe une relation statistiquement significative entre la taille du fragment inversé et le pourcentage de gamètes génétiquement déséquilibrés obtenu (Anton et al., 2005; Morel et al., 2007) (Figure I-43).

Cependant, cette relation n'est pas linéaire : en effet, lorsque la taille du fragment inversé représente moins de 50% de la taille totale du chromosome, le taux de gamètes déséquilibrés produit est très faible, et les effets de l'anomalie sont considérés comme négligeables, voire nuls.

Au dessus de ce seuil, par contre, la proportion de gamètes déséquilibrés devient plus importante à mesure que la taille du fragment inversé augmente (pour revue, Morel et al., 2007; Vialard et al., 2007)

En fonction de l'inversion, le pourcentage de gamètes déséquilibrés produits varie ainsi de 0,3% à 52,5% chez l'homme (Anton et al., 2005; Caer et al., 2008; Morel et al., 2007; Vialard et al., 2007).

Chez la femelle

Deux études seulement ont permis d'évaluer la proportion de gamètes génétiquement déséquilibrés chez la femme (par le biais d'analyses d'embryons obtenus après fécondation). Ainsi, l'impact de la présence d'une inversion chez 4 patientes a été étudié : pour l'une d'elles, la présence d'une large inversion du chromosome 5 (environ 85 % de la taille totale du chromosome) est corrélée à une production d'embryons porteurs d'un déséquilibre consécutif à la présence de l'inversion chez la mère dans environ 50% des cas (Iwarsson et al., 1998). La seconde étude a permis d'étudier la proportion d'embryons au contenu génétique déséquilibré chez trois patientes présentant deux inversions du chromosome 2 et une inversion du chromosome 4. Les résultats montrent que 0%, 26% et 33% des cellules analysées présentaient un contenu chromosomique anormal, pour des tailles relatives de fragment inversé d'environ 11%, 30% et 37% respectivement (Escudero et al., 2001). Si ces études semblent être cohérentes avec les données obtenues chez l'homme, les résultats publiés doivent être interprétés avec beaucoup de précaution dans la mesure où une vingtaine de cellules seulement ont été analysées dans chaque cas.

Le très faible nombre d'études peut quant à lui s'expliquer par des considérations éthiques et pratiques : il est en effet beaucoup plus difficile d'obtenir des ovocytes ou des embryons que de la semence masculine, et les traitements à mettre en œuvre pour analyser le contenu chromosomique des gamètes féminins sont beaucoup plus contraignants (pour revue, Vialard and Pellestor, 2008) (cf. paragraphe III.3.3).

Il existe cependant une étude chez la souris, où deux inversions paracentriques représentant chacune environ 80% de la taille totale des chromosomes 19 et X ont été étudiées.

Ces recherches ont permis de montrer que le pourcentage de gamètes génétiquement déséquilibrés produits représentait respectivement 48 % et 54 % du nombre de gamètes étudiés.

Ces études tendent ainsi à montrer que, chez la femelle tout comme chez le mâle, la production de gamètes anormaux est aussi très fortement corrélée à la taille du fragment inversé.

La taille du fragment inversé est donc un paramètre important à considérer dans l'analyse du risque que représente une inversion pour la fertilité des porteurs.

III.3.3 Analyse des risques et solutions proposées aux patients porteurs d'inversion

III.3.3.1 Risques de naissance d'enfants présentant des anomalies phénotypiques

Comme évoqué précédemment, le risque de voir naître un enfant porteur d'anomalies diverses est fortement corrélé à la taille du fragment inversé (Anton et al., 2005; Bocian et al., 2005; McKinlay-Gardner and Sutherland 2004). Ainsi, plus la taille de l'inversion est grande, plus les fragments dupliqués et délétés (fragments hors de l'inversion) seront petits (et les déséquilibres génétiques faibles), rendant possible la formation d'un embryon viable après fécondation d'un gamète remanié. Pour les mêmes raisons, les inversions paracentriques ont un meilleur pronostic concernant la naissance d'enfants anormaux que les péricentriques, car la présence de chromosomes dicentriques ou acentriques empêche la formation d'embryons viables (pour revue, McKinlay-Gardner and Sutherland 2004; Muss and Schwanitz, 2007).

Quelques études ont tenté de quantifier ce risque : cependant, du fait de la très grande hétérogénéité des inversions, les résultats obtenus sont extrêmement variables. Boué et Gallano (1984), pour leur part, estiment que le risque de produire une descendance recombinante viable est très faible, de l'ordre de 1,3%. Au contraire, Daniel et son équipe (1989) ont estimé ce même risque à 10-15% pour des familles ayant déjà un enfant anormal et porteuses d'une inversion de grande taille. D'autres auteurs estiment plutôt que le risque de concevoir un enfant porteur d'anomalies pour des individus présentant une inversion péricentrique particulière se situe entre 6 et 8% (Ayukawa et al., 1994; Smith et al., 1987).

Au vu des différents types de gamètes produits et du faible nombre d'enfants recombinants nés d'un parent porteur d'une inversion paracentrique, le risque de conception d'un individu anormal dans ce cas est très faible, et donc difficilement quantifiable (Daniel et al., 1989; Madan, 1995).

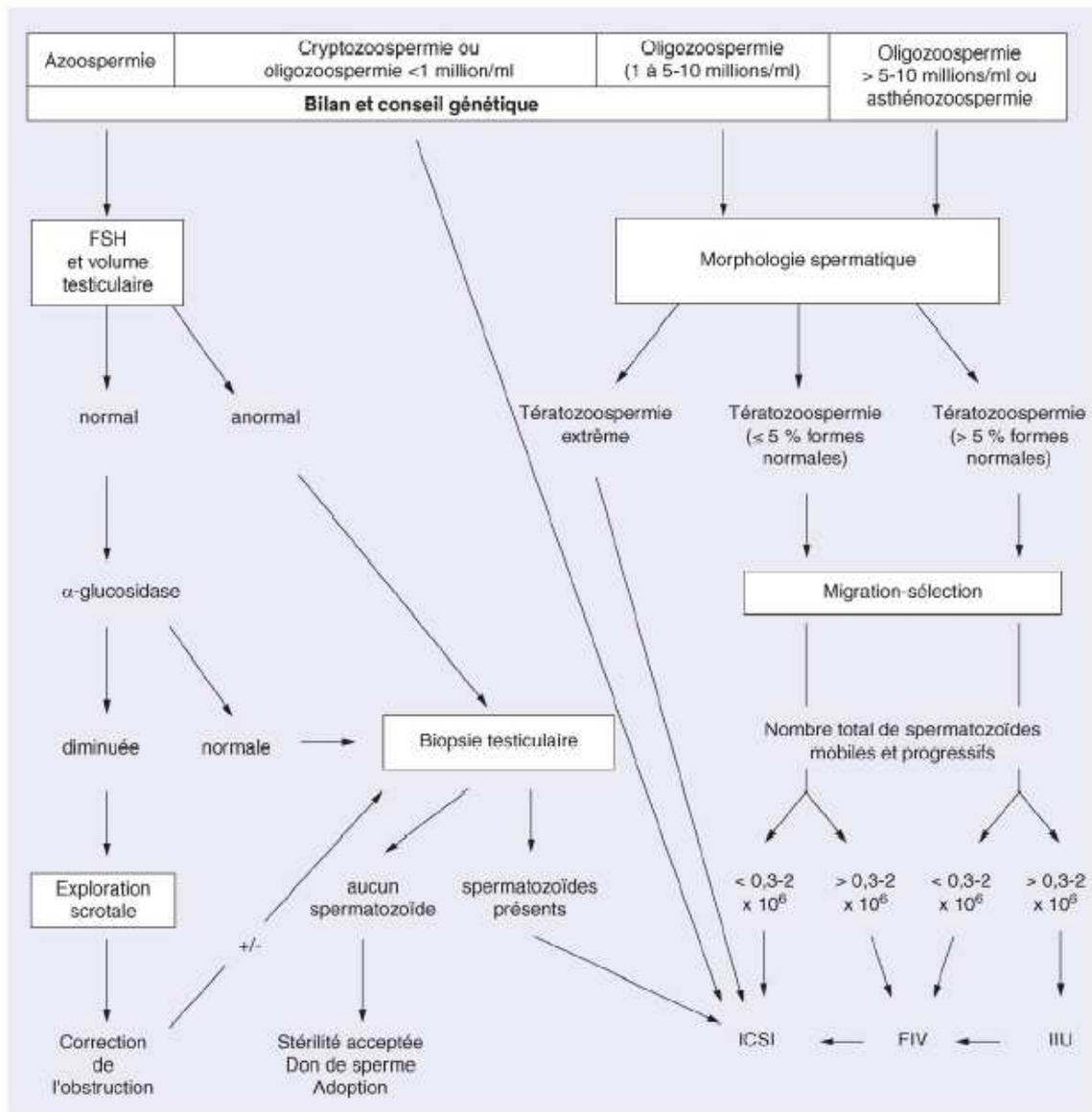


Figure I-44 : Arbre décisionnel ; représentation schématique du processus de prise en charge des azoospermies et oligo-asthéo-tératospermies chez l'homme. (Schlosser et al., 2007).

Dans le cas des inversions des chromosomes sexuels, les risques de concevoir un enfant anormal sont peu importants : pour les inversions du chromosome X, qui sont relativement rares (Madariaga and Rivera, 1997) le risque de produire des individus présentant des anomalies est faible. Si certaines filles peuvent présenter des anomalies de la fonction ovarienne, les garçons porteurs d'un chromosome X recombinant sont normaux (McKinlay-Gardner and Sutherland 2004). Les risques sont quasiment nuls en ce qui concerne les inversions du chromosome Y, ces dernières étant considérées majoritairement comme des polymorphismes (pour revue, Madariaga and Rivera, 1997; McKinlay-Gardner and Sutherland 2004; Toth et al., 1984).

III.3.3.2 Le conseil génétique : un outil personnalisé au service des patients porteurs d'anomalies chromosomiques

La probabilité qu'un individu porteur d'une inversion présente une baisse de fertilité est intrinsèquement liée à la proportion de gamètes génétiquement déséquilibrés pouvant être produits, et, par conséquent au comportement méiotique des chromosomes lors de la méiose. Ainsi, chaque inversion possède son propre risque, et une prise en charge individuelle des couples rencontrant des problèmes de fertilité et dont un des partenaires est porteur d'une inversion est donc nécessaire dans le cadre du conseil génétique.

La prise en charge de couples ayant des difficultés à concevoir se déroule toujours en plusieurs étapes. Tout d'abord, un questionnaire approfondi des deux partenaires est réalisé afin de cerner au mieux les problèmes que ces derniers rencontrent (Kamel, 2010). Par la suite un spermogramme est réalisé pour l'homme, et plusieurs analyses (notamment des dosages hormonaux de LH et FSH) (Figure I-44) sont effectuées chez les deux partenaires afin de détecter d'éventuelles anomalies des paramètres mesurés (Kamel, 2010; Schlosser et al., 2007).

Dans le cas où ces analyses ne permettraient pas de définir la cause de l'infertilité de l'un et/ou l'autre des partenaires, et si le spermogramme réalisé auparavant chez l'homme a mis en évidence une concentration du sperme inférieure à 10 millions/ml (Tableau I-3), un caryotype d'un ou des partenaires est alors recommandé (AUA and ASRM, 2006; McLachlan and O'Bryan, 2010).

paramètres	Valeurs normales	Valeurs anormales
Volume	2 - 6 ml	< 2 ml : hypospermie
Concentration	au moins 20.10 ⁶ spz/ml	< 20.10 ⁶ spz/ml : oligospermie 0 : azospermie
Mobilité	50% de spz avec mobilité progressive	< 50% : asthénospermie
Morphologie	Au moins 30% normaux	< 30 % : tératospermie

Tableau I-3: Paramètres séminaux normaux et anormaux de l'homme, définis par l'organisation mondiale de la santé (WHO, 1992).

Mise en place du diagnostic

En présence d'une inversion, plusieurs facteurs doivent être pris en compte par le personnel médical avant de proposer toute procréation médicalement assistée (PMA) (par exemple McKinlay-Gardner and Sutherland 2004) : la présence d'enfants normaux ou anormaux au sein de la famille, le type et la taille de l'inversion, le chromosome impliqué et la localisation des points de cassure en font partie. Dans le cas où un ou plusieurs enfants anormaux sont présents, un caryotype de chaque individu est aussi réalisé. Dans le cas où les anomalies seraient difficiles à détecter par l'analyse en bandes, d'autres techniques permettent d'établir un diagnostic. Par exemple, une duplication et une délétion de fragments chromosomiques sur le chromosome 20 ont pu être détectés chez trois frères et sœurs par l'utilisation de la technique MPLA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) et d'une puce SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (Stevens et al., 2009).

Afin de déterminer de façon précise les risques pour un porteur mâle de concevoir des enfants anormaux, l'étude du pourcentage de gamètes génétiquement déséquilibrés produit par cet individu est une étape cruciale (Anton et al., 2006; Bernicot et al., 2010; Malan et al., 2006; Sarrate et al., 2010). En fonction des résultats obtenus, plusieurs stratégies peuvent être mises en place.

- Si le pourcentage de gamètes génétiquement déséquilibrés est faible (de zéro à quelques pour cent), et si de plus l'inversion mise en évidence chez l'individu fait partie de celles considérées comme des polymorphismes, alors le risque lié à l'utilisation de techniques de PMA dépasse souvent celui de l'inversion en lui-même. Dans ce cas, il est préférable de ne pas intervenir de façon médicale (Ferfour et al., 2009) même si un diagnostic prénatal peut être réalisé.

- Dans le cas d'un porteur d'une inversion paracentrique la conduite à adopter semble vraiment devoir s'adapter au cas par cas : au vu des résultats obtenus par leurs équipes, certains considèrent que les inversions paracentriques n'induisent aucun risque, et estiment qu'aucun suivi médical n'est nécessaire (Madan, 1995; Vialard et al., 2007).

Cependant, l'existence d'individus viables porteurs de remaniements chromosomiques dus à la présence d'une inversion paracentrique chez un de ses parents tend à remettre en cause l'innocuité de ces anomalies, et souligne l'importance que peut avoir dans certains cas la mise en place d'un conseil génétique (Yang et al., 1997).

- Si la proportion de gamètes anormaux est plus élevée, et/ou si des enfants anormaux sont déjà nés et dans le cas où les qualités de semence du porteur seraient dégradées, alors la mise en place d'un protocole de procréation médicalement assisté se justifie.

Techniques de procréation médicalement assistée (PMA)

La technique préférentiellement utilisée dans ce cas est appelée Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI). Mise au point dans les années 90, elle consiste à introduire un spermatozoïde unique dans un ovocyte (Palermo et al., 1992). Elle est utilisée lorsque les patients présentent par exemple des anomalies sévères de leur spermogramme, des infertilités « obstructives » (pour revue, Bonduelle et al., 1999; Schlosser et al., 2007) ainsi que pour des patients porteurs de réarrangements chromosomiques (par exemple Bernicot et al., 2010; Van Assche et al., 1999).

Cependant, l'utilisation de l'ICSI (ou de la fécondation in vitro- FIV) élimine tout effet de la sélection naturelle et peut accroître les risques d'anomalies chromosomiques ou génétiques du futur embryon par la sélection d'un gamète porteur de réarrangements (Gekas et al., 2001; Schlosser et al., 2007). Ce problème est d'autant plus important chez des individus présentant des anomalies chromosomiques. C'est pourquoi un diagnostic préimplantatoire (DPI) doit être réalisé afin d'écarter tout risque de production d'enfants anormaux (pour revue, Basille et al., 2009; Simpson, 2010).

Le DPI

Le diagnostic préimplantatoire, mis au point lui aussi dans les années 90 (Handyside et al., 1990) consiste à analyser le contenu chromosomique ou génétique d'une ou deux cellules embryonnaires prélevées par biopsie généralement trois jours après fécondation, afin de n'implanter que les embryons indemnes d'anomalies. L'analyse du premier ou second globule polaire des ovocytes peut aussi être réalisée avant une fécondation (Altarescu et al., 2008; Verlinsky et al., 1996). On parle dans ce cas de diagnostic pré-conceptionnel (DPC).

Pour les femmes porteuses d'anomalies chromosomiques, le DPI ou le DPC sont par ailleurs les seules méthodes permettant l'analyse du risque de transmission de gamètes déséquilibrés, étant donné que l'analyse d'ovocytes à grande échelle est irréalisable (Chantot-Bastaraud et al., 2007).

En ce qui concerne les individus porteurs d'inversion, la mise en place d'un diagnostic préimplantatoire dans le cadre d'une PMA a déjà été réalisée.

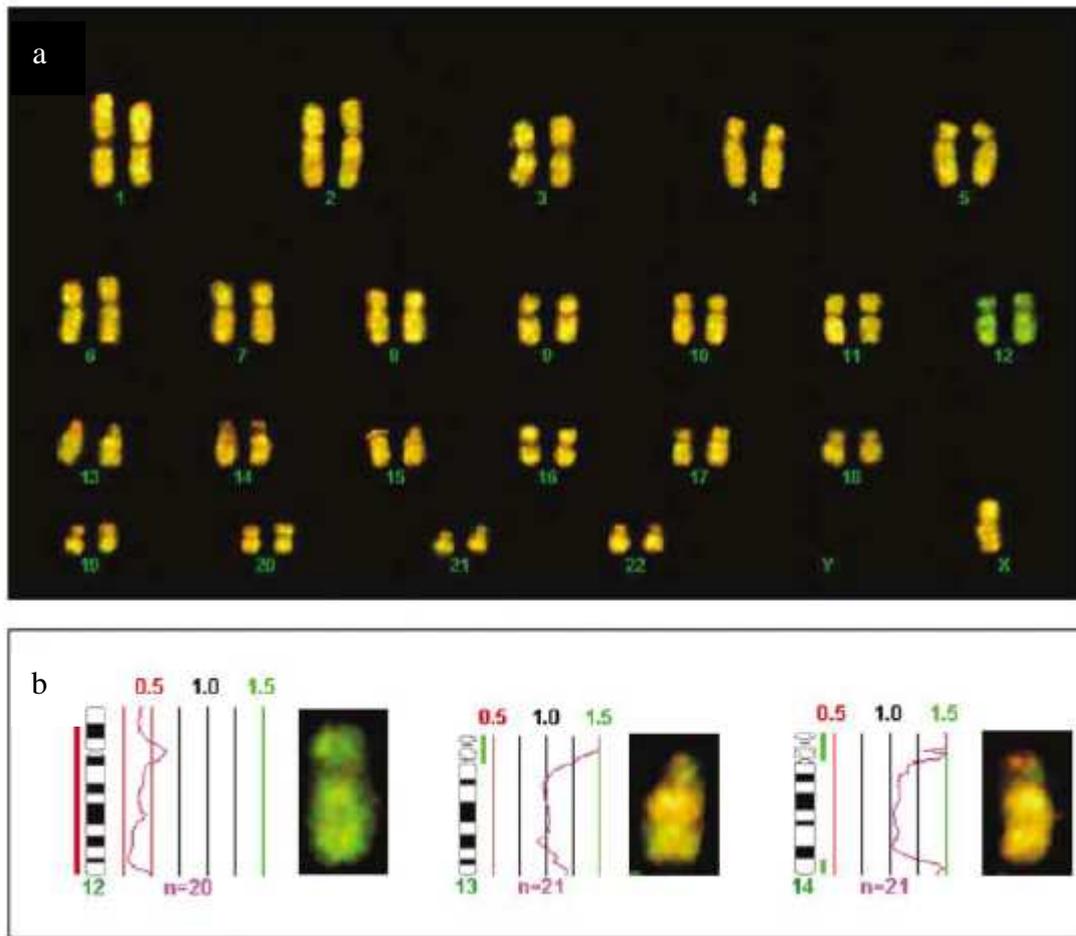


Figure I-45: Image CGH d'un globule polaire issu d'une patiente porteuse d'une translocation robertsonienne (13;14) (d'après Gutierrez-Mateo et al., 2005).

a: Caryotype complet. La paire de chromosomes 12 apparait plus verte que les autres.

b: Profils CGH des chromosomes 12, 13 et 14. Les ratios de fluorescence (fluorescence verte par rapport à fluorescence rouge) sont proches de 1 pour les chromosomes 13 et 14 : le nombre de copie de ces chromosomes est normal dans cette cellule. Au contraire, le ratio de fluorescence est inférieur à 1 pour le chromosome 12, indiquant une perte de matériel chromosomique dans le globule polaire étudié.

Pour connaitre plus précisément le principe de la technique, se référer à l'Annexe II.

Malgré des échecs (Malan et al., 2006), l'implantation de ces embryons à permis dans certains cas la naissance de bébés présentant des caryotypes normaux/équilibrés (Anton et al., 2002; Escudero et al., 2001). L'analyse génétique des cellules est réalisée par diverses techniques, la plus répandue étant l'Hybridation *In Situ* en Fluorescence (FISH - cf. Annexe II) de sondes spécifiques de fragments chromosomiques. C'est la technique de référence pour mettre à jour des anomalies chromosomiques potentielles (Basille et al., 2009). La technique de PCR (Polymérase Chain Reaction) permet quand à elle de déterminer la présence de mutations géniques connues, ou de marqueurs indirects de ces anomalies. La limite de cette technique réside dans l'amplification de l'ADN de l'unique cellule étudiée, quand normalement une PCR demande la présence d'une plus grande quantité d'ADN (Burllet et al., 2005).

L'utilisation de puces nucléotidiques contenant les principales régions mutées du génome humain sont d'ores et déjà des outils intéressants pour le diagnostic des maladies génétiques (Salvado and Cram, 2007), même si pour l'instant, l'utilisation de ces puces ADN n'est pas possible à partir du contenu d'une seule cellule.

Depuis quelques années, la CGH (comparative genomic hybridization - cf. Annexe II) est aussi utilisée dans le cadre du diagnostic préimplantatoire. Son grand avantage par rapport à la FISH est de permettre une analyse complète du caryotype de la cellule, et non plus quelques chromosomes particuliers (pour revue Wilton, 2002). Son utilisation est cependant encore limitée du fait de la longueur de sa mise en œuvre, mais a déjà fait ses preuves dans le cadre d'une translocation robertsonienne (Figure I-45) (Gutierrez-Mateo et al., 2005). Là aussi, l'utilisation récente de la CGH sur puce (CGH microarrays - Annexe II) permet d'améliorer considérablement la technique (Hellani et al., 2008; Hu et al., 2007; Johnson et al., 2010). Le seul désavantage important de la CGH est l'impossibilité de détecter des anomalies chromosomiques équilibrées (Basille et al., 2009).

Limites de la PMA

Bien que la mise en place d'une reproduction médicalement assistée permette à des couples présentant des problèmes de fertilité de concevoir, il ne faut pas oublier que les techniques utilisées sont complexes, délicates à mettre en œuvre et ne sont pas un gage de succès systématique de grossesse (pour revue, Basille et al., 2009; Johnson et al., 2010; Kamel, 2010). Un diagnostic prénatal est d'ailleurs souvent proposé aux parents afin de confirmer les résultats obtenus par le DPI (AUA and ASRM, 2006; Basille et al., 2009).

De plus, les impacts psychologiques de ces traitements sont loin d'être négligeables et se doivent d'être pris en compte, notamment par un suivi psychologique particulier (Flis-Treves et al., 2003; Karatas et al., 2010a; Karatas et al., 2010b).

III. 4 Conséquences zootechniques des inversions chez le porc

Chez le porc, du fait du faible nombre de cas documentés, très peu d'informations concernant les conséquences méiotiques des inversions sont disponibles : les premiers résultats d'analyse directe de la ségrégation méiotique chez des verrats porteurs d'inversions sont ceux présentés dans le cadre de cette thèse. Par ailleurs, une seule étude a montré qu'il n'y avait pas de baisse de prolificité chez des femelles inséminées avec de la semence d'un mâle porteur hétérozygote d'une inversion du chromosome 4, suggérant que cette anomalie n'avait pas d'effet sur la fertilité du porteur (Ducos et al., 1997b).

Les données concernant le comportement méiotique des chromosomes en présence d'inversion sont elles aussi très limitées : l'étude de l'appariement des chromosomes a été réalisée une seule fois avant les travaux développés dans ma thèse. Elle concernait une inversion paracentrique du chromosome 8 ($inv(8)(p1.1;p2;2)$). La majorité des cellules étudiées présentait une hétérosynapsis de la région inversée, et aucune boucle d'inversion n'a pu être détectée. Ces résultats sont cohérents avec la taille du fragment inversé, qui représentait seulement 8% de la taille totale du chromosome (Switonski et al., 1998).

De plus, aucune étude de ségrégation ou appariement méiotique chez la femelle n'a été réalisé dans l'espèce porcine.

En résumé

Les inversions sont les anomalies de structure les moins fréquemment décelées chez l'Homme. Bien que la majorité d'entre elles soient considérées comme des polymorphismes ou sont retrouvées fréquemment dans plusieurs familles, un nombre non négligeable d'inversions apparaissent spontanément et sont référencées comme des cas uniques.

Les inversions, tant péri- que paracentriques, entraînent une modification du comportement des chromosomes impliqués lors de la méiose, et peuvent donc être responsables d'une production plus ou moins importante de gamètes génétiquement déséquilibrés.

Le facteur de variation le plus important à prendre en compte concernant l'impact de ces réarrangements sur la fertilité des porteurs est la taille du fragment inversé. Cependant, la localisation des points de cassure est aussi un facteur à considérer.

La mise en place d'un conseil génétique adapté, au cas par cas, est donc très important, afin d'évaluer au mieux les risques que représente une inversion en terme d'impact sur la fertilité et de risque de conception d'enfants anormaux. Un suivi médical pouvant inclure un diagnostic préimplantatoire sera alors proposé si cela s'avère pertinent.

Très peu de cas d'inversions ont été documentés dans l'espèce porcine et très peu de données sont donc disponibles concernant l'impact de ces réarrangements chromosomiques sur les performances de reproduction des porteur

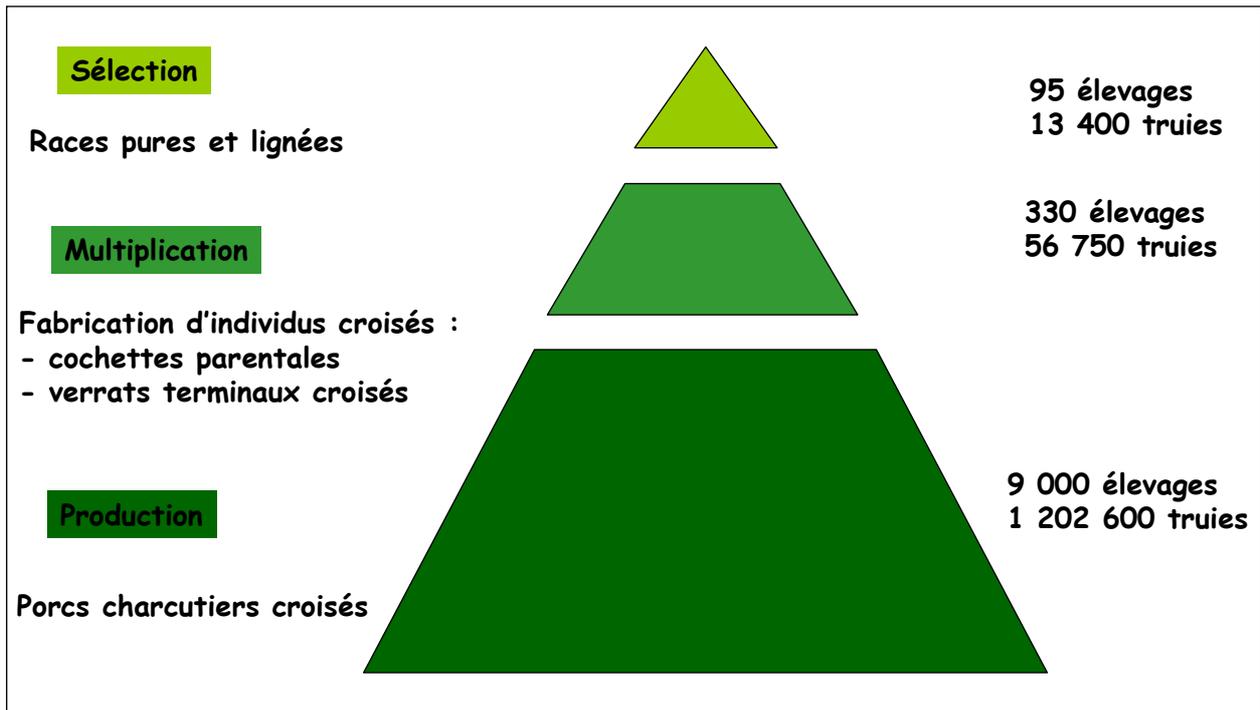


Figure II-1 : Schéma représentant l'organisation pyramidale de la sélection porcine en France (année 2008 - IFIP).

Encadré 1 : La sélection porcine en France

La filière porcine française est organisée de manière pyramidale, où l'on peut distinguer 3 étages successifs : sélection, multiplication et production (Figure II-1): Les élevages assurant la sélection se situent au sommet de la pyramide. Ils assurent à eux seuls la création du progrès génétique des races sélectionnées. Ils approvisionnent les étages inférieurs ainsi que les centres d'inséminations artificielles (CIA) en reproducteurs (Jussiau et al., 2006).

Les élevages de multiplication assurent les croisements entre races pures sélectionnées afin de répondre aux besoins en reproducteurs des producteurs formant la base de la pyramide. Les animaux produits à cet étage sont très souvent issus d'un schéma de croisement à double étage. Quatre races porcines sont principalement sélectionnées. Il s'agit des races Large White Femelle et Landrace pour les lignées maternelles (à l'origine de 9 truies parentales sur 10), et Large White mâle et Piétrain pour les lignées paternelles (Jussiau et al., 2006). D'autres populations sont aussi exploitées, comme des races locales (porc Basque, porc de Bayeux...) ou des lignées composites détenues de manière exclusive par une seule entreprise de sélection. La sélection de ces populations est réalisée par des Organismes de Sélection Porcine (OSP) agréés par le ministère de l'agriculture (au nombre de 12 au 31 décembre 2009). Une partie de ces OSP (NUCLEUS, GENE+, ADN) adhèrent à « l'association des livres généalogiques porcins collectifs » (LGPC) afin de mettre en place un programme de sélection collective encadré par l'IFIP (institut du porc) et l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique). La base de la pyramide contient la majorité des élevages français qui produisent les animaux destinés à la consommation humaine. Ces derniers, appelés « porcs charcutiers », sont abattus à un poids d'environ 110kg atteint à l'âge de 5-6 mois (Jussiau et al., 2006).

Chapitre 2 – Données expérimentales

I. Introduction : objectifs de la thèse

Dès les années 60, l'utilisation de techniques classiques de cytogénétique a permis de détecter les premières anomalies chromosomiques chez des animaux d'élevage : une translocation robertsonienne chez les bovins (Gustavsson and Rockborn, 1964), et une translocation réciproque chez le porc (Henricson and Backstrom, 1964). La mise en relation de ce type d'anomalies chromosomiques avec une dégradation des aptitudes à la reproduction des animaux porteurs ou de leurs conjoint(e)s (Gustavsson 1980a) s'est traduite par un essor important de la cytogénétique animale à cette période. Parallèlement, de nombreuses anomalies chromosomiques de nombre ou de structure ont été mises en évidence, dans les espèces bovine et porcine principalement (Ducos et al., 1997a; Popescu and Legault, 1979; Stranzinger and Forster, 1976). Afin de limiter la diffusion de ces anomalies, responsables de pertes importantes au niveau économique pour les élevages (Popescu and Tixier, 1984), les acteurs des filières de productions animales ont été incités à mettre en place un contrôle chromosomique des populations.

Au début des années 1990, le principal dispositif de contrôle chromosomique des populations porcines en vigueur était basé sur la détection des verrats « hypoprolifiques » par l'intermédiaire de la base de données de gestion technique des troupeaux de truies (GTTT). Le développement important de l'insémination artificielle à la même période a progressivement conduit les responsables de centres d'insémination artificielle (CIA) et d'organisations de sélection porcine (OSP) à faire contrôler une partie de leurs reproducteurs avant leur mise en service (essentiellement des verrats de race pure à l'étage de sélection - cf. encadré « La sélection porcine française » - Figure II-1). Aujourd'hui, ces animaux représentent plus de 90 % des individus contrôlés (Ducos et al., 2008). De façon à limiter l'utilisation de verrats terminaux porteurs d'anomalies chromosomiques, une troisième stratégie de contrôle, complémentaire des deux précédentes, a été mise en œuvre.

Encadré 2 : conséquences économiques de la présence d'une inversion dans un élevage porcin

En utilisant les données zootechniques et économiques récentes sur la filière porcine, il est possible d'estimer la perte économique potentiellement engendrée par une baisse de prolificité dans le troupeau.

Prenons le cas d'un porteur d'une inversion dont la taille du fragment inversé est de 70 % de la taille totale du chromosome. En utilisant comme références les données humaines, le pourcentage théorique de gamètes génétiquement déséquilibrés produit se situe autour de 25 %. En sachant que la cause majoritaire de baisse de prolificité est due à la production de gamètes anormaux, on peut estimer que la taille de la portée produite sera réduite de 25 %. Prenons une moyenne de porcelets nés vivants dans des conditions normales : 11 (moyenne en fonction de différents types génétiques - Canario et al., 2006).

La présence d'une inversion chez l'un ou l'autre des parents entraîne donc une perte de 3 porcelets par portée. Le prix d'un porcelet à 8 kg étant de 34 € environ (semaine du 16 au 20 Aout 2010- <http://www.ifip.asso.fr>), la perte sèche de l'éleveur est de 102 €. Cependant, le manque à gagner est plus important si l'on considère que ces 3 animaux ne seront pas vendus en tant que porcs charcutiers. A un prix de 1,20 € /kg de carcasse pour un porc charcutier (prix moyen, semaine du 16 au 20 Aout 2010- <http://www.ifip.asso.fr>), le manque à gagner de l'éleveur se chiffre à 100 € environ pour un animal (pour une moyenne de poids de carcasse de 83 kg), environ 300 € pour les trois.

Dans le cas où le porteur de l'anomalie serait le mâle, il faut multiplier ce montant par autant de truies inséminées par sa semence : la perte en terme de chiffre d'affaire pour l'éleveur peut alors se chiffrer à plusieurs milliers d'euros (par exemple pour 20 truies : 6000 €).

Une nouvelle disposition, adoptée en Commission Nationale d'Amélioration Génétique, a été ajoutée à l'arrêté de 1998 définissant les règles d'agrément des verrats d'IA : les animaux issus de portées de faible taille (un des parents et cinquante pour cent des individus de la portée sont susceptibles d'être porteurs d'une anomalie chromosomique) doivent, pour obtenir l'agrément, être déclarés « non porteurs d'anomalie chromosomique après analyse effectuée avec une technique de coloration en bandes des chromosomes ». Les seuils ont été fixés à six porcelets pour les types génétiques paternels et à sept pour les types génétiques maternels (Ducos et al., 2007).

Aujourd'hui, la très grande majorité des analyses de caryotype, représentant un volume de 2000 individus analysés par an, sont réalisées au laboratoire de Génétique Cellulaire au sein de l'UMR 444 INRA-ENVT ou j'effectue ma thèse (Ducos et al., 2008). Depuis sa mise en place, le contrôle chromosomique a permis de détecter 146 réarrangements originaux dans notre laboratoire (statistiques du laboratoire ; Ducos et al., 2007; Ducos et al., 2002).

Seulement quelques uns sont des inversions (cf. paragraphe partie bibliographique, III.1.2), et très peu d'études documentent l'impact de telles anomalies sur les performances de reproduction des porteurs (ou de leurs conjointes). Or, une estimation simple (cf. encadré « conséquences économiques de la présence d'une inversion dans un élevage porcin ») montre que la présence d'une inversion chez un verrot ou une truie pourrait induire de graves conséquences économiques pour un éleveur.

L'objectif de mon travail de thèse est donc double. Il consiste, grâce à l'étude du processus méiotique à :

- **estimer les effets potentiels d'inversions sur la reproduction (recherche appliquée),**
- **apporter de nouvelles connaissances sur le déroulement de la méiose en présence de ces anomalies (recherche fondamentale).**

En effet, dans le cas des translocations réciproques (les effets délétères de ces anomalies étant connus) les individus porteurs sont systématiquement exclus du schéma de sélection et réformés. Mais quelle attitude doit-on adopter lorsque l'animal est porteur d'une inversion ? Le recul dont nous disposons à l'heure actuelle étant très limité, un « principe de précaution » prévaut et il est conseillé aux sélectionneurs d'écarter aussi ces animaux du schéma de sélection.

Cependant, dans le cas où un individu porteur présente un fort potentiel génétique, ou lorsqu'une telle anomalie est détectée dans une race à petits effectifs, la question de la pertinence d'une réforme peut se poser. S'il s'avère que l'effet induit par l'inversion est minime sur la fertilité de cet individu, ne serait-il pas plus intéressant de diffuser sa semence ?

Pour tenter de répondre à ces questions, comprendre les mécanismes liés à la production de gamètes génétiquement déséquilibrés (principale cause des problèmes de reproduction) est crucial. Plusieurs études ont donc été menées afin d'analyser :

- **les paramètres influençant la production de gamètes anormaux.**
- **le comportement méiotique des chromosomes lors des phases précoces de la méiose.**

Par ailleurs, malgré les connaissances acquises, des considérations techniques et éthiques chez l'Homme rendent plus difficile certaines investigations concernant l'impact des inversions sur la reproduction. De par sa facilité d'élevage et sa structure chromosomique proche de celle de l'Homme, le porc pourrait être considéré comme un modèle animal pertinent dans le cadre de nos études, comme cela est déjà le cas dans d'autres domaines de la recherche biologique (pour revue, Litten-Brown et al., 2010). Les connaissances obtenues pourraient ainsi nous permettre d'apporter des éléments de réponses importants aux interrogations suivantes :

- **Quelle est l'influence réelle du sexe du porteur sur le processus méiotique en présence d'inversion ?**
- **Existe-t-il une variation inter (entre individus apparentés) ou intra-individuelle (au cours du temps) de l'impact d'une inversion sur la fertilité des porteurs ?**

Le principe et les protocoles détaillés des techniques utilisées dans le cadre de mon travail de thèse sont présentés dans les Annexes II et III.

II. Etude de l'effet de différents facteurs influençant la production de gamètes déséquilibrés dans le cas des inversions

II.1. Présentation de l'article

L'article « Male meiotic segregation analyses of peri- and paracentric inversions in the pig species », paru dans *Cytogenetic and Genome Research* (2009 ;125:117-12) présente les résultats obtenus dans le cadre de l'analyse des ségrégations méiotiques de six verrats porteurs chacun d'une inversion différente.

Il est le premier, à notre connaissance, à documenter l'impact de la présence d'une inversion sur la ségrégation méiotique des chromosomes chez le porc.

Trois inversions du chromosome 1 et trois inversions du chromosome 2 ont été analysées. Toutes présentaient des tailles de fragments inversés différentes : de 8% à 86% de la taille totale du chromosome impliqué. De même, deux d'entre elles (une inversion du chromosome 1 et une inversion du chromosome 2) étaient paracentriques. Pour une inversion du chromosome 2 (inv(2)(p1.1;q1.1)), des échantillons de sperme disponibles pour deux animaux non apparentés ont pu être étudiés.

Les analyses ont été effectuées par la technique du SpermFISH en utilisant des sondes de BACs télomériques (bras p et q) des chromosomes 1 et 2 (cf. Annexes II et III).

Les pourcentages de gamètes déséquilibrés obtenus pour les deux animaux porteurs de l'inv(2)(p1.1;q1.1) étant similaires, aucun impact du fond génétique de l'animal sur la production de gamètes anormaux n'a pu être démontré.

Pour toutes les inversions étudiées, les pourcentages de gamètes génétiquement déséquilibrés produits étaient compris entre 0,6% et 4%, suggérant un impact faible de ces réarrangements sur la fertilité des porteurs. De plus, la comparaison des résultats avec les données connues chez l'Homme nous ont permis de montrer que pour l'espèce porcine, la taille du fragment inversé n'est pas corrélée à la proportion de gamètes génétiquement déséquilibrés produits. En effet, les pourcentages de gamètes anormaux obtenus après analyse des deux plus grandes inversions (71% et 86% de la taille totale du chromosome) sont seulement de 3% et 1,2%, respectivement. Afin d'expliquer ces résultats, l'hypothèse selon laquelle le comportement méiotique des chromosomes diffère de celui observé chez l'Homme a été avancée. Afin de la vérifier, des études des phases précoces de la méiose chez des porteurs d'une inversion du chromosome 4 ont été menées : les résultats sont présentés dans le second article.

II.2 Article

Male Meiotic Segregation Analyses of Peri- and Paracentric Inversions in the Pig Species

K. Massip N. Bonnet A. Calgaro S. Billoux V. Baquié N. Mary
A. Bonnet-Garnier A. Ducos M. Yerle A. Pinton

UMR INRA-ENVT Génétique Cellulaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France

Key Words

Pericentric inversions · Paracentric inversions · Pig · Sperm FISH · Meiotic segregation

Abstract

Inversions are well-known structural chromosomal rearrangements in humans and pigs. Such rearrangements generally have no effect on the carriers' phenotype. However, the presence of an inversion can lead to spermatogenesis impairments and to the production of unbalanced (recombinant) gametes, responsible for early miscarriages, stillbirth, or congenital abnormalities. Sperm samples from boars heterozygote for pericentric $inv(2)(p1.1;q1.1)$, $inv(2)(p1.1;q2.1)$, $inv(1)(p2.1;q2.10)$, or $inv(1)(p2.4;q2.9)$, as well as for paracentric $inv(2)(q1.3;q2.5)$ or $inv(1)(q1.2;q2.4)$ were analyzed using sperm FISH (fluorescent in situ hybridization on decondensed sperm heads) to determine the male meiotic segregation profiles of the rearrangements. Furthermore, the availability of sperm samples for 2 unrelated carriers of $inv(2)(p1.1;q1.1)$ allowed us to check for the occurrence of inter-individual variability of the rates of unbalanced meiotic products for this rearrangement. The estimated proportions of recombinant gametes were very low for all the inversions studied (0.62%, 1.30%, 3.05%, 1.27%, 4.12% and 0.84%, respectively), albeit significantly higher than the control. The

rearrangements should therefore have very little impact on the reproductive performance of the carriers. No difference was found between the 2 carriers of $inv(2)(p1.1;q1.1)$, suggesting a lack of inter-individual variability for this rearrangement. Overall, no significant correlation was found between the sizes of the inverted fragments and the proportions of recombinant (unbalanced) gametes for the 6 inversions studied. This is in contradiction with most human results. Further studies (pairing and recombination analysis using immunostaining techniques) should be carried out to elucidate the origin of such an inter-species difference.

Copyright © 2009 S. Karger AG, Basel

Inversions are intrachromosomal rearrangements formed when a chromosome breaks in 2 places and the material between the 2 breakpoints reverses orientation [Kaiser-Rogers and Rao, 1999]. If the breakpoints lie on either side of the centromere, the inversion is called 'pericentric'. In the other case, inversions are called 'paracentric'. If we exclude the relatively frequent inversions having a breakpoint within the heterochromatic regions of chromosomes 1, 9, 16 and Y, which are commonly considered as variants and not abnormal chromosomes [Anton et al., 2005], inversions are relatively rare rearrangements in humans. Estimates of frequency range from

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2009 S. Karger AG, Basel
1424-8581/09/1252-0117\$26.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/cgr

Alain Pinton, UMR 444 INRA-ENVT Génétique Cellulaire
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
23 chemin des Capelles, BP 87614, FR-31076 Toulouse Cedex 3 (France)
Tel. +33 5 61 19 39 23, +33 6 18 51 60 35, Fax +33 5 61 19 39 24
E-Mail a.pinton@envt.fr

about 0.012% to 0.07% for pericentrics, and from about 0.01% to 0.05% for paracentrics [McKinlay-Gardner and Sutherland, 2004]. In pig populations, the estimated prevalence is 0.06% for pericentric inversions, and 0.03% for paracentrics [Ducos et al., 2007].

Usually, both para- and pericentric inversions are phenotypically harmless, but the presence of an inversion can occasionally lead to severe reproductive disorders. On the one hand, chromosomal pairing abnormalities can occur during meiosis-I in heterozygotes, leading to spermatogenesis impairments [De Braekeleer and Dao, 1991]. On the other hand, inversions can be responsible for the production of genetically unbalanced gametes. For instance, depending on the nature of the chromosome involved, the size of the inverted fragment and the location of the breakpoints, an inversion loop can be formed [Anton et al., 2005]. If an odd number of crossovers occur within the loop, recombinant chromosomes can be produced, leading to duplications or deletions of p-arm or q-arm fragments located outside the inversion [Morel et al., 2007]. Depending on the nature (size and genetic content) of the duplicated/deleted regions, unbalanced gametes can be responsible for early miscarriages, stillbirth, or congenital abnormalities [Madan, 1995; Lefort et al., 2002].

Although many cases of inversions have been described in man [Madan, 1995; Pettenati et al., 1995; Anton et al., 2005; Morel et al., 2007] as well as in pigs [Ducos et al., 2007], only few studies have reported on the analysis of chromosome segregation of pericentric [Anton et al., 2005; Malan et al., 2006; Chantot-Bastarud et al., 2007; Morel et al., 2007; Caer et al., 2008] or paracentric [Devine et al., 2000; Anton et al., 2006; Bhatt et al., 2007, 2009; Vialard et al., 2007] inversions. Fluorescent in situ hybridization on decondensed sperm nuclei (sperm FISH) using a combination of telomeric probes has become the state-of-the-art technique to assess the segregation patterns of inversions in man [Anton et al., 2007; Vialard et al., 2007; Caer et al., 2008].

This sperm FISH technique was used for the first time in the pig species to assess the segregation patterns of 6 different inversions: 2 pericentric and 1 paracentric inversions of chromosome 1, as well as 2 pericentric and 1 paracentric inversions of chromosome 2. A putative inter-individual variation of the segregation patterns was also studied using sperm samples from 2 different animals carrying the same pericentric inversion of chromosome 2. Our results were compared with previous human data.

Material and Methods

Animals

Four pericentric inversions, i.e. $inv(2)(p1.1;q1.1)$, $inv(2)(p1.1;q2.1)$, $inv(1)(p2.1;q2.10)$ and $inv(1)(p2.4;q2.9)$, as well as 2 paracentric inversions, i.e. $inv(2)(q1.3;q2.5)$ and $inv(1)(q1.2;q2.4)$ (fig. 1) were identified in young pedigree boars examined before use in artificial insemination centers. All the boars entering French artificial insemination centers undergo semen examination (determination of concentration, motility, and morphology parameters in fresh standardized – diluted – semen samples) in a single French laboratory (Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs, Maisons-Alfort) before being subjected to cytogenetic analysis. Only the boars presenting ‘favorable’ (i.e. within a normal range) semen parameters are subsequently karyotyped in our laboratory [National Cytogenetic Screening Programme – Ducos et al., 2008]. We can therefore state that all the boars used in the present study had normal semen parameters. Unfortunately, more accurate information could not be obtained from the owners. Raw sperm samples were taken at the age of 6 months and sent to our laboratory for meiotic segregation pattern analyses. These samples were subsequently stored at -20°C (one sperm sample per individual). For $inv(2)(p1.1;q1.1)$, sperm samples of 2 unrelated individuals were available, allowing the investigation of a potential inter-individual effect. Meiotic segregation pattern analysis was also carried out for a boar presenting a normal karyotype, as negative control.

Fluorescence in situ Hybridization

Preparation of the Probes: Segregation patterns were assessed using dual-color sperm FISH. A combination of 2 probes located on the p- and q-arm distal regions of each chromosome of interest (SSC1 or SSC2) was defined.

Probes were selected using recent data from the pig genome sequencing project (http://pre.ensembl.org/Sus_Scrofa/index.html) [Hubbard et al., 2007]. Each probe consisted of 1 or 2 BACs (Bacterial Artificial Chromosome).

These BACs were obtained from the Biological Resources Center – GADIE (<http://www.crb.jouy.inra.fr/>) [Rogel-Gaillard et al., 1999]. All the BACs used in this study are presented in table 1. For each combination, probes 1 and 2 were labeled with biotin and digoxigenin, respectively. Labeling of the probes was carried out using random priming, as previously described [Pinton et al., 2004]. Specificity of the probes was first tested on lymphocyte metaphases. As an example, the location of the telomeric probes used to analyze the 2 pericentric inversions of chromosome 1 is presented in figure 2.

Sperm Preparation, Hybridization and Signal Analyses: Sperm preparation and hybridization were carried out according to the protocol described by Pinton et al. [2004]. Biotin-labeled probes were revealed in red using Streptavidin coupled to Alexa 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Digoxigenin-labeled probes were revealed by a mouse anti-digoxigenin antibody coupled to FITC (Sigma, St Louis, MO, USA).

The slides were analyzed under a Zeiss microscope fitted with a triple bandpass filter. Only sperm heads presenting signals of equivalent intensity and separated by a distance of at least the size of one signal were counted. As an illustration, fluorescent phenotypes of sperm heads observed in the case of $inv(2)(q1.3;q2.5)$ are shown in figure 3.

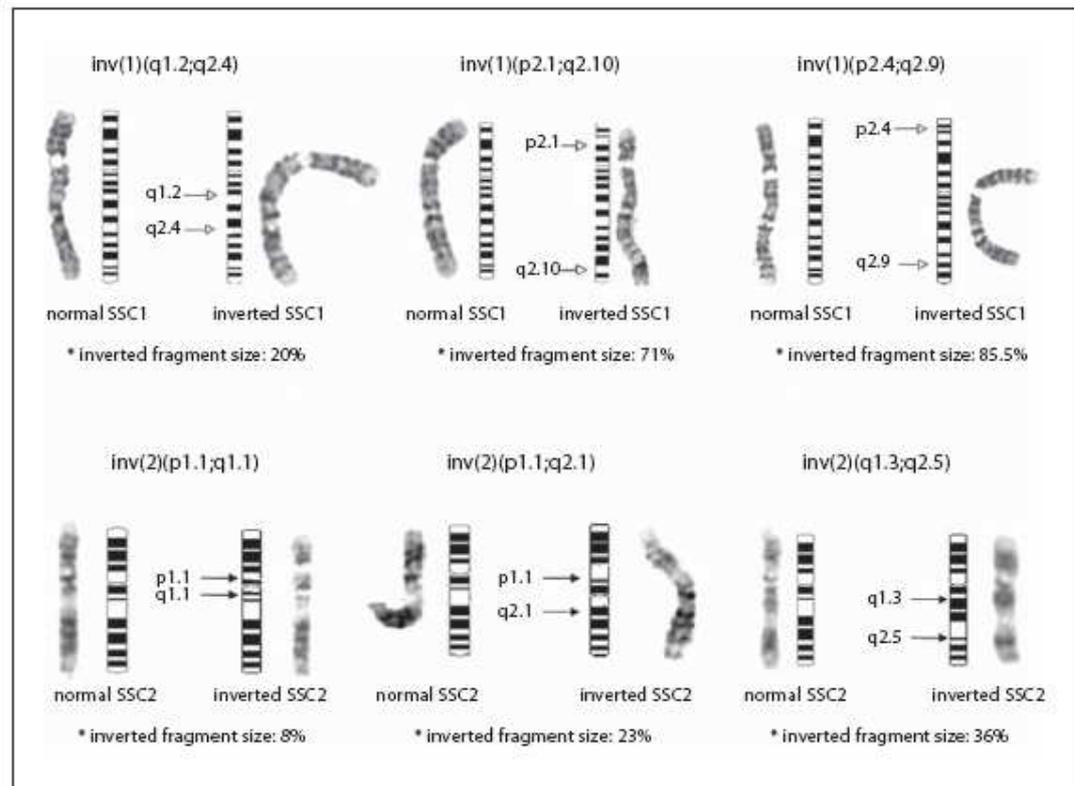


Fig. 1. Characterization of the different inversions studied. * Percentage of the total chromosome length.

Table 1. References and locations of the telomeric probes used in the present study

Chromosome	BAC reference	Location on the chromosome	Inversions studied
SSC1	597F6	p2.5	inv(1)(p2.4;q2.9); inv(1)(p2.1;q2.10); inv(1)(q1.2;q2.4)
	824G4	q2.10	inv(1)(p2.4;q2.9); inv(1)(q1.2;q2.4)
	670B11	q2.13	inv(1)(p2.1;q2.10)
SSC2	512B7	p1.6	inv(2)(p1.1;q1.1); inv(2)(p1.1;q2.1); inv(2)(q1.3;q2.5)
	654B1	p1.6	inv(2)(p1.1;q1.1); inv(2)(p1.1;q2.1); inv(2)(q1.3;q2.5)
	486F5	q2.6	inv(2)(p1.1;q1.1); inv(2)(p1.1;q2.1); inv(2)(q1.3;q2.5)

About 3000 sperm heads were analyzed for each experiment. For a given sperm sample, meiotic segregation pattern analyses were carried out twice (2 experiments) to check the reliability of the experiments, except for inv(1)(p2.1;q2.10) and the negative control (1 experiment).

Statistical Analysis

Classical χ^2 tests were carried out using the R software [R Development Core Team, 2007] to assess the reliability of our experiments, as well as to compare the proportions of unbalanced gametes between the inversion carriers and the control, or between the 2 carriers of inv(2)(p1.1;q1.1). The same software was used to estimate the correlation between the size of the inverted fragments and the proportion of unbalanced gametes produced.

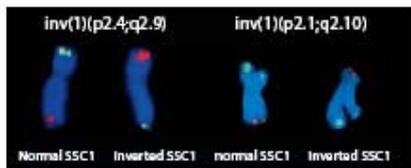


Fig. 2. Location of the telomeric probes used for meiotic segregation analysis of *inv(1)(p2.4;q2.9)* and *inv(1)(p2.1;q2.10)*, after hybridization on lymphocyte metaphases and revelation in 2 colors.

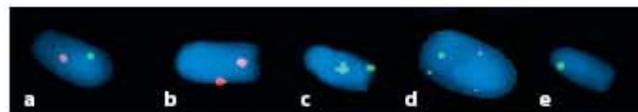


Fig. 3. Examples of fluorescent phenotypes of sperm heads obtained after hybridization and probe revelation – *inv(2)(q1.3;q2.5)*. **a** Balanced sperm (normal or inverted chromosome). **b** *del(p)/dup(q)* unbalanced sperm. **c** *del(q)/dup(p)* unbalanced sperm. **d** Diploid or disomic sperm. **e** *del(q)/dup(p)* fragment (due to the break of a dicentric chromosome).

Table 2. Proportions of unbalanced gametes for all the inversions studied

Chrom.	Inversions	Inverted fragment size % (Mb)	Percentage of unbalanced gametes	Normal/ inverted (%)	<i>del(p)</i> - <i>dup(q)</i> (%)	<i>del(q)</i> - <i>dup(p)</i> (%)	Disomic/ diploid (%)	Others (%) ^a	Total
SSC1	Paracentric	20 (56)	0.79	3000 (99.21)	3 (0.10)	6 (0.20)	6 (0.20)	9 (0.30)	3024
	<i>inv(1)(q1.2;q2.4)</i>		0.89	3003 (99.14)	7 (0.23)	4 (0.13)	6 (0.20)	10 (0.33)	3029
	Total		0.84	6003 (99.17)	10 (0.17)	10 (0.17)	12 (0.20)	19 (0.31)	6053
	Pericentric	71 (199)	3.05	2926 (96.95)	41 (1.36)	43 (1.42)	8 (0.27)		3018
	<i>inv(1)(p2.1;q2.10)</i>								
	Pericentric	86 (241)	1.22	3006 (98.78)	18 (0.59)	16 (0.53)	3 (0.10)		3043
	<i>inv(1)(p2.4;q2.9)</i>		1.31	3003 (98.69)	16 (0.53)	20 (0.66)	4 (0.13)		3043
	Total		1.27	6009 (98.73)	34 (0.56)	36 (0.59)	7 (0.12)		6086
SSC2	Pericentric	8 (13)	0.47	2987 (99.53)	5 (0.17)	5 (0.17)	4 (0.13)		3001
	<i>inv(2)(p1.1;q1.1)</i>		0.53	2997 (99.47)	5 (0.17)	5 (0.17)	6 (0.20)		3013
			0.86 ^b	3001 (99.14) ^b	8 (0.26) ^b	9 (0.30) ^b	9 (0.30) ^b		3027 ^b
	Total		0.62	8985 (99.38)	18 (0.20)	19 (0.21)	19 (0.21)		9041
	Pericentric	23 (36)	1.23	2971 (98.77)	16 (0.53)	18 (0.60)	3 (0.10)		3008
	<i>inv(2)(p1.1;q2.1)</i>		1.36	2967 (98.64)	17 (0.57)	20 (0.66)	4 (0.13)		3008
	Total		1.30	5938 (98.70)	33 (0.55)	38 (0.63)	7 (0.12)		6016
	Paracentric	36 (56)	3.84	2926 (96.16)	19 (0.62)	51 (1.68)	14 (0.46)	33 (1.08)	3043
	<i>inv(2)(q1.3;q2.5)</i>		4.40	2936 (95.60)	22 (0.72)	54 (1.76)	25 (0.81)	34 (1.11)	3071
	Total		4.12	5862 (95.88)	41 (0.67)	105 (1.72)	39 (0.64)	67 (1.10)	6114
Negative control			0.23	3007 (99.77)	3 (0.10)	2 (0.07)	2 (0.07)		3014

^a Unbalanced gametes formed only with paracentric inversions: *del(q)/dup(p)* fragment + one normal/inverted chromosome, or *del(q)/dup(p)* fragment alone.

^b Second animal.

In italics: results obtained for the second experiment (2 different experiments performed from the same sample).

Results

The meiotic segregation results obtained for the 6 inversions studied are summarized in table 2.

The proportions of unbalanced gametes estimated for the 2 experiments carried out for all the inversions (except *inv(1)(p2.1;q2.10)*) from the same sperm sample (same in-

dividual) were systematically similar (p values >0.9 – table 2), indicating that our analyses were reliable. Therefore, the data obtained in the 2 experiments were systematically pooled to increase the sample size and to improve the accuracy of further statistical comparisons.

As shown in table 2, the proportions of unbalanced gametes produced by the 2 unrelated carriers of *inv(2)*

(p1.1;q1.1) were 0.50% (average of the 2 experiments carried out for animal 1) and 0.86% (animal 2), respectively. These results were not statistically different ($p = 0.59$). We can therefore hypothesize that there was no inter-individual variation of the meiotic segregation patterns for this particular rearrangement. As a consequence, only the average proportions (for instance 0.62% for unbalanced gametes – table 2) will be considered further.

The proportion of unbalanced gametes estimated for each of the 6 inversions studied (average value of all experiments) was compared to the proportion estimated for the negative control. These proportions were statistically different (inversion > control) in all cases ($p < 0.05$). We can therefore postulate that all the inversions result in a slight increase in the production of unbalanced gametes.

Some results obtained for paracentric $inv(2)(q1.3;q2.5)$ differed from those observed for the other inversions. On the one hand, the percentage of $del(q)$ - $dup(p)$ gametes (i.e. dicentric chromosome) was twice as high as the proportion of the symmetrical $del(p)$ - $dup(q)$ ones (i.e. acentric chromosome). Such a distortion between symmetrical segregation products was not observed for the other inversions studied (neither the pericentrics, nor the other paracentric of chromosome 1). On the other hand, the average percentage of disomic/diploid cells for this paracentric $inv(2)(q1.3;q2.5)$ was 0.64%, i.e. more than 3 times higher than the percentages obtained for all the other inversions studied and the negative control.

Finally, as indicated in table 2, the inverted fragment sizes differed strongly between the 6 inversions studied (from 8% to 86% of the total chromosome length or from 13 to 241 Mb). In comparison, the estimated percentages of recombinant gametes were much less variable. The correlation coefficient between the inverted fragment sizes (in Mb) and the percentages of recombinant gametes was not statistically different from zero (0.18).

Discussion

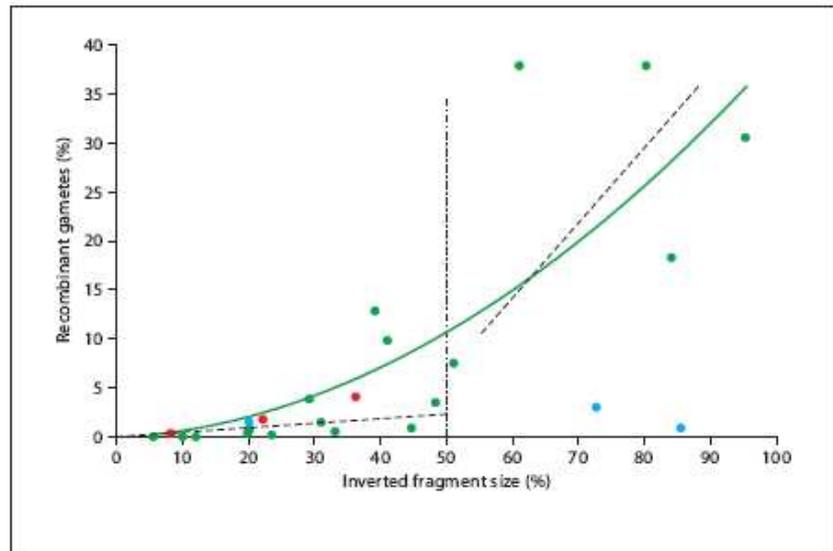
As in humans, the prevalence of balanced constitutional structural chromosomal rearrangements is quite high in the pig species (0.5%) [Ducos et al., 2008]. Amongst these rearrangements, the most frequent are reciprocal translocations. Several meiotic studies of reciprocal translocations have been carried out and published so far in pigs [Pinton et al., 2004; Massip et al., 2008]. They revealed relatively high rates of unbalanced gametes (from

24.3% to 48.4%). The present study, however, is the first to provide meiotic segregation results for inversions in pigs. All 6 rearrangements considered in the present study give rise to very low rates of unbalanced gametes, which should result in very moderate effects on the reproductive performance of the carrier boars. Other inversions should be analyzed in pigs in order to appreciate the generality of such results.

The two unrelated carriers of $inv(2)(p1.1;q1.1)$ produced similar proportions of recombinant gametes. Thus, the meiotic behavior of this particular rearrangement seems to be independent of the familial origin of the cases. However, the effect of $inv(2)(p1.1;q1.1)$, i.e. the estimated proportion of unbalanced gametes produced, was very low. This was probably the result of the very small size of the inverted fragment. Therefore, the conclusion drawn for this particular rearrangement (lack of inter-individual variability) may not be valid for other inversions involving larger inverted fragments. Such a comparison between meiotic segregation patterns of different individuals carrying the same inversion has never been carried out in humans. It should therefore be very worthwhile to take advantage of the breeding opportunities offered by animal species (pig for instance) to carry out this kind of comparison for larger inversions resulting in higher rates of unbalanced gametes.

It is now well-established that acentric chromosomes, produced only in cases of paracentric inversions are frequently lost during meiosis, because of the lack of the centromere [Anton et al., 2005]. This could explain the low percentage of acentric ($del(p)$ - $dup(q)$) gametes compared to the rate of dicentric ($del(q)$ - $dup(p)$) spermatozoa found in our study for $inv(2)(q1.3;q2.5)$. However, such a result was not observed for the other paracentric inversion studied ($inv(1)(q1.2;q2.4)$). The very low overall rate of recombinant gametes estimated for the latter rearrangement (0.84%) could explain the apparent discrepancy between the 2 paracentric inversions studied. Otherwise, the average percentage of disomic/diploid cells estimated for paracentric $inv(2)(q1.3;q2.5)$ (0.64%) was higher than the percentages obtained for all the other inversions studied and the negative control, and also much higher than those reported in other studies in pigs (between 0.02% and 0.17%) [Pinton et al., 2004, 2005; Massip et al., 2008]. A very few macrocephalic spermatozoa were observed in this case, but also in the other cases. Therefore, this cannot fully explain the observed differences. On the other hand, this result could be explained by the paracentric nature of the inversion.

Fig. 4. Schematic representation of the relationship between the inverted fragment size and the percentage of recombinant gametes. In blue: data from the present study (inversions of chromosome 1). In red: data from the present study (inversions of chromosome 2). In green: data from human sperm FISH studies – peri- and paracentric inversions [review of Anton et al., 2005; Morel et al., 2007; Caer et al., 2008; Bhatt et al., 2009]. Dotted lines: linear adjustments inferred below and above the 50% inverted fragment size threshold. Green line: non-linear adjustment inferred from the whole data.



Indeed, it is now commonly accepted that the presence of a dicentric chromosome can disturb the chromosome segregation during anaphase: the 2 centromeres of a dicentric chromosome migrate in opposite directions and form a bridge. If the bridge does not break, then the segregation of the chromosome could be altered, inducing the formation of disomic or diploid cells [Madan, 1995]. However, despite a comparable inverted fragment size, such results were not observed for the other paracentric *inv(1)(q1.2;q2.4)* inversion studied. Comparison of our results with human data is impossible because such disomic/diploid cell ratios are generally not clearly indicated in human studies.

Overall, our results suggest that there is no significant correlation (0.18, NS) between the sizes of the inverted fragment and the proportions of recombinant (unbalanced) gametes. This is in contradiction with most human results [Anton et al., 2006; Morel et al., 2007; Bhatt et al., 2009]. More precisely, the human data suggest that the relation between the rates of recombinant gametes and the inverted fragment sizes is not linear (fig. 4). Indeed, the production of unbalanced gametes seems to remain low as long as the inverted fragment sizes are lower than 50%, and to increase rapidly beyond this threshold [Malan et al., 2006; Morel et al., 2007; Vialard et al., 2007]. Our results for the 4 smallest inversions studied, involving inverted fragment sizes up to 36% of the total chromosome length, are in accordance with the human literature. This is clearly not the case for the 2

largest chromosome 1 inversions studied, i.e. *inv(1)(p2.1;q2.10)*, and *inv(1)(p2.4;q2.9)*, involving very large chromosome fragments (71% and 86%, respectively) but resulting in the production of very low proportions of recombinant gametes (3.05% and 1.27%, respectively – table 2). However, these results are in accordance with earlier observations in pigs in the case of a pericentric inversion of chromosome 4 (*inv(4)(p1.4;q2.3)*) [Ducos et al., 1997]. In that case, the inversion studied involved about 90% of the total chromosome length. No meiotic segregation results were available, but the average size of the litters sired by heterozygous boars (11.9; n = 85) was not statistically different from that of the litters sired by normal contemporary boars (12.05), suggesting that the proportion of recombinant gametes produced by the carrier boars was also very low. Male meiotic segregation studies carried out in humans frequently involved infertile individuals with altered spermatogenesis [Morel et al., 2007; Vialard et al., 2007]. This was not the case of the boars used in the present study. This could partly explain the differences pointed out between the 2 species. Otherwise, in the case of very large inversions, it has been postulated [Anton et al., 2005; Chantot-Bastaraud et al., 2007] that synapsis of the inverted region with its homologous non-inverted segment prevails over pairing of the terminal segments, and that the regions outside the inversion may remain unpaired or aligned through heterosynapsis. This is consistent with the high proportions of recombinant gametes reported in the cases of

large inversions in humans. For the large inversions studied in pigs so far, such a meiotic configuration was not likely to occur.

Indeed, if that was the case, recombination within the synapsed segment should have occurred, leading to the production of unbalanced chromosomes. The formation of an inversion loop and repression of the recombination within the loop, or homologous pairing of the terminal segments and concomitant heterosynapsis/asynapsis of the inverted region could explain the very low proportion of recombinant gametes produced in these porcine cases, and were therefore more likely to occur. Complementary studies of the first meiotic stages (pairing and recombination analysis using immunostaining techniques, as carried out for instance by Pigozzi et al. [2005] or Ferguson et al. [2008] in the case of reciprocal translocations), would allow confirmation of this hypothesis. Unfortunately, such analyses could not be carried out in our porcine cases because of the unavailability of biological (testicular) material. Neither have human inversions been studied using such immunostaining techniques to date. This should be considered in the future.

Conclusion and Perspectives

This study is the first report on the meiotic segregation of inversions in the pig species. The results obtained for the 6 porcine inversions studied usefully complete the relatively few results obtained to date in humans for this kind of rearrangement (as compared with translocations), and give new insights into the meiotic behavior of inversions.

All the results obtained to date in the pig species show that, contrary to the case with humans, there is no correlation between the size of the inverted fragment and the proportion of recombinant gametes produced: whatever the size of the inverted fragment (even if very large), a very low proportion of recombinant gametes (<5%) are produced. New porcine inversions should be studied to confirm this figure. Further analyses (recombination and pairing) should also be carried out to elucidate the origin of such an inter-species difference.

Almost all the meiotic segregation results published for inversions so far were obtained in males. As carried out earlier for reciprocal translocations [Pinton et al., 2005], it should be very worthwhile to investigate the meiotic segregation differences between males and females carrying the same inversion. Experimental matings (insemination of normal sows with the semen of a boar that

is heterozygous for pericentric inv(4)(p1.4;q2.3) inversion) [Ducos et al., 1997] have been carried out recently. It will soon result in the production of male and female littermates carrying the inversion. Segregation profiles determined using sperm FISH for males, and using dual color FISH on in vitro matured oocytes for females will be compared.

Otherwise, the presence of an inversion could also affect the meiotic segregation of chromosomes belonging to other pairs than those directly involved in the inversions (interchromosomal effect).

This has been investigated only once in humans [Vialard et al., 2007], and only for reciprocal translocations in pigs (no interchromosomal effect) [Bonnet-Garnier et al., 2008]. This should be considered in future porcine studies.

Finally, although the sperm FISH technique used in the present study (as well as in the majority of recent human studies) is efficient, the telomeric probes used do not allow the distinction of all segregation products. The use of probes spanning the inversion breakpoints, as suggested by Bhatt et al. [2007], theoretically allows the identification of all meiotic products in the sperm, and should be a beneficial alternative to the classical use of telomeric probes, especially for paracentric inversions.

Acknowledgements

The authors want to thank the CRB for its technical support and for providing the BAC probes.

References

- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F: Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 111:297–304 (2005).
- Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J: Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil Steril* 85:661–666 (2006).
- Anton E, Vidal F, Blanco J: Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod* 22:2088–2092 (2007).
- Bhatt S, Moradkhani K, Mrasek K, Puechberty J, Lefort G, et al: Breakpoint characterization: a new approach for segregation analysis of paracentric inversion in human sperm. *Mol Hum Reprod* 13:751–756 (2007).
- Bhatt S, Moradkhani K, Mrasek K, Puechberty J, Manvelyan M, et al: Breakpoint mapping and complete analysis of meiotic segregation patterns in three men heterozygous for paracentric inversions. *Eur J Hum Genet* 17:44–50 (2009).

- Bonnet-Garnier A, Guardia S, Bonnet N, Calgaro A, Billoux S, et al: Interchromosomal effect and reciprocal translocation in pigs. *Chromosome Res* 16:1039 (2008).
- Caer E, Perrin A, Douet-Guilbert N, Amice V, De Braekeleer M, et al: Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8. *Fertil Steril* 89:1637–1640 (2008).
- Chantot-Bastarud S, Ravel C, Berthaut I, McElreavey K, Boucharid P, et al: Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Mol Hum Reprod* 13:55–59 (2007).
- De Braekeleer M, Dao TN: Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6: 245–250 (1991).
- Devine DH, Whitman-Elia G, Best RG, Edwards JG: Paternal paracentric inversion of chromosome 2: a possible association with recurrent pregnancy loss and infertility. *J Assist Reprod Genet* 17:293–296 (2000).
- Ducos A, Pinton A, Séguéla A, Berland HM, Blanc MF, et al: A pericentric inversion of chromosome 4 in pigs. *Genet Sel Evol* 29: 383–394 (1997).
- Ducos A, Berland HM, Bonnet N, Calgaro A, Billoux S, et al: Chromosomal control of pig populations in France: 2002–2006 survey. *Genet Sel Evol* 39:583–597 (2007).
- Ducos A, Revay T, Kovacs A, Hidas A, Pinton A, et al: Cytogenetic screening of livestock populations in Europe: an overview. *Cytogenet Genome Res* 120:26–41 (2008).
- Ferguson KA, Chow V, Ma S: Silencing of unpaired meiotic chromosomes and altered recombination patterns in an azoospermic carrier of a t(8;13) reciprocal translocation. *Hum Reprod* 23:988–995 (2008).
- Hubbard TJ, Aken BL, Beal K, Ballester B, Caccamo M, et al: Ensembl 2007. *Nucleic Acids Res* 35:D610–D617 (2007).
- Kaiser-Rogers K, Rao K: Structural chromosome rearrangements, in Gersen S, Keagle M (eds): *The Principles of Clinical Cytogenetics*, pp 191–228 (Humana Press, Totowa 1999).
- Lefort G, Blanchet P, Belgrade N, Rivier F, Chaze AM, et al: Stable dicentric duplication-deficiency chromosome 14 resulting from crossing-over within a maternal paracentric inversion. *Am J Med Genet* 113:333–338 (2002).
- Madan K: Paracentric inversions: a review. *Hum Genet* 96:503–515 (1995).
- Malan V, Pipiras E, Sifer C, Kanafani S, Cedrin-Durnerin I, et al: Chromosome segregation in an infertile man carrying a unique pericentric inversion, inv(21)(p12q22.3), analysed using fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei: significance for clinical genetics. A case report. *Hum Reprod* 21:2052–2056 (2006).
- Massip K, Berland H, Bonnet N, Calgaro A, Billoux S, et al: Study of inter- and intra-individual variation of meiotic segregation patterns in t(3;15)(q27;q13) boars. *Theriogenology* 70:655–661 (2008).
- McKinlay-Gardner RJ, Sutherland GR: *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling* (Oxford University Press, New York 2004).
- Morel F, Laudier B, Guerif F, Couet ML, Royere D, et al: Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 22:136–141 (2007).
- Pettenati MI, Rao PN, Phelan MC, Grass F, Rao KW, et al: Paracentric inversions in humans: a review of 446 paracentric inversions with presentation of 120 new cases. *Am J Med Genet* 55:171–187 (1995).
- Pigozzi ML, Sciarano RB, Solari AJ: Changes in crossover distribution along a quadrivalent in a man carrier of a reciprocal translocation t(11;14). *Biocell* 29:195–203 (2005).
- Pinton A, Ducos A, Yerle M: Estimation of the proportion of genetically unbalanced spermatozoa in the semen of boars carrying chromosomal rearrangements using FISH on sperm nuclei. *Genet Sel Evol* 36:123–137 (2004).
- Pinton A, Faraut T, Yerle M, Gruand J, Pellestor F, et al: Comparison of male and female meiotic segregation patterns in translocation heterozygotes: a case study in an animal model (*Sus scrofa domestica* L.). *Hum Reprod* 20:2476–2482 (2005).
- R Development Core Team: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>. (2007).
- Rogel-Gaillard C, Bourgeois N, Billault A, Vaiman M, Chardon P: Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements. *Cytogenet Cell Genet* 85:205–211 (1999).
- Vialard F, Delanete A, Clement P, Simon-Bouy B, Aubriot FX, et al: Sperm chromosome analysis in two cases of paracentric inversion. *Fertil Steril* 87:418.e1–418.e5 (2007).

III. Analyse du processus méiotique et comparaison des ségrégations méiotiques mâle et femelle

III.I. Présentation de l'article

Dans le cadre de notre étude, nous avons à notre disposition des paillettes de semence d'un verrat porteur d'une inversion péricentrique du chromosome 4 ($inv(4)(p1.4;q2.3)$), représentant environ 80% de la taille totale du chromosome. Il y a environ une dizaine d'années, un premier verrat porteur de cette anomalie avait été décelé grâce au contrôle chromosomique systématique effectué par notre laboratoire (Ducos et al., 1997b). Un programme de reproduction a été mis en place à la station expérimentale de l'INRA « Le Magneraud » durant ma thèse afin d'obtenir de nombreux descendants porteurs de l'anomalie. Cela nous a permis d'obtenir le matériel biologique nécessaire à l'étude des ségrégations méiotiques chez le mâle et chez la femelle.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article «Studies of male and female meiosis in $inv(4)(p1.4;q2.3)$ pig carriers », publié dans Chromosome Research.

Pour la première fois dans le cadre d'une inversion péricentrique, une comparaison des processus méiotiques mâle et femelle a pu être réalisée.

Nous avons aussi l'opportunité de présenter ici les premiers résultats, à notre connaissance, concernant à la fois une analyse du comportement méiotique des chromosomes lors des phases précoces de la méiose et une analyse des produits de ségrégation méiotique pour un même individu.

Des échantillons de semence ont été prélevés sur 6 mâles porteurs hétérozygotes de l'inversion et étudiés par SpermFISH (cf. Annexes II et III) afin d'analyser la proportion de gamètes génétiquement déséquilibrés produite par chaque animal. Les 40 femelles porteuses hétérozygotes ont toutes été sacrifiées, et leurs ovaires récoltés afin d'étudier par FISH sur métaphases II d'ovocytes maturés *in vitro* (cf. Annexes II et III) le pourcentage de gamètes déséquilibrés produit chez ces dernières.

Malgré la taille importante de l'inversion (environ 80% de la taille totale du chromosome), une moyenne de seulement 4% de spermatozoïdes et 3,6% d'ovocytes génétiquement déséquilibrés ont été observés. L'impact de cette inversion sur la fertilité des porteurs semble donc faible, que ce soit chez le mâle ou la femelle. Par ailleurs, l'effet du sexe du porteur semble avoir ici un impact négligeable sur la production de gamètes anormaux.

Une étude par immunohistochimie d'échantillons testiculaires d'un verrat porteur nous à permis d'étudier le comportement méiotique du bivalent 4 au stade pachytène de la prophase de première division méiotique. Sur les 700 spermatocytes environ analysés, 92% montraient une hétérosynapsis des régions inversées. La faible proportion de crossing-overs dans la région inversée (environ 5%) s'explique donc par le comportement des chromosomes 4 normaux et inversés, qui en s'appariant de manière non homologue inhibent la recombinaison méiotique dans la région inversée, limitant ainsi la production de gamètes génétiquement déséquilibrés.

D'autres analyses devront être réalisées sur des inversions de taille et de types différents afin de mieux comprendre les facteurs influençant le comportement méiotique de chromosomes porteurs d'inversion, et par conséquent la production de gamètes génétiquement déséquilibrés.

III.2 Article

Studies of male and female meiosis in *inv(4)(p1.4;q2.3)* pig carriers

Katia Massip · Martine Yerle · Yvon Billon · Stéphane Ferchaud ·
Nathalie Bonnet · Anne Calgaro · Nicolas Mary · Anne-Marie Dudez ·
Céline Sentenac · Christophe Plard · Alain Ducos · Alain Pinton

Received: 7 July 2010 / Revised: 7 October 2010 / Accepted: 8 October 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract Inversions are well-known structural chromosomal rearrangements in humans and pigs. Such rearrangements generally have no effect on the carrier's phenotype. However, the presence of an inversion may impair spermatogenesis and lead to the production of recombinant gametes, responsible for early miscarriages, stillbirth, or congenital abnormalities. This is the first report on meiotic segregation and pairing behavior of the *inv(4)(p1.4;q2.3)* pericentric inversion in pigs. Despite the very large size of the inverted fragment (76% of the chromosome), SpermFISH results showed that only 4.08% of the gametes produced by male heterozygotes were unbalanced. This low proportion could be explained by the

particular behavior of normal and inverted SSC4 chromosomes during the initial stages of meiosis. Indeed, immunohistochemistry analyses revealed that heterosynapsis occurred in 92% of the cells, whereas synaptic adjustment was detected in a few spermatocytes only. Unexpectedly, the proportion of unbalanced gametes produced by female heterozygotes, estimated by FISH on metaphase II oocytes, was also very low (3.69%) and comparable to that in males. According to previous results for male and female meiotic processes, different proportions of recombinant gametes in the two genders would have been expected. Complementary studies should be carried out to further document the meiotic behavior of inversions in pigs.

Responsible Editor: Walther Traut.

K. Massip · M. Yerle · N. Bonnet · A. Calgaro · N. Mary ·
A.-M. Dudez · C. Sentenac · C. Plard · A. Ducos ·
A. Pinton (✉)
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
UMR 444 INRA-ENVT Génétique Cellulaire,
23 chemin des Capelles, BP 87614,
31076 Toulouse Cedex 3, France
e-mail: a.pinton@envt.fr

Y. Billon
Génétique Expérimentale en Productions Animales,
INRA Le Magneraud,
17450 Saint Pierre d'Amilly, France

S. Ferchaud
Unité expérimentale Insémination Caprine et Porcine,
INRA,
86480 Rouillé, France

Keywords Pericentric inversions · pig · SpermFISH · immunohistochemistry · meiotic segregation · pairing behavior

Abbreviations

BAC	Bacterial artificial chromosome
BSA	Bovine serum albumin
CO	Crossing-over
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic acid
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Inv	Inversion
Mb	Megabase
MLHI	MutL Homolog 1
PBS	Phosphate-buffered saline

Published online: 02 December 2010

 Springer

SCP3 Synaptonemal complex protein 3
 SSC *Sus scrofa domestica*

Introduction

Inversions are structural rearrangements formed when a chromosome breaks in two places and the fragment reverses orientation (Groupe de cytogénéticiens français 1986; Kaiser-Rogers and Rao 1999). The inversion is “pericentric” if the breaks occur on either side of the centromere and “paracentric” in other cases. Prevalence estimates in human populations range from 0.012% to 0.07% for pericentrics and from 0.01% to 0.05% for paracentrics (McKinlay-Gardner and Sutherland 2004). Similar results have been obtained in pigs, 0.06% and 0.03% for pericentric and paracentric inversions, respectively (Ducos et al. 2007).

Usually, both para- and pericentric inversions are phenotypically harmless, but the presence of an inversion can occasionally lead to severe reproductive disorders due to spermatogenesis impairments (De Braekeleer and Dao 1991) and the production of genetically unbalanced gametes. For instance, depending on various parameters such as the nature of the chromosome involved, the size of the inverted fragment, and the location of the breakpoints, hom-synapsis can occur, an inversion loop may form, or one of the chromosomes may reverse orientation allowing the homologous centromeric regions to pair. In the latter case, the telomeric regions are frequently kept unpaired (Anton et al. 2005).

Finally, a phenomenon first described by Moses et al. (1982) in mice and called “synaptic adjustment” can occur. This mechanism allows inversion loops to be resolved, leading to the formation of a straight bivalent. It seems to occur when the inverted fragments are longer than 30% of the total chromosome length (Poorman et al. 1981; Moses et al. 1982; Gabriel-Robez et al. 1986; Guichaoua et al. 1986; De Perdigo et al. 1989). This particular behavior is still not well understood, and the way the loop is resolved remains unclear. Moses et al. (1982) suggested that loop resolution consists of desynapsis of the homologous chromatids and immediate resynapsis with non-homologous partners, which leads to heterosynapsis of the inverted region, except for a small region that remains homologously synapsed.

Whatever the meiotic pairing mechanism, if an odd number of crossovers occurs within these inverted homologously synapsed regions, recombinant chromosomes can be produced, leading to duplications or deletions of p-arm and q-arm fragments located outside the inversion (Morel et al. 2007). The gametes produced containing these chromosomes are genetically unbalanced, and their proportion in human semen varies greatly from one inversion to another (0 to 40%; Anton et al. 2005; Vialard et al. 2007; Morel et al. 2007). On the contrary, recent data in pig suggest that the percentage of unbalanced gametes remains low whatever the inversion studied (0.6% to 4%; Massip et al. 2009). However, in man as well as in pig, the proportion of aneuploid gametes in inversion carriers seems to be low (0.6% vs 0.2%, e.g., Ferfour et al. 2009; Massip et al. 2009). Depending on the nature (size and genetic content) of the duplicated/deleted regions, unbalanced gametes can be responsible for early miscarriages, stillbirth, or congenital abnormalities (Madan 1995; Lefort et al. 2002).

Many cases of inversions have been described in humans (Madan 1995; Pettenati et al. 1995; Anton et al. 2005; Morel et al. 2007) as well as in pigs (Ducos et al. 2007). However, relatively few studies have reported meiotic segregation pattern analyses of inversions in males (Goldman et al. 1992; Anton et al. 2005; Malan et al. 2006; Chantot-Bastaraud et al. 2007; Morel et al. 2007; Caer et al. 2008), while it remains even less studied in females (Iwarsson et al. 1998; Koehler et al. 2002), mostly due to ethical and practical considerations.

To understand the pairing behavior of inversions in males, analyses of the early meiotic stages (pachytene) have been carried out in several species, including Man (Gabriel-Robez et al. 1986; Saadallah and Hulten 1986; De Perdigo et al. 1989; Goldman et al. 1992) and mice (Moses et al. 1982; Tease and Fisher 1986; Ashley et al. 1993; Cheng et al. 1999; Koehler et al. 2004).

These analyses were initially based on electron microscopy, but recent and simpler immunohistochemistry techniques, allowing the analysis of a greater number of cells, are now commonly used (see, for instance, Koehler et al. 2004; Codina-Pascual et al. 2005; Pinton et al. 2009). However, to the best of our knowledge, the entire meiotic process (pairing

and segregation) for a particular inversion has never been studied, and the meiotic segregation profiles in males and females carrying the same pericentric inversion have never been compared.

During the 1990s, an *inv(4)(p1.4;q2.3)* was detected in several boars in different insemination centers in France. Semen from one of these boars was cryoconserved so that offspring carrying the rearrangement could be produced. Here, we report the male and female meiotic segregation pattern analyses for heterozygous carriers of this inversion. The pairing behavior of chromosomes during the early stages of meiosis in males was also studied, using immunohistochemistry techniques.

Materials and methods

Animals

Production of inversion carriers

The anomaly was initially detected in 1995 in a young Large White boar (“founder”) examined before use in an artificial insemination center.

Semen was collected from this boar and cryoconserved at the INRA center of Rouillé (France).

The same rearrangement, namely *inv(4)(p1.4;q2.3)*, as shown in Fig. 1, was later found in several related boars, within the framework of the National Cytogenetic Screening Programme—Ducos et al. (2007).

Fourteen Meishan sows from the GEPA-INRA experimental unit at Le Magneraud (France) were

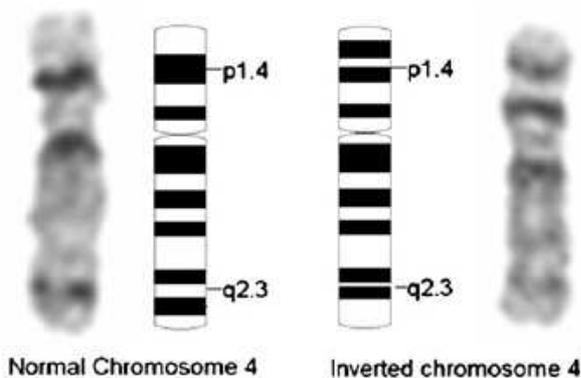


Fig. 1 Characterization of the *inv(4)(p1.4;q2.4)*. The inverted fragment size represents 76% of the total chromosome length

inseminated with sperm from the founder boar. All the offspring were karyotyped to detect those carrying the rearrangement.

Forty females carrying the inversion were conserved until puberty. Among the experimentally produced male offspring, six inversion carriers and five normal individuals (controls) were also reared until puberty.

Semen and testicular biopsy collection

The semen from all 11 males (six inversion carriers and five normal) was subjected to examination (determination of concentration, motility, and morphology parameters in fresh standardized—diluted—semen samples) in a French reference laboratory (Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs, Maisons-Alfort). The semen parameters of all boars were normal. Two semen samples were then collected from each male, and samples were stored at -20°C in our laboratory. All males except one were sacrificed at puberty, and testicular biopsies were conserved in liquid nitrogen.

One inversion carrier was kept alive in order to evaluate a potential intra-individual “time” effect on the production of unbalanced gametes (semen sample collection scheduled every 6 months over at least 2 years).

Segregation pattern analyses were carried out on the six inversion carriers and one control.

Oocyte collection

The females were sacrificed after puberty (two batches of 12, then nine and seven animals). The females had been subjected to a heat synchronization protocol using Régumate[®] as progestative so as to maximize oocyte collection (Martinat-Botté et al. 1996).

Oocytes were punctured on the ovaries according to the protocol of Pinton et al. (2009). Ovaries were also collected from 15 normal sows and used as controls in studies of female meiosis.

Fluorescence in situ hybridization

Preparation of the probes

Segregation patterns were assessed using dual-color fluorescent in situ hybridization of BAC (bacterial

artificial chromosome) probes on decondensed sperm heads (SpermFISH), and on metaphase II of *in vitro* matured oocytes. The same combination of two probes, located on the p- and q-arm telomeric regions of chromosome 4, was chosen for hybridization on both sperm heads and oocytes. A supplementary experiment was carried out using a chromosome 14 BAC probe as an internal control, on animals n°2 and n°4 as well as on a normal pig (control), in order to differentiate disomic sperm heads from diploid ones.

These BAC probes were selected according to recent data from the pig genome sequencing project (http://pre.ensembl.org/Sus_Scrofa/index.html) (Hubbard et al. 2007) and were obtained from the Biological Resources Center-GADIE (<http://www-crb.jouy.inra.fr/>) (Rogel-Gaillard et al. 1999).

The p- and q-arm chromosome 4 telomeric probes were labeled with biotin and digoxigenin, respectively, and the chromosome 14 probe was labeled with both haptens using the BioPrime labeling system (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions. Probe specificity was first tested on lymphocyte metaphases (Fig. 2).

The early stages of meiosis were also analyzed after co-hybridization on spermatocytes of the q-telomeric BAC probe and the SSC4 p-arm painting probe generated by microdissection (Pinton et al. 2003).

SpermFISH and FISH on metaphase II of matured in vitro oocytes

Sperm preparation and hybridization were carried out according to the protocol described by Pinton et al.

(2004). Oocyte culture, maturation, and hybridization were carried out according to Pinton et al. (2009).

Biotin-labeled probes were visualized in red using streptavidin conjugated with Alexa 594 (Molecular Probes, Eugene, OR), digoxigenin-labeled probes in green by a mouse anti-digoxigenin antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC; SIGMA, St Louis, MO), and chromosome 14 BAC probe in yellow by combining both revelation systems. The slides were analyzed under a Zeiss microscope fitted with a triple bandpass filter.

Only sperm heads presenting signals of equivalent intensity and separated by a distance at least the size of one signal were counted. The meiotic segregation patterns were analyzed twice using only the p- and q-arm SSC4 probes in one animal (n°1) and in the negative control to check the reliability of the experiments.

Immunohistochemistry

Preparation of cell suspensions

Cell suspensions were prepared just after sacrificing the animal. The fresh testicular samples were dilacerated on ice in 5 mL of phosphate-buffered saline (PBS) solution using needles.

The gross suspension was transferred to a 10-mL tube and agitated with a pipette to flush out remaining cells from the tubules.

The suspension was then left to stand for a few minutes on ice. The supernatant was transferred to another 10-mL tube and left to stand again. This stage

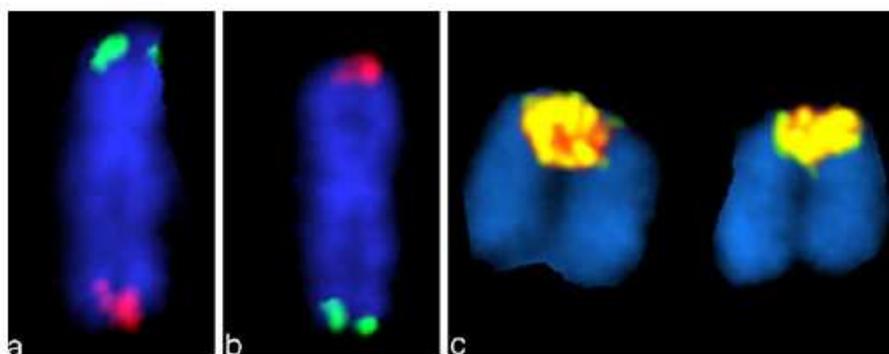


Fig. 2 Position of the telomeric BAC probes (p in green and q in red) used for male and female meiotic segregation pattern analyses of *inv(4)(p1.4;q2.4)* and position of BAC probe of chromosome 14 after hybridization on metaphases and revela-

tion in two colors (red or green for SSC4 BAC probes, both for SSC14). Normal (a) and inverted (b) chromosomes 4 can be distinguished by the position of the probes. BAC probe of chromosome 14 (c) is revealed in yellow

was repeated once or twice in order to obtain a suspension without testicular fragments. The final cell suspension was then centrifuged at 600g for 5 min, the supernatant was discarded and the pellet resuspended in a few drops of PBS.

Twenty microliters of the cell suspension were then spread on a microscope slide with 120 μ L of fixative solution: a commercial solution of formaldehyde+triton (0.4/0.05%; Sigma). After 10 min, the excess solution was discarded, and the slides were washed briefly in distilled water. The slides were left lying flat for a few minutes at room temperature and were then immunostained.

Surface-spread spermatocytes were also obtained from testicular biopsies of normal animals as negative control.

Fluorescence immunostaining and FISH

These experiments were carried out according to the protocol of Pinton et al. (2009), with slight modifications.

Synaptonemal complex protein 3 (SCP3), *MutL* homolog 1 (MLH1), γ H2AX, and centromeres were immunolocalized using primary antibodies prepared in PBT (PBS+0.16% BSA+0.1% Tween (Sigma)): rabbit anti-SCP3 (3:1,000; ABCAM, Cambridge, UK), mouse anti-MLH1 (4:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), mouse anti- γ H2AX (1:100) (ABCAM), and human anti-centromeres (1:100; Antibodies Incorporated, Davis, CA).

Secondary antibodies consisted of Alexa 594-conjugated donkey anti-rabbit (Molecular Probes) and Alexa 488-conjugated goat anti-mouse (Molecular Probes) and, in a second phase, to visualize the γ H2AX foci and the centromeres, Alexa 647-conjugated goat anti-mouse and AMCA-conjugated donkey anti-human (JACKSON, Grove, PA, USA) used at 1:100. Slides were mounted with antifade solution (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA).

Spermatocytes were captured and analyzed using the Cytovision FISH imaging system (Applied Genetics, Sunderland, UK).

FISH was performed on the same slides with a SSC4 p-arm painting probe and the telomeric q-arm BAC in order to detect SSC4 and determine the meiotic pairing behavior of the bivalents. The painting probe was labeled with digoxigenin and revealed using mouse anti-digoxigenin conjugated

with FITC. Labeling and revelation of the q-telomeric BAC probe was the same as described earlier (see SpermFISH paragraph).

Statistical analysis

Classical Chi-square tests were carried out, using the R software (R Development Core Team 2007), to assess the reliability of our experiments and to compare the proportions of unbalanced gametes between the six different inversion carriers and between each animal and the control, as well as to compare the female meiotic segregation pattern between normal and inversion carrier sows. The same software was used to compare the male and female segregation patterns for inversion 4.

Results

Male meiotic segregation analyses using SpermFISH

About 3,000 sperm heads were scored for each experiment. The meiotic segregation patterns obtained for the six males carrying the inversion are summarized in Table 1. Different types of normal and unbalanced (recombinant) spermatozoa are shown in Fig. 3.

The estimated proportions of unbalanced gametes for the two independent experiments carried out on animal n°1, as well as on the control boar, were similar (P values > 0.9; Table 1), indicating that our analyses were reliable. Therefore, the data were pooled for each animal (total of 6,012 spermatozoa for the control and 6,031 for animal n°1) to increase the sample size and thus improve the accuracy of further statistical analyses.

The proportions of unbalanced gametes produced by *inv(4)(p1.4;q2.4)* carriers varied between 3.8% and 4.66% (see Table 1) and were not statistically different to each other ($P > 0.9$).

As shown in Table 1, the proportions of unbalanced gametes were systematically and significantly ($P < 0.05$) higher in animals carrying the inversion than in the control. Among these unbalanced gametes, the frequency of diploid or disomic spermatozoa was also higher in *inv(4)(p1.2;q2.3)* carriers, as compared with the control (0.2% vs 0.05%— $P = 0.012$), but remained very low in both cases. To go further on (distinction of

Table 1 Proportions of unbalanced spermatozoa in six male carriers of the inv(4)(p1.4;q2.3) and in a control boar

Inversion	Inverted fragment size % (Mb)	Animal	Percentage of unbalanced gametes	Normal/ inverted (%)	del(p)-dup(q) (%)	del(q)-dup(p) (%)	disomic for chromosome 4 (%)	diploids (%)	total
inv(4)(p1.4;q2.3)	76% (10.4)	1	3.65	2902 (96.35)	53 (1.76)	53 (1.76)	4 (0.13)	4 (0.13)	3012
		mean value	3.80	5802 (96.20)	111 (1.84)	108 (1.79)	10 (0.17)	6031	
		2	3.92	2907 (95.72)	59 (1.94)	60 (1.98)	11 (0.36)	3037	
		mean value	3.81	5797 (96.01)	108 (1.79)	111 (1.84)	9 (0.30)	3000	
		3	4.66	2885 (95.34)	67 (2.21)	68 (2.25)	6 (0.20)	3026	
		4	4.19	2903 (95.81)	57 (1.88)	61 (2.01)	9 (0.30)	3030	
		mean value	4.28	5778 (95.73)	119 (1.97)	121 (2.01)	9 (0.30)	3006	
		5	3.81	2905 (96.19)	56 (1.85)	54 (1.79)	5 (0.17)	3020	
		6	4.13	2904 (95.87)	60 (1.98)	60 (1.98)	5 (0.17)	3029	
		control	0.27	3002 (99.80)	2 (0.07)	3 (0.10)	3 (0.10)	3008	
		mean value	0.23	8985 (99.79)	5 (0.06)	10 (0.11)	2 (0.07)	2992	
								0 (0)	1 (0.03)

In italics: results obtained in the second experiment (two different experiments performed on the same sample)
 In bold: mean number of cells when different experimentations were made for one animal or results obtained for animal 2 and 5. Only the results in bold were used for the comparison between the individuals and for statistical analyses

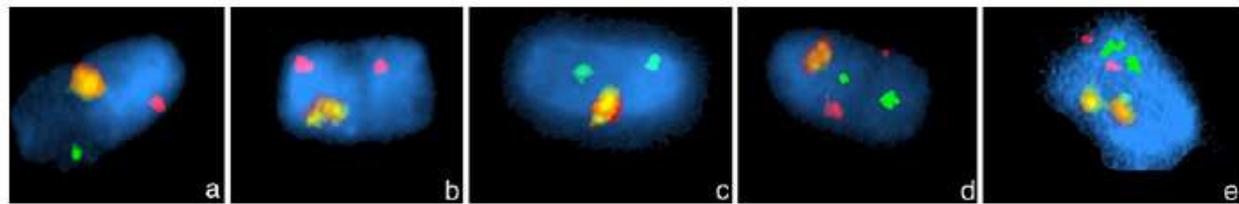


Fig. 3 Examples of fluorescent phenotypes of sperm heads obtained after hybridization and probe revelation. **a** Balanced gamete (normal or inverted chromosome±1 chromosome 14), **b** del (p)/dup(q) unbalanced gamete±1 chromosome 14, **c** del (q)/

dup(p) unbalanced gamete±1 chromosome 14, **d** disomic gamete (two red and green signals±1 chromosome 14), **e** diploid gamete (two red, green, and yellow signals)

diploid versus disomic spermatozoa), we realized a supplementary experiment (using an internal control) on animals n°2 and n°4. It revealed that the frequency of diploid spermatozoa was not different compared with the control ($P=0.6$). On the contrary, the proportion of disomic sperm heads was four times higher (0.30% vs 0.07%), but this difference was not statistically significant ($P=0.08$).

Female meiotic segregation

Female meiotic segregation results are presented in Table 2. Examples of normal and unbalanced metaphase II oocytes are shown in Fig. 4. Ninety-six metaphases from normal sows were studied. None of them presented duplications/deletions.

Conversely, seven out of the 190 metaphases analyzed from inverted carriers (3.69%) presented deletions and duplications of p and q chromosome 4 fragments (see Table 2). On the other hand, the frequency of diploid cells did not differ between sows carrying the inversion and the controls ($P=0.66$).

Pairing behavior of SSC4 chromosomes during spermatogenesis

Ninety-one spermatocytes from normal boars (controls), as well as 720 spermatocytes from one *inv(4)(p1.4;q2.4)* heterozygote were captured and analyzed after immunostaining and FISH. The results are summarized in Table 3.

Results from the normal boars (controls) indicate that the crossing-overs took place preferentially on telomeric ends of the chromosomes. There were mostly two chiasma events per SSC4 bivalent (62.64%), and about 12% of the cells analyzed showed at least one interstitial crossing-over.

Analyses of pairing behavior in presence of the inversion showed that a great majority of chromosome 4 synaptonemal complexes presented a straight configuration (92%), with one or two distal recombination events (Fig. 5). However, a few cells clearly showed synaptonemal complexes with particular shapes, such as inversion loops (Figs. 6 and 7). In addition, interstitial crossing-over signals were detected in 5.2% of the 720 spermatocytes analyzed (3.7% on inversion loops and 1.5% on straight bivalents).

This proportion is much lower than the one estimated for normal boars ($P=0.039$).

Discussion

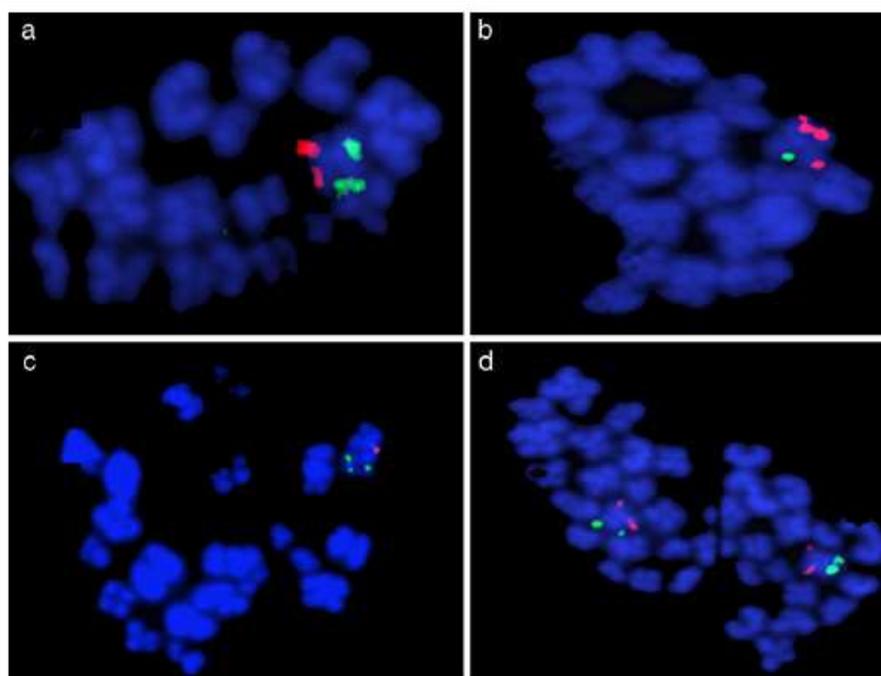
Male meiotic segregation patterns

No significant difference was found between the segregation profiles of the six inversion carriers. As a consequence, only the average proportion of unbalanced gametes (4.08%) will be considered further, e.g., for comparison with the female meiotic segregation results. This figure is consistent with

Table 2 Proportions of unbalanced oocytes in female carriers of the *inv(4)(p1.4;q2.3)* and in a control

Animals	Percentage of unbalanced gametes	Normal/ inverted (%)	del(p)-dup(q) (%)	del(q)-dup(p) (%)	Disomic/diploid (%)	Total
Carriers of the <i>inv(4)(p1.4;q2.3)</i>	3.69	162 (85.26)	4 (2.11)	3 (1.58)	21 (11.05)	190
Control	0	88 (91.67)	0 (0)	0 (0)	8 (8.33)	96

Fig. 4 Examples of metaphases II of in vitro matured oocytes after FISH with p (*green*) and q (*red*) specific BACs. **a** Balanced oocyte (normal or inverted chromosome), **b** del (p)/dup(q) unbalanced oocyte, **c** del (q)/dup(p) unbalanced oocyte, **d** diploid oocytes



previous “inter-individual effect” evaluations carried out in the pig species in the case of inversions (one inversion—two animals—Massip et al. 2009), Robertsonian (one anomaly—four individuals—Pinton et al. 2009), and reciprocal (one translocation—three animals—Massip et al. 2008) translocations. This very low proportion (4.08%) is consistent with initial zootechnical data (Ducos et al. 1997) that showed an absence of effect of the *inv(4)(p1.4;q2.4)* on the reproductive performance of sows sired by heterozygous boars. It is also in accordance with recent reproduction results obtained during the current study: the 14 Meishan sows inseminated with semen from the

founder boar (to produce male and female offspring carrying the inversion) presented a 100% pregnancy rate and normal litter sizes (13.28 piglets born alive, on average).

The percentage of disomic/diploid spermatozoa, albeit very low (0.2%), was significantly higher in semen from inversion carriers than from the control (0.05%). This result is in accordance with disomy/diploidy rates found for other inversions (Massip et al. 2009) and reciprocal translocations (Pinton et al. 2004; Massip et al. 2008).

Complementary results on $n^{\circ}2$ and $n^{\circ}4$ animals suggested that the inversion could be responsible of a

Table 3 Meiotic pairing behavior of chromosome 4 bivalents for the *inv(4)(p1.4;q2.3)* in spermatocytes

		2 distal COs	1 distal CO (p)	1 distal CO (q)	synaptic adjustment with interstitial CO	synaptic adjustment without interstitial CO	Total	
<i>inv(4)(p1.4;q2.3)</i>	number	385	108	170	39	18	720	
	%	53.47	15.00	23.60	5.42	2.50		
		92.07						
Control	interstitial CO (1 or more)							
	number	57	10	13	11	/	91	
	%	62.64	10.99	14.29	12.09	/		
		87.92						

In bold: mean percentage of distal or interstitial crossing-overs for the control and the inversion carrier, in order to compare these results more easily

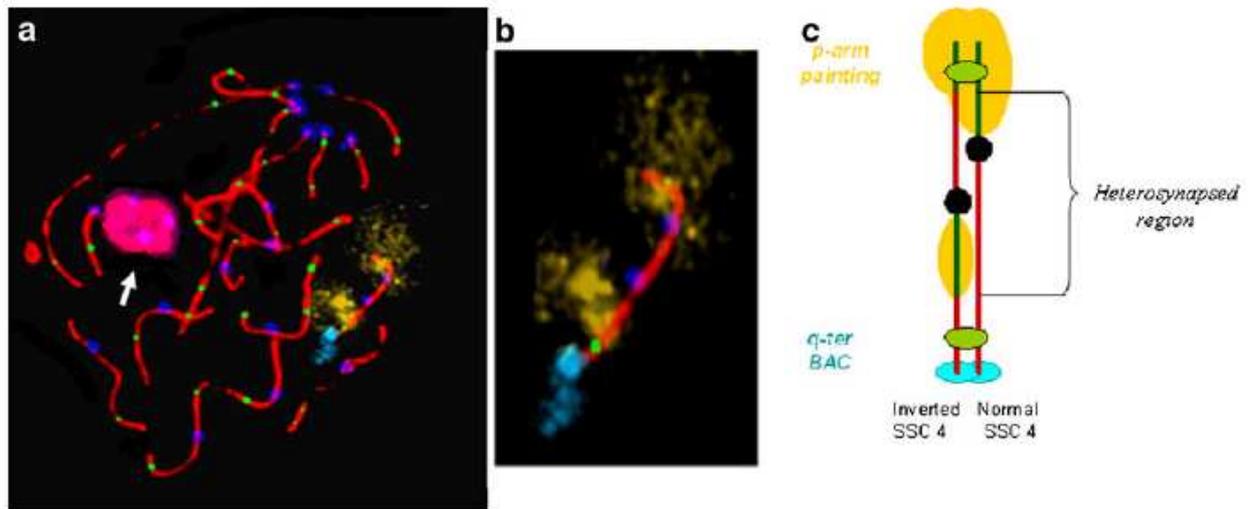


Fig. 5 A spermatocyte presenting heterosynapsis on the SSC 4 bivalent. *Red*: SCP3 synaptonemal complex protein. *Dark blue*: centromeres. *Green*: MLH1 signals. *Pink*: γ H2AX protein. *Yellow*: SSC4 p-arm painting probe. *Bright blue*: SSC4 q-arm BAC probe. a SSC4 bivalent underwent heterosynapsis as illustrated by two painting and centromere signals. The configuration of the XY body, according to Codina-Pascual et al. (2005), suggests that the spermatocyte is in a late pachytene substage (*arrow*). **b** Enlarged picture of the SSC4 bivalent;

SCP3 signal shows no breaks, suggesting a total pairing of the bivalent. The crossing-overs are outside the inverted region. The telomeric q probe allows orientation of the bivalent. The single *blue* telomeric signal shows that the homologous telomeric regions are paired. The presence of two centromere signals and two p-arm signals on the inverted chromosome indicates non-homologous synapsis. **c** Schematic representation of heterosynapsis between normal and inverted chromosome 4

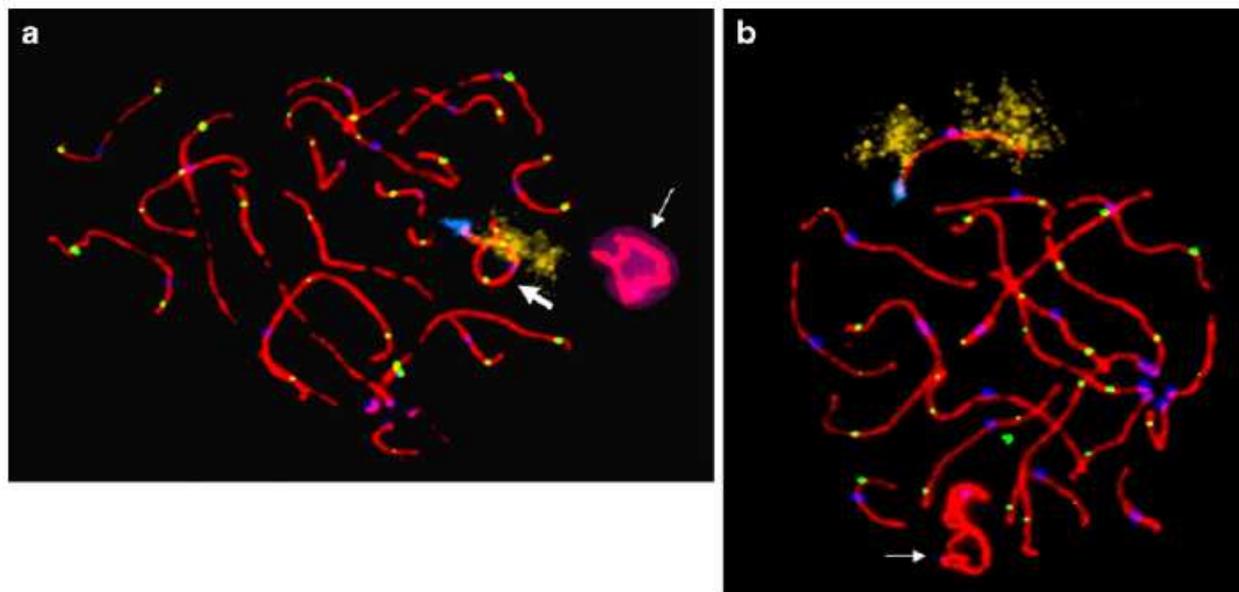


Fig. 6 Spermatocytes presenting inversion loops on SSC4 bivalents. *Red*: SCP3 synaptonemal complex protein. *Dark blue*: centromeres. *Green*: MLH1 signals. *Yellow*: SSC4 p-arm painting probe. *Pink*: γ H2AX protein. *Bright blue*: SSC4 q-arm BAC probe. *Large arrows* point to inversion loops, *small arrows* to sexual vesicle. **a** Early pachytene stage (according to

the sexual vesicle aspect; Codina-Pascual et al. 2005); the spermatocyte shows a complete inversion loop on the SSC4 bivalent. **b** Beginning of the mid pachytene stage (Codina-Pascual et al. 2005): only a small inversion loop could be detected, suggesting a synaptic adjustment

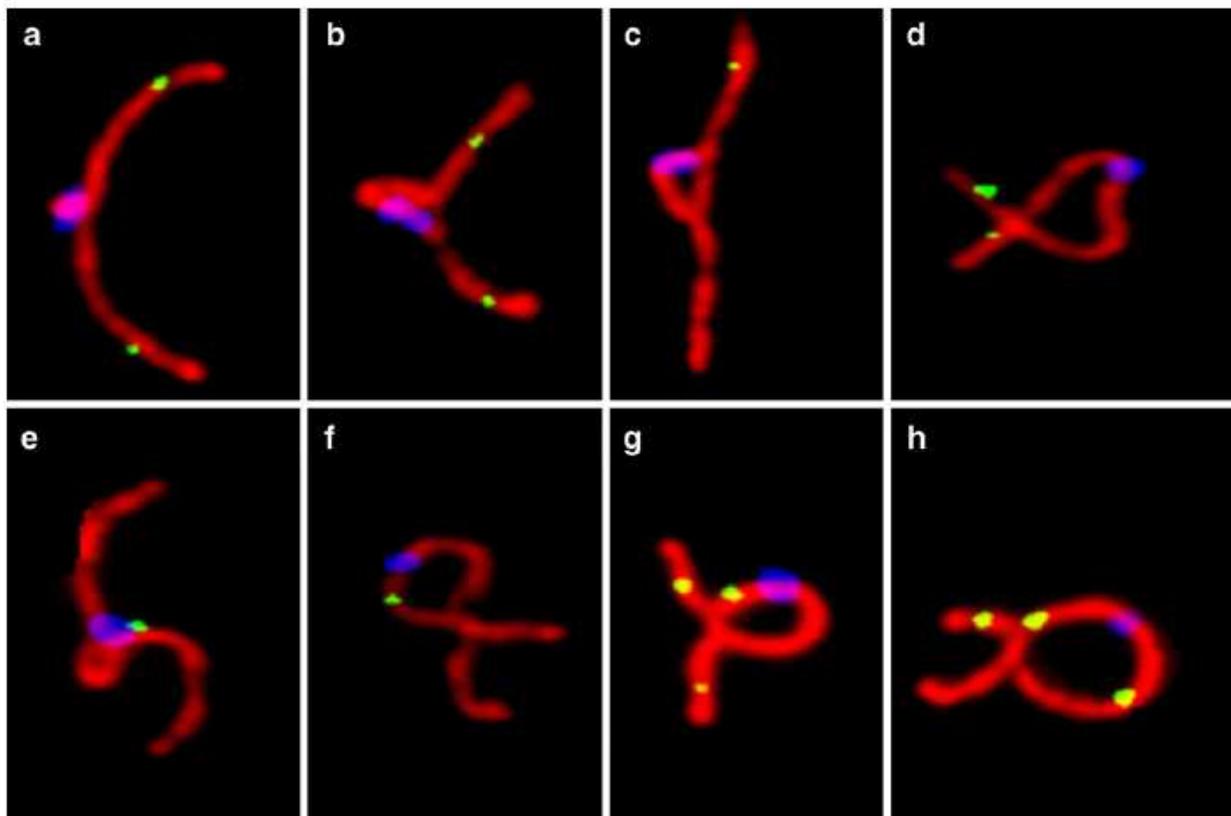


Fig. 7 Pictures showing inversion loops of the SSC 4 bivalent. *Red*: SCP3 synaptonemal complex protein. *Blue*: centromeres. *Green*: MLH1 signals. **a–d** Bivalents showing inversion loops with crossing-overs outside the inverted region: different sizes

were observed, suggesting an inversion loop resolution. **e–g** Bivalents showing inversion loops with one interstitial crossing-over. **h** Bivalent showing an inversion loop with two interstitial crossing-overs

higher rate of disomic spermatozoa, potentially due to an increase of missegregation of the chromosome 4.

According to recent human data, several authors have postulated the existence of a relationship between the sizes of the inverted chromosome fragments and the proportion of unbalanced gametes in the semen of male carriers (Anton et al. 2005; Malan et al. 2006; Morel et al. 2007; Vialard et al. 2007).

More precisely, the percentage of abnormal spermatozoa is expected to remain low as long as the inverted fragment size is less than 50% of the total chromosome length and to increase rapidly beyond this threshold (Malan et al. 2006; Morel et al. 2007; Vialard et al. 2007). Therefore, considering the large size of the inverted fragment in the case of *inv(4)(p1.4;q2.3)* (76% of the total chromosome size), the expected proportion of unbalanced gametes should be much higher than the 4.08% found in the present study: indeed in man, the percentage of unbalanced gametes considering the same

inverted fragment size varies between 20% and 40% (Anton et al. 2005). However, our results are consistent with previous studies in pigs, where no correlation was found between the sizes of the inverted fragments and the percentages of unbalanced gametes produced—3.5% and 1.27% for inverted fragment sizes of 71% and 86% of total chromosome length, respectively (Massip et al. 2009). This seems to imply that the meiotic behavior of inversions is different in pigs (as compared with humans). However, complementary porcine as well as human data will need to be gathered to document this point more thoroughly. Analyses of meiotic pairing/recombination of the *inv(4)(p1.4;q2.3)* were therefore carried out, and the results are discussed below.

Male meiotic pairing and recombination

According to previous human data, when the size of the inverted fragment exceeds 50% of the total

chromosome length, homologous pairing is likely to occur through the formation of an inversion loop (Anton et al. 2005; Anton et al. 2007; Morel et al. 2007). Homosynapsis of the normal and inverted regions may also occur when one of the two chromosomes reverses orientation. In that case, the telomeric regions, which are not homologous, remain unpaired or heterosynapsed. When one or more crossing-overs (CO) occur in the homologously paired interstitial region, unbalanced spermatozoa are generated (Anton et al. 2005).

When the inverted region is large, the probability that crossing-overs occur in this fragment is high, so the risk of producing unbalanced gametes is increased (Martin et al. 1994).

The most likely hypothesis to explain the low proportion of unbalanced gametes found in the case of *inv(4)(p1.4;q2.3)* is that heterosynapsis or asynapsis of the interstitial region preferentially occurs, preventing the formation of crossing-overs in that region, and the subsequent formation of unbalanced gametes. By using the SSC4 p-arm painting probe (observation of two distinct p-arm

signals as well as two distinct centromeric signals on SSC 4 bivalents as shown in Fig. 5), we were able to detect heterosynapsis of the inverted region in more than 90% of the cells. In addition, the phosphorylated form of H2AX, which is specifically localized on the unsynapsed chromosomal regions (Fernandez-Capetillo et al. 2004), was never found on chromosome 4 bivalents. These results suggested that the two homologs were always fully paired, without remaining asynapsed fragments. These results confirm the “heterosynapsis” hypothesis mentioned above.

Use of the SSC 4 p arms painting probes also allowed distinguishing of the interstitial and telomeric regions and detection of “interstitial” chiasmata in 5.4% of the 720 spermatocytes studied.

The reduced frequency of interstitial crossing-overs observed between our case and the control could be explained by the large proportion of SSC 4 bivalents undergoing heterosynapsis and thus preventing the formation of interstitial chromosomal exchanges. This result is consistent with the 4.08% of unbalanced gametes found in this study.

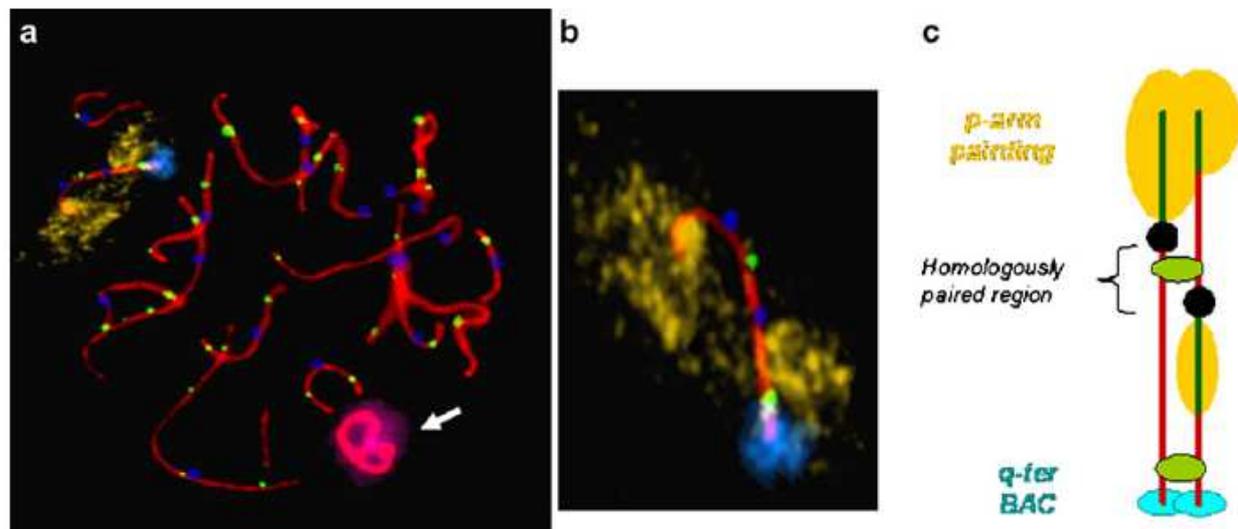


Fig. 8 Spermatocyte presenting a synaptic adjustment on SSC4 bivalent. *Red*: SCP3 synaptonemal complex protein. *Dark blue*: centromeres. *Green*: MLH1 signals. *Pink*: γ H2AX protein. *Yellow*: SSC4 p-arm painting probe. *Bright blue*: SSC4 q-arm BAC probe. **a** SSC4 bivalent underwent synaptic adjustment as illustrated by two painting and centromere signals and an interstitial crossing-over. The configuration of the XY body, according to Codina-Pascual et al. (2005), suggests that the spermatocyte is in a mid-pachytene substage (*arrow*). **b** Enlarged picture of the SSC4 bivalent that underwent synaptic adjustment:

it presents a straight structure with two centromere signals and interstitial crossing-over between the two centromeres. The SCP3 signal shows no break, suggesting total pairing of the bivalent. The single *blue* telomeric signal shows that the telomeric homologous regions are paired. The presence of two centromere and two p-arm signals on the inverted chromosome indicates non-homologous synapsis but an interstitial crossing-over can be detected. **c** Schematic representation of synaptic adjustment between normal and inverted chromosome 4

Inversion loops, which are one of the mechanisms allowing homosynapsis of the interstitial regions, were also observed in our study (6.39% of the spermatocytes studied, see Figs. 6 and 7). We observed also 1.53% of chromosome 4 straight bivalents with two p-arm paintings and two centromere signals, like heterosynapsed ones, but with also one interstitial CO (usually between the two centromeres, as shown in Fig. 8). Such a configuration could be the result of a synaptic adjustment. Thanks to the shape of the sexual vesicle, which is a good indicator of the different pachytene substages in man as well as in pig (Villagomez 1993; Codina-Pascual et al. 2005), we observed that synaptic adjustment occurs between early and mid pachytene and that it is a fast process. Indeed, at mid and late pachytene, all bivalents showing obvious synaptic adjustment presented straight shapes and no loop at all (see Figs. 6, 7, and 8).

Earlier studies showed that different pairing mechanisms could take place within a population of germ cells from the same individual (Chandley et al. 1987; Rumpler et al. 1995). This seems to be the case here. However, the probes used in our study do not allow distinction between real heterosynapsis and bivalents that have undergone synaptic adjustment. Indeed, in both cases, bivalents presented a straight configuration as well as two paintings and two centromere signals. Unless crossing-over occurred interstitially, synaptic adjustment could not be clearly demonstrated (Fig. 8).

Probes specific to the small non-inverted region generated by synaptic adjustment would need to be used to distinguish the two phenomena unequivocally. However, because this region is not well characterized, the production of such probes could be extremely time-consuming and problematic.

Otherwise, an analysis of intermediate size inversions (i.e., size of inverted fragment about 50% of the total chromosome length) should be carried out in pig, in order to investigate the way in which meiotic pairing behavior (e.g., proportion of synaptic adjustment vs heterosynapsis) is influenced by the size of the inverted fragment and to obtain complementary knowledge of the meiotic behavior of inversions.

Female meiotic segregation

Results for female meiotic segregation in the case of inversions are very scarce in the literature (Iwarsson et al. 1998; Koehler et al. 2002). Our data demonstrate

that the percentage of unbalanced gametes produced during female meiosis is low (3.69%), suggesting a moderate impact on the fertility of the carriers.

These results are very different from those obtained in the case of an *inv(5)(p1.4;q3.5)* in humans as 50% of unbalanced gametes were detected for an inversion involving 83.5% of the total chromosome length (Iwarsson et al. 1998). However, these results were based on the analysis of only 23 embryos and should therefore be considered with caution.

The presence of the inversion seems to have no impact on the overall rate of diploid cells, as similar proportions were observed for sows carrying the inversion and for control sows.

These proportions are also comparable to those reported in the pig species (e.g., Sosnowski et al. 2003).

Comparison of male and female meiotic segregation patterns

To our knowledge, this is the first study to compare segregation profiles in males and females carrying the same pericentric inversion. According to our data, there is no significant difference between the percentages of unbalanced gametes produced in males and females carrying the *inv(4)(p1.4;q2.3)*. However, compared with male, female meiosis presents some specificities in different mammalian species: the total synaptonemal complex length is higher in females (about 500 $\mu\text{m}/\text{cell}$ vs 250 $\mu\text{m}/\text{per cell}$ in man; Tease and Hulten 2004), pairing initiation is assumed to be more interstitial (Bojko 1983; Pfeifer et al. 2001), the number of crossing-overs is higher (mean number of crossing-overs per cell, 50 in males vs 70 in females; Tease and Hulten 2004), and they are more interstitially localized in females (Lenzi et al. 2005; Roig et al. 2005; Robles et al. 2007; Cheng et al. 2009). A more interstitial pairing initiation would make loop formation (and subsequent crossing-overs within the loop) easier in females than in males. For these reasons, one would have expected a higher proportion of recombinant (unbalanced) gametes in females than in males. However, this was clearly not the case in our study.

Thorough analysis of the initial meiotic stages (oocytes-I), even if technically very difficult in female swine, would help to better explain and interpret such results.

Acknowledgments The authors would like to thank T. Faraut for constructive discussions on the interest of comparing male and female meiotic segregation patterns in carriers of chromosomal rearrangements.

References

- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2005) Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 111:297–304
- Anton E, Blanco J, Vidal F (2007) Recombination in heterozygote inversion carriers. *Hum Reprod* 22:1192
- Ashley T, Cacheiro NL, Russell LB, Ward DC (1993) Molecular characterization of a pericentric inversion in mouse chromosome 8 implicates telomeres as promoters of meiotic recombination. *Chromosoma* 102:112–120
- Bojko M (1983) Human meiosis VIII. Chromosome pairing and formation of the synaptonemal complex in oocytes. *Carlberg Res Commun* 48:457–483
- Caer E, Perrin A, Douet-Guilbert N, Amice V, De Braekeleer M, Morel F (2008) Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8. *Fertil Steril* 89:1637–1640
- Chandley AC, McBeath S, Speed RM, Yorston L, Hargreave TB (1987) Pericentric inversion in human chromosome 1 and the risk for male sterility. *J Med Genet* 24:325–334
- Chantot-Bastaraud S, Ravel C, Berthaut I et al (2007) Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46, XY, inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Mol Hum Reprod* 13:55–59
- Cheng EY, Chen YJ, Distchele CM, Gartler SM (1999) Analysis of a paracentric inversion in human oocytes: nonhomologous pairing in pachytene. *Hum Genet* 105:191–196
- Cheng EY, Hunt PA, Nalwai-Cecchini TA et al (2009) Meiotic recombination in human oocytes. *PLoS Genet* 5:e1000661
- Codina-Pascual M, Oliver-Bonet M, Navarro J et al (2005) Synapsis and meiotic recombination analyses: MLH1 focus in the XY pair as an indicator. *Hum Reprod* 20:2133–2139
- De Braekeleer M, Dao TN (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6:245–250
- De Perdigo A, Gabriel-Robez O, Rumpler Y (1989) Correlation between chromosomal breakpoint positions and synaptic behaviour in human males heterozygous for a pericentric inversion. *Hum Genet* 83:274–276
- Ducos A, Pinton A, Séguéla A et al (1997) A pericentric inversion of chromosome 4 in pigs. *Genet Sel Evol* 29:383–394
- Ducos A, Berland HM, Bonnet N et al (2007) Chromosomal control of pig populations in France: 2002–2006 survey. *Genet Sel Evol* 39:583–597
- Ferfourri F, Clement P, Gomes DM et al (2009) Is classic pericentric inversion of chromosome 2 inv(2)(p11q13) associated with an increased risk of unbalanced chromosomes? *Fertil Steril* 92(1497):e1491–1494
- Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A (2004) H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* 3:959–967
- Gabriel-Robez O, Ratomponirina C, Rumpler Y, Le Marec B, Luciani JM, Guichaoua MR (1986) Synapsis and synaptic adjustment in an infertile human male heterozygous for a pericentric inversion in chromosome 1. *Hum Genet* 72:148–152
- Goldman AS, Martin RH, Johannisson R et al (1992) Meiotic and sperm chromosome analysis in a male carrier of an inverted insertion (3;10)(q13.2;p14p13). *J Med Genet* 29:460–464
- Groupe de cytogénéticiens français (1986) Pericentric inversions in man. A French collaborative study. *Ann Génét* 29:129–168
- Guichaoua MR, Gabriel-Robez O, Ratomponirina C et al (1986) Meiotic behaviour of familial pericentric inversions of chromosomes 1 and 9. *Ann Génét* 29:207–214
- Hubbard TJ, Aken BL, Beal K et al (2007) Ensembl 2007. *Nucleic Acids Res* 35:D610–617
- Iwarsson E, Ahrlund-Richter L, Inzunza J et al (1998) Preimplantation genetic diagnosis of a large pericentric inversion of chromosome 5. *Mol Hum Reprod* 4:719–723
- Kaiser-Rogers K, Rao K (1999) Structural chromosome rearrangements. In: Gersen S, Keagle M (eds) *The principles of clinical cytogenetics*. Totowa Humana Press, pp 191–228
- Koehler KE, Millie EA, Cherry JP et al (2002) Sex-specific differences in meiotic chromosome segregation revealed by dicentric bridge resolution in mice. *Genetics* 162:1367–1379
- Koehler KE, Millie EA, Cherry JP, Schrupp SE, Hassold TJ (2004) Meiotic exchange and segregation in female mice heterozygous for paracentric inversions. *Genetics* 166:1199–1214
- Lefort G, Blanchet P, Belgrade N et al (2002) Stable dicentric duplication-deficiency chromosome 14 resulting from crossing-over within a maternal paracentric inversion. *Am J Med Genet* 113:333–338
- Lenzi ML, Smith J, Snowden T et al (2005) Extreme heterogeneity in the molecular events leading to the establishment of chiasmata during meiosis in human oocytes. *Am J Hum Genet* 76:112–127
- Madan K (1995) Paracentric inversions: a review. *Hum Genet* 96:503–515
- Malan V, Pipiras E, Sifer C et al (2006) Chromosome segregation in an infertile man carrying a unique pericentric inversion, inv(21)(p12q22.3), analysed using fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei: significance for clinical genetics. A case report. *Hum Reprod* 21:2052–2056
- Martin RH, Chemos JE, Lowry RB, Pattinson HA, Barclay L, Ko E (1994) Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 1. *Hum Genet* 93:135–138
- Martinat-Botté F, Quesnel HPA, Tourmut J, Terqui M (1996) Reproduction de la truie: bases physiologiques et maîtrise. 1ère partie. *Revue Méd Vét* 147:33–46
- Massip K, Berland H, Bonnet N et al (2008) Study of inter- and intra-individual variation of meiotic segregation patterns in t(3;15)(q27;q13) boars. *Theriogenology* 70:655–661
- Massip K, Bonnet N, Calgario A et al (2009) Male meiotic segregation analyses of peri- and paracentric inversions in the pig species. *Cytogenet Genome Res* 125:117–124
- McKinlay-Gardner RJ, Sutherland GR (2004) *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. Oxford University Press, New York

- Morel F, Laudier B, Guerif F et al (2007) Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 22:136–141
- Moses MJ, Poorman PA, Roderick TH, Davisson MT (1982) Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. IV. Synapsis and synaptic adjustment in two paracentric inversions. *Chromosoma* 84:457–474
- Pettenati MJ, Rao PN, Phelan MC et al (1995) Paracentric inversions in humans: a review of 446 paracentric inversions with presentation of 120 new cases. *Am J Med Genet* 55:171–187
- Pfeifer C, Thomsen PD, Scherthan H (2001) Centromere and telomere redistribution precedes homologue pairing and terminal synapsis initiation during prophase I of cattle spermatogenesis. *Cytogenet Cell Genet* 93:304–314
- Pinton A, Ducos A, Yerle M (2003) Chromosomal rearrangements in cattle and pigs revealed by chromosome microdissection and chromosome painting. *Genet Sel Evol* 35:685–696
- Pinton A, Ducos A, Yerle M (2004) Estimation of the proportion of genetically unbalanced spermatozoa in the semen of boars carrying chromosomal rearrangements using FISH on sperm nuclei. *Genet Sel Evol* 36:123–137
- Pinton A, Calgario A, Bonnet N et al (2009) Influence of sex on the meiotic segregation of a t(13;17) Robertsonian translocation: a case study in the pig. *Hum Reprod* 24:2034–2043
- Poorman PA, Moses MJ, Davisson MT, Roderick TH (1981) Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. III. Cytogenetic observations on two paracentric inversions. *Chromosoma* 83:419–429
- R Development Core Team (2007) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Robles P, Roig I, Garcia R et al (2007) Pairing and synapsis in oocytes from female fetuses with euploid and aneuploid chromosome complements. *Reproduction* 133:899–907
- Rogel-Gaillard C, Bourgeaux N, Billault A, Vaiman M, Chardon P (1999) Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements. *Cytogenet Cell Genet* 85:205–211
- Roig I, Robles P, Garcia R et al (2005) Evolution of the meiotic prophase and of the chromosome pairing process during human fetal ovarian development. *Hum Reprod* 20:2463–2469
- Rumpler Y, Gabriel-Robez O, Volobouev V, Yu W, Rasamimanana P, de Perdigo A (1995) Male sterility and double heterozygosity for chromosomal inversion. *Cytogenet Cell Genet* 69:66–70
- Saadallah N, Hulten M (1986) EM investigations of surface spread synaptonemal complexes in a human male carrier of a pericentric inversion inv(13)(p12q14): the role of heterosynapsis for spermatocyte survival. *Ann Hum Genet* 50:369–383
- Sosnowski J, Waroczyk M, Switonski M (2003) Chromosome abnormalities in secondary pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 60:571–581
- Tease C, Fisher G (1986) Further examination of the production-line hypothesis in mouse foetal oocytes. I. Inversion heterozygotes. *Chromosoma* 93:447–452
- Tease C, Hulten MA (2004) Inter-sex variation in synaptonemal complex lengths largely determine the different recombination rates in male and female germ cells. *Cytogenet Genome Res* 107:208–215
- Vialard F, Delanete A, Clement P, Simon-Bouy B, Aubriot FX, Selva J (2007) Sperm chromosome analysis in two cases of paracentric inversion. *Fertil Steril* 87(418):e411–415
- Villagomez DA (1993) Zygotene-pachytene substaging and synaptonemal complex karyotyping of boar spermatozoa. *Hereditas* 118:87–99

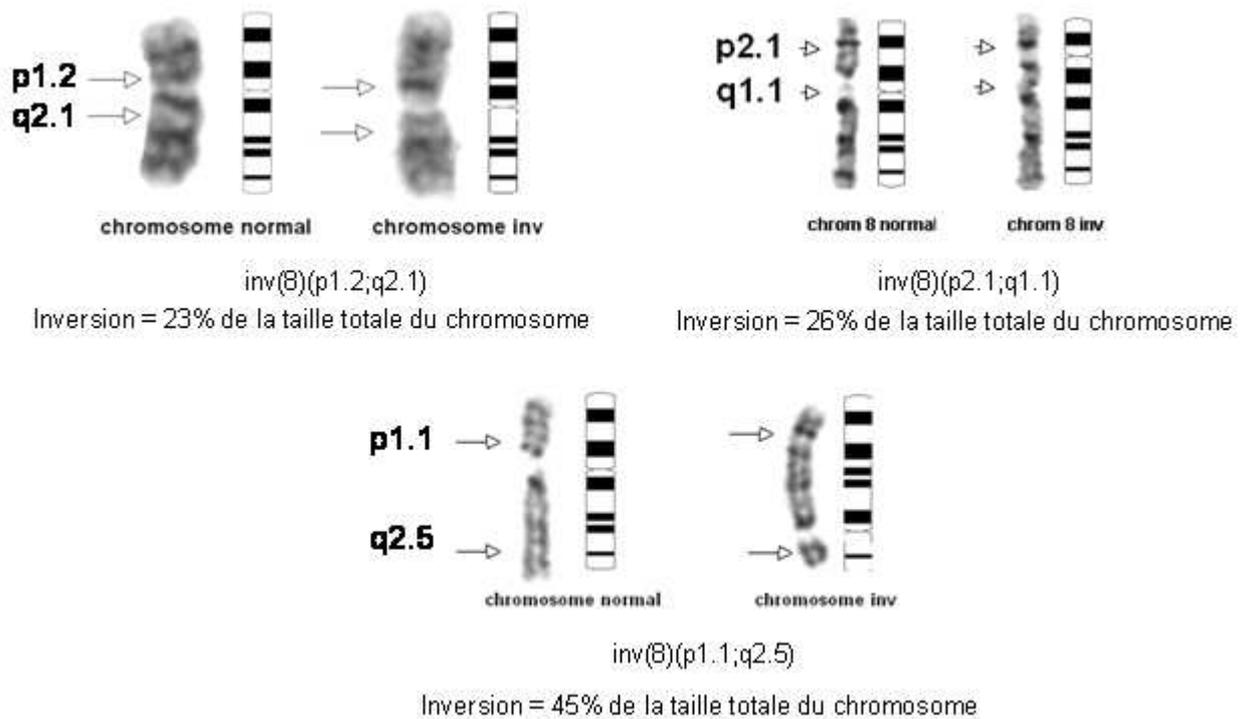


Figure II-2 : Caractérisation cytogénétique des trois inversions du chromosome 8 étudiées.

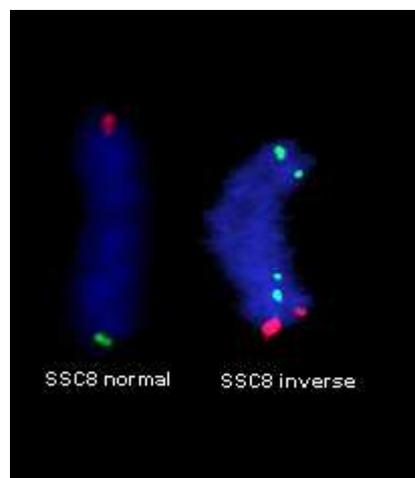


Figure II-3 : Caractérisation de l'inversion inv(8)(p1.1;q2.5) par des sondes de BAC télomériques.

On remarque sur le chromosome inversé que la sonde de BAC télomérique du bras q (en vert) est en deux parties, suggérant que la sonde se situe sur le point de cassure de l'inversion.

IV: Etude du processus méiotique pour des porteurs de trois inversions du chromosome 8

IV.1 Analyse des ségrégations méiotiques

Grâce au contrôle chromosomique mis en place au laboratoire, nous avons à notre disposition des échantillons de semence de trois individus porteurs d'inversions du chromosome 8 (Figure II-2). Pour deux des animaux, des échantillons testiculaires étaient aussi disponibles (congelés dans l'azote liquide). Contrairement aux inversions des chromosomes 1, 2 et 4 étudiées auparavant, la taille des fragments inversés pour ces trois inversions était plus intermédiaire (23%, 26% et 45% de la taille totale du chromosome). Il était donc très intéressant d'analyser la production de gamètes génétiquement déséquilibrés produits par ces porteurs afin de comparer les résultats obtenus précédemment avec ces nouvelles données. De même, l'analyse des appariements méiotiques pour deux inversions du chromosome 8 auraient pu nous permettre d'étudier le processus méiotique dans son entier et de mieux comprendre les facteurs influençant la façon dont les chromosomes impliqués dans l'inversion s'apparient, et ainsi compléter les résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'inversion du chromosome 4.

Des résultats préliminaires ont cependant montré que les sondes à notre disposition ne permettaient pas l'étude des ségrégations méiotiques pour l'une de ces inversions du chromosome 8 (inv(8)(p1.1q2.5)). En effet, bien que les BACs choisis soient situés aux extrémités télomériques des bras p et q, l'hybridation préalable des sondes sur des chromosomes métaphasiques normaux et inversés a montré que le BAC terminal du bras q était situé sur un des points de cassure de l'inversion (Figure II-3). Aucun autre BAC plus distal n'étant disponible dans la banque à notre disposition, il n'a pas été possible d'obtenir des résultats concernant la proportion de gamètes déséquilibrés produits par le porteur de cette inversion.

Pour les deux autres inversions péracentriques en revanche, des études ont bien pu être menées.

inv(8)(p1.2;q2.1)

norm/inv	dup(p)/del(q)	dup(q)/del(p)	« diploïdes »	autres
● ●	● ●	● ●	● ● ● ●	● ● ● ● ● ●
5436	106	104	70	397
95.1%	1.8%	1.8%	1.2%	6.9%

Total = 5716

inv(8)(p2.1;q1.1)

norm/inv	dup(p)/del(q)	dup(q)/del(p)	« diploïdes »	autres
● ●	● ●	● ●	● ● ● ●	● ● ● ● ● ●
4061	119	112	69	235
93.1%	2.7%	2.6%	1.6%	5.4%

Total = 4361

Tableau II-1 : Proportion des gamètes déséquilibrés et inattendus trouvés lors de l'étude des ségrégations méiotiques des inversions inv(8)(p1.2;q2.1) et inv(8)(p2.1;q1.1).

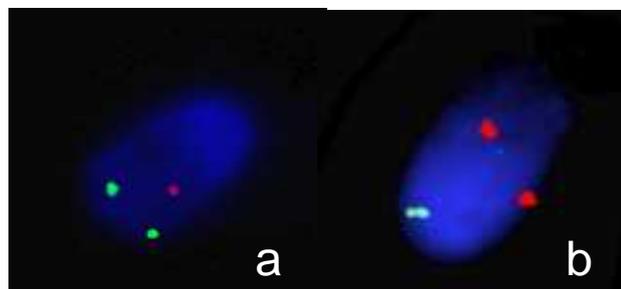


Figure II-4 : Noyaux de spermatozoïdes présentant des signaux inattendus : deux signaux verts et un rouge (a) et deux signaux rouges et un vert (b).

De manière surprenante, un très grand nombre de noyaux de spermatozoïdes analysés possédaient un profil inhabituel: ces cellules présentaient simultanément deux signaux d'une même couleur et un troisième de la couleur complémentaire (Tableau II-1, Figure II-4).

On peut observer cette configuration dans le cas d'inversions paracentriques, lorsque par exemple un fragment de chromosome dicentrique (formé durant la ségrégation des chromosomes) est intégré dans un gamète possédant un chromosome normal ou inversé. Pour les inversions péricentriques en revanche, la ségrégation des chromosomes n'est *a priori* pas perturbée et des fragments chromosomiques ne sont normalement pas générés.

Chaque manipulation, réalisée deux fois, montre que les techniques d'hybridation et de révélation ne sont pas à remettre en cause. La qualité des sondes des BACs utilisés a alors été mise en doute. Des études chez l'homme ont en effet montré que des défauts d'hybridation (perte ou duplication d'un signal) sur un nombre important de cellules analysées (parfois près de 10 %) étaient directement liés aux sondes télomériques utilisées (Mikhaail-Philips et al., 2004; Mikhaail-Philips et al., 2005). De même, une trop forte décondensation des spermatozoïdes peut être à l'origine d'un dédoublement du signal (Egozcue et al., 1997).

La semence d'un porteur d'une inversion inv(8)(p1.2;q2.1), ainsi que de la semence d'un porc normal ont alors été analysées en utilisant d'autres BACs situés sur les régions chromosomiques non télomériques p2.1, p1.2 et q2.1 du chromosome 8 (Figure II-5a). Les sondes ont été préalablement hybridées sur chromosomes métaphasiques et les signaux obtenus confirment que ces dernières ne chevauchent pas les régions inversées (Figure II-5b). Bien que réduite, la proportion de gamètes inattendus (présentant deux signaux rouges et un signal vert, et vice-versa) représentait encore 0,8 % du total des cellules comptées. La même proportion a aussi été détectée lors de l'analyse de 1000 spermatozoïdes provenant de la semence d'un verrat indemne d'anomalies chromosomiques (Tableau II-2). Ce dernier résultat tend à démontrer que les nouvelles sondes utilisées sont susceptibles, dans une moindre mesure, d'être à l'origine de défauts d'hybridation. Ne pouvant pas exclure la présence d'un biais dans nos données, il nous a semblé préférable de ne pas tenir compte des résultats obtenus. Ainsi, il ne sera pas fait de comparaison entre le pourcentage de gamètes génétiquement déséquilibrés produits par les porteurs d'inversions du chromosome 8 et les données obtenues dans le cadre de l'étude des autres inversions des chromosomes 1, 2 et 4.

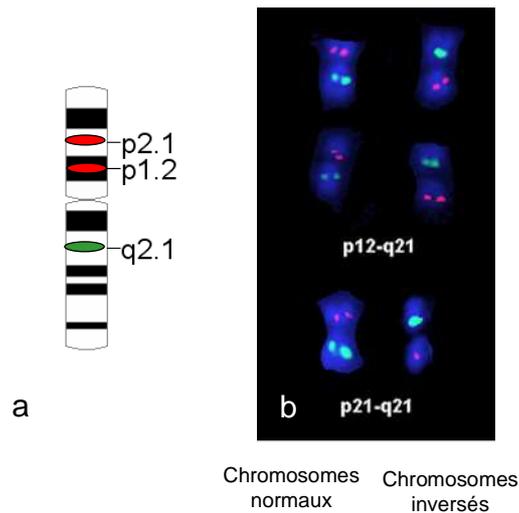


Figure II-5 : Localisation des nouvelles sondes utilisées sur des chromosomes 8 normaux et inversés.

a : localisation des sondes sur le chromosome 8. Les sondes du bras p ont été révélées en rouge, celle du bras q en vert.

b : la présence de seulement deux signaux rouges et verts sur les chromosomes indique que les sondes utilisées sont bien en dehors des régions inversées.

inv(8)(p1.2;q2.1)- BACs en p1.2 et q21.5

norm/inv	dup(p)/del(q)	dup(q)/del(p)	« diploïdes »	autres	
• •	• •	• •	• • • •	• • • •	
3000	12	8	6	27	3053
98.2%	0.39%	0.26%	0.19%	0.88%	

inv(8)(p1.2;q2.1)- BACs en p2.1 et q21.5

	norm/inv	dup(p)/del(q)	dup(q)/del(p)	« diploïdes »	autres	
	• •	• •	• •	• • • •	• • • •	
	3001	10	6	4	26	3047
	98.5%	0.33%	0.20%	0.13%	0.85%	
Contrôle	986	3	2	1	8	1000
	98.6%	0.3%	0.2%	0.1%	0.8%	

Tableau II-2 : Proportion des gamètes déséquilibrés et inattendus trouvés lors de l'étude des ségrégations méiotiques de l'inversion inv(8)(p1.2 ;q2.1) en utilisant des sondes de BACs localisées sur différentes régions chromosomiques.

IV.2 Analyse de l'appariement des chromosomes de deux individus porteurs d'inversions du chromosome 8

Outre les échantillons de semence à notre disposition, les échantillons testiculaires conservés pour deux inversions nous ont permis d'étudier aussi l'appariement des chromosomes lors des phases précoces de la méiose.

Une étude préliminaire, réalisée sur 145 spermatocytes du porteur de la plus grande des inversions du chromosome 8 (inversion caractérisée cytogénétiquement comme $inv(8)(p1.1;q2.5)$), a permis de mettre en évidence un comportement particulier du bivalent. En effet, 9 % des cellules analysées ont montré que le bivalent SSC 8 (identifié grâce à l'hybridation d'une sonde spécifique de ce chromosome) présentait des défauts plus ou moins importants d'appariement, visibles par l'accumulation de l'histone γ H2AX. Des formes indéterminées, mais aussi des boucles partielles ont pu être observées (Figure II-6).

Malheureusement, il n'a pas été possible de visualiser les sites de crossing-overs (pas de signaux MLH1), et les centromères ont aussi été très difficiles à distinguer. De plus, les étalements obtenus étaient pour la plupart de mauvaise qualité : chromosomes « en paquet », nombreux spermatozoïdes chevauchant les spermatocytes, bivalents fragmentés, etc.

Les résultats obtenus doivent être pris avec précaution et de nouvelles analyses seront réalisées par la suite pour les confirmer.

Il semble cependant que des facteurs comme la taille du fragment inversé ou le chromosome impliqué dans l'inversion jouent un rôle dans la manière dont les bivalents normaux et inversés s'apparient lors des phases précoces de la méiose.

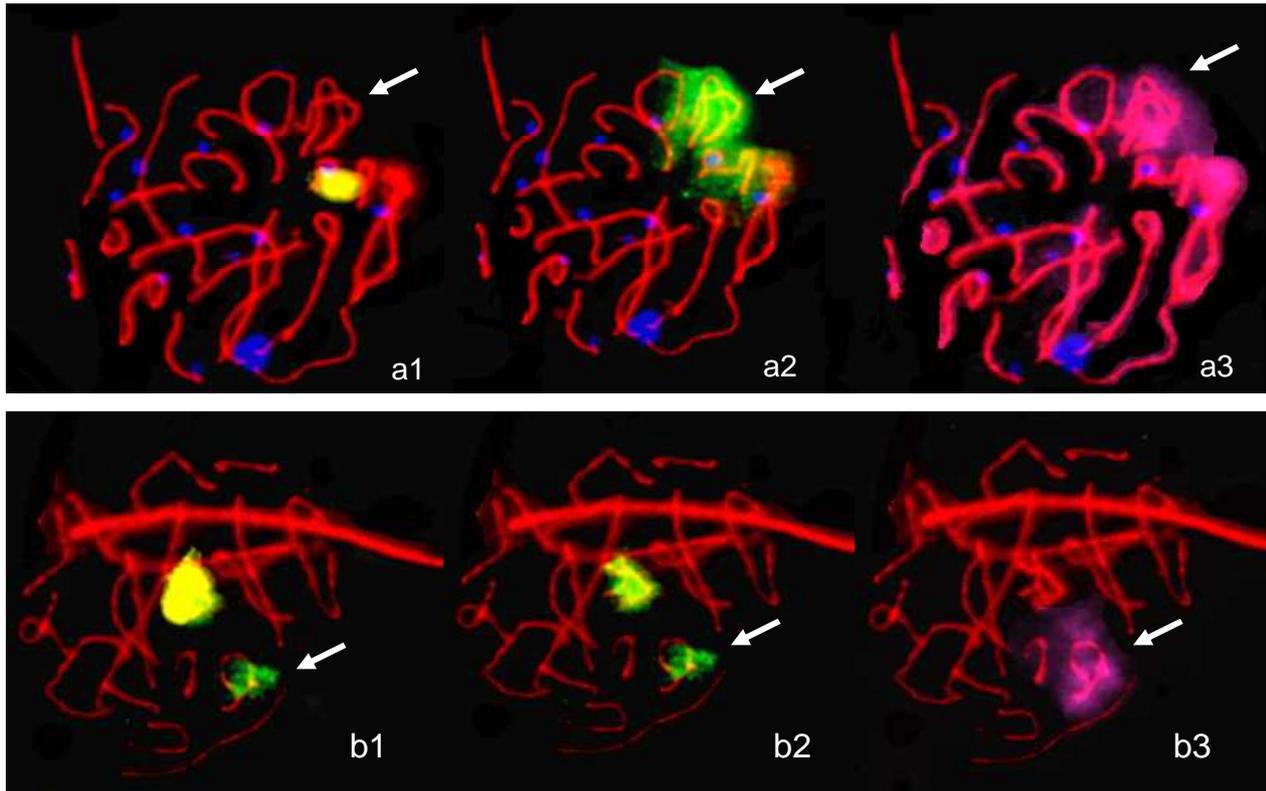


Figure II-6 : Spermatocytes issus d'un échantillon testiculaire du porteur de l'inversion $inv(8)(p1.1 ;q2.5)$ et dont le bivalent 8 présente des défauts d'appariement (flèches).

En rouge : complexes synaptonémaux

En bleu (a1, a2, a3) : centromères

En jaune (a1 et b1) : peinture du chromosome Y

En vert (a2, b1 et b2) : γ H2AX marquant les régions non appariées

En rose (a3 et b3) : peinture du chromosome 8

Images (a) : Asynapsis importante du bivalent 8. Les deux complexes synaptonémaux latéraux sont parfaitement visibles sur une grande partie du bivalent.

Images (b) : Formation d'une boucle d'inversion partiellement asynapsiée. La zone non appariée est visible par l'accumulation de γ H2AX. Le segment marqué en rouge recouvrant le spermatocyte correspond à une queue de spermatozoïde, qui réagit aussi aux anticorps anti-SCP3.

V. Discussion générale et perspectives

Les études réalisées pendant ma thèse répondaient à des objectifs à la fois fondamentaux et appliqués : d'une part, apporter de nouvelles connaissances sur la méiose, en utilisant le porc comme espèce modèle. D'autre part, documenter les effets des inversions dans l'espèce porcine, très peu de ces anomalies ayant fait l'objet d'études.

Pour la première fois chez le porc, des analyses de ségrégations méiotiques d'animaux porteurs de différents types d'inversions ont été réalisées. L'étude de l'impact comparé d'une même inversion sur la méiose mâle et femelle et l'analyse de l'ensemble du processus méiotique chez un individu porteur d'une inversion sont réalisées pour la première fois.

Dans ce chapitre, les principaux résultats obtenus seront rappelés, puis leurs implications pratiques et fondamentales seront présentées. Les perspectives ouvertes par nos travaux à plus ou moins long terme seront aussi évoquées.

V.1 Recherche appliquée : Estimation de l'effet des inversions sur la reproduction d'individus mâle et femelle porteurs

Bien que les études réalisées dans le cadre de cette thèse soient basées sur l'analyse d'un nombre limité de cas et que des études complémentaires (autres types d'inversions) soient nécessaires, les principaux résultats obtenus montrent que :

- 1)- L'effet potentiel de l'inversion 4 estimé à partir de l'analyse des gamètes génétiquement déséquilibrés produits est cohérent avec les effets réels constatés de l'anomalie (taille de portée des conjointes du verrat « inversé »). Ces résultats valident au moins pour ce remaniement la technique de SpermFISH comme méthode de prédiction *à priori* des effets d'inversions sur la reproduction.
- 2)- Pour les autres cas étudiés, l'impact des inversions sur les performances de reproduction des porteurs (estimé par la proportion de gamètes génétiquement déséquilibrés) semble faible.
- 3)- La taille du fragment inversé n'est pas corrélée à la proportion de gamètes génétiquement déséquilibrés produits, contrairement à ce que montrent les recherches effectuées chez l'Homme.
- 4)- Dans le cadre de l'inversion 4, le sexe du porteur ne semble pas avoir d'impact sur la proportion de gamètes déséquilibrés produits.

5)- Pour les inversions étudiées, il n'existe pas d'effet « inter-individu » sur la production de gamètes génétiquement déséquilibrés. Autrement dit, le fond génétique d'un individu porteur ne semble pas avoir d'impact sur la proportion de gamètes anormaux produits.

Ces résultats devraient permettre d'affiner le conseil génétique donné aux OSP lorsqu'un individu porteur d'une inversion est identifié dans leur élevage.

En effet, l'impact des inversions sur la reproduction semblant très limité, la pertinence d'une réforme des verrats porteurs d'inversions peut être remise en cause.

Si un animal à fort potentiel génétique ou issu d'une population à petits effectifs porteur d'une inversion est décelé dans le cadre du contrôle chromosomique, nous pourrions conseiller aux OSP de conserver cet individu dans leur schéma de sélection. De plus, dans le cas d'une diffusion de l'anomalie, en analysant la semence d'un seul reproducteur porteur d'une inversion, il serait possible d'estimer *a priori* la proportion de gamètes génétiquement déséquilibrés produits par ses apparentés (frères et descendants mâles), mais aussi, même si le cas est beaucoup plus rare, par d'autres individus non apparentés porteurs de la même inversion.

Le développement dans le laboratoire d'un panel de sondes télomériques pour l'ensemble des chromosomes porcins et la maîtrise de la méthode de SpermFISH nous permettent d'envisager la réalisation dans un futur proche d'un service « à façon » pour les acteurs de la filière porcine. En effet, les études réalisées dans le cadre de l'inversion du chromosome 4 ont montré que la proportion de gamètes génétiquement déséquilibrés produits était cohérente avec l'effet réel de l'anomalie sur les performances de reproduction du porteur. Ainsi, l'étude des profils de ségrégation méiotique pourrait être proposée aux OSP lors de la détection d'un verroat porteur d'une inversion. Le conseil génétique que nous donnerions alors serait « personnalisé » et beaucoup plus précis. Il pourrait être précieux pour les acteurs de la filière porcine pour qui l'évaluation du ratio bénéfices/risques à diffuser la semence d'un reproducteur porteur d'un réarrangement chromosomique est cruciale.

V.2 Recherche fondamentale : apport de nouvelles connaissances sur le processus méiotique en présence d'inversions

D'un point de vu plus fondamental, nous avons montré que :

1)- L'appariement des chromosomes normaux et inversés lors des phases précoces de la méiose est différent selon les inversions étudiées.

Pour des inversions de grande taille, on observe majoritairement des phénomènes d'hétérosynapsis des régions chromosomiques non homologues contrairement à ce qui est généralement reporté chez l'Homme et la souris.

2)- La recombinaison méiotique est fortement perturbée sur le bivalent formé par le chromosome inversé et son homologue normal.

V.2.1. Quels sont les mécanismes d'appariements des chromosomes chez le porc ?

Comme évoqué dans le premier chapitre bibliographique, l'appariement des chromosomes est orchestré par des mécanismes complexes, où plusieurs protéines jouent un rôle crucial. Ainsi par exemple, SCP3, SCP1, REC8 ou encore SMC1 β sont des protéines indispensables pour assurer une synapsis correcte des chromosomes.

Les différences d'appariement des chromosomes mises en évidence entre l'homme et le porc pourraient ainsi s'expliquer par une apparition de certaines protéines à des étapes différentes du processus méiotique, et/ou par un rôle différent de ces dernières au cours de la synapsis des homologues. Il a été montré par exemple, chez la souris, que REC8 et SMC1 β étaient indispensables à un appariement adéquat des chromosomes homologues (Bannister et al., 2004; Revenkova et al., 2004). Ces études ont aussi montré que ces cohésines sont normalement présentes dès le stade leptotène.

Chez le porc, on peut supposer que des timings d'apparition différents de REC8 et SMC1 β mais aussi de SCP1 et SCP3 (protéines du complexe synaptonémal) pourraient être responsables d'un appariement particulier des chromosomes (phénomène d'hétérosynapsis fréquemment observé). De même, les modes d'action (rôles, interactions...) de ces protéines pourraient être différents, et être à l'origine d'une synapsis particulière des homologues dans cette espèce.

Nous avons pour l'instant focalisé nos recherches sur le stade pachytène chez le porc, mais l'analyse de stades plus précoces (leptotène et zygotène) pourrait nous permettre de comprendre comment l'appariement des chromosomes est mis en place et quels rôles jouent les différentes protéines méiotiques impliquées dans ce phénomène, en présence ou non d'anomalies chromosomiques.

Ces données nouvelles pourraient nous permettre d'expliquer pourquoi la synapsis des chromosomes en présence d'une inversion est particulière chez le porc.

Ces études pourraient être réalisées par le biais de techniques immunohistochimiques, comme cela a déjà été réalisé chez l'homme et certaines espèces animales dont le bovin (pour revue, Vallente et al., 2006 et Pfeifer et al., 2003; Pfeifer et al., 2001).

L'appariement préférentiel des chromosomes par hétérosynapsis des régions non homologues suggère aussi que des problèmes d'homologie de séquence ne sont pas détectés au moment de l'appariement. Une explication possible repose sur l'hypothèse d'Ashley : la localisation des points de cassure peut en effet induire une hétérosynapsis si ces derniers (ou un seul) sont situés dans une bande G sombre. C'est le cas pour l'inversion du chromosome 4 étudiée (inv(4)(p1.4;q2.3) - la bande p1.4 est une bande G sombre). D'autres études doivent être menées à court terme pour approfondir nos connaissances sur l'appariement des chromosomes en présence d'inversions et confirmer ou infirmer cette hypothèse. Pour cela, une analyse plus détaillée de l'inversion (8)(p1.1;q2.5), dont les deux points de cassure sont situés dans des bandes claires, et de l'inversion inv(8)(p1.2;q2.1) (taille du fragment inversé plus petit- 23% de la taille totale du chromosome) dont un des points de cassure est situé dans une bande sombre sera réalisée.

La mise en place d'accouplements raisonnés chez le porc nous permet aussi d'envisager la création d'animaux porteurs de réarrangements « complexes », tels que des individus porteurs de deux inversions différentes. Des études menées chez des souris porteuses de deux inversions situées sur le même chromosome ont permis de mieux comprendre le mécanisme de formation des boucles d'inversion chez cette espèce (Borodin et al., 1992; Chandley, 1982; Rumpler et al., 1995). Nous pourrions nous aussi améliorer nos connaissances sur le comportement méiotique des chromosomes en présence d'inversions par ce biais.

Bien que l'utilisation de l'espèce porcine présente plusieurs avantages (structure chromosomique comparable à celle de l'Homme, création d'animaux porteurs d'anomalies chromosomiques par le biais d'accouplements raisonnés), les données obtenues nous poussent à nous interroger sur la pertinence de l'utilisation du porc comme modèle animal pour l'étude du processus méiotique en présence d'inversion. Toutefois, le nombre de cas porcins analysés est relativement limité et d'autres études sont nécessaires pour documenter ce sujet. La comparaison des données obtenues chez l'Homme et chez le porc doit cependant être effectuée en prenant en compte le fait qu'un biais peut exister dans le recrutement des cas étudiés. En effet, la majorité des cas humains étudiés sont des individus avec des problèmes de fertilité avérés. Ces cas présentent des altérations souvent sévères de leurs paramètres séminaux résultant d'une méiose globalement perturbée. A l'inverse, tous les porcs analysés dans le cadre de notre thèse présentaient des paramètres séminaux normaux.

V.2.2. Quel est l'impact des inversions sur la recombinaison chez le porc ?

Nos études sur l'inversion 4 ont également permis de montrer que la recombinaison méiotique était fortement perturbée pour le bivalent correspondant (chromosomes 4 normal et inversé). La diminution importante d'événements de recombinaison dans la région inversée est due à la manière dont les chromosomes s'apparient. En effet, toute recombinaison est supprimée dans les régions chromosomiques appariées de manière non homologue. Il est donc logique de ne dénombrer des CO « interstitiels » que dans des cellules présentant un appariement homologue des chromosomes par le biais d'une boucle d'inversion.

De plus, des études préliminaires sur un petit nombre de spermatoocytes provenant d'un porc « témoin » (indemne d'anomalies chromosomiques) ont montré que la localisation des crossing overs est préférentiellement télomérique pour la majorité des chromosomes. Cette disposition « naturelle » des CO pourrait donc ainsi expliquer une faible proportion d'événements de recombinaison interstitiels en présence d'une inversion. Un programme de recherche a donc récemment débuté au laboratoire afin d'analyser la recombinaison méiotique (nombre et position des crossing overs) et l'interférence chez des porcs normaux, afin de créer une « carte » de la recombinaison méiotique pour chaque chromosome, comme cela a déjà été réalisé chez l'homme (Sun et al., 2006), la souris (Froenicke et al., 2002) et le chien (Basheva et al., 2008). Dans notre cas, des analyses séquentielles devront être réalisées : trois pools de 6 BACs seront ainsi hybridés sur les mêmes spermatoocytes afin d'identifier tous les chromosomes porcins. En effet, nous ne possédons pas le matériel nécessaire pour réaliser une hybridation simultanée de tous les chromosomes, contrairement aux expérimentations menées chez l'homme (Sun et al., 2006).

V.3. Autres perspectives

V.3.1 Affiner l'analyse des produits de ségrégations méiotiques d'inversion

Il est envisageable dans un futur proche de compléter nos études sur la constitution chromosomique des gamètes génétiquement déséquilibrés produits en présence d'inversions. En effet, la technique utilisée lors de cette thèse (SpermFISH et utilisation de sondes p- et q-terminales) présente certaines limites.

Elle ne permet notamment pas de discerner, parmi les produits génétiquement équilibrés (noyaux de spermatozoïdes présentant un signal de chaque sonde), ceux qui sont porteurs du chromosome inversé de ceux qui portent le chromosome « normal » ainsi que d'éventuels gamètes recombinés issus d'échanges de type « U-loop » entre les chromosomes (Bhatt et al., 2007).

L'utilisation de sondes télomériques ne permet donc pas de réaliser une estimation précise de tous les types de gamètes déséquilibrés, et donc d'en déduire les mécanismes ayant mené à leur formation.

Très récemment, l'utilisation de sondes particulières, recouvrant les points de cassure de l'inversion, ont été utilisées. Elles permettent de distinguer les différents types de gamètes normaux, inversés et issus de mécanismes d'échanges de chromatides particuliers (Bhatt et al., 2007; Bhatt et al., 2008) et apportent de nouvelles connaissances sur la ségrégation méiotique des chromosomes. Malheureusement, l'utilisation de telles sondes demande de connaître très précisément la localisation des points de cassure, et de nombreuses étapes de test de sondes rendent le procédé long et fastidieux (Lu et al., 2009). Il serait cependant intéressant dans un futur proche de créer de telles sondes dans l'espèce porcine pour mieux comprendre les mécanismes régissant la ségrégation méiotique des chromosomes en présence d'inversions.

V.3.2 Analyser dans son intégralité le processus méiotique en présence d'inversions.

III.3.2.1. Chez le mâle

Grâce aux techniques d'immunohistochimie et de SpermFISH, il est possible d'étudier certaines phases précoces de la méiose ainsi que les produits finaux résultant des deux divisions méiotiques successives. Cependant, très peu de données sont connues sur les produits intermédiaires de la méiose que sont les métaphases I et II.

Or, l'analyse de la totalité du processus méiotique pourrait être cruciale pour améliorer nos connaissances sur la manière dont les gamètes anormaux sont produits : en effet, l'étude des métaphases I et II permettrait d'obtenir des données sur la manière dont les chromosomes ségrégent dans les différentes cellules filles. Dans le cas des inversions péricentriques du chromosome 8 par exemple, où des types de gamètes inattendus ont été observés, l'analyse des produits intermédiaires de méiose pourrait permettre de comprendre les mécanismes responsables de la formation de ces spermatozoïdes particuliers.

De même, l'étude des cellules germinales en métaphase chez des porteurs d'inversions paracentriques permettrait d'obtenir des données sur la proportion de cassures de chromatides dicentriques et la propension des chromosomes acentriques à incorporer un gamète.

Développée au départ chez la souris (Takahashi and Yamanaka, 2006), la production de cellules pluripotentes par reprogrammation de cellules somatiques différenciées (cellules IPS : Induced Pluripotent Stem cells) a ouvert de nouvelles perspectives dans la recherche biologique (pour revue, Telugu et al., 2009). Chez le porc, la production de cellules pluripotentes a aussi été entreprise avec succès très récemment (Esteban et al., 2009; Ezashi et al., 2009; Roberts et al., 2009). Comme chez l'homme et la souris, les cellules pluripotentes sont créées en infectant des cellules différenciées par des lentivirus contenant 4 gènes « de reprogrammation » (Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc - Ezashi et al., 2009). Les cellules IPS peuvent ensuite participer à toutes les lignées somatiques, mais aussi à la production de cellules germinales pré et post méiotiques (par exemple Geijsen et al., 2004; Mathews et al., 2009).

D'autres équipes ont quant à elles réussi à induire une spermatogénèse *in vitro* en ensemençant des spermatogonies isolées à partir d'un échantillon testiculaire chez la souris (Hamra et al., 2008; Lee et al., 2007; Lee et al., 2006; Stukenborg et al., 2009).

L'utilisation de cellules IPS différenciées en cellules germinales ou la mise en place d'une spermatogénèse *in vitro* à partir de spermatogonies pourraient nous permettre de collecter des cellules à différents stades et d'analyser leur contenu chromosomique.

Contrairement aux techniques « classiques » d'étude de cellules méiotiques qui ne permettent pas d'analyser un grand nombre de cellules, la culture contrôlée de spermatogonies ou spermatocytes permet au contraire de prélever un nombre plus important de cellules à un stade précis du processus méiotique.

Depuis quelques mois, notre équipe de recherche (Hervé Acloque et col.) développe un protocole permettant d'obtenir des cellules IPS à partir de fibroblastes issus de biopsies de peau, puis de les différencier en cellules gamétiques. A moyen terme, nous espérons donc pouvoir étudier l'intégralité du processus méiotique de verrats porteurs d'anomalies chromosomiques.

Cependant, bien que ces techniques soient prometteuses, les cellules germinales analysées auront été obtenues de manière « artificielle » et on ne peut exclure que leur comportement soit modifié par rapport à celui qu'elles auraient pu avoir *in vivo*.

Il faudra alors impérativement vérifier que l'utilisation de la culture *in vitro* n'induit pas un quelconque biais dans l'analyse des résultats que nous pourrions obtenir.

III.3.2.2. Chez la femelle

Chez la femelle, il est aussi possible d'étudier les phases précoces de la méiose en utilisant des techniques d'immunohistochimie sur des cellules au stade pachytène, comme cela a déjà été réalisé chez la souris (Koehler et al., 2004). Cependant, du fait de la spécificité de la méiose chez la femelle, l'obtention de cellules méiotiques aux stades adéquats demande la mise en place d'un protocole relativement long et contraignant. Des truies devraient être inséminées, puis sacrifiées (autours de 60 jours de gestation) afin de ponctionner les ovaires des fœtus femelles et ainsi obtenir des ovocytes au stade pachytène.

En prélevant ces fœtus à d'autres périodes de leur développement, il est théoriquement possible d'obtenir des ovocytes à différents stades de la méiose. Cependant, de telles expérimentations seraient très lourdes à mettre en œuvre et très gourmandes en temps. Il serait donc très intéressant de réfléchir à l'avenir à la possibilité d'appliquer les techniques de culture *in vitro* aux cellules méiotiques primordiales femelles, comme cela est déjà réalisé chez la souris (Hubner et al., 2003).

V.3.3 Identifier d'autres conséquences possibles des inversions

V.3.3.1. Micro-déséquilibres chromosomiques associés aux inversions

Comme cela a été précédemment évoqué dans le chapitre II de l'étude bibliographique, les translocations « réciproques » ne le sont pas toujours, et des microdélétions peuvent survenir au niveau des points de cassure et entraîner des anomalies phénotypiques plus ou moins sévères chez les porteurs.

Encadré 3 : L'épigénétique, une discipline émergente aux multiples implications

Le terme « épigénétique » a été utilisé pour la première fois par Conrad Waddington, un des premiers biologistes ayant suggéré que la génétique et la biologie du développement étaient intrinsèquement liées (Waddington, 1939). Au cours des découvertes effectuées dans le domaine, la définition même du terme a souvent été modifiée durant les années qui suivirent. Aujourd'hui, l'épigénétique est définie comme étant l'étude des mécanismes moléculaires associés à des modifications de l'activité des gènes, hérissables à travers la mitose voire même la méiose et sans changements de la séquence des nucléotides (Goldberg et al., 2007). Par exemple, des méthylations de l'ADN lui-même ou des histones assurant sa compaction, induisent des modifications de la structure de la chromatine et des répressions ou activations géniques (Cheung and Lau, 2005; Fischle et al., 2003). Plus récemment, plusieurs équipes ont aussi mis en évidence le rôle de petits ARNs (Acide Ribo Nucléique) dans des mécanismes épigénétiques (pour revue, Feil, 2008).

Le rôle des marqueurs épigénétiques sur la formation de tumeurs et de cancers (pour revue, Richly et al., 2010), mais aussi sur le phénomène d'empreinte parentale (e.g. Bartolomei, 2009; Weaver et al., 2009), par exemple, est aujourd'hui très étudié.

Une situation équivalente est susceptible d'être rencontrée dans le cas des inversions (e.g Brown et al., 2009; Jiang et al., 2008). Notre laboratoire a mis en place très récemment un programme visant à étudier le statut chromosomique de verrats porteurs de paramètres séminaux dégradés. Dans le cas où un porteur d'inversion serait détecté dans cette population, il serait pertinent d'utiliser la technique de CGH array afin de mettre en évidence des microdélétions éventuelles dans les régions des points de cassure qui pourraient expliquer le phénotype du porteur. Grâce à l'avancée du séquençage du génome porcine et le nombre de plus en plus important de puces ADN disponibles chez le porc, cette technique va très certainement se développer et nous pourrions envisager d'étudier plus finement certains réarrangements chromosomiques dans l'espèce porcine.

V.3.3.2 Impact des anomalies chromosomiques sur les phénomènes épigénétiques se déroulant dans les gamètes

Si les causes génétiques de l'infertilité mâle sont aujourd'hui bien documentées (par exemple Martin, 2008; O'Flynn O'Brien et al., 2010), l'avancée de l'épigénétique (cf. encadré « l'épigénétique, une discipline émergente aux multiples implications ») ces dernières années dans de nombreux domaines ont incité certaines équipes de recherche à étudier l'impact que pouvaient engendrer des modifications épigénétiques sur la fonction de reproduction.

Plusieurs études ont en effet montré qu'il existait une forte activité de reprogrammation épigénétique des cellules germinales durant la spermiogénèse, par le biais de méthylation de l'ADN (pour revue, Carrell and Hammoud, 2010; Rousseaux et al., 2006). Ces phénomènes épigénétiques sont d'ailleurs essentiels : ils contrôlent l'expression génique dans le gamète, notamment au niveau des gènes soumis à empreinte parentale (Rousseaux et al., 2008) et de certains gènes cruciaux pour le développement embryonnaire tel que les gènes Hox (pour revue, Miller et al., 2010).

L'étude de la méthylation globale de l'ADN ainsi que de l'acétylation des histones spermatiques ont déjà permis de montrer que des anomalies de ces marques épigénétiques pouvaient être associées à des échecs de fécondation (Benchaib et al., 2005) ou à la présence du Sertoli cell-only syndrome (SCO), c'est-à-dire l'absence totale de cellules germinales, chez les patients étudiés (Faure et al., 2003; Seli and Sakkas, 2005). Récemment, il a aussi été mis en évidence que des défauts de méthylation de gènes soumis à empreinte parentale pouvaient être la cause d'oligospermie chez les patients étudiés (Filipponi and Feil, 2009).

De même il a été proposé que des défauts épigénétiques chez des patients infertiles pouvaient être la cause de l'augmentation d'anomalies chez leur descendance issue d'une fécondation *in vitro* (Lim et al., 2009; Manipalviratn et al., 2009).

Aucune étude ne permet aujourd'hui de savoir dans quelle mesure la présence d'anomalies chromosomiques de structure, comme les inversions, influent sur les marques épigénétiques des cellules germinales. La mise en place d'un programme de recherche mené par Hervé Acloque depuis quelques mois dans notre laboratoire pourrait permettre de mieux appréhender l'impact des anomalies chromosomiques sur les marques épigénétiques dans le spermatozoïde. Comme cela a été réalisé récemment chez le mouton (Colosimo et al., 2009), des analyses de la méthylation de gènes soumis à empreinte parentale sur des verrats indemnes et porteurs de remaniements chromosomiques seront réalisées bientôt.

Nous pourrions ensuite étudier les marques épigénétiques d'autres gènes (notamment ceux impliqués dans le développement embryonnaire) chez des porteurs de translocations ou d'inversions et améliorer encore nos connaissances sur l'impact global des remaniements chromosomiques sur la fonction de reproduction.

Conclusion

Les inversions sont des anomalies chromosomiques de structure n'impliquant qu'un seul chromosome. Elles peuvent être à l'origine de problèmes de reproduction chez les porteurs en raison de perturbations du processus méiotique, conduisant à des troubles de la spermatogenèse et/ou à la production de gamètes génétiquement déséquilibrés. Bien qu'un grand nombre de cas aient été documentés chez l'Homme, très peu d'études de ségrégation méiotique d'inversions (permettant d'analyser la production de gamètes déséquilibrés) ont été publiées à ce jour. Du fait du petit nombre de cas documentés dans l'espèce porcine, les données disponibles concernant l'impact des inversions sur la reproduction sont encore plus limitées.

L'analyse méiotique de différentes inversions identifiées chez le porc dans le cadre du programme national de contrôle chromosomique mis en œuvre par notre laboratoire a donc présenté un double intérêt.

Grâce aux méthodes développées pour estimer les risques associés à ces anomalies (SpermFISH notamment), nous avons pu montrer que les inversions étudiées avaient un impact très limité sur la reproduction des porteurs, mâles ou femelles. D'un point de vue zootechnique, les résultats obtenus nous permettront dans le futur de conseiller de la manière la plus pertinente possible les acteurs de la filière porcine sur l'utilité de conserver des animaux porteurs de tels remaniements dans leurs schémas de sélection.

L'utilisation de techniques d'immunohistochimie nous a permis d'étudier plus précisément le comportement méiotique des chromosomes lors des phases précoces de la méiose en présence d'inversions, et ainsi d'approfondir nos connaissances sur le processus méiotique en présence de telles anomalies. Un appariement particulier du chromosome normal et inversé (phénomène d'hétérosynapsis) a ainsi pu être mis en évidence. Ainsi, malgré les atouts que présente le porc pour nos expérimentations (structure chromosomique proche de l'Homme, création d'individus porteurs d'anomalies chromosomiques...), les résultats obtenus pourraient remettre en question la pertinence de cette espèce comme modèle animal pour l'étude méiotique d'inversions. D'autres études devront être réalisées pour documenter ce sujet.

Dans le cas où ces résultats seraient vérifiés, de nouvelles perspectives de recherche seraient envisagées afin de comprendre les mécanismes pouvant expliquer les comportements méiotiques différents entre l'Homme et le porc.

De nouvelles techniques développées en premier lieu chez d'autres espèces, comme la production de cellules IPS et la mise en place d'une spermatogénèse *in vitro*, pourraient nous permettre d'améliorer nos connaissances fondamentales sur le processus méiotique en présence d'anomalies chromosomiques chez le porc.

Au-delà d'une considération purement « génétique » des effets des inversions sur la reproduction, nous pourrions aussi envisager dans le futur d'étudier l'impact des anomalies chromosomiques de structure sur les phénomènes épigénétiques se déroulant dans les gamètes, par le biais notamment d'analyses de méthylation de l'ADN.

Abdullah MF, Hoffmann ER, Cotton VE, Borts RH: A role for the MutL homologue MLH2 in controlling heteroduplex formation and in regulating between two different crossover pathways in budding yeast. *Cytogenet Genome Res* 107:180-190 (2004).

Acar H, Yildirim MS, Cora T, Ceylaner S: Evaluation of segregation patterns of 21;21 Robertsonian translocation along with sex chromosomes and interchromosomal effects in sperm nuclei of carrier by FISH technique. *Mol Reprod Dev* 63:232-236 (2002).

Agarwal S, Roeder GS: Zip3 provides a link between recombination enzymes and synaptonemal complex proteins. *Cell* 102:245-255 (2000).

Allers T, Lichten M: Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* 106:47-57 (2001).

Almeida Santos T, Dias C, Brito R, Henriques P, Almeida Santos A: Analysis of human spermatozoa by fluorescence in situ hybridization with preservation of the head morphology is possible by avoiding a decondensation treatment. *J Assist Reprod Genet* 19:291-294 (2002).

Altarescu G, Renbaum P, Brooks PB, Margalioth EJ, Ben Chetrit A, Munter G, Levy-Lahad E, Eldar-Geva T: Successful polar body-based preimplantation genetic diagnosis for achondroplasia. *Reprod Biomed Online* 16:276-282 (2008).

Amiel A, Sardos-Albertini F, Fejgin MD, Sharony R, Diukman R, Bartoov B: Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin. *J Hum Genet* 46:245-250 (2001).

Anahory T, Andreo B, Regnier-Vigouroux G, Soulie JP, Baudouin M, Demaille J, Pellestor F: Sequential multiple probe fluorescence in-situ hybridization analysis of human oocytes and polar bodies by combining centromeric labelling and whole chromosome painting. *Mol Hum Reprod* 9:577-585 (2003).

Anderson LK, Reeves A, Webb LM, Ashley T: Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* 151:1569-1579 (1999).

Anderson LK, Doyle GG, Brigham B, Carter J, Hooker KD, Lai A, Rice M, Stack SM: High-resolution crossover maps for each bivalent of *Zea mays* using recombination nodules. *Genetics* 165:849-865 (2003).

Angell RR: Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet* 86:383-387 (1991).

Angell RR, Xian J, Keith J, Ledger W, Baird DT: First meiotic division abnormalities in human oocytes: mechanism of trisomy formation. *Cytogenet Cell Genet* 65:194-202 (1994).

Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F: Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion inv6p23q25 carrier using FISH on decondensed sperm nuclei. *Cytogenet Genome Res* 97:149-154 (2002).

Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F: Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod* 19:1345-1351 (2004).

Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F: Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 111:297-304 (2005).

Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J: Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil Steril* 85:661-666 (2006).

Anton E, Vidal F, Blanco J: Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod* 22:2088-2092 (2007).

Arrighi FE, Hsu TC: Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10:81-86 (1971).

- Ashley T**, Moses MJ, Solari AJ: Fine structure and behaviour of a pericentric inversion in the sand rat, *Psammomys obesus*. *J Cell Sci* 50:105-119 (1981).
- Ashley T**: G-band position effects on meiotic synapsis and crossing over. *Genetics* 118:307-317 (1988).
- Ashley T**: Prediction of mammalian meiotic synaptic and recombinational behavior of inversion heterozygotes based on mitotic breakpoint data and the possible evolutionary consequences. *Genetica* 83:1-7 (1990).
- Ashley T**, Cacheiro NL, Russell LB, Ward DC: Molecular characterization of a pericentric inversion in mouse chromosome 8 implicates telomeres as promoters of meiotic recombination. *Chromosoma* 102:112-120 (1993).
- Ashley T**, Westphal C, Plug-de Maggio A, de Rooij DG: The mammalian mid-pachytene checkpoint: meiotic arrest in spermatocytes with a mutation in *Atm* alone or in combination with a *Trp53* (p53) or *Cdkn1a* (p21/cip1) mutation. *Cytogenet Genome Res* 107:256-262 (2004).
- Astachova N**, Vysotskaya L, Graphodatsky A: Detailed analysis of a new translocation in pig. *Genet Sel Evol* 23:65-69 (1991).
- AUA**, ASRM: Report on optimal evaluation of the infertile male. *Fertil Steril* 86:S202-209 (2006).
- Ayukawa H**, Tsukahara M, Fukuda M, Kondoh O: Recombinant chromosome 18 resulting from a maternal pericentric inversion. *Am J Med Genet* 50:323-325 (1994).
- Baarends WM**, Wassenaar E, van der Laan R, Hoogerbrugge J, Sleddens-Linkels E, Hoeijmakers JH, de Boer P, Grootegoed JA: Silencing of unpaired chromatin and histone H2A ubiquitination in mammalian meiosis. *Mol Cell Biol* 25:1041-1053 (2005).
- Baccetti B**, Bruni E, Collodel G, Gambera L, Moretti E, Marzella R, Piomboni P: 10, 15 reciprocal translocation in an infertile man: ultrastructural and fluorescence in-situ hybridization sperm study: case report. *Hum Reprod* 18:2302-2308 (2003).
- Baik SH**, Jee BK, Choi JS, Yoon HK, Lee KH, Kim YH, Lim Y: DNA profiling by array comparative genomic hybridization (CGH) of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and tumor tissue cell in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Mol Biol Rep* 36:1767-1778 (2009).
- Baker SM**, Bronner CE, Zhang L, Plug AW, Robatzek M, Warren G, Elliott EA, Yu J, Ashley T, Arnheim N, Flavell RA, Liskay RM: Male mice defective in the DNA mismatch repair gene *PMS2* exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell* 82:309-319 (1995).
- Baker SM**, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie DM, Monell C, Arnheim N, Bradley A, Ashley T, Liskay RM: Involvement of mouse *Mlh1* in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet* 13:336-342 (1996).
- Balhorn R**: A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 93:298-305 (1982).
- Bannister LA**, Reinholdt LG, Munroe RJ, Schimenti JC: Positional cloning and characterization of mouse *mei8*, a disrupted allele of the meiotic cohesin *Rec8*. *Genesis* 40:184-194 (2004).
- Bardhan A**, Sharma T: Sequential meiotic prophase development in the pubertal Indian pygmy field mouse: synaptic progression of the XY chromosomes, autosomal heterochromatin, and pericentric inversions. *Genome* 43:172-180 (2000).
- Barlow AL**, Hulten MA: Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I oocytes from normal human females. *Zygote* 6:27-38 (1998).

- Barlow C**, Liyanage M, Moens PB, Tarsounas M, Nagashima K, Brown K, Rottinghaus S, Jackson SP, Tagle D, Ried T, Wynshaw-Boris A: Atm deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptotema of prophase I. *Development* 125:4007-4017 (1998).
- Bartolomei MS**: Genomic imprinting: employing and avoiding epigenetic processes. *Genes Dev* 23:2124-2133 (2009).
- Basheva EA**, Bidau CJ, Borodin PM: General pattern of meiotic recombination in male dogs estimated by MLH1 and RAD51 immunolocalization. *Chromosome Res* 16:709-719 (2008).
- Basille C**, Frydman R, El Aly A, Hesters L, Fanchin R, Tachdjian G, Steffann J, LeLorc'h M, Achour-Frydman N: Preimplantation genetic diagnosis: state of the art. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 145:9-13 (2009).
- Bastin-Shanower SA**, Fricke WM, Mullen JR, Brill SJ: The mechanism of Mus81-Mms4 cleavage site selection distinguishes it from the homologous endonuclease Rad1-Rad10. *Mol Cell Biol* 23:3487-3496 (2003).
- Batanian J**, Hulten MA: Electron microscopic investigations of synaptonemal complexes in an infertile human male carrier of a pericentric inversion inv(1)(p32q42). Regular loop formation but defective synapsis including a possible interchromosomal effect. *Hum Genet* 76:81-89 (1987).
- Baudat F**, Nicolas A: Clustering of meiotic double-strand breaks on yeast chromosome III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5213-5218 (1997).
- Baudat F**, Manova K, Yuen JP, Jasin M, Keeney S: Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell* 6:989-998 (2000).
- Baudat F**, Keeney S: Meiotic recombination: Making and breaking go hand in hand. *Curr Biol* 11:R45-48 (2001).
- Baudat F**, de Massy B: Regulating double-stranded DNA break repair towards crossover or non-crossover during mammalian meiosis. *Chromosome Res* 15:565-577 (2007).
- Benchai M**, Braun V, Ressenkoff D, Lornage J, Durand P, Niveleau A, Guerin JF: Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum Reprod* 20:768-773 (2005).
- Benet J**, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J: Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 111:281-290 (2005).
- Berger R**: Cytogénétique humaine. , in Feingold J, Fellous M, Solignac M (eds): *Principes de génétique humaine*, pp 33-58 (Hermann, Paris 1998).
- Bergerat A**, de Massy B, Gadelle D, Varoutas PC, Nicolas A, Forterre P: An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* 386:414-417 (1997).
- Bernicot I**, Dechanet C, Mace A, Hedon B, Hamamah S, Pellestor F, Anahory T: Predictive value of sperm-FISH analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis (PGD) for a pericentric inversion inv5(p15.3q11.2) carrier. *Hum Reprod* (2010).
- Bhatt S**, Moradkhani K, Mrasek K, Puechberty J, Lefort G, Lespinasse J, Sarda P, Liehr T, Hamamah S, Pellestor F: Breakpoint characterization: a new approach for segregation analysis of paracentric inversion in human sperm. *Mol Hum Reprod* 13:751-756 (2007).
- Bhatt S**, Moradkhani K, Mrasek K, Puechberty J, Manvelyan M, Hunstig F, Lefort G, Weise A, Lespinasse J, Sarda P, Liehr T, Hamamah S, Pellestor F: Breakpoint mapping and complete analysis of meiotic segregation patterns in three men heterozygous for paracentric inversions. *Eur J Hum Genet* (2008).

- Bielanska-Osuchowska Z:** Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reprod Biol* 6:161-193 (2006).
- Bishop DK, Park D, Xu L, Kleckner N:** DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 69:439-456 (1992).
- Bishop DK, Zickler D:** Early decision; meiotic crossover interference prior to stable strand exchange and synapsis. *Cell* 117:9-15 (2004).
- Black JL, Erickson BH:** Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *Anat Rec* 161:45-55 (1968).
- Bocian E, Suchenek K, Obersztyn E, Nowakowska B, Mazurczak T:** Recombination aneusomy of subtelomeric regions of chromosome 5, resulting from a large familial pericentric inversion inv(5)(p15.33q35.3). *J Appl Genet* 46:109-114 (2005).
- Bojesen A, Juul S, Gravholt CH:** Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study. *J Clin Endocrinol Metab* 88:622-626 (2003).
- Bojko M:** Human meiosis VIII. Chromosome pairing and formation of the synaptonemal complex in oocytes. *Carlberg Res Commun* 48:457-483 (1983).
- Bonduelle M, Camus M, De Vos A, Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, Verheyen G, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A:** Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children. *Hum Reprod* 14 Suppl 1:243-264 (1999).
- Borde V, Cobb J:** Double functions for the Mre11 complex during DNA double-strand break repair and replication. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1249-1253 (2009).
- Borde V, Robine N, Lin W, Bonfils S, Geli V, Nicolas A:** Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *EMBO J* 28:99-111 (2009).
- Borgaonkar DS:** Chromosomal variation in Man. A catalog of chromosomal variants and anomalies. (Wiley-Liss, Inc, New York 1997).
- Borner GV, Kleckner N, Hunter N:** Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell* 117:29-45 (2004).
- Borodin PM, Gorlov IP, Ladygina T:** Synaptic interrelationships between the segments of the heteromorphic bivalent in double heterozygotes for paracentric inversions in chromosome 1 of the house mouse. *Chromosoma* 101:374-379 (1992).
- Borts RH, Chambers SR, Abdullah MF:** The many faces of mismatch repair in meiosis. *Mutat Res* 451:129-150 (2000).
- Boué A, Gallano P:** A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. *Prenat Diagn* 4 Spec No:45-67 (1984).
- Braun RE:** Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* 28:10-12 (2001).
- Breeuwsma AJ:** A case of XXY sex chromosome constitution in an intersex pig. *J Reprod Fertil* 16:119-120 (1968).
- Brinkley BR, Stubblefield E:** The fine structure of the kinetochore of a mammalian cell in vitro. *Chromosoma* 19:28-43 (1966).
- Brown KK, Alkuraya FS, Matos M, Robertson RL, Kimonis VE, Morton CC:** NR2F1 deletion in a patient with a de novo paracentric inversion, inv(5)(q15q33.2), and syndromic deafness. *Am J Med Genet A* 149A:931-938 (2009).
- Brunet S, Pahlavan G, Taylor S, Maro B:** Functionality of the spindle checkpoint during the first meiotic division of mammalian oocytes. *Reproduction* 126:443-450 (2003).
- Buard J, Barthes P, Grey C, de Massy B:** Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *EMBO J* 28:2616-2624 (2009).

Bugno-Poniewierska M, Jablonska Z, Slota E: Modification of equine sperm chromatin decondensation method to use fluorescence in situ hybridization (FISH). *Folia Histochem Cytobiol* 47:663-666 (2009).

Burgoyne PS, Baker TG: Meiotic pairing and gametogenic failure. *Symp Soc Exp Biol* 38:349-362 (1984).

Burke DT, Carle GF, Olson MV: Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236:806-812 (1987).

Burlet P, Frydman N, Gigarel N, Bonnefont JP, Kerbrat V, Tachdjian G, Frydman R, Munnich A, Steffann J, Ray PF: Improved single-cell protocol for preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy. *Fertil Steril* 84:734-739 (2005).

Buysse K, Crepel A, Menten B, Pattyn F, Antonacci F, Veltman JA, Larsen LA, Tumer Z, de Klein A, van de Laar I, Devriendt K, Mortier G, Speleman F: Mapping of 5q35 chromosomal rearrangements within a genomically unstable region. *J Med Genet* 45:672-678 (2008).

Caer E, Perrin A, Douet-Guilbert N, Amice V, De Braekeleer M, Morel F: Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8. *Fertil Steril* 89:1637-1640 (2008).

Canario L, Cantoni E, Le Bihan E, Caritez JC, Billon Y, Bidanel JP, Foulley JL: Between-breed variability of stillbirth and its relationship with sow and piglet characteristics. *J Anim Sci* 84:3185-3196 (2006).

Carballo JA, Johnson AL, Sedgwick SG, Cha RS: Phosphorylation of the axial element protein Hop1 by Mec1/Tell ensures meiotic interhomolog recombination. *Cell* 132:758-770 (2008).

Carlton PM: Three-dimensional structured illumination microscopy and its application to chromosome structure. *Chromosome Res* 16:351-365 (2008).

Carpenter AT: Electron microscopy of meiosis in *Drosophila melanogaster* females: II. The recombination nodule--a recombination-associated structure at pachytene? *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3186-3189 (1975).

Carrell DT, Hammoud SS: The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Mol Hum Reprod* 16:37-47 (2010).

Celerin M, Merino ST, Stone JE, Menzie AM, Zolan ME: Multiple roles of Spo11 in meiotic chromosome behavior. *EMBO J* 19:2739-2750 (2000).

Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Oлару A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A: Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296:922-927 (2002).

Chandley AC: A pachytene analysis of two male-fertile paracentric inversions in chromosome 1 of the mouse and in the male-sterile double heterozygote. *Chromosoma* 85:127-135 (1982).

Chandley AC: A model for effective pairing and recombination at meiosis based on early replicating sites (R-bands) along chromosomes. *Hum Genet* 72:50-57 (1986).

Chandley AC, McBeath S, Speed RM, Yorston L, Hargreave TB: Pericentric inversion in human chromosome 1 and the risk for male sterility. *J Med Genet* 24:325-334 (1987).

Chantot-Bastarud S, Ravel C, Berthaut I, McElreavey K, Bouchard P, Mandelbaum J, Siffroi JP: Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Mol Hum Reprod* 13:55-59 (2007).

- Chen SY**, Tsubouchi T, Rockmill B, Sandler JS, Richards DR, Vader G, Hochwagen A, Roeder GS, Fung JC: Global analysis of the meiotic crossover landscape. *Dev Cell* 15:401-415 (2008).
- Cheng CY**, Mruk DD: Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 82:825-874 (2002).
- Cheng EY**, Chen YJ, Disteché CM, Gartler SM: Analysis of a paracentric inversion in human oocytes: nonhomologous pairing in pachytene. *Hum Genet* 105:191-196 (1999).
- Cheng EY**, Hunt PA, Nalwai-Cecchini TA, Fligner CL, Fujimoto VY, Pasternack TL, Schwartz JM, Steinauer JE, Woodruff TJ, Cherry SM, Hansen TA, Vallente RU, Broman KW, Hassold TJ: Meiotic recombination in human oocytes. *PLoS Genet* 5:e1000661 (2009).
- Cheung P**, Lau P: Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol* 19:563-573 (2005).
- Ciccia A**, Constantinou A, West SC: Identification and characterization of the human mus81-eme1 endonuclease. *J Biol Chem* 278:25172-25178 (2003).
- Cleland WW**: Dithiothreitol, a New Protective Reagent for Sh Groups. *Biochemistry* 3:480-482 (1964).
- Codina-Pascual M**, Campillo M, Kraus J, Speicher MR, Egozcue J, Navarro J, Benet J: Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis. *Mol Hum Reprod* 12:123-133 (2006).
- Cohen O**, Mermet MA, Demongeot J: HC Forum: a web site based on an international human cytogenetic database. *Nucleic Acids Res* 29:305-307 (2001).
- Cohen PE**, Pollard JW: Regulation of meiotic recombination and prophase I progression in mammals. *Bioessays* 23:996-1009 (2001).
- Cohen PE**, Pollack SE, Pollard JW: Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr Rev* 27:398-426 (2006).
- Collodel G**, Moretti E, Capitani S, Piomboni P, Anichini C, Estenoz M, Baccetti B: TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia* 38:122-127 (2006).
- Colosimo A**, Di Rocco G, Curini V, Russo V, Capacchietti G, Berardinelli P, Mattioli M, Barboni B: Characterization of the methylation status of five imprinted genes in sheep gametes. *Anim Genet* 40:900-908 (2009).
- Concolino D**, Iembo MA, Rossi E, Giglio S, Coppola G, Miraglia Del Giudice E, Strisciuglio P: Familial pericentric inversion of chromosome 5 in a family with benign neonatal convulsions. *J Med Genet* 39:214-216 (2002).
- Cooke CA**, Schaar B, Yen TJ, Earnshaw WC: Localization of CENP-E in the fibrous corona and outer plate of mammalian kinetochores from prometaphase through anaphase. *Chromosoma* 106:446-455 (1997).
- Copenhaver GP**, Housworth EA, Stahl FW: Crossover interference in *Arabidopsis*. *Genetics* 160:1631-1639 (2002).
- Cortez D**, Wang Y, Qin J, Elledge SJ: Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 286:1162-1166 (1999).
- Costa Y**, Speed R, Ollinger R, Alsheimer M, Semple CA, Gautier P, Maratou K, Novak I, Hoog C, Benavente R, Cooke HJ: Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci* 118:2755-2762 (2005).
- Counce SJ**, Meyer GF: Differentiation of the synaptonemal complex and the kinetochore in *Locusta* spermatocytes studied by whole mount electron microscopy. *Chromosoma* 44:231-253 (1973).

- Cozzi J**, Chevret E, Rousseaux S, Pelletier R, Sele B: Human sperm chromosome analysis after microinjection into hamster oocytes. *J Assist Reprod Genet* 12:384-388 (1995).
- Crackower MA**, Kolas NK, Noguchi J, Sarao R, Kikuchi K, Kaneko H, Kobayashi E, Kawai Y, Koziaradzki I, Landers R, Mo R, Hui CC, Nieves E, Cohen PE, Osborne LR, Wada T, Kunieda T, Moens PB, Penninger JM: Essential role of Fkbp6 in male fertility and homologous chromosome pairing in meiosis. *Science* 300:1291-1295 (2003).
- Cromie GA**, Hyppa RW, Taylor AF, Zakharyevich K, Hunter N, Smith GR: Single Holliday junctions are intermediates of meiotic recombination. *Cell* 127:1167-1178 (2006).
- Croquette MF**, Couturier J, Dutrillaux B, Turleau C, De Grouchy J: Présence, chez un homme stérile, de deux inversions péricentriques des chromosomes 9: inv(9)(p11q1209), inv(9)(pterq1209). *Ann Genet* 22:53-56 (1979).
- Dailey T**, Dale B, Cohen J, Munne S: Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *Am J Hum Genet* 59:176-184 (1996).
- Daniel A**, Hook EB, Wulf G: Risks of unbalanced progeny at amniocentesis to carriers of chromosome rearrangements: data from United States and Canadian laboratories. *Am J Med Genet* 33:14-53 (1989).
- Danielak-Czech B**, Kozubskasobocinska A, Slota E, Rejduch B, Kwaczynska A: Preliminary identification of pair 1 chromosome rearrangement in a Polish Landrace Sow. *Arch Zootec* 45:215-219 (1996).
- Davalos IP**, Rivas F, Ramos AL, Galaviz C, Sandoval L, Rivera H: inv(9)(p24q13) in three sterile brothers. *Ann Genet* 43:51-54 (2000).
- Davisson MT**, Poorman PA, Roderick TH, Moses MJ: A pericentric inversion in the mouse. *Cytogenet Cell Genet* 30:70-76 (1981).
- De Boer E**, Stam P, Dietrich AJ, Pastink A, Heyting C: Two levels of interference in mouse meiotic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9607-9612 (2006).
- De Braekeleer M**, Dao TN: Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6:245-250 (1991).
- de Kretser DM**: Male infertility. *Lancet* 349:787-790 (1997).
- de los Santos T**, Hunter N, Lee C, Larkin B, Loidl J, Hollingsworth NM: The Mus81/Mms4 endonuclease acts independently of double-Holliday junction resolution to promote a distinct subset of crossovers during meiosis in budding yeast. *Genetics* 164:81-94 (2003).
- De Perdigo A**, Gabriel-Robez O, Rumpler Y: Correlation between chromosomal breakpoint positions and synaptic behaviour in human males heterozygous for a pericentric inversion. *Hum Genet* 83:274-276 (1989).
- de Vries F**, De Boer E, van den Bosch M, Baarends WM, Ooms M, Yuan L, van Zeeland A, Heyting C, Pastink A: Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes and Development* 19:1376-1389 (2005).
- Deckbar D**, Birraux J, Krempler A, Tchouandong L, Beucher A, Walker S, Stiff T, Jeggo P, Lobrich M: Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *J Cell Biol* 176:749-755 (2007).
- Decordier I**, Cundari E, Kirsch-Volders M: Mitotic checkpoints and the maintenance of the chromosome karyotype. *Mutat Res* 651:3-13 (2008).
- Dernburg AF**, McDonald K, Moulder G, Barstead R, Dresser M, Villeneuve AM: Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 94:387-398 (1998).
- Di Bernardino D**, Iannuzzi L, Lioi MB: The high-resolution RBA-banding pattern of bovine chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 39:136-139 (1985).

- Ding X**, Xu R, Yu J, Xu T, Zhuang Y, Han M: SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Dev Cell* 12:863-872 (2007).
- Dix DJ**, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM: Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3264-3268 (1996).
- Dix DJ**, Allen JW, Collins BW, Poorman-Allen P, Mori C, Blizard DR, Brown PR, Goulding EH, Strong BD, Eddy EM: HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development* 124:4595-4603 (1997).
- Dobzhansky T**: Genetics of the evolutionary process. Columbia Univ. Press, New York (1970).
- Dohle GR**, Halley DJ, Van Hemel JO, van den Ouwel AM, Pieters MH, Weber RF, Govaerts LC: Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod* 17:13-16 (2002).
- Ducos A**, Berland HM, Pinton A, Séguéla A, Blanc MF, Darré A, Sans P, Darré R: Les translocations réciproques chez le porc : état des lieux et perspectives.: Journées de la Recherche Porcine France pp 375-382 Institut Technique du Porc, Paris (1997a).
- Ducos A**, Pinton A, Séguéla A, Berland HM, Blanc MF, Darré A, Pinton P, Yerle M, Darré R: A pericentric inversion of chromosome 4 in pigs. *Genet Sel Evol* 29:383-394 (1997b).
- Ducos A**, Berland HM, Pinton A, Guillemot E, Seguela A, Blanc MF, Darre A, Darre R: Nine new cases of reciprocal translocation in the domestic pig (*Sus scrofa domestica* L.). *J Hered* 89:136-142 (1998a).
- Ducos A**, Pinton A, Berland HM, Seguela A, Blanc MF, Darre A, Darre R: Five new cases of reciprocal translocation in the domestic pig. *Hereditas* 128:221-229 (1998b).
- Ducos A**, Pinton A, Berland H, Séguéla A, Brun-Baronnat C, Bonnet N, Darré R: Contrôle chromosomique des populations porcines en France : bilan de cinq années d'activité. *Journées Recherche Porcine* 34:269-275 (2002).
- Ducos A**, Pinton A, Berland HM, Seguela A, Brun-Baronnat C, Bonnet N, Darre R, Milan D: Cleft palate associated with an unbalanced karyotype in piglets sired by a heterozygous carrier boar with a balanced constitutional reciprocal translocation. *Vet Rec* 154:659-661 (2004).
- Ducos A**, Berland HM, Bonnet N, Calgaro A, Billoux S, Mary N, Garnier-Bonnet A, Darre R, Pinton A: Chromosomal control of pig populations in France: 2002-2006 survey. *Genet Sel Evol* 39:583-597 (2007).
- Ducos A**, Revay T, Kovacs A, Hidas A, Pinton A, Bonnet-Garnier A, Molteni L, Slota E, Switonski M, Arruga MV, van Haeringen WA, Nicolae I, Chaves R, Guedes-Pinto H, Andersson M, Iannuzzi L: Cytogenetic screening of livestock populations in Europe: an overview. *Cytogenet Genome Res* 120:26-41 (2008).
- Dutrillaux B**, Lejeune J: [A new technic of analysis of the human karyotype]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 272:2638-2640 (1971).
- Eaker S**, Cobb J, Pyle A, Handel MA: Meiotic prophase abnormalities and metaphase cell death in MLH1-deficient mouse spermatocytes: insights into regulation of spermatogenic progress. *Dev Biol* 249:85-95 (2002).
- Edelmann W**, Cohen PE, Kane M, Lau K, Morrow B, Bennett S, Umar A, Kunkel T, Cattoretti G, Chaganti R, Pollard JW, Kolodner RD, Kucherlapati R: Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell* 85:1125-1134 (1996).
- Egozcue J**, Blanco J, Vidal F: Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 3:441-452 (1997).

Eicher EM: An air-drying procedure for mammalian male meiotic chromosomes, following softening in gluconic acid and cell separation by an ethanol-acetic mixture. *Stain Technol* 41:317-321 (1966).

Eijpe M, Offenberg H, Jessberger R, Revenkova E, Heyting C: Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol* 160:657-670 (2003).

Enomoto R, Kinebuchi T, Sato M, Yagi H, Shibata T, Kurumizaka H, Yokoyama S: Positive role of the mammalian TBPIP/HOP2 protein in DMC1-mediated homologous pairing. *J Biol Chem* 279:35263-35272 (2004).

Escudero T, Lee M, Stevens J, Sandalinas M, Munne S: Preimplantation genetic diagnosis of pericentric inversions. *Prenat Diagn* 21:760-766 (2001).

Esteban MA, Xu J, Yang J, Peng M, Qin D, Li W, Jiang Z, Chen J, Deng K, Zhong M, Cai J, Lai L, Pei D: Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem* 284:17634-17640 (2009).

Evans E, Alani E: Roles for mismatch repair factors in regulating genetic recombination. *Mol Cell Biol* 20:7839-7844 (2000).

Evans EP, Breckon G, Ford CE: An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics* 15:289-294 (1964).

Ezashi T, Telugu BP, Alexenko AP, Sachdev S, Sinha S, Roberts RM: Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:10993-10998 (2009).

Faed MJ, Lamont MA, Baxby K: Cytogenetic and histological studies of testicular biopsies from subfertile men with chromosome anomaly. *J Med Genet* 19:49-56 (1982).

Faure AK, Pivot-Pajot C, Kerjean A, Hazzouri M, Pelletier R, Peoc'h M, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S: Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. *Mol Hum Reprod* 9:757-763 (2003).

Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13 (1983).

Feldman GL, Weiss L, Phelan MC, Schroer RJ, Van Dyke DL: Inverted duplication of 8p: ten new patients and review of the literature. *Am J Med Genet* 47:482-486 (1993).

Ferfourri F, Clement P, Gomes DM, Minz M, Amar E, Selva J, Vialard F: Is classic pericentric inversion of chromosome 2 inv(2)(p11q13) associated with an increased risk of unbalanced chromosomes? *Fertil Steril* 92:1497 e1491-1494 (2009).

Ferguson-Smith MA: The prepubertal testicular lesion in chromatin-positive Klinefelter's syndrome (primary micro-orchidism) as seen in mentally handicapped children. *Lancet* 1:219-222 (1959).

Ferlin A, Arredi B, Foresta C: Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol* 22:133-141 (2006).

Fernandez-Capetillo O, Celeste A, Nussenzweig A: Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle* 2:426-427 (2003a).

Fernandez-Capetillo O, Liebe B, Scherthan H, Nussenzweig A: H2AX regulates meiotic telomere clustering. *J Cell Biol* 163:15-20 (2003b).

Feuk L, MacDonald JR, Tang T, Carson AR, Li M, Rao G, Khaja R, Scherer SW: Discovery of human inversion polymorphisms by comparative analysis of human and chimpanzee DNA sequence assemblies. *PLoS Genet* 1:e56 (2005).

Filipponi D, Feil R: Perturbation of genomic imprinting in oligozoospermia. *Epigenetics* 4:27-30 (2009).

- Fischle W**, Wang Y, Allis CD: Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 15:172-183 (2003).
- Flint J**, Knight S: The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 13:310-316 (2003).
- Flis-Treves M**, Achour-Frydman N, Kerbrat V, Munnich A, Vekemans M, Frydman R: [Preimplantation genetic diagnosis and its psychological effects]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 32:127-131 (2003).
- Ford CE**, Hamerton JL: The chromosomes of man. *Nature* 178:1020-1023 (1956).
- Ford CE**, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH: A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1:711-713 (1959).
- Ford CE**, Pollock DL, Gustavsson I: Proceedings of the First International Conference for the Standardisation of Banded Karyotypes of Domestic Animals. University of Reading Reading, England. 2nd-6th August 1976. *Hereditas* 92:145-162 (1980).
- Forejt J**, Gregorova S: Meiotic studies of translocations causing male sterility in the mouse. I. Autosomal reciprocal translocations. *Cytogenet Cell Genet* 19:159-179 (1977).
- Foresta C**, Moro E, Ferlin A: Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 22:226-239 (2001).
- Foss E**, Lande R, Stahl FW, Steinberg CM: Chiasma interference as a function of genetic distance. *Genetics* 133:681-691 (1993).
- Foss EJ**, Stahl FW: A test of a counting model for chiasma interference. *Genetics* 139:1201-1209 (1995).
- França LR**, Russell LD: The testis of domestic mammals, in Martinez-Garcia F, Regadera J (eds): Male reproduction: a multidisciplinary overview, pp 197-219 (Churchill Communications, Europe Espagne 1998).
- Franca LR**, Avelar GF, Almeida FF: Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 63:300-318 (2005).
- Fransz P**, De Jong JH, Lysak M, Castiglione MR, Schubert I: Interphase chromosomes in Arabidopsis are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14584-14589 (2002).
- Froenicke L**, Anderson LK, Wienberg J, Ashley T: Male mouse recombination maps for each autosome identified by chromosome painting. *Am J Hum Genet* 71:1353-1368 (2002).
- Fukuda T**, Kugou K, Sasanuma H, Shibata T, Ohta K: Targeted induction of meiotic double-strand breaks reveals chromosomal domain-dependent regulation of Spo11 and interactions among potential sites of meiotic recombination. *Nucleic Acids Res* 36:984-997 (2008).
- Fukuda T**, Daniel K, Wojtasz L, Toth A, Hoog C: A novel mammalian HORMA domain-containing protein, HORMAD1, preferentially associates with unsynapsed meiotic chromosomes. *Exp Cell Res* 316:158-171 (2010).
- Fung JC**, Marshall WF, Dernburg A, Agard DA, Sedat JW: Homologous chromosome pairing in *Drosophila melanogaster* proceeds through multiple independent initiations. *J Cell Biol* 141:5-20 (1998).
- Fung JC**, Rockmill B, Odell M, Roeder GS: Imposition of crossover interference through the nonrandom distribution of synapsis initiation complexes. *Cell* 116:795-802 (2004).
- Fusco JC**, Clark LM, Van Dilla MA: Construction of fifteen human chromosome-specific DNA libraries from flow-purified chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 43:79-86 (1986).

Gabriel-Robez O, Ratomponirina C, Rumpler Y, Le Marec B, Luciani JM, Guichaoua MR: Synapsis and synaptic adjustment in an infertile human male heterozygous for a pericentric inversion in chromosome 1. *Hum Genet* 72:148-152 (1986).

Gabriel-Robez O, Jaafar H, Ratomponirina C, Boscher J, Bonneau J, Popescu CP, Rumpler Y: Heterosynapsis in a heterozygous fertile boar carrier of a 3;7 translocation. *Chromosoma* 97:26-32 (1988a).

Gabriel-Robez O, Ratomponirina C, Croquette M, Couturier J, Rumpler Y: Synaptonemal complexes in a subfertile man with a pericentric inversion in chromosome 21. Heterosynapsis without previous homosynapsis. *Cytogenet Cell Genet* 48:84-87 (1988b).

Gaillard PH, Noguchi E, Shanahan P, Russell P: The endogenous Mus81-Eme1 complex resolves Holliday junctions by a nick and counternick mechanism. *Mol Cell* 12:747-759 (2003).

Ganner E, Evans HJ: The relationship between patterns of DNA replication and of quinacrine fluorescence in the human chromosome complement. *Chromosoma* 35:326-341 (1971).

Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ: Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 427:148-154 (2004).

Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, Rio M, Bourouillou G, Carre-Pigeon F, Wasels R, Benzacken B: Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod* 16:82-90 (2001).

Gerton JL, Hawley RS: Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nat Rev Genet* 6:477-487 (2005).

Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128: 635-638 (2007)

Gomez R, Valdeolmillos A, Parra MT, Viera A, Carreiro C, Roncal F, Rufas JS, Barbero JL, Suja JA: Mammalian SGO2 appears at the inner centromere domain and redistributes depending on tension across centromeres during meiosis II and mitosis. *EMBO Rep* 8:173-180 (2007).

Gondos B, Bhiraleus P, Hobel CJ: Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 110:644-652 (1971).

Gonsalves J, Turek PJ, Schlegel PN, Hopps CV, Weier JF, Pera RA: Recombination in men with Klinefelter syndrome. *Reproduction* 130:223-229 (2005).

Greenbaum IF, Reed MJ: Evidence for heterosynaptic pairing of the inverted segment in pericentric inversion heterozygotes of the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). *Cytogenet Cell Genet* 38:106-111 (1984).

Grelon M, Vezon D, Gendrot G, Pelletier G: AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J* 20:589-600 (2001).

Guichaoua MR, Delafontaine D, Taurelle R, Taillemite JL, Morazzani MR, Luciani JM: Loop formation and synaptic adjustment in a human male heterozygous for two pericentric inversions. *Chromosoma* 93:313-320 (1986a).

Guichaoua MR, Gabriel-Robez O, Ratomponirina C, Delafontaine D, Le Marec B, Taillemite JL, Rumpler Y, Luciani JM: Meiotic behaviour of familial pericentric inversions of chromosomes 1 and 9. *Ann Genet* 29:207-214 (1986b).

Guichaoua MR, Speed RM, Luciani JM, Delafontaine D, Chandley AC: Infertility in human males with autosomal translocations. II. Meiotic studies in three reciprocal rearrangements, one showing tertiary monosomy in a 45-chromosome individual and his father. *Cytogenet Cell Genet* 60:96-101 (1992).

Guillon H, Baudat F, Grey C, Liskay RM, de Massy B: Crossover and noncrossover pathways in mouse meiosis. *Mol Cell* 20:563-573 (2005).

- Gustavsson I**, Rockborn G: Chromosome Abnormality in Three Cases of Lymphatic Leukaemia in Cattle. *Nature* 203:990 (1964).
- Gustavsson I**: Chromosome aberrations and their influence on the reproductive performance of domestic animals - a review. *Tierz Zuchtungsbiol* 97:176-195 (1980).
- Gustavsson I**: Chromosomes of the pig, in Feely M (ed): *Domestic animals cytogenetics, advances in veterinary science and comparative medicine*, pp 73-107 San Diego (1990).
- Gustavsson I**, Jonsson L: Stillborns, partially monosomic and partially trisomic, in the offspring of a boar carrying a translocation: rcp(14;15)(q29;q24). *Hereditas* 117:31-37 (1992).
- Gutierrez-Mateo C**, Gadea L, Benet J, Wells D, Munne S, Navarro J: Aneuploidy 12 in a Robertsonian (13;14) carrier: Case report. *Hum Reprod* 20:1256-1260 (2005).
- Guttenbach M**, Schmid M: Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 46:553-558 (1990).
- Hadano S**, Watanabe M, Yokoi H, Kogi M, Kondo I, Tsuchiya H, Kanazawa I, Wakasa K, Ikeda JE: Laser microdissection and single unique primer PCR allow generation of regional chromosome DNA clones from a single human chromosome. *Genomics* 11:364-373 (1991).
- Haldeman-Englert CR**, Chapman KA, Kruger H, Geiger EA, McDonald-McGinn DM, Rappaport E, Zackai EH, Spinner NB, Shaikh TH: A de novo 8.8-Mb deletion of 21q21.1-q21.3 in an autistic male with a complex rearrangement involving chromosomes 6, 10, and 21. *Am J Med Genet A* 152A:196-202 (2009).
- Hale DW**: Heterosynapsis and suppression of chiasmata within heterozygous pericentric inversions of the Sitka deer mouse. *Chromosoma* 94:425-432 (1986).
- Hall H**, Hunt P, Hassold T: Meiosis and sex chromosome aneuploidy: how meiotic errors cause aneuploidy; how aneuploidy causes meiotic errors. *Curr Opin Genet Dev* 16:323-329 (2006).
- Hamer G**, Gell K, Kouznetsova A, Novak I, Benavente R, Hoog C: Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci* 119:4025-4032 (2006).
- Hamra K**, Chapman K, Wu Z, DL. G: Isolating Highly pure rat spermatogonial stem cells in culture, in Hou S, Singh S (eds): *Methods in Molecular Biology* (Humana Press, Totowa 2008).
- Hancock JL**, Daker MG: Testicular hypoplasia in a boar with abnormal sex chromosome constitution (39 XXY). *J Reprod Fertil* 61:395-397 (1981).
- Handel MA**, Eppig JJ: Sexual dimorphism in the regulation of mammalian meiosis. *Curr Top Dev Biol* 37:333-358 (1998).
- Handel MA**: The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Exp Cell Res* 296:57-63 (2004).
- Handel MA**, Schimenti JC: Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet* 11:124-136 (2010).
- Handyside AH**, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM: Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344:768-770 (1990).
- Harper L**, Golubovskaya I, Cande WZ: A bouquet of chromosomes. *J Cell Sci* 117:4025-4032 (2004).
- Hassold T**, Hunt P: To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2:280-291 (2001).
- Hassold T**, Hall H, Hunt P: The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2:R203-208 (2007).

Hauf S, Biswas A, Langegger M, Kawashima SA, Tsukahara T, Watanabe Y: Aurora controls sister kinetochore mono-orientation and homolog bi-orientation in meiosis-I. *EMBO J* 26:4475-4486 (2007).

Hayes H: Techniques de marquage chromosomique, in Popescu P, Hayes H, Dutrillaux B (eds): Techniques de cytogénétique animale, pp 41-82 (INRA Editions, Paris 1998).

Hayes H, Dutrillaux B: Techniques d'Hybridation *in situ*, in Popescu P, Hayes H, Dutrillaux B (eds): Techniques de cytogénétique animale, pp 85-95 (INRA Editions, 1998).

Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J, El-Akoum S: Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online* 17:841-847 (2008).

Henderson KA, Keeney S: Tying synaptonemal complex initiation to the formation and programmed repair of DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4519-4524 (2004).

Henricson B, Backstrom L: Translocation heterozigosity in a boar. *Hereditas* 52:166-170 (1964).

Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE: Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microsc Res Tech* 73:241-278 (2010).

Higgins JD, Armstrong SJ, Franklin FC, Jones GH: The Arabidopsis MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in Arabidopsis. *Genes Dev* 18:2557-2570 (2004).

Higgins JD, Buckling EF, Franklin FC, Jones GH: Expression and functional analysis of AtMUS81 in Arabidopsis meiosis reveals a role in the second pathway of crossing-over. *Plant J* 54:152-162 (2008).

Hirshfield AN: Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124:43-101 (1991).

Hjerrild BE, Mortensen KH, Gravholt CH: Turner syndrome and clinical treatment. *Br Med Bull* 86:77-93 (2008).

Hodges CA, LeMaire-Adkins R, Hunt PA: Coordinating the segregation of sister chromatids during the first meiotic division: evidence for sexual dimorphism. *J Cell Sci* 114:2417-2426 (2001).

Hodges CA, Revenkova E, Jessberger R, Hassold TJ, Hunt PA: SMC1beta-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nat Genet* 37:1351-1355 (2005).

Hoffmann AA, Rieseberg LH: Revisiting the Impact of Inversions in Evolution: From Population Genetic Markers to Drivers of Adaptive Shifts and Speciation? *Annu Rev Ecol Evol Syst* 39:21-42 (2008).

Hoffmann ER, Borts RH: Meiotic recombination intermediates and mismatch repair proteins. *Cytogenet Genome Res* 107:232-248 (2004).

Hojager B, Peters H, Byskov AG, Faber M: Follicular development in ovaries of children with Down's syndrome. *Acta Paediatr Scand* 67:637-643 (1978).

Holliday R: A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet Res* 5:282-304 (1964).

Hollingsworth NM, Ponte L, Halsey C: MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. *Genes Dev* 9:1728-1739 (1995).

Hollingsworth NM, Brill SJ: The Mus81 solution to resolution: generating meiotic crossovers without Holliday junctions. *Genes Dev* 18:117-125 (2004).

Holloway JK, Booth J, Edelmann W, McGowan CH, Cohen PE: MUS81 generates a subset of MLH1-MLH3-independent crossovers in mammalian meiosis. *PLoS Genet* 4:e1000186 (2008).

- Holmquist G**, Gray M, Porter T, Jordan J: Characterization of Giemsa dark- and light-band DNA. *Cell* 31:121-129 (1982).
- Homolka D**, Ivanek R, Capkova J, Jansa P, Forejt J: Chromosomal rearrangement interferes with meiotic X chromosome inactivation. *Genome Res* 17:1431-1437 (2007).
- Housworth EA**, Stahl FW: Crossover interference in humans. *Am J Hum Genet* 73:188-197 (2003).
- Hu DG**, Guan XY, Hussey N: Gender determination and detection of aneuploidy in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Methods Mol Med* 132:135-151 (2007).
- Hubner K**, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF, 3rd, Boiani M, Scholer HR: Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300:1251-1256 (2003).
- Hulten M**: Chiasma distribution at diakinesis in the normal human male. *Hereditas* 76:55-78 (1974).
- Hulten M**: Chromosome Behaviour at meiotic cell divisions: European cytogeneticists association 2006).
- Hunt PA**, Hassold TJ: Sex matters in meiosis. *Science* 296:2181-2183 (2002).
- Hunt PA**, Koehler KE, Susiarjo M, Hodges CA, Ilagan A, Voigt RC, Thomas S, Thomas BF, Hassold TJ: Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol* 13:546-553 (2003).
- Hunter N**, Kleckner N: The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell* 106:59-70 (2001).
- Iliakis G**, Wang Y, Guan J, Wang H: DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 22:5834-5847 (2003).
- ISCN**: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1985) ISCN 1985. Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. *Birth Defects Orig Artic Ser* 21:1-117 (1985).
- Ishiguro K**, Watanabe Y: Chromosome cohesion in mitosis and meiosis. *J Cell Sci* 120:367-369 (2007).
- Iwarsson E**, Ahrlund-Richter L, Inzunza J, Rosenlund B, Fridstrom M, Hillensjo T, Sjoblom P, Nordenskjold M, Blennow E: Preimplantation genetic diagnosis of a large pericentric inversion of chromosome 5. *Mol Hum Reprod* 4:719-723 (1998).
- Jaafar H**, Bouvet A, Gabriel-Robez O, Bonneau M, Boscher J, Maetz JL, Popescu CP, Rumpler Y: Heterosynapsis in two fertile but hypoproliferic boars carriers of reciprocal translocations. *Ann Genet* 35:3-7 (1992).
- Jaafar H**, Gabriel-Robez O, Rumpler Y: Chromosomal anomalies and disturbance of transcriptional activity at the pachytene stage of meiosis: relationship to male sterility. *Cytogenet Cell Genet* 64:273-280 (1993).
- Jaarola M**, Martin RH, Ashley T: Direct evidence for suppression of recombination within two pericentric inversions in humans: a new sperm-FISH technique. *Am J Hum Genet* 63:218-224 (1998).
- Jablonski SA**, Chan GK, Cooke CA, Earnshaw WC, Yen TJ: The hBUB1 and hBUBR1 kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma* 107:386-396 (1998).
- Jacobs PA**, Strong JA: A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183:302-303 (1959).
- Jager S**, Wijchman J, Kremer J: Studies on the decondensation of human, mouse, and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions. *J Exp Zool* 256:315-322 (1990).

- Jessberger R:** The many functions of SMC proteins in chromosome dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:767-778 (2002).
- Jessop L, Lichten M:** Mus81/Mms4 endonuclease and Sgs1 helicase collaborate to ensure proper recombination intermediate metabolism during meiosis. *Mol Cell* 31:313-323 (2008).
- Jiang YH, Martinez JE, Ou Z, Cooper ML, Kang SH, Pursley A, Cheung SW:** De novo and complex imbalanced chromosomal rearrangements revealed by array CGH in a patient with an abnormal phenotype and apparently "balanced" paracentric inversion of 14(q21q23). *Am J Med Genet A* 146A:1986-1993 (2008).
- Johannisson R, Gropp A, Winking H, Coerdts W, Rehder H, Schwinger E:** Down's syndrome in the male. Reproductive pathology and meiotic studies. *Hum Genet* 63:132-138 (1983).
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW:** RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582-587 (1969).
- Johnson DS, Gemelos G, Baner J, Ryan A, Cinnioglu C, Banjevic M, Ross R, Alper M, Barrett B, Frederick J, Potter D, Behr B, Rabinowitz M:** Preclinical validation of a microarray method for full molecular karyotyping of blastomeres in a 24-h protocol. *Hum Reprod* 25:1066-1075 (2010).
- Jones GH, Franklin FC:** Meiotic crossing-over: obligation and interference. *Cell* 126:246-248 (2006).
- Jordan P:** Initiation of homologous chromosome pairing during meiosis. *Biochem Soc Trans* 34:545-549 (2006).
- Joseph AM, Gosden JR, Chandley AC:** Estimation of aneuploidy levels in human spermatozoa using chromosome specific probes and in situ hybridisation. *Hum Genet* 66:234-238 (1984).
- Juchniuk de Vozi M, Santos S, Pereira C, Cuzzi J, Laureano L, Franco JJ, Martelli L:** Meiotic segregation and interchromosomal effect in the sperm of a double translocation carrier: a case report. *Mol Cytogenet* 2 (2009).
- Jussiau R, Montméas L, Papet A:** Aperçu sur la sélection des ruminants, des porcs et des chevaux: Amélioration génétique des animaux d'élevage, pp 271-277 (Educagri éditions, Dijon 2006).
- Kaiser-Rogers K, Rao K:** Structural chromosome rearrangements, in Gersen S, Keagle M (eds): *The principles of clinical cytogenetics*, pp 191-228 (Humana Press, Totowa 1999).
- Kaiser P:** Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics. *Hum Genet* 68:1-47 (1984).
- Kaiser P:** Pericentric inversions: their problems and clinical significance., in Daniel A (ed): *The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements*, pp 163-247 (Liss, A.R., New York 1988).
- Kaliraman V, Mullen JR, Fricke WM, Bastin-Shanower SA, Brill SJ:** Functional overlap between Sgs1-Top3 and the Mms4-Mus81 endonuclease. *Genes Dev* 15:2730-2740 (2001).
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D:** Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821 (1992).
- Kalz L, Schwanitz G:** Characterisation of constitutive heterochromatin, in particular of fluorescence polymorphisms in a Central European population. *Int J Hum Genet* 4:1-10 (2004).
- Kamel RM:** Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod Biol Endocrinol* 8:21 (2010).

Kamiguchi Y, Rosenbusch B, Sterzik K, Mikamo K: Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method. *Hum Genet* 90:533-541 (1993).

Karatas JC, Barlow-Stewart K, Meiser B, McMahon C, Strong KA, Hill W, Roberts C, Kelly P: Psychological adjustment, knowledge and unmet information needs in women undergoing PGD. *Hum Reprod* 25:1481-1489 (2010a).

Karatas JC, Strong KA, Barlow-Stewart K, McMahon C, Meiser B, Roberts C: Psychological impact of preimplantation genetic diagnosis: a review of the literature. *Reprod Biomed Online* 20:83-91 (2010b).

Kawarasaki T, Kohsaka T, Sone M, Yoshida M, Bamba K: Detection of Y-bearing porcine spermatozoa by in situ hybridization using digoxigenin-labeled, porcine male-specific DNA probe produced by polymerase chain reaction. *Mol Reprod Dev* 40:455-459 (1995).

Kawarasaki T, Sone M, Yoshida M, Bamba K: Rapid and simultaneous detection of chromosome Y- and 1-bearing porcine spermatozoa by fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev* 43:548-553 (1996).

Keeney S, Giroux CN, Kleckner N: Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88:375-384 (1997).

Keeney S: Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol* 52:1-53 (2001).

Kerrebrock AW, Miyazaki WY, Birnby D, Orr-Weaver TL: The *Drosophila* mei-S332 gene promotes sister-chromatid cohesion in meiosis following kinetochore differentiation. *Genetics* 130:827-841 (1992).

King JS, Mortimer RK: A polymerization model of chiasma interference and corresponding computer simulation. *Genetics* 126:1127-1138 (1990).

King M: Species evolution. (Cambridge Univ. Press, Cambridge 1993).

Kirkpatrick M, Barton N: Chromosome inversions, local adaptation and speciation. *Genetics* 173:419-434 (2006).

Kleckner N: Meiosis: how could it work? *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8167-8174 (1996).

Kleckner N, Zickler D, Jones GH, Dekker J, Padmore R, Henle J, Hutchinson J: A mechanical basis for chromosome function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12592-12597 (2004).

Kleczkowska A, Fryns JP, Van den Berghe H: Pericentric inversions in man: personal experience and review of the literature. *Hum Genet* 75:333-338 (1987).

Klein F, Mahr P, Galova M, Buonomo SB, Michaelis C, Nairz K, Nasmyth K: A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 98:91-103 (1999).

Kobayashi J, Kohsaka T, Sasada H, Umezumi M, Sato E: Fluorescence in situ hybridization with Y chromosome-specific probe in decondensed bovine spermatozoa. *Theriogenology* 52:1043-1054 (1999).

Koehler KE, Cherry JP, Lynn A, Hunt PA, Hassold TJ: Genetic control of mammalian meiotic recombination. I. Variation in exchange frequencies among males from inbred mouse strains. *Genetics* 162:297-306 (2002a).

Koehler KE, Millie EA, Cherry JP, Burgoyne PS, Evans EP, Hunt PA, Hassold TJ: Sex-specific differences in meiotic chromosome segregation revealed by dicentric bridge resolution in mice. *Genetics* 162:1367-1379 (2002b).

Koehler KE, Millie EA, Cherry JP, Schrumpp SE, Hassold TJ: Meiotic exchange and segregation in female mice heterozygous for paracentric inversions. *Genetics* 166:1199-1214 (2004).

Kolas NK, Cohen PE: Novel and diverse functions of the DNA mismatch repair family in mammalian meiosis and recombination. *Cytogenet Genome Res* 107:216-231 (2004).

Kouznetsova A, Novak I, Jessberger R, Hoog C: SYCP2 and SYCP3 are required for cohesin core integrity at diplotene but not for centromere cohesion at the first meiotic division. *J Cell Sci* 118:2271-2278 (2005).

Kubickova S, Cernohorska H, Musilova P, Rubes J: The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. *Chromosome Res* 10:571-577 (2002).

Kudo NR, Wassmann K, Anger M, Schuh M, Wirth KG, Xu H, Helmhart W, Kudo H, McKay M, Maro B, Ellenberg J, de Boer P, Nasmyth K: Resolution of chiasmata in oocytes requires separase-mediated proteolysis. *Cell* 126:135-146 (2006).

Kunz C, Schar P: Meiotic recombination: sealing the partnership at the junction. *Curr Biol* 14:R962-964 (2004).

Langier-Tourenne C, Ginglinger E, Alembik Y, De Saint Martin A, Peter MO, Dulucq P, Jonveaux P, Jeandidier E: Two cousins with partial trisomy 12q and monosomy 12p recombinants of a familial pericentric inversion of the chromosome 12. *Am J Med Genet A* 125A:77-85 (2004).

Lam SY, Horn SR, Radford SJ, Housworth EA, Stahl FW, Copenhaver GP: Crossover interference on nucleolus organizing region-bearing chromosomes in Arabidopsis. *Genetics* 170:807-812 (2005).

Lammers JH, Offenberg HH, van Aalderen M, Vink AC, Dietrich AJ, Heyting C: The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* 14:1137-1146 (1994).

Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E: Klinefelter's syndrome. *Lancet* 364:273-283 (2004).

Laurie DA, Hulten MA: Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Ann Hum Genet* 49:203-214 (1985).

Lechniak D, Warzych E, Pers-Kamczyc E, Sosnowski J, Antosik P, Rubes J: Gilts and sows produce similar rate of diploid oocytes in vitro whereas the incidence of aneuploidy differs significantly. *Theriogenology* 68:755-762 (2007).

Lee JH, Kim HJ, Kim H, Lee SJ, Gye MC: In vitro spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix. *Biomaterials* 27:2845-2853 (2006).

Lee JH, Gye MC, Choi KW, Hong JY, Lee YB, Park DW, Lee SJ, Min CK: In vitro differentiation of germ cells from nonobstructive azoospermic patients using three-dimensional culture in a collagen gel matrix. *Fertil Steril* 87:824-833 (2007).

Lejeune J, Gautier M, Turpin R: [Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children.]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 248:1721-1722 (1959).

Lejeune J: Autosomal Disorders. *Pediatrics* 32:326-337 (1963).

Leng M, Li G, Zhong L, Hou H, Yu D, Shi Q: Abnormal synapses and recombination in an azoospermic male carrier of a reciprocal translocation t(1;21). *Fertil Steril* 91:1293 e1217-1222 (2009).

Lenzi ML, Smith J, Snowden T, Kim M, Fishel R, Poulos BK, Cohen PE: Extreme heterogeneity in the molecular events leading to the establishment of chiasmata during meiosis I in human oocytes. *Am J Hum Genet* 76:112-127 (2005).

Leu JY, Chua PR, Roeder GS: The meiosis-specific Hop2 protein of *S. cerevisiae* ensures synapsis between homologous chromosomes. *Cell* 94:375-386 (1998).

Li W, Chen C, Markmann-Mulisch U, Timofejeva L, Schmelzer E, Ma H, Reiss B: The Arabidopsis AtRAD51 gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10596-10601 (2004).

Liebe B, Petukhova G, Barchi M, Bellani M, Braselmann H, Nakano T, Pandita TK, Jasin M, Fornace A, Meistrich ML, Baarends WM, Schimenti J, de Lange T, Keeney S, Camerini-Otero RD, Scherthan H: Mutations that affect meiosis in male mice influence the dynamics of the mid-preleptotene and bouquet stages. *Exp Cell Res* 312:3768-3781 (2006).

Lim D, Bowdin SC, Tee L, Kirby GA, Blair E, Fryer A, Lam W, Oley C, Cole T, Brueton LA, Reik W, Macdonald F, Maher ER: Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 24:741-747 (2009).

Lin HY, Lin SP, Chen YJ, Hung HY, Kao HA, Hsu CH, Chen MR, Chang JH, Ho CS, Huang FY, Shyur SD, Lin DS, Lee HC: Clinical characteristics and survival of trisomy 18 in a medical center in Taipei, 1988-2004. *Am J Med Genet A* 140:945-951 (2006).

Lipkin SM, Moens PB, Wang V, Lenzi M, Shanmugarajah D, Gilgeous A, Thomas J, Cheng J, Touchman JW, Green ED, Schwartzberg P, Collins FS, Cohen PE: Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat Genet* 31:385-390 (2002).

Lipshultz L, Howards S: Infertility in the male. (Mosby-Year Book inc., St Louis, USA 1997).

Litten-Brown J, Corson A, Clarke L: Porcine models for the metabolic syndrome, digestive and bone disorders: a general overview. *Animal* 4:899-920 (2010).

Liu L, Keefe DL: Ageing-associated aberration in meiosis of oocytes from senescence-accelerated mice. *Hum Reprod* 17:2678-2685 (2002).

Liu L, Keefe DL: Nuclear origin of aging-associated meiotic defects in senescence-accelerated mice. *Biol Reprod* 71:1724-1729 (2004).

Lu CM, Kwan J, Weier JF, Baumgartner A, Wang M, Escudero T, Munne S, Weier HU: Rapid mapping of chromosomal breakpoints: from blood to BAC in 20 days. *Folia Histochem Cytobiol* 47:367-375 (2009).

Luciani JM, Devictor-Vuillet M, Gagne R, Stahl A: An air-drying method for first meiotic prophase preparations from mammalian ovaries. *J Reprod Fertil* 36:409-411 (1974).

Luciani JM, Devictor-Vuillet M, Stahl A: Hypotonic KCl: an improved method of processing human testicular tissue for meiotic chromosomes. *Clin Genet* 2:32-36 (1971).

Luciani JM, Guichaoua MR, Cau P, Devictor B, Salagnon N: Differential elongation of autosomal pachytene bivalents related to their DNA content in human spermatocytes. *Chromosoma* 97:19-25 (1988).

Lue Y, Rao PN, Sinha Hikim AP, Im M, Salameh WA, Yen PH, Wang C, Swerdloff RS: XXY male mice: an experimental model for Klinefelter syndrome. *Endocrinology* 142:1461-1470 (2001).

Lynn A, Koehler KE, Judis L, Chan ER, Cherry JP, Schwartz S, Seftel A, Hunt PA, Hassold TJ: Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. *Science* 296:2222-2225 (2002).

Lynn A, Ashley T, Hassold T: Variation in human meiotic recombination. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5:317-349 (2004).

Lyon MF: Transmission ratio distortion in mice. *Annu Rev Genet* 37:393-408 (2003).

MacQueen AJ, Colaiacovo MP, McDonald K, Villeneuve AM: Synapsis-dependent and -independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans*. *Genes Dev* 16:2428-2442 (2002).

Madan K: Paracentric inversions: a review. *Hum Genet* 96:503-515 (1995).

- Madariaga ML**, Rivera H: Familial inv(X) (p22q22): ovarian dysgenesis in two sisters with del Xq and fertility in one male carrier. *Clin Genet* 52:180-183 (1997).
- Mahadevaiah SK**, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodriguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS: Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 27:271-276 (2001).
- Mahadevaiah SK**, Bourc'his D, de Rooij DG, Bestor TH, Turner JM, Burgoyne PS: Extensive meiotic asynapsis in mice antagonises meiotic silencing of unsynapsed chromatin and consequently disrupts meiotic sex chromosome inactivation. *J Cell Biol* 182:263-276 (2008).
- Makinen A**, Andersson M, Nikunen S: Detection of the X chromosomes in a Klinefelter boar using a whole human X chromosome painting probe. *Anim Reprod Sci* 52:317-323 (1998).
- Malan V**, Pipiras E, Sifer C, Kanafani S, Cedrin-Durnerin I, Martin-Pont B, Hugues JN, Wolf JP, Benzacken B: Chromosome segregation in an infertile man carrying a unique pericentric inversion, inv(21)(p12q22.3), analysed using fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei: significance for clinical genetics. A case report. *Hum Reprod* 21:2052-2056 (2006).
- Maleki S**, Neale MJ, Arora C, Henderson KA, Keeney S: Interactions between Mei4, Rec114, and other proteins required for meiotic DNA double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* 116:471-486 (2007).
- Malmanche N**, Maia A, Sunkel CE: The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett* 580:2888-2895 (2006).
- Mancera E**, Bourgon R, Brozzi A, Huber W, Steinmetz LM: High-resolution mapping of meiotic crossovers and non-crossovers in yeast. *Nature* 454:479-485 (2008).
- Manipalviratn S**, DeCherney A, Segars J: Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 91:305-315 (2009).
- Martin RH**, Lin CC, Balkan W, Burns K: Direct chromosomal analysis of human spermatozoa: preliminary results from 18 normal men. *Am J Hum Genet* 34:459-468 (1982).
- Martin RH**: Cytogenetic analysis of sperm from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv (3) (p25q21). *Am J Hum Genet* 48:856-861 (1991).
- Martin RH**: Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a paracentric inversion of chromosome 14 (q24.1q32.1). *Am J Hum Genet* 64:1480-1484 (1999).
- Martin RH**: Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update* 14:379-390 (2008).
- Martinez-Flores I**, Egozcue J, Cabero LI, Garcia M: Synaptic behaviour of some structural and numerical chromosome anomalies in female and male rats (*Rattus norvegicus*). *Histol Histopathol* 16:701-706 (2001).
- Martinez-Flores I**, Cabero LL, Egozcue J, Garcia M: Synaptic process in the rat (*Rattus norvegicus*): Influence of methodology on results. *Microsc Res Tech* 60:450-457 (2003).
- Massip K**, Berland H, Bonnet N, Calgaro A, Billoux S, Baquie V, Mary N, Bonnet-Garnier A, Ducos A, Yerle M, Pinton A: Study of inter- and intra-individual variation of meiotic segregation patterns in t(3;15)(q27;q13) boars. *Theriogenology* 70:655-661 (2008).
- Massip K**, Bonnet N, Calgaro A, Billoux S, Baquie V, Mary N, Bonnet-Garnier A, Ducos A, Yerle M, Pinton A: Male meiotic segregation analyses of peri- and paracentric inversions in the pig species. *Cytogenet Genome Res* 125:117-124 (2009).
- Massip K**, Yerle M, Billon , Ferchaud S, Bonnet N, Calgaro A, Mary N, Dudez AM, Sentenac C, Plard C, Ducos A and Pinton A: Studies of male and female meiosis in inv(4)(p1.4;q2.3) pig carriers. *Chromosome Res* 18, 925-938 (2010).
- Mathews DJ**, Donovan PJ, Harris J, Lovell-Badge R, Savulescu J, Faden R: Pluripotent stem cell-derived gametes: truth and (potential) consequences. *Cell Stem Cell* 5:11-14 (2009).

- Mau-Holzmann UA:** Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res* 111:317-336 (2005).
- May KM, Hardwick KG:** The spindle checkpoint. *J Cell Sci* 119:4139-4142 (2006).
- McKim KS,** Green-Marroquin BL, Sekelsky JJ, Chin G, Steinberg C, Khodosh R, Hawley RS: Meiotic synapsis in the absence of recombination. *Science* 279:876-878 (1998).
- McKinlay-Gardner RJ,** Sutherland GR: Chromosome abnormalities and genetic counseling. (Oxford university press, New York 2004).
- McLachlan RI,** O'Bryan MK: Clinical Review#: State of the art for genetic testing of infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 95:1013-1024 (2010).
- McPeck MS,** Speed TP: Modeling interference in genetic recombination. *Genetics* 139:1031-1044 (1995).
- Meltzer PS,** Guan XY, Burgess A, Trent JM: Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nat Genet* 1:24-28 (1992).
- Mercier R,** Jolivet S, Vezon D, Huppe E, Chelysheva L, Giovanni M, Nogue F, Doutriaux MP, Horlow C, Grelon M, Mezard C: Two meiotic crossover classes cohabit in Arabidopsis: one is dependent on MER3, whereas the other one is not. *Curr Biol* 15:692-701 (2005).
- Meredith R:** A simple method for preparing meiotic chromosomes from mammalian testis. *Chromosoma* 26:254-258 (1969).
- Meschede D,** Froster UG, Bergmann M, Nieschlag E: Familial pericentric inversion of chromosome 1 (p34q23) and male infertility with stage specific spermatogenic arrest. *J Med Genet* 31:573-575 (1994).
- Mets DG,** Meyer BJ: Condensins regulate meiotic DNA break distribution, thus crossover frequency, by controlling chromosome structure. *Cell* 139:73-86 (2009).
- Meuwissen RL,** Offenbergh HH, Dietrich AJ: A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J* 11:5091-5100 (1992).
- Meyn MS:** Ataxia-telangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM gene. *Clin Genet* 55:289-304 (1999).
- Midro AT,** Wiland E, Panasiuk B, Lesniewicz R, Kurpisz M: Risk evaluation of carriers with chromosome reciprocal translocation t(7;13)(q34;q13) and concomitant meiotic segregation analyzed by FISH on ejaculated spermatozoa. *Am J Med Genet A* 140:245-256 (2006).
- Mikawa S,** Akita T, Hisamatsu N, Inage Y, Ito Y, Kobayashi E, Kusumoto H, Matsumoto T, Mikami H, Minezawa M, Miyake M, Shimanuki S, Sugiyama C, Uchida Y, Wada Y, Yanai S, Yasue H: A linkage map of 243 DNA markers in an intercross of Gottingen miniature and Meishan pigs. *Anim Genet* 30:407-417 (1999).
- Mikhaail-Philips MM,** Ko E, Chernos J, Greene C, Rademaker A, Martin RH: Analysis of chromosome segregation in sperm from a chromosome 2 inversion heterozygote and assessment of an interchromosomal effect. *Am J Med Genet A* 127A:139-143 (2004).
- Mikhaail-Philips MM,** McGillivray BC, Hamilton SJ, Ko E, Chernos J, Rademaker A, Martin RH: Unusual segregation products in sperm from a pericentric inversion 17 heterozygote. *Hum Genet* 117:357-365 (2005).
- Miller D,** Brinkworth M, Iles D: Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139:287-301 (2010).
- Mimitou EP,** Symington LS: DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA Repair (Amst)* 8:983-995 (2009).

Mitchell JJ, Vekemans M, Luscombe S, Hayden M, Weber B, Richter A, Sparkes R, Kojis T, Watters G, Der Kaloustian VM: U-type exchange in a paracentric inversion as a possible mechanism of origin of an inverted tandem duplication of chromosome 8. *Am J Med Genet* 49:384-387 (1994).

Miyake YI, Kawata K, Ishikawa T, Umezu M: Translocation heterozygosity in a malformed piglet and its normal littermates. *Teratology* 16:163-165 (1977).

Miyake YI, Matsubara T, Hata M, Kaneda Y: Chromosomal pericentric inversion detected in a sow and her piglets. *Theriogenology* 42:241-246 (1994).

Moens PB, Tarsounas M, Morita T, Habu T, Rottinghaus ST, Freire R, Jackson SP, Barlow C, Wynshaw-Boris A: The association of ATR protein with mouse meiotic chromosome cores. *Chromosoma* 108:95-102 (1999).

Moens PB, Kolas NK, Tarsounas M, Marcon E, Cohen PE, Spyropoulos B: The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci* 115:1611-1622 (2002).

Moens PB: Electron microscopy of mammalian chromosomes, in Keeney S (ed): *Meiosis*, Volume 2: cytological methods, pp 323-338 (Humana Press, 2009).

Moradkhani K, Puechberty J, Bhatt S, Lespinasse J, Vago P, Lefort G, Sarda P, Hamamah S, Pellestor F: Rare Robertsonian translocations and meiotic behaviour: sperm FISH analysis of t(13;15) and t(14;15) translocations: a case report. *Hum Reprod* 21:3193-3198 (2006a).

Moradkhani K, Puechberty J, Bhatt S, Vago P, Janny L, Lefort G, Hamamah S, Sarda P, Pellestor F: Meiotic segregation of rare Robertsonian translocations: sperm analysis of three t(14q;22q) cases. *Hum Reprod* 21:1166-1171 (2006b).

Morel F, Laudier B, Guerif F, Couet ML, Royere D, Roux C, Bresson JL, Amice V, De Braekeleer M, Douet-Guilbert N: Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 22:136-141 (2007).

Morelli MA, Cohen PE: Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 130:761-781 (2005).

Morris JK, Alberman E, Scott C, Jacobs P: Is the prevalence of Klinefelter syndrome increasing? *Eur J Hum Genet* 16:163-170 (2008).

Moses MJ, Poorman PA, Roderick TH, Davisson MT: Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. IV. Synapsis and synaptic adjustment in two paracentric inversions. *Chromosoma* 84:457-474 (1982).

Moses MJ, Poorman PA: Synapsis, synaptic adjustment and DNA synthesis in mouse oocytes in Bennet M, Gropp A, Wolf U (eds): *Chromosomes Today*, pp 90-103 (George Allen and Unwin, London 1984).

Motta PM, Nottola SA, Makabe S: Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 75:5-10 (1997).

Murakami H, Keeney S: Regulating the formation of DNA double-strand breaks in meiosis. *Genes Dev* 22:286-292 (2008).

Muss B, Schwanitz G: Characterization of inversions as a type of structural chromosome aberration. *Int J Hum Genet* 7:141-161 (2007).

Nakaoka Y, Okamoto E, Miharu N, Ohama K: Chromosome analysis in human oocytes remaining unfertilized after in-vitro insemination: effect of maternal age and fertilization rate. *Hum Reprod* 13:419-424 (1998).

Nasmyth K: Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297:559-565 (2002).

- Neale MJ**, Pan J, Keeney S: Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature* 436:1053-1057 (2005).
- Neale MJ**, Keeney S: Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. *Nature* 442:153-158 (2006).
- Nes N**: Chromosomes aberrations in animals. *Nord Jordbrug*:393-410 (1969).
- Nicklas RB**: How cells get the right chromosomes. *Science* 275:632-637 (1997).
- Nishikawa N**, Murakami I, Ikuta K, Suzumori K: Sex chromosomal analysis of spermatozoa from infertile men using fluorescence in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet* 17:97-102 (2000).
- Niu H**, Wan L, Baumgartner B, Schaefer D, Loidl J, Hollingsworth NM: Partner choice during meiosis is regulated by Hop1-promoted dimerization of Mek1. *Mol Biol Cell* 16:5804-5818 (2005).
- Nunes M**, Yerle M, Dezeure F, Gellin J, Chardon P, Vaiman M: Isolation of four HSP70 genes in the pig and localization on chromosomes 7 and 14. *Mamm Genome* 4:247-251 (1993).
- O'Flynn O'Brien KL**, Varghese AC, Agarwal A: The genetic causes of male factor infertility : a review. *Fertil Steril* 93:1-12 (2010).
- Obeso D**, Dawson DS: Temporal characterization of homology-independent centromere coupling in meiotic prophase. *PLoS One* 5:e10336 (2010).
- Oblomova G**, Ban C, Hsieh P, Yang W: Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature* 407:703-710 (2000).
- Offenberg HH**, Schalk JA, Meuwissen RL, van Aalderen M, Kester HA, Dietrich AJ, Heyting C: SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res* 26:2572-2579 (1998).
- Ogur G**, Van Assche E, Vegetti W, Verheyen G, Tournaye H, Bonduelle M, Van Steirteghem A, Liebaers I: Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 Robertsonian translocation carriers. *Mol Hum Reprod* 12:209-215 (2006).
- Oh SD**, Lao JP, Taylor AF, Smith GR, Hunter N: RecQ helicase, Sgs1, and XPF family endonuclease, Mus81-Mms4, resolve aberrant joint molecules during meiotic recombination. *Mol Cell* 31:324-336 (2008).
- Ohta K**, Wu TC, Lichten M, Shibata T: Competitive inactivation of a double-strand DNA break site involves parallel suppression of meiosis-induced changes in chromatin configuration. *Nucleic Acids Res* 27:2175-2180 (1999).
- Oktem O**, Oktay K: The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci* 1127:1-9 (2008).
- Oliver-Bonet M**, Benet J, Sun F, Navarro J, Abad C, Liehr T, Starke H, Greene C, Ko E, Martin RH: Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Hum Reprod* 20:683-688 (2005).
- Osman F**, Dixon J, Doe CL, Whitby MC: Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: a role for Mus81-Eme1 in meiosis. *Mol Cell* 12:761-774 (2003).
- Pacchierotti F**, Ranaldi R: Mechanisms and risk of chemically induced aneuploidy in mammalian germ cells. *Curr Pharm Des* 12:1489-1504 (2007).
- Palermo G**, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340:17-18 (1992).
- Pandita TK**, Westphal CH, Anger M, Sawant SG, Geard CR, Pandita RK, Scherthan H: Atm inactivation results in aberrant telomere clustering during meiotic prophase. *Mol Cell Biol* 19:5096-5105 (1999).
- Paques F**, Haber JE: Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:349-404 (1999).

- Pardue ML**, Gall JG: Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64:600-604 (1969).
- Parisi S**, McKay MJ, Molnar M, Thompson MA, van der Spek PJ, van Drunen-Schoenmaker E, Kanaar R, Lehmann E, Hoeijmakers JH, Kohli J: Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans. *Mol Cell Biol* 19:3515-3528 (1999).
- Parra MT**, Viera A, Gomez R, Page J, Benavente R, Santos JL, Rufas JS, Suja JA: Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *J Cell Sci* 117:1221-1234 (2004).
- Pasierbek P**, Jantsch M, Melcher M, Schleiffer A, Schweizer D, Loidl J: A *Caenorhabditis elegans* cohesion protein with functions in meiotic chromosome pairing and disjunction. *Genes Dev* 15:1349-1360 (2001).
- Pawlowski WP**, Cande WZ: Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends Cell Biol* 15:674-681 (2005).
- Peiffer DA**, Le JM, Steemers FJ, Chang W, Jenniges T, Garcia F, Haden K, Li J, Shaw CA, Belmont J, Cheung SW, Shen RM, Barker DL, Gunderson KL: High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping. *Genome Res* 16:1136-1148 (2006).
- Pellestor F**: [Maternal age and chromosomal abnormalities in human oocytes]. *Med Sci (Paris)* 20:691-696 (2004).
- Pellestor F**, Andreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J: Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Hum Reprod* 17:2134-2145 (2002).
- Peoples-Holst TL**, Burgess SM: Multiple branches of the meiotic recombination pathway contribute independently to homolog pairing and stable juxtaposition during meiosis in budding yeast. *Genes Dev* 19:863-874 (2005).
- Perreault SD**, Barbee RR, Elstein KH, Zucker RM, Keefer CL: Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry. *Biol Reprod* 39:157-167 (1988a).
- Perreault SD**, Barbee RR, Slott VL: Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* 125:181-186 (1988b).
- Peters AH**, Plug AW, van Vugt MJ, de Boer P: A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res* 5:66-68 (1997).
- Peters JM**: The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:644-656 (2006).
- Pettenati MJ**, Rao PN, Phelan MC, Grass F, Rao KW, Cospers P, Carroll AJ, Elder F, Smith JL, Higgins MD : Paracentric inversions in humans: a review of 446 paracentric inversions with presentation of 120 new cases. *Am J Med Genet* 55:171-187 (1995).
- Petukhova GV**, Pezza RJ, Vanevski F, Ploquin M, Masson JY, Camerini-Otero RD: The Hop2 and Mnd1 proteins act in concert with Rad51 and Dmc1 in meiotic recombination. *Nat Struct Mol Biol* 12:449-453 (2005).
- Pfeifer C**, Thomsen PD, Scherthan H: Centromere and telomere redistribution precedes homologue pairing and terminal synapsis initiation during prophase I of cattle spermatogenesis. *Cytogenet Cell Genet* 93:304-314 (2001).
- Pfeifer C**, Scherthan H, Thomsen PD: Sex-specific telomere redistribution and synapsis initiation in cattle oogenesis. *Dev Biol* 255:206-215 (2003).

Phelan MC, Stevenson RE, Anderson EV, Jr.: Recombinant chromosome 9 possibly derived from breakage and reunion of sister chromatids within a paracentric inversion loop. *Am J Med Genet* 46:304-308 (1993).

Pieters MH, Geraedts JP, Meyer H, Dumoulin JC, Evers JL, Jongbloed RJ, Nederlof PM, van der Flier S: Human gametes and zygotes studied by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 53:15-19 (1990).

Pigozzi MI, Solari AJ: Recombination nodule mapping and chiasma distribution in spermatocytes of the pigeon, *Columba livia*. *Genome* 42:308-314 (1999).

Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG: High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20:207-211 (1998).

Pinton A, Ducos A, Yerle M: Chromosomal rearrangements in cattle and pigs revealed by chromosome microdissection and chromosome painting. *Genet Sel Evol* 35:685-696 (2003).

Pinton A, Ducos A, Yerle M: Estimation of the proportion of genetically unbalanced spermatozoa in the semen of boars carrying chromosomal rearrangements using FISH on sperm nuclei. *Genet Sel Evol* 36:123-137 (2004).

Pinton A: Caractérisation d'anomalies dans l'espèce porcine et analyse des déséquilibres chromosomiques dans les gamètes de reproducteurs porteurs hétérozygotes: Ecole Pratique des Hautes Etudes, p 108 Toulouse 2004.

Pinton A, Faraut T, Yerle M, Gruand J, Pellestor F, Ducos A: Comparison of male and female meiotic segregation patterns in translocation heterozygotes: a case study in an animal model (*Sus scrofa domestica* L.). *Hum Reprod* 20:2476-2482 (2005).

Pinton A, Raymond Letron I, Berland HM, Bonnet N, Calgaro A, Garnier-Bonnet A, Yerle M, Ducos A: Meiotic studies in an azoospermic boar carrying a Y;14 translocation. *Cytogenet Genome Res* 120:106-111 (2008).

Pinton A, Calgaro A, Bonnet N, Ferchaud S, Billoux S, Dudez AM, Mary N, Massip K, Bonnet-Garnier A, Yerle M, Ducos A: Influence of sex on the meiotic segregation of a t(13;17) Robertsonian translocation: a case study in the pig. *Hum Reprod* 24:2034-2043 (2009).

Pinton A, Bordedeбат M, Raymond Letron I, Barasc H, Mary N, Massip K, Bonnet N, Calgaro A, Dudez AM, Feve K, Riquet J, Yerle M, Ducos A : Meiotic analysis of a mosaic Klinefelter boar. 19th international colloquium on animal cytogenetics and gene mapping, Krakow (2010).

Pittman DL, Cobb J, Schimenti KJ, Wilson LA, Cooper DM, Brignull E, Handel MA, Schimenti JC: Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* 1:697-705 (1998).

Plug AW, Peters AH, Keegan KS, Hoekstra MF, de Boer P, Ashley T: Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *J Cell Sci* 111 (Pt 4):413-423 (1998).

Popescu C, Legault C: Une nouvelle translocation réciproque t(4q+ ;4q-) chez le porc domestique (*Sus scrofa domestica*). *Ann Génét Sél Anim* 11:361-369 (1979).

Popescu C, Tixier M: L'incidence des anomalies chromosomiques chez les animaux de ferme et leurs conséquences économiques. *Ann Genet* 27:69-72 (1984).

Popescu P: Cytogénétique des mammifères d'élevage. (INRA, Paris 1989).

Pradhan M, Dalal A, Khan F, Agrawal S: Fertility in men with Down syndrome: a case report. *Fertil Steril* 86:1765 e1761-1763 (2006).

Prieto I, Suja JA, Pezzi N, Kremer L, Martinez AC, Rufas JS, Barbero JL: Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol* 3:761-766 (2001).

- Prieto I**, Tease C, Pezzi N, Buesa JM, Ortega S, Kremer L, Martinez A, Martinez AC, Hulten MA, Barbero JL: Cohesin component dynamics during meiotic prophase I in mammalian oocytes. *Chromosome Res* 12:197-213 (2004).
- Prontera P**, Buldrini B, Aiello V, Rogaia D, Mencarelli A, Gruppioni R, Bonfatti A, Beltrami N, Donti E, Sensi A: Familial pericentric inversion of chromosome 18: intrafamilial variability of the recombinant dup(18q). *Genet Couns* 21:91-97 (2010).
- Quilter CR**, Wood D, Southwood OI, Griffin DK: X/XY/XYY mosaicism as a cause of subfertility in boars: a single case study. *Anim Genet* 34:51-54 (2003).
- Reed KM**, Sites JW, Jr., Greenbaum IF: Synapsis, recombination, and meiotic segregation in the mesquite lizard, *Sceloporus grammicus*, complex. I. Pericentric inversion heteromorphism of the F5 cytotype. *Cytogenet Cell Genet* 61:40-45 (1992).
- Rens W**, Yang F, Welch G, Revell S, O'Brien PC, Solanky N, Johnson LA, Ferguson Smith MA: An X-Y paint set and sperm FISH protocol that can be used for validation of cattle sperm separation procedures. *Reproduction* 121:541-546 (2001).
- Requena A**, Bronet F, Guillen A, Agudo D, Bou C, Garcia-Velasco JA: The impact of in-vitro maturation of oocytes on aneuploidy rate. *Reprod Biomed Online* 18:777-783 (2009).
- Revenkova E**, Eijpe M, Heyting C, Gross B, Jessberger R: Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol Cell Biol* 21:6984-6998 (2001).
- Revenkova E**, Eijpe M, Heyting C, Hodges CA, Hunt PA, Liebe B, Scherthan H, Jessberger R: Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol* 6:555-562 (2004).
- Revenkova E**, Jessberger R: Keeping sister chromatids together: cohesins in meiosis. *Reproduction* 130:783-790 (2005).
- Richly H**, Lange M, Simboeck E, Di Croce L: Setting and resetting of epigenetic marks in malignant transformation and development. *Bioessays* 32:669-679 (2010).
- Rigby PW**, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113:237-251 (1977).
- Rives N**, Jarnot M, Mousset-Simeon N, Joly G, Mace B: Fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis of chromosome segregation and interchromosomal effect in spermatozoa of a reciprocal translocation t(9,10)(q11;p11.1) carrier. *J Hum Genet* 48:535-540 (2003).
- Roberts RM**, Telugu BP, Ezashi T: Induced pluripotent stem cells from swine (*Sus scrofa*): why they may prove to be important. *Cell Cycle* 8:3078-3081 (2009).
- Robinson A**, Bender BG, Linden MG, Salbenblatt JA: Sex chromosome aneuploidy: the Denver Prospective Study. *Birth Defects Orig Artic Ser* 26:59-115 (1990).
- Robles P**, Roig I, Garcia R, Ortega A, Egozcue J, Cabero LL, Garcia M: Pairing and synapsis in oocytes from female fetuses with euploid and aneuploid chromosome complements. *Reproduction* 133:899-907 (2007).
- Rockmill B**, Sym M, Scherthan H, Roeder GS: Roles for two RecA homologs in promoting meiotic chromosome synapsis. *Genes Dev* 9:2684-2695 (1995).
- Rodriguez A**, Sanz E, De Mercado E, Gomez E, Martin M, Carrascosa C, Gomez-Fidalgo E, Villagomez DA, Sanchez-Sanchez R: Reproductive consequences of a reciprocal chromosomal translocation in two Duroc boars used to provide semen for artificial insemination. *Theriogenology* 74:67-74 (2010).
- Roeder GS**: Sex and the single cell: meiosis in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10450-10456 (1995).
- Roeder GS**: Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev* 11:2600-2621 (1997).
- Rogel-Gaillard C**, Bourgeaux N, Billault A, Vaiman M, Chardon P: Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements. *Cytogenet Cell Genet* 85:205-211 (1999).

Roig I, Liebe B, Egozcue J, Cabero L, Garcia M, Scherthan H: Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes. *Chromosoma* 113:22-33 (2004).

Roig I, Robles P, Garcia R, Martin M, Egozcue J, Cabero L, Barambio S, Garcia M: Evolution of the meiotic prophase and of the chromosome pairing process during human fetal ovarian development. *Hum Reprod* 20:2463-2469 (2005).

Romanienko PJ, Camerini-Otero RD: The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell* 6:975-987 (2000).

Ronne M: Fluorouacil synchronization of pig lymphocyte cultures, induction of high resolution R-banding by in vitro exposure to 5-bromodeoxyuridine/Hoechst33258: Proceedings of the 6th european Colloquium on cytogenetics of domestic animals, pp 189-196 (1984).

Ronne M, Poulsen BS, Shibasaki Y: The high resolution R-banded karyotype of *Sus scrofa domestica* L.: Proceedings of the 8th european colloquium on cytogenetics of domestic animals, pp 106-114 Bristol 1988).

Ross-Macdonald P, Roeder GS: Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. *Cell* 79:1069-1080 (1994).

Rothfels KH, Siminovitch L: An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian oells grown in vitro. *Stain Technol* 33:73-77 (1958).

Rouquette J, Cremer C, Cremer T, Fakan S: Functional nuclear architecture studied by microscopy: present and future. *Int Rev Cell Mol Biol* 282:1-90 (2010).

Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Devillard F, Lespinasse J, Sele B: Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocations: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 71:240-246 (1995).

Rousseaux S, Faure AK, Thevenon J, Escoffier E, Lestrat C, Govin J, Hennebicq S, Sele B, Caron C, Khochbin S: [Epigenetics of the sperm cell]. *Gynecol Obstet Fertil* 34:831-835 (2006).

Rousseaux S, Reynoird N, Escoffier E, Thevenon J, Caron C, Khochbin S: Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod Biomed Online* 16:492-503 (2008).

Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC, Bresson JL: Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenet Genome Res* 111:291-296 (2005).

Rowe LR, Lee JY, Rector L, Kaminsky EB, Brothman AR, Martin CL, South ST: U-type exchange is the most frequent mechanism for inverted duplication with terminal deletion rearrangements. *J Med Genet* 46:694-702 (2009).

Rubes J, Pinton A, Bonnet-Garnier A, Fillon V, Musilova P, Michalova K, Kubickova S, Ducos A, Yerle M: Fluorescence in situ hybridization applied to domestic animal cytogenetics. *Cytogenet Genome Res* 126:34-48 (2009).

Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R: Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 274:911-913 (1978).

Rumpler Y, Gabriel-Robez O, Volobouev V, Yu W, Rasamimanana P, de Perdigo A: Male sterility and double heterozygosity for chromosomal inversion. *Cytogenet Cell Genet* 69:66-70 (1995).

Russell LD, Ettliln RA, Sinha Hikim AP : Histological and histopatological evaluation of the testis. (Cache River Press, Vienna 1990).

Saadallah N, Hulten M: EM investigations of surface spread synaptonemal complexes in a human male carrier of a pericentric inversion inv(13)(p12q14): the role of heterosynapsis for spermatocyte survival. *Ann Hum Genet* 50:369-383 (1986).

Saito-Ohara F, Fukuda Y, Ito M, Agarwala KL, Hayashi M, Matsuo M, Imoto I, Yamakawa K, Nakamura Y, Inazawa J: The Xq22 inversion breakpoint interrupted a novel Ras-like GTPase gene in a patient with Duchenne muscular dystrophy and profound mental retardation. *Am J Hum Genet* 71:637-645 (2002).

Salvado C, Cram D: Microarray technology for mutation analysis of low-template DNA samples. *Methods Mol Med* 132:153-173 (2007).

Sanlaville D, Lapierre JM, Coquin A, Turleau C, Vermeesch J, Colleaux L, Borck G, Vekemans M, Aurias A, Romana SP: [Microarray CGH: principle and use for constitutional disorders]. *Arch Pediatr* 12:1515-1520 (2005).

Sarrate Z, Vidal F, Blanco J: Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertil Steril* 93:1892-1902 (2010).

Schalk JA, Dietrich AJ, Vink AC, Offenberger HH, van Aalderen M, Heyting C: Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Chromosoma* 107:540-548 (1998).

Scherthan H, Bahler J, Kohli J: Dynamics of chromosome organization and pairing during meiotic prophase in fission yeast. *J Cell Biol* 127:273-285 (1994).

Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C, Harle M, Cremer T: Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol* 134:1109-1125 (1996).

Scherthan H, Eils R, Trelles-Sticken E, Dietzel S, Cremer T, Walt H, Jauch A: Aspects of three-dimensional chromosome reorganization during the onset of human male meiotic prophase. *J Cell Sci* 111 (Pt 16):2337-2351 (1998).

Scherthan H: A bouquet makes ends meet. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:621-627 (2001).

Schlosser J, Nakib I, Carre-Pigeon F, Staerman F: [Male infertility: management strategies]. *Ann Urol (Paris)* 41:6-11 (2007).

Schmekel K, Meuwissen RL, Dietrich AJ, Vink AC, van Marle J, van Veen H, Heyting C: Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Exp Cell Res* 226:20-30 (1996).

Schultz H, Mennicke K, Schlieker H, Al-Hasani S, Bals-Pratsch M, Diedrich K, Schwinger E: Comparative study of disomy and diploidy rates in spermatozoa of fertile and infertile men: a donor-adapted protocol for multi-colour fluorescence in situ hybridization (FISH). *Int J Androl* 23:300-308 (2000).

Seabright M: A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-972 (1971).

Seli E, Sakkas D: Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 11:337-349 (2005).

Shan J, Zhang C, Sun J, Li L: [Synaptonemal complex analysis of 13/17 Robertsonian translocation in the domestic pig]. *Yi Chuan Xue Bao* 21:96-103 (1994).

Sharpe RM: Regulation of spermatogenesis in Knobil E, Neill JD (eds): *The physiology of reproduction* 2nd ed pp 1363-1434 (Raven Press, New York 1994).

Shashi V, Golden WL, Allinson PS, Blanton SH, von Kap-Herr C, Kelly TE: Molecular analysis of recombination in a family with Duchenne muscular dystrophy and a large pericentric X chromosome inversion. *Am J Hum Genet* 58:1231-1238 (1996).

Shinohara A, Shinohara M: Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination. *Cytogenet Genome Res* 107:201-207 (2004).

Shinohara M, Oh SD, Hunter N, Shinohara A: Crossover assurance and crossover interference are distinctly regulated by the ZMM proteins during yeast meiosis. *Nat Genet* 40:299-309 (2008).

Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M: Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8794-8797 (1992).

Shizuya H, Kouros-Mehr H: The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system. *Keio J Med* 50:26-30 (2001).

Simpson JL: Preimplantation genetic diagnosis at 20 years. *Prenat Diagn* 30:682-695 (2010).

Siomos MF, Badrinath A, Pasierbek P, Livingstone D, White J, Glotzer M, Nasmyth K: Separase is required for chromosome segregation during meiosis I in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 11:1825-1835 (2001).

Smith AC, Spuhler K, Williams TM, McConnell T, Sujansky E, Robinson A: Genetic risk for recombinant 8 syndrome and the transmission rate of balanced inversion 8 in the Hispanic population of the southwestern United States. *Am J Hum Genet* 41:1083-1103 (1987).

Smith GR, Boddy MN, Shanahan P, Russell P: Fission yeast Mus81.Eme1 Holliday junction resolvase is required for meiotic crossing over but not for gene conversion. *Genetics* 165:2289-2293 (2003).

Snowden T, Acharya S, Butz C, Berardini M, Fishel R: hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday Junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol Cell* 15:437-451 (2004).

Solari AJ: Synaptosomal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* 81:315-337 (1980).

Solari AJ: Primitive forms of meiosis: the possible evolution of meiosis. *Biocell* 26:1-13 (2002).

Sosnowski J, Waroczyk M, Switonski M: Chromosome abnormalities in secondary pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 60:571-581 (2003).

South ST, Swensen JJ, Maxwell T, Rope A, Brothman AR, Chen Z: A new genomic mechanism leading to cri-du-chat syndrome. *Am J Med Genet A* 140:2714-2720 (2006).

Speed RM: Oocyte development in XO fetuses of man and mouse: the possible role of heterologous X-chromosome pairing in germ cell survival. *Chromosoma* 94:115-124 (1986).

Stack SM: Heterochromatin, the synaptonemal complex and crossing over. *J Cell Sci* 71:159-176 (1984).

Stahl FW, Foss HM, Young LS, Borts RH, Abdullah MF, Copenhaver GP: Does crossover interference count in *Saccharomyces cerevisiae*? *Genetics* 168:35-48 (2004).

Stefansson H, Helgason A, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Masson G, Barnard J, Baker A, Jonasdottir A, Ingason A, Gudnadottir VG, Desnica N, Hicks A, Gylfason A, Gudbjartsson DF, Jonsdottir GM, Sainz J, Agnarsson K, Birgisdottir B, Ghosh S, Olafsdottir A, Cazier JB, Kristjansson K, Frigge ML, Thorgeirsson TE, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K: A common inversion under selection in Europeans. *Nat Genet* 37:129-137 (2005).

Stevens SJ, Smeets EE, Blom E, van Uum CM, Albrechts JC, Herbergs J, Janssen JW, Engelen JJ: Identical cryptic partial monosomy 20pter and trisomy 20qter in three adult siblings due to a large maternal pericentric inversion: detection by MLPA and breakpoint mapping by SNP array analysis. *Am J Med Genet A* 149A:2226-2230 (2009).

Storlazzi A, Tesse S, Gargano S, James F, Kleckner N, Zickler D: Meiotic double-strand breaks at the interface of chromosome movement, chromosome remodeling, and reductional division. *Genes Dev* 17:2675-2687 (2003).

Stranzinger GF, Forster M: Autosomal chromosometranslocation of piebald cattle and brown cattle. *Experientia* 32:24-27 (1976).

Stukenborg JB, Schlatt S, Simoni M, Yeung CH, Elhija MA, Luetjens CM, Huleihel M, Wistuba J: New horizons for in vitro spermatogenesis? An update on novel three-dimensional culture systems as tools for meiotic and post-meiotic differentiation of testicular germ cells. *Mol Hum Reprod* 15:521-529 (2009).

Sturtevant AH: A Third Group of Linked Genes in *Drosophila Ampelophila*. *Science* 37:990-992 (1913).

Sun H, Treco D, Szostak JW: Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the ARG4 recombination initiation site. *Cell* 64:1155-1161 (1991).

Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker A, Navarro J, Benet J, Martin RH: Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet* 74:521-531 (2004).

Sun F, Oliver-Bonet M, Turek PJ, Ko E, Martin RH: Meiotic studies in an azoospermic human translocation (Y;1) carrier. *Mol Hum Reprod* 11:361-364 (2005).

Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Turek P, Ko E, Rademaker A, Martin RH: Variation in MLH1 distribution in recombination maps for individual chromosomes from human males. *Hum Mol Genet* 15:2376-2391 (2006).

Sun F, Handel MA: Regulation of the meiotic prophase I to metaphase I transition in mouse spermatocytes. *Chromosoma* 117:471-485 (2008).

Surtees JA, Argueso JL, Alani E: Mismatch repair proteins: key regulators of genetic recombination. *Cytogenet Genome Res* 107:146-159 (2004).

Svetlanov A, Cohen PE: Mismatch repair proteins, meiosis, and mice: understanding the complexities of mammalian meiosis. *Exp Cell Res* 296:71-79 (2004).

Switonski M, Danielak-Czech B, Slota E, Sysa P: Lack of pairing loop formation in synaptonemal complex preparation of a boar carrying an inversion. *Hereditas* 128:83-85 (1998).

Switonski M, Stranzinger G: Studies of synaptonemal complexes in farm mammals--a review. *J Hered* 89:473-480 (1998).

Sym M, Engebrecht JA, Roeder GS: ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* 72:365-378 (1993).

Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW: The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33:25-35 (1983).

Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676 (2006).

Tarsounas M, Morita T, Pearlman RE, Moens PB: RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J Cell Biol* 147:207-220 (1999).

Tartaglia NR, Howell S, Sutherland A, Wilson R, Wilson L: A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet J Rare Dis* 5:8 (2010).

Taylor SS, Scott MI, Holland AJ: The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res* 12:599-616 (2004).

Tease C, Fisher G: Further examination of the production-line hypothesis in mouse foetal oocytes. I. Inversion heterozygotes. *Chromosoma* 93:447-452 (1986).

Tease C, Hartshorne GM, Hulten MA: Patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes. *Am J Hum Genet* 70:1469-1479 (2002).

Telugu BP, Ezashi T, Roberts RM: The promise of stem cell research in pigs and other ungulate species. *Stem Cell Rev Rep* (2009).

Terasawa M, Ogawa H, Tsukamoto Y, Shinohara M, Shirahige K, Kleckner N, Ogawa T: Meiotic recombination-related DNA synthesis and its implications for cross-over and non-cross-over recombinant formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5965-5970 (2007).

Thacker J: The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett* 219:125-135 (2005).

Tjio JH, Levan A: The chromosome number of man. *Hereditas* 42:1-6 (1956).

Toth A, Gaal M, Laszlo J: Familial pericentric inversion of the Y chromosome. *Ann Genet* 27:60-61 (1984).

Trelles-Sticken E, Loidl J, Scherthan H: Bouquet formation in budding yeast: initiation of recombination is not required for meiotic telomere clustering. *J Cell Sci* 112 (Pt 5):651-658 (1999).

Tsubouchi T, Roeder GS: A synaptonemal complex protein promotes homology-independent centromere coupling. *Science* 308:870-873 (2005).

Turner JM, Aprelikova O, Xu X, Wang R, Kim S, Chandramouli GV, Barrett JC, Burgoyne PS, Deng CX: BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol* 14:2135-2142 (2004).

Turner JM, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu X, Deng CX, Burgoyne PS: Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet* 37:41-47 (2005).

Vallente RU, Cheng EY, Hassold TJ: The synaptonemal complex and meiotic recombination in humans: new approaches to old questions. *Chromosoma* 115:241-249 (2006).

Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I: Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in-situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Mol Hum Reprod* 5:682-690 (1999).

Vazquez J, Belmont AS, Sedat JW: The dynamics of homologous chromosome pairing during male *Drosophila* meiosis. *Curr Biol* 12:1473-1483 (2002).

Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Lifchez A, Strom C, Kuliev A: Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body fluorescent in situ hybridization analysis. Preimplantation Genetics Group. *Fertil Steril* 66:126-129 (1996).

Vialard F, Delanete A, Clement P, Simon-Bouy B, Aubriot FX, Selva J: Sperm chromosome analysis in two cases of paracentric inversion. *Fertil Steril* 87:418 e411-415 (2007).

Vialard F, Pellestor F: [Benefit of human gamete cytogenetics: results and perspectives]. *Pathol Biol (Paris)* 56:388-399 (2008).

Villagomez DA, Gustavsson I, Jonsson L, Ploen L: Reciprocal chromosome translocation, rcp(7;17)(q26;q11), in a boar giving reduced litter size and increased rate of piglets dying in the early life. *Hereditas* 122:257-267 (1995).

Villagomez DA, Pinton A: Chromosomal abnormalities, meiotic behavior and fertility in domestic animals. *Cytogenet Genome Res* 120:69-80 (2008).

Villagomez DA, Parma P, Radi O, Di Meo G, Pinton A, Iannuzzi L, King WA: Classical and molecular cytogenetics of disorders of sex development in domestic animals. *Cytogenet Genome Res* 126:110-131 (2009).

Visootsak J, Graham JM: Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. *Orphanet J Rare Dis* 1:42 (2006).

Vogt E, Kirsch-Volders M, Parry J, Eichenlaub-Ritter U: Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutat Res* 651:14-29 (2008).

Vozdova M, Oracova E, Horinova V, Rubes J: Sperm fluorescence in situ hybridization study of meiotic segregation and an interchromosomal effect in carriers of t(11;18). *Hum Reprod* 23:581-588 (2008).

Waddington CH: Introduction to modern genetics. (Allen and Unwin, Londres 1939).

Wang K, Li J, Li S, Bolund L, Wiuf C: Estimation of tumor heterogeneity using CGH array data. *BMC Bioinformatics* 10:12 (2009).

Wang TF, Kleckner N, Hunter N: Functional specificity of MutL homologs in yeast: evidence for three Mlh1-based heterocomplexes with distinct roles during meiosis in recombination and mismatch correction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13914-13919 (1999).

Wang TF, Kung WM: Supercomplex formation between Mlh1-Mlh3 and Sgs1-Top3 heterocomplexes in meiotic yeast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 296:949-953 (2002).

Ward WS: Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 48:1193-1201 (1993).

Watanabe Y: Modifying sister chromatid cohesion for meiosis. *J Cell Sci* 117:4017-4023 (2004).

Watanabe Y: Shugoshin: guardian spirit at the centromere. *Curr Opin Cell Biol* 17:590-595 (2005).

Weaver JR, Susiarjo M, Bartolomei MS: Imprinting and epigenetic changes in the early embryo. *Mamm Genome* 20:532-543 (2009).

Welsh PL, Owens KN, King MC: Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet* 16:69-74 (2000).

Whitby MC, Osman F, Dixon J: Cleavage of model replication forks by fission yeast Mus81-Eme1 and budding yeast Mus81-Mms4. *J Biol Chem* 278:6928-6935 (2003).

Whitby MC: Junctions on the road to cancer. *Nat Struct Mol Biol* 11:693-695 (2004).

White M: Modes of speciation. (Freeman, W.H., San Francisco 1978).

WHO: WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. 3rd edn. (Cambridge University Press, Cambridge 1992).

Wiland E, Midro AT, Panasiuk B, Kurpisz M: The analysis of meiotic segregation patterns and aneuploidy in the spermatozoa of father and son with translocation t(4;5)(p15.1;p12) and the prediction of the individual probability rate for unbalanced progeny at birth. *J Androl* 28:262-272 (2007).

Wilton L: Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review. *Prenat Diagn* 22:512-518 (2002).

Winsor EJ, Palmer CG, Ellis PM, Hunter JL, Ferguson-Smith MA: Meiotic analysis of a pericentric inversion, inv(7) (p22q32), in the father of a child with a duplication-deletion of chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet* 20:169-184 (1978).

Wojtasz L, Daniel K, Roig I, Bolcun-Filas E, Xu H, Boonsanay V, Eckmann CR, Cooke HJ, Jasin M, Keeney S, McKay MJ, Toth A: Mouse HORMAD1 and HORMAD2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with the help of TRIP13 AAA-ATPase. *PLoS Genet* 5:e1000702 (2009).

Woods LM, Hodges CA, Baart E, Baker SM, Liskay M, Hunt PA: Chromosomal influence on meiotic spindle assembly: abnormal meiosis I in female Mlh1 mutant mice. *J Cell Biol* 145:1395-1406 (1999).

Wu TC, Lichten M: Factors that affect the location and frequency of meiosis-induced double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 140:55-66 (1995).

Wyandt HE, Tonk VS: Atlas of Human Chromosome Heteromorphisms. (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London 2004).

Wyrobek AJ, Alhborn T, Balhorn R, Stanker L, Pinkel D: Fluorescence in situ hybridization to Y chromosomes in decondensed human sperm nuclei. *Mol Reprod Dev* 27:200-208 (1990).

Xu H, Beasley MD, Warren WD, van der Horst GT, McKay MJ: Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Dev Cell* 8:949-961 (2005).

Yakut T, Ercelen N, Acar H, Kimya Y, Egeli U: Meiotic segregation analysis of reciprocal translocations both in sperms and blastomeres. *Am J Med Genet A* 140:1074-1082 (2006).

Yamamoto A, West RR, McIntosh JR, Hiraoka Y: A cytoplasmic dynein heavy chain is required for oscillatory nuclear movement of meiotic prophase and efficient meiotic recombination in fission yeast. *J Cell Biol* 145:1233-1249 (1999).

Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ: The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 15:471-476 (1976).

Yang SP, Bidichandani SI, Figuera LE, Juyal RC, Saxon PJ, Baldini A, Patel PI: Molecular analysis of deletion (17)(p11.2p11.2) in a family segregating a 17p paracentric inversion: implications for carriers of paracentric inversions. *Am J Hum Genet* 60:1184-1193 (1997).

Yerle M, Schmitz A, Milan D, Chaput B, Monteagudo L, Vaiman M, Frelat G, Gellin J: Accurate characterization of porcine bivariate flow karyotype by PCR and fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 16:97-103 (1993).

Yin H, Cukurcam S, Betzendahl I, Adler ID, Eichenlaub-Ritter U: Trichlorfon exposure, spindle aberrations and nondisjunction in mammalian oocytes. *Chromosoma* 107:514-522 (1998).

Yokobayashi S, Watanabe Y: The kinetochore protein Moa1 enables cohesion-mediated monopolar attachment at meiosis I. *Cell* 123:803-817 (2005).

Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y, Morita T: The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* 1:707-718 (1998).

Yuan L, Liu JG, Hoja MR, Wilbertz J, Nordqvist K, Hoog C: Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* 296:1115-1118 (2002).

Zickler D: From early homologue recognition to synaptonemal complex formation. *Chromosoma* 115:158-174 (2006).

Zickler D, Kleckner N: The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet* 32:619-697 (1998).

Zickler D, Kleckner N: Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* 33:603-754 (1999).

Zirkin BR, Chang TS, Heaps J: Involvement of an acrosinlike proteinase in the sulfhydryl-induced degradation of rabbit sperm nuclear protamine. *J Cell Biol* 85:116-121 (1980).

Annexes

A-I : Article paru dans Theriogenology

Study of inter- and intra-variation of meiotic segregation patterns of t(13;15)(q27;q13) boars

Paru en 2008

Study of inter- and intra-individual variation of meiotic segregation patterns in t(3;15)(q27;q13) boars

K. Massip, H. Berland, N. Bonnet, A. Calgaro, S. Billoux, V. Baquié,
N. Mary, A. Bonnet-Garnier, A. Ducos, M. Yerle, A. Pinton*

UMR 444 INRA-ENVY Génétique Cellulaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des Capelles,
BP 87614, 31076 Toulouse Cedex 3, France

Received 21 February 2008; received in revised form 10 April 2008; accepted 11 April 2008

Abstract

Constitutional chromosomal rearrangements are relatively frequent genetic anomalies in both man and pigs. Among them, reciprocal translocations, present a specific meiotic segregation pattern. The potential "individual" effect of the t(3;15)(q27;q13) translocation was studied using SpermFISH to analyze the meiotic segregation patterns of three boars carrying this rearrangement. Three samples were taken at different times from one of these boars to analyze a potential "time" effect. No "time" or "individual" effect was found in this study. These results should allow more efficient management of certain reciprocal translocations in pig populations but need to be completed by the study of other kinds of chromosomal rearrangements.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Reciprocal translocation; Pig; SpermFISH; Intra-individual variation; Inter-individual variation

1. Introduction

Balanced constitutional reciprocal translocations are the most frequent structural chromosomal rearrangements identified in man and pigs [1,2]. Carriers are generally phenotypically normal, but such rearrangements frequently lead to reproductive disorders. For instance, reciprocal translocation in a boar can lead to an average reduction of 40% in the litter size of his mates, with major economic repercussions for the breeder [2]. Indeed, spermatogenesis impairments (azoospermia, oligospermia, ...) have been reported in some carriers [3]. In addition, reciprocal translocations lead to the production of chromosomally

unbalanced gametes which are responsible for the reduced fertility of carriers and/or their mates, and increase the risk of producing unbalanced progeny (development anomalies, spontaneous abortion) [4–7].

During the prophase of meiosis I, chromosomes involved in reciprocal translocations form quadrivalents. These particular structures segregate by five modes, i.e. alternate, adjacent I, adjacent II, 3:1 and 4:0, leading to the production of 18 different types of gametes with a high frequency of unbalanced ones [1]. All segregation modes occur in various frequencies from one translocation to another, depending notably on the chromosomes involved, the size of the translocated fragments and location of the breakpoints. Determination of the segregation pattern consists of estimating the proportions of the different types of gametes issued from the 5 segregation modes.

The SpermFISH technique (fluorescent *in situ* hybridization on decondensed sperm nuclei) is now

* Corresponding author. Tel.: +33 5 61 19 39 23/6 18 51 60 35;
fax: +33 5 61 19 39 24.

E-mail address: a.pinton@envt.fr (A. Pinton).

commonly used to assess the segregation patterns of reciprocal translocations in man [1,8] and other mammalian species including pigs [9] and cattle [10]. Thus, theoretically, it can be used to predict the potential effects of the rearrangements on fertility caused by the production of genetically unbalanced gametes. However, until now, very few studies have investigated the occurrence of a variation between the segregation patterns of individuals carrying the same rearrangement (“inter-individual” effect) [11–16]. Similarly, only one study has reported the analysis of a variation in translocation meiotic segregation patterns over time in the same carrier (“time effect”) [17].

However, these two parameters need to be considered in order to accurately evaluate the potential effects of reciprocal translocations on reproduction. Indeed, it is important to know if a particular reciprocal translocation has the same consequences for each carrier. Moreover, it is necessary to be sure that there is no variation of the segregation pattern throughout the individual’s life, and then that the proportion of unbalanced gametes estimated by the SpermFISH technique at a particular time is relevant.

Experiments were carried out on sperm samples collected from boars carrying $t(3;15)(q27,q13)$. The sperm from one boar carrier of this particular translocation has already been analyzed in the laboratory [9].

In the present study, the meiotic segregation patterns of three offspring of this boar were analyzed and compared. A potential “time” effect was also studied.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The $t(3;15)(q27;q13)$ was initially identified in a 10-month-old purebred Large White boar controlled before reproduction in an artificial insemination (AI) centre. Experimental inseminations were carried out to produce two generations of offspring carrying the chromosomal rearrangement. In this study, segregation patterns were studied in three pubescent grandsons (animals numbered 1–3) of the boar initially carrying the rearrangement. The “time” effect was studied by collecting three samples from animal No. 2 with an interval of 2 months between each sample.

2.2. Preparation of the probes

Probes were selected using recent data from the pig genome sequencing project (http://pre.ensembl.org/Sus_Scrofa/index.html) [18]. Each probe consisted of

a pool of four BACs (Bacterial Artificial Chromosome) selected in a contig (maximal distance between clones: 500 bp), in order to increase the size of the sequence covered by the probe (around 1 Mb) and thus the intensity of the FISH signals. These BACs were obtained from the Biological Resources Center, GADIE [19]. Probes 1–3 (Fig. 1) were labeled with Biotin, Digoxigenin and FITC respectively by random priming as previously described [9].

Specificity of the probes was first tested on lymphocyte metaphases. The schematic representation of the reciprocal translocation and localization of the BACs used in this study are presented in Fig. 1.

2.3. Sperm preparation, hybridization and signal analysis

Sperm preparations and hybridization were carried out according to the protocol described by Pinton et al. [9] with some modifications. Biotin-labeled probes were revealed in red using Streptavidin coupled to Alexa 594 (Molecular Probes Eugene, OR, USA), and amplified using a rabbit anti-Streptavidin antibody (Bethyl, Montgomery, Texas, USA) and an Alexa 594 conjugated donkey anti-rabbit antibody (Molecular Probes Eugene).

Digoxigenin-labeled probes were revealed by a mouse anti-Digoxigenin antibody (Roche Diagnostic, Meylan, France), and a mix of Alexa 488 conjugated goat anti-mouse antibody (Molecular Probes Eugene) and Alexa 546 conjugated goat anti-mouse antibody (Molecular Probes Eugene). The signal was finally amplified using an Alexa 546 conjugated donkey anti-goat antibody (Molecular Probes Eugene). Red and green fluorochromes were used simultaneously to obtain a yellow color. FITC-labeled probes were first revealed in green by a mouse anti-FITC coupled with a Cy2 fluorochrome (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Grove, PA, USA), and then by an Alexa 488 conjugated goat anti-mouse antibody (Molecular Probes Eugene).

The slides were analyzed under a Zeiss microscope fitted with a triple bandpass filter. Only sperm heads presenting signals of equivalent intensity and separated by a distance of at least the size of one signal were counted. The different types of gametes are presented in tables. About 3000 spermatozoa heads were analyzed for each sperm sample.

2.4. Statistical analysis

The repeatability of the experiments and the potential variation in the segregation pattern between individuals

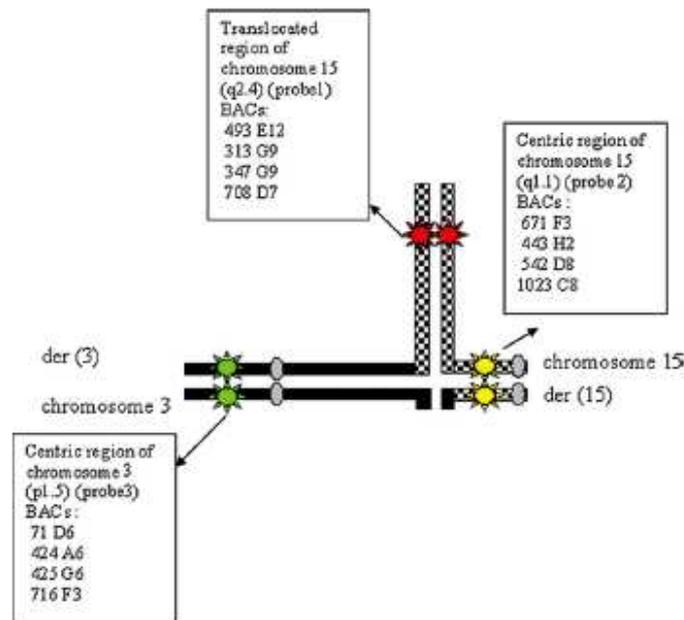


Fig. 1. Representation of the quadrivalent of the $\lambda(3;15)$ and location of the BAC probes used in this study.

or over time were analyzed by using a classical χ^2 test [20] to compare the proportions of gametes derived from the different segregation modes.

3. Results and discussion

3.1. Repeatability of the experiments

The repeatability of the SpermFISH experiments was assessed by analyzing two slides prepared from the same sperm sample from the animal (No. 1). Some examples of spermatozoa heads obtained after hybridization and probes revelation are presented (Fig. 2).

The percentage of balanced gametes determined on slide No. 1 (51.95%) was not statistically different from that of slide No. 2 (51.29%, $P = 0.62$). Comparable results (no statistically significant difference) were obtained for all other major classes of gametes.

The existence of equivalent proportions of each type of gamete on the two slides from the same sample indicated that our analysis was reliable and in agreement with previously published results for the same reciprocal translocation [9].

By using pooled BACs derived from a contig we were able to obtain strong hybridization signals and confirm that the method was reliable and repeatable.

3.2. "Time" effect

The occurrence of a "time" effect was investigated by comparing the segregation patterns in three different samples collected from animal No. 2 with a 2-month interval between samplings. As shown in Table 1, no statistically significant difference was observed between these samples (i.e. the percentages of balanced gametes were equivalent: 54.55, 52.50 and 53.43%, $P = 0.27$).

The length of a spermatogenesis cycle in pigs is about 34 days. Therefore, the three samples from animal No. 2 corresponded to different meiotic waves. Our results did not show any variation of the meiotic segregation patterns over time for this boar. These results are consistent with the only one obtained in man [17]. However, the time period tested here is not representative of a boar career (about 2 years). Samplings could not be obtained over such a long period for technical and economic reasons, and did not allow us to evaluate some environmental effects (breeding, temperature, seasons, ...).

3.3. "Individual" effect

The data obtained for animal No. 1 (repeatability experiments) were pooled in order to increase sample

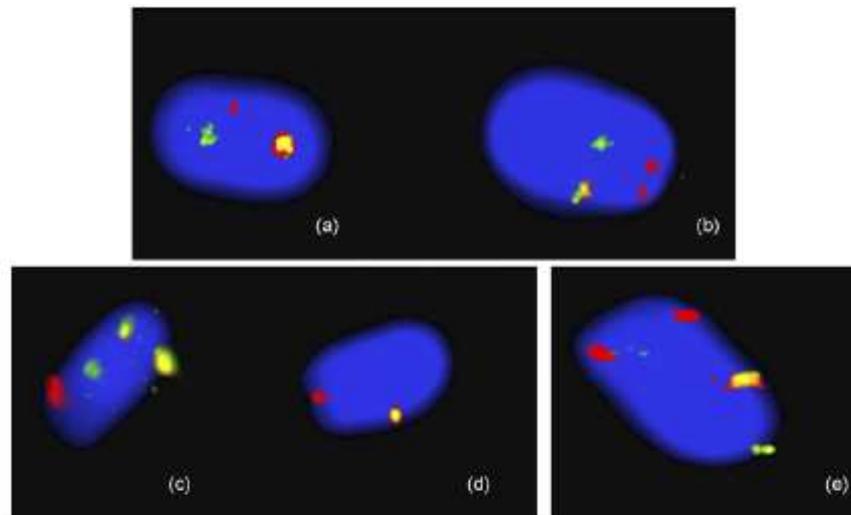


Fig. 2. Examples of spermatozoa heads obtained after hybridization and probes revelation (a) balanced sperm from alternate segregation (red, green, yellow); (b) one 15 der (3) unbalanced sperm from adjacent 1 segregation; (c) one 3-15-der (15) and (d) one 15 unbalanced sperms from 3:1 segregation; (e) one 15-15 sperm from adjacent 2 segregation.

Table 1

"Time" effect analysis: comparison of the segregation patterns obtained from three slides prepared from 3 sperm samples of the same animal (No. 2) collected at 2 months intervals (period covered: 5 months)

Fluorescent signals ^b	Segregation	Chromosomal constitution	% by combinations (number of gametes investigated)			
			Animal No. 2 11/25/03	Animal No. 2 01/27/04	Animal No. 2 03/09/04	Total
RGY	Alternate	3–15	54.55 (1640)	52.5 (1583)	53.43 (1611)	53.49 (4834)
GY	Adjacent 1	der (3)-der (15)	6.12 (184)	4.94 (149)	5.37 (162)	5.48 (495)
RRGY		15-der (3)	12.8 (387)	14.99 (452)	15.95 (481)	14.61 (1320)
RGG	Adjacent 2	3-der (3)	18.92 (571)	19.93 (601)	21.32 (643)	20.09 (1815)
RYY		15-der (15)	0.67 (20)	1.39 (42)	0.70 (21)	0.91 (83)
GG	Adjacent 2 + CO	3-3 ^a	1.46 (44)	1.23 (37)	1.39 (42)	1.36 (123)
YY		der (15)-der (15) ^a	0.50 (15)	0.63 (19)	0.40 (12)	0.51 (46)
RRYY		15-15 ^a	0.50 (15)	0.46 (14)	0.63 (19)	0.53 (48)
RRGG		15-15 ^a	0.17 (5)	0.56 (17)	0.46 (14)	0.40 (36)
		der (3)-der (3) ^a	0.37 (11)	0.60 (18)	0.43 (13)	0.46 (42)
G	3:1	3	3.67 (110)	4.87 (147)	4.01 (121)	4.18 (378)
Y		der (15)	1.06 (32)	2.19 (66)	1.36 (41)	1.54 (139)
RY		15	2.43 (73)	1.43 (43)	2.26 (68)	2.04 (184)
RG		der (3)	3.76 (113)	5.51 (166)	4.11 (124)	4.46 (403)
RGYY		3-15-der (15)	8.51 (256)	7.00 (211)	7.30 (220)	7.60 (687)
RGGY		3-15-der (3)	3.19 (96)	3.02 (91)	3.22 (97)	3.14 (284)
RRGY		15-der (15)-der (3)	1.96 (59)	1.86 (56)	1.49 (45)	1.77 (160)
RRGGY		15-der (15)-der (3)	0.73 (22)	1.00 (30)	0.66 (20)	0.80 (72)
		15-3-der (3)	0.70 (21)	0.63 (19)	0.76 (23)	0.70 (63)
			22.34 (672)	22.64 (682)	21.16 (638)	22.05 (1992)
RRGGYY	4:0 or diploid		0.17 (5)	0.13 (4)	0.07 (2)	0.12 (11)
Total			(3006)	(3015)	(3015)	(9036)

Bold values signifies total percentage and number of gametes of each class.

^a Chromosomal constitutions resulting from the presence of interstitial chiasmata.

^b Fluorescent signals identified on decondensed sperm nuclei: R = red; Y = yellow; G = green.

Table 2
 “Individual” effect analysis: comparison of the segregation patterns of three different pigs carriers of the same translocation

Fluorescent signals ^c	Segregation	Chromosomal constitution	% by combinations (number of gametes investigated)		
			Animal No. 1 (total)	Animal No. 2 (total)	Animal No. 3
RGY	Alternate	3–15	51.62 (3116) ^b	53.49 (4834) ^b	51.60 ^b (1553)
GY	Adjacent 1	der (3)-der (15)	7.60 (459)	5.48 (495)	5.72 (172)
RRGY		3-der (15)	13.66 (825)	14.61 (1320)	15.29 (460)
			21.26 (1284)	20.09 (1815)	21.01 (632)
RGG	Adjacent 2	3-der (3)	0.57 (32)	0.91 (83)	0.89 (27)
RYY	Adjacent 2 + CO	15-der (15)	1.43 (86)	1.36 (123)	1.43 (43)
GG		3-3 ^a	0.88 (53)	0.51 (46)	0.60 (18)
YY		der (15)-der (15) ^a	0.63 (38)	0.53 (48)	0.80 (24)
RRYY		15-15 ^a	0.36 (22)	0.40 (36)	0.13 (4)
RRGG		der (3)-der (3) ^a	0.50 (30)	0.46 (42)	0.43 (13)
			4.37 (261)	4.18 (378)	4.28 (129)
G	3:1	3	0.60 (36)	1.54 (139)	1.16 (35)
Y		der (15)	2.22 (134)	2.04 (184)	3.03 (91)
RY		15	4.67 (282)	4.46 (403)	3.96 (119)
RG		der (3)	5.73 (346)	7.60 (687)	8.28 (249)
RGYY		3-15-der (15)	4.90 (296)	3.14 (284)	3.26 (98)
RRGY		3-15-der (3)	2.47 (149)	1.77 (160)	1.70 (51)
RRYY		15-der (15)-der (3)	1.33 (80)	0.80 (72)	0.73 (22)
RRGGY		15-3-der (3)	0.80 (48)	0.70 (63)	0.86 (26)
			22.71 (1371)	22.05 (1992)	22.98 (691)
RRGGYY	4:0 or diploid		0.03 (2)	0.12 (11)	0.10 (3)
Total			(6036)	(9036)	(3008)

Bold values signifies total percentage and number of gametes of each class

^a Chromosomal constitutions resulting from the presence of interstitial chiasmata.

^b Statistical differences between individuals ($P < 0.05$).

^c Fluorescent signals identified on decondensed sperm nuclei: R = red; Y = yellow; G = green.

size (number of spermatozoa nuclei analyzed) and to improve the accuracy of the statistical test. Similarly, the data concerning the three samples collected from animal No. 2 (“time” effect) were added together. Consequently, the analyses were based on comparison of the segregation patterns in about 6000 (animal No. 1), 9000 (animal No. 2) and 3000 (animal No. 3) spermatozoa nuclei. The results are presented in Table 2. A very slight difference in the percentages of balanced gametes was detected between these three individuals (51.62%–No. 1, 53.50%–No. 2, 51.60%–No. 3, $P = 0.04$). Indeed, the maximum variation in the percentage of balanced gametes between the two most distant animals (No. 2 and No. 3) was only 1.9%. This difference could be attributed to the high resolution power of the statistical analysis, carried out on a large number of sperm nuclei, as suggested in man by Anton et al. [14].

Despite the limited number of publications concerning this type of study, our results are in agreement with data collected in humans.

It is interesting to note that, in man, the variations in the percentage of balanced gametes were in some cases

as high as 5% [11,12,14] in contrast to the 1.9% variation found in our study. The differences observed between these two species can be partly explained by the possible occurrence of certain defects of spermatogenesis in these men rather than a real “individual” effect [21]. Each boar analyzed in this study in fact presented normal sperm quality (concentration, morphology, ...), so that no spermatogenesis impairment was suspected. In contrast, the men in whom the segregation patterns had been analyzed had encountered spermatogenesis problems and/or several miscarriages [11,12,14]. These data suggest that pig carriers of translocations with no spermatogenesis defects constitute a good model for the accurate investigation of “individual” and “time” effects on meiotic segregation patterns.

If we compare our results with the only ones previously published in pigs by Pinton et al., similar segregation patterns were observed between our animals and their grand-father [9]. On the contrary, the meiotic segregation pattern reported in the same study for another translocation (t(12;14)(q13;q21)), differed notably from our results: the percentages of

balanced gametes and gametes from adjacent I, adjacent II and 3:1 segregations were 75.67, 14.84, 5.63 and 3.41% respectively compared to 52.23, 20.79, 4.28 and 22.58% respectively for the t(3;15)(q27;q13) presented in this study. These results are consistent with the fact that each translocation leads to a specific meiotic segregation pattern.

To the best of our knowledge, this study is the first evaluation of the potential “inter-individual” and “time” effects of a reciprocal translocation on meiotic segregation in livestock species.

Our results open the door to interesting possibilities. Indeed, if inter-individual variation is absent or very low, the consequences of a translocation in a related boar can be estimated from a previously analyzed one carrying the same abnormality.

Thus, these data should allow more efficient management of certain reciprocal translocations in pig populations and be used to advise selection centres on the need or not to reform a boar carrying that reciprocal translocation.

The fact that there is no variation in segregation pattern during 5 months of the boar's life is also interesting: the proportion of unbalanced gametes determined at time *T* could be used to estimate the effect of the translocation throughout the reproductive career of a boar.

4. Conclusion

Our results did not show any “individual” or “time” effect on the meiotic segregation patterns of boars carrying (3;15)(q27;q13). However, our results concern this particular translocation. This study must be completed by performing the same work on other types of chromosomal rearrangements (Robertsonian translocations, inversions, ...) and other reciprocal translocations available in the laboratory [2].

Finally, this study shows the interest of the pig species as an animal model for increasing knowledge of the meiotic behaviour of chromosomal rearrangements. Indeed, this species is potentially a carrier of the same types of chromosomal rearrangements as man, its karyotype structure is close to that of humans and it is possible to create families carrying the same rearrangement.

Acknowledgement

The authors want to thank the CRB for its technical support and for providing the BAC probes.

References

- [1] Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:281–90.
- [2] Ducos A, Berland HM, Bonnet N, Calgaro A, Billoux S, Mary N, et al. Chromosomal control of pig populations in France: 2002–2006 survey. *Genet Sel Evol* 2007;39:583–97.
- [3] Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, et al. Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod* 1996;11 Suppl. 4:1–24 [discussion 25–6].
- [4] Jalbert P, Sele B. Factors predisposing to adjacent 2 and 3:1 disjunctions: study of 161 human reciprocal translocations. *J Med Genet* 1979;16:467–78.
- [5] Jalbert P, Sele B, Jalbert H. Reciprocal translocations: a way to predict the mode of imbalanced segregation by pachytene-diagram drawing. *Hum Genet* 1980;55:209–22.
- [6] Boue A, Gallano P. A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. *Prenat Diagn* 1984; 4 Spec No: 45–67.
- [7] Daniel A, Hook EB, Wulf G. Risks of unbalanced progeny at amniocentesis to carriers of chromosome rearrangements: data from United States and Canadian laboratories. *Am J Med Genet* 1989;33:14–53.
- [8] Anton E, Vidal F, Blanco J. Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod* 2007;22:2088–92.
- [9] Pinton A, Ducos A, Yerle M. Estimation of the proportion of genetically unbalanced spermatozoa in the semen of boars carrying chromosomal rearrangements using FISH on sperm nuclei. *Genet Sel Evol* 2004;36:123–37.
- [10] Bonnet-Gamier A, Pinton A, Berland HM, Khireddine B, Eggen A, Yerle M, et al. Sperm nuclei analysis of 1/29 Robertsonian translocation carrier bulls using fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Genome Res* 2006;112:241–7.
- [11] Estop AM, Levinson F, Cieply K, Vankirk V. The segregation of a translocation t(1;4) in two male carriers heterozygous for the translocation. *Hum Genet* 1992;89:425–9.
- [12] Rousseaux S, Chevret E, Montel M, Cozzi J, Pelletier R, Devillard F, et al. Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocations: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1995;71:240–6.
- [13] Cora T, Acar H, Kaynak M. Molecular cytogenetic detection of meiotic segregation patterns in sperm nuclei of carriers of 46,XY,t(15;17)(q21; q25). *J Androl* 2002;23:793–8.
- [14] Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J. Preferential alternate segregation in the common t(11;22)(q23;q11) reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers. *Reprod Biomed Online* 2004;9:637–44.
- [15] Morel F, Douet-Guilbert N, Roux C, Tripogney C, Le Bris MJ, De Braekeleer M, et al. Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21;cen) translocation in two carrier brothers. *Fertil Steril* 2004;81:682–5.
- [16] Wiland E, Midro AT, Panasiuk B, Kurpisz M. The analysis of meiotic segregation patterns and aneuploidy in the spermatozoa of father and son with translocation t(4;5)(p15.1;p12) and the prediction of the individual probability rate for unbalanced progeny at birth. *J Androl* 2007;28:262–72.
- [17] Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Marchetti C, Lefebvre V, et al. Lack of intraindividual variation of unbalanced spermatozoa frequencies from a 46,XY,t(9;22)(q21;q11.2) carrier: case report. *Hum Reprod* 2004;19:2227–30.

- [18] Hubbard TJ, Aken BL, Beal K, Ballester B, Caccamo M, Chen Y, et al. Ensembl 2007. *Nucleic Acids Res* 2007;35: D610–7.
- [19] Rogel-Gaillard C, Bourgeaux N, Billault A, Vaiman M, Chardon P. Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements. *Cytogenet Cell Genet* 1999;85:205–11.
- [20] Team RDC. R: a language and environment for statistical computing, 2007.
- [21] Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K. Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1999;105: 428–36.

A-II: Méthodes cytogénétiques d'étude de la méiose : appariement, recombinaison et ségrégations méiotiques

I. Techniques de cytogénétique classique

I.1 Le caryotype

Les débuts de la cytogénétique humaine datent de 1956, année où le nombre diploïde des chromosomes humains fut publié (Ford and Hamerton, 1956; Tjio and Levan, 1956). Très rapidement, les premières anomalies chromosomiques furent détectées : trisomie 21 (Lejeune et al., 1959), syndrome de Klinefelter (Jacobs and Strong, 1959) et syndrome de Turner (Ford et al., 1959).

Progressivement, les techniques mises au point chez l'Homme ont été appliquées aux animaux de ferme, et les premières anomalies chromosomiques ont été détectées chez le bovin et le porc (cf. paragraphe chapitre 2, II.1).

A la fin des années 60 les premières techniques de marquage en bandes des chromosomes voient le jour, permettant avec d'autres critères (notamment la taille et la forme des chromosomes) de mettre en place une classification internationale des chromosomes, c'est-à-dire le caryotype standard humain (ISCN, 1985).

Les mêmes techniques furent ensuite utilisées avec succès dans les espèces d'élevage, conduisant à l'établissement de caryotypes standardisés lors de la conférence de Reading en 1976 (Ford et al., 1980).

Les techniques les plus utilisées reposent sur différentes propriétés de l'ADN chromosomique : richesse en bases A-T et G-C, compaction différentielle de l'ADN, régions eu- ou hétérochromatiques notamment (pour revue, Hayes, 1998). Ainsi, les bandes G, R et C sont les plus couramment utilisées afin d'identifier les chromosomes.

Les bandes G, utilisées en routine au laboratoire, ont été décrites pour la première fois en 1971 (Seabright, 1971).



Figure A-II-1 : Caryotype de porc normal en bandes G (laboratoire d'accueil)

Une troisième technique repose sur la coloration des régions hétérochromatiques des chromosomes. Les bandes C sont révélées après des traitements successifs acides, alcalins et salins, puis coloration au Giemsa (Arrighi and Hsu, 1971).

Quelle que soit la technique utilisée, la mise en place du caryotype en bande a constitué une avancée majeure dans le domaine de la cytogénétique, tant humaine qu'animale : de nombreuses anomalies chromosomiques ont pu être identifiées, ainsi que de nombreux polymorphismes. La mise en place de cartes génétiques et des études phylogénétiques ont aussi grandement bénéficié de l'apport des caryotypes en bandes (pour revue, Popescu, 1989).

La révélation des bandes à lieu à l'aide d'enzymes protéolytiques, telle que de la trypsine ou sous des conditions particulières de dénaturation, puis coloration au Giemsa (Figure A-II-1).

Les bandes R mettent en évidence le contre-type des bandes G par une dénaturation des chromosomes par la chaleur puis coloration au Giemsa (Dutrillaux and Lejeune, 1971). Elle repose sur le principe que les régions riches en bases G-C sont plus résistantes à la dénaturation et restent donc plus sombres après coloration.

Afin d'augmenter la résolution du marquage en bandes des chromosomes, de nouvelles techniques ont vu le jour : l'utilisation d'agents bloquants la synthèse d'ADN (et donc le cycle cellulaire) a ainsi permis de réaliser des caryotypes sur des cellules prométaphasiques, (chromosomes de grande taille). Les caryotypes en bandes de porc (Ronne, 1984; Ronne et al., 1988) et de bovins ont ainsi été affinés (Di Berardino et al., 1985).

I. 2 Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

Décrites pour la première fois à la fin des années 60 (John et al., 1969; Pardue and Gall, 1969) les techniques d'hybridation *in situ* permettent de visualiser des « sondes » (séquences de nucléotides spécifiques plus ou moins grandes) sur des chromosomes, des cellules ou des tissus.

Afin de pouvoir être visualisées sur les cibles adéquates, les sondes doivent être marquées. Ce marquage était initialement radioactif (Joseph et al., 1984; Rigby et al., 1977). Cependant, l'utilisation d'isotopes radioactifs présentait de nombreux inconvénients (règles strictes de manipulation, longues durées d'exposition, bruit de fond élevé et résolution faible du signal) (Hayes and Dutrillaux, 1998). L'utilisation de sondes non radioactives a permis de faire progresser énormément la technique d'hybridation *in situ*.

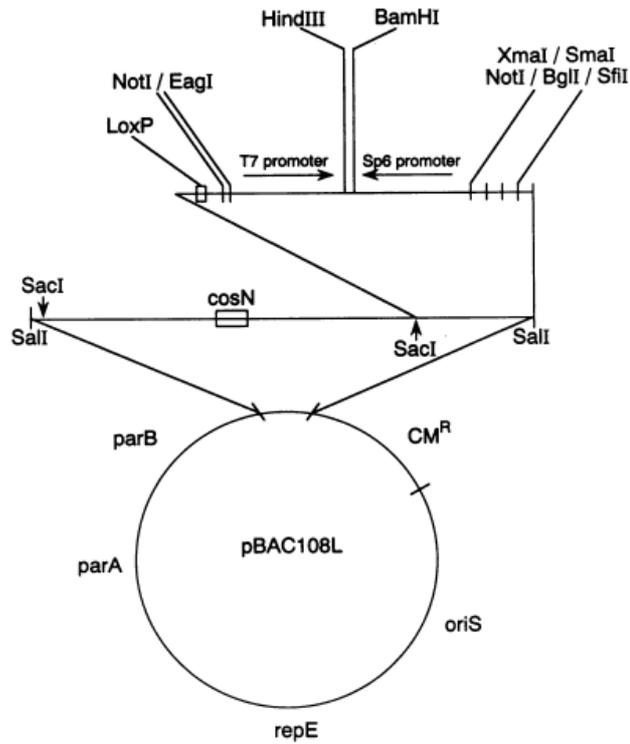


Figure A-II-2 : Représentation schématique d'un BAC (Bacterial Artificial Chromosome)(Shizuya et al., 1992)

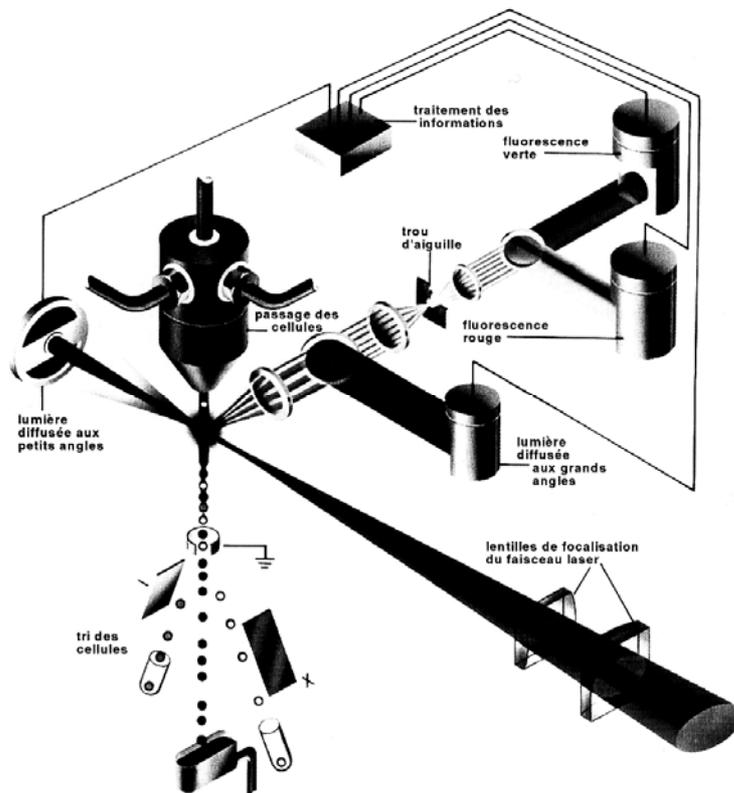


Figure A-II-3 : Représentation schématique d'un cytomètre en flux de type tri-axial (d'après Hausmann et Cremer, 1998).

La FISH est depuis utilisée chez l'Homme et d'autres espèces en cytogénétique clinique (détection, caractérisation d'anomalies), cartographie de génomes (localisation de séquences spécifiques ou de gènes), études phylogénétiques (définition d'homologies de séquences entre espèces) (pour revue, Rubes et al., 2009).

Par ailleurs, les techniques de FISH peuvent être également utilisées pour étudier les ségrégations méiotiques de chromosomes impliqués dans des réarrangements chromosomiques, chez le mâle ou la femelle.

1.2.1 Types de sondes utilisées

Différents types de sondes peuvent être utilisés pour la FISH. Il peut s'agir de fragments d'ADN d'une taille de 120 à 150 kb contenus dans des BACs (Bacterial Artificial Chromosome), ou un mélange de petits fragments représentatifs d'un bras ou chromosomes entiers.

Créés en 1992 (Shizuya et al., 1992) les BACs, issus du plasmide F de *E.coli* contenant les gènes codant pour sa propre réplication, sont des structures stables permettant de contenir des fragments d'ADN spécifiques (Figure A-II-2). Ce sont des vecteurs de choix, comme l'ont été les cosmides. Cependant, leur contenance ne dépassant pas 40 kb, les cosmides sont aujourd'hui moins utilisés (Nunes et al., 1993). Les YACs (Yeast artificial chromosomes), pouvaient contenir de très grands fragments d'ADN (1 à 2 Mb) mais étaient beaucoup trop instables et chimériques, et furent rapidement délaissés (Burke et al., 1987; Shizuya and Kouros-Mehr, 2001). Une librairie de sondes de BACs de l'espèce porcine représentant tout le génome a été construite (Rogel-Gaillard et al., 1999) et est disponible à l'INRA. Cependant, il n'existe par contre aucune sonde commerciale chez le porc.

Les sondes de chromosomes entiers ou bras chromosomiques, appelées aussi sondes « de peinture », sont créées par différentes méthodes : les chromosomes entiers par cytométrie de flux (Figure A-II-3) (Fusco et al., 1986; Yerle et al., 1993) les sondes plus petites par microdissection préférentiellement (Meltzer et al., 1992; Pinton et al., 2003).

La cytométrie permet d'obtenir une grande quantité d'ADN spécifique d'un chromosome, mais est plus délicate lorsqu'il s'agit de trier des chromosomes dont la taille est sensiblement identique ou dont la composition en paires de bases est similaire (pour revue, Rubes et al., 2009).

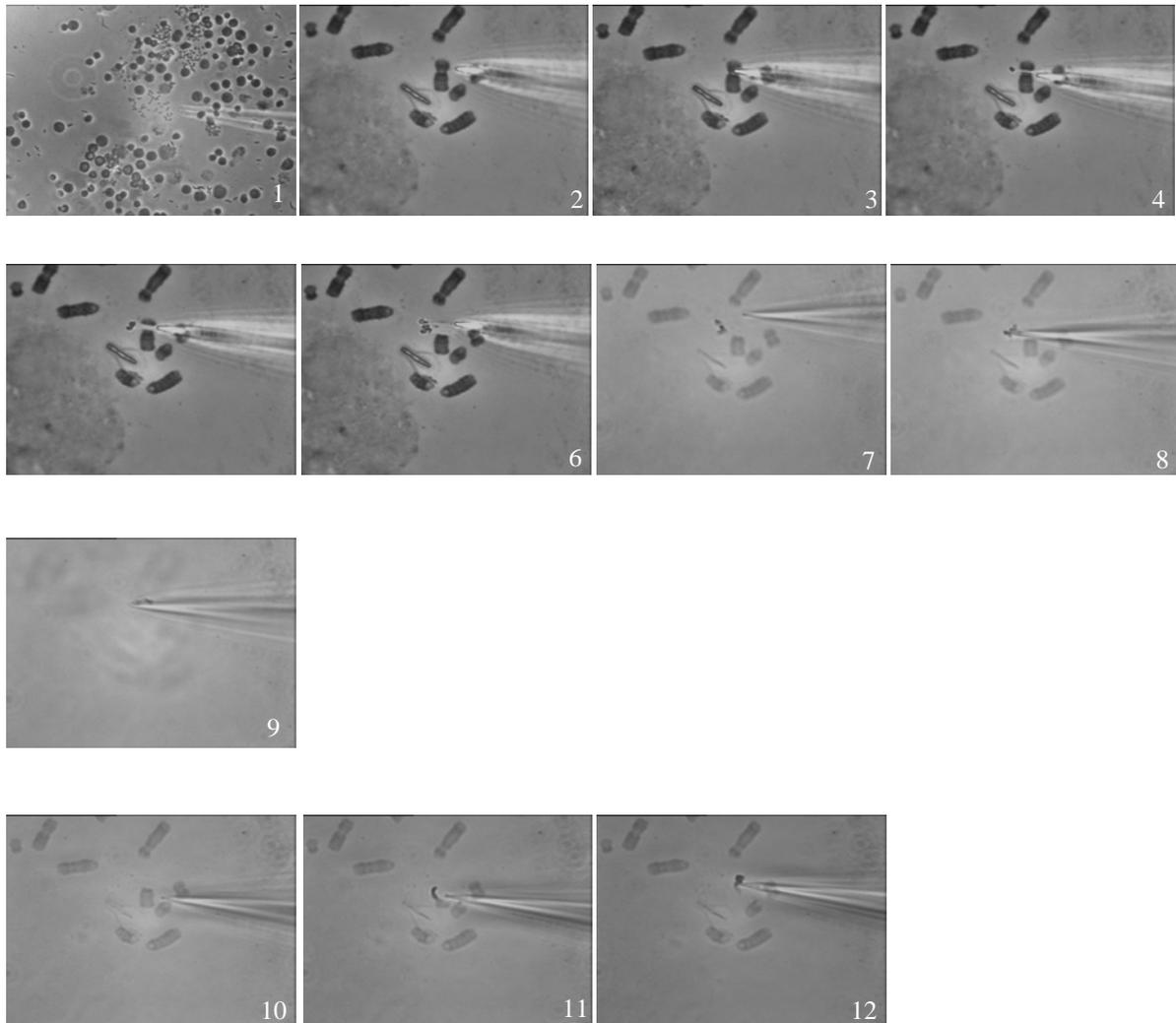


Figure A-II-4 : Représentation des différentes étapes de la microdissection des bras p et q du chromosome 4 porcin (Pinton, 2004).

1) Repérage de la métaphase et approche de l'aiguille au grossissement X100 :

2 à 6) Approche de l'aiguille au grossissement X1000 et microdissection des bras p du chromosome 4 à « sec » : l'aiguille est placée (sans toucher la lamelle) juste à côté de la zone à microdisséquer et à ce moment seulement elle est mise en contact avec la lamelle (l'extrémité devient réfringente). La microdissection est réalisée en décalant les segments chromosomiques de l'axe du chromosome.

7 à 9) Récupération sous eau des fragments chromosomiques générés par la microdissection des bras p : les fragments, une fois mouillés, collent facilement à l'aiguille.

10 à 12) Microdissection sous eau des bras q du chromosome 4 restants : avec de l'eau, les bras q deviennent mous et collent facilement à l'aiguille.

Ainsi, lorsque deux chromosomes ne peuvent pas être séparés par cytométrie ou lorsque l'on souhaite créer une sonde spécifique d'une région chromosomique, l'utilisation de la microdissection est une bonne alternative. Elle consiste, grâce à un appareillage spécifique (notamment des microaiguilles), à récolter par « grattage » le fragment chromosomique d'intérêt (Figure A-II-4). La microdissection peut être également réalisée par laser (Hadano et al., 1991; Kubickova et al., 2002). Après qu'un nombre satisfaisant de copies ait été récupéré (5 à 10) l'ADN de ces fragments est amplifié par PCR (pour revue, Pinton, 2004).

1.2.2 Marquage des sondes

Il existe différents types de marquage de sondes. Les sondes utilisées dans le cadre de notre étude ont été marquées de deux manières différentes : par « amorçage aléatoire » (Random-Priming) ou par DOP-PCR.

Les sondes issues de BACs ont été marquées par la première méthode (Feinberg and Vogelstein, 1983). Après une séparation des deux brins d'ADN par chauffage, les fragments d'ADN sont incubés avec une solution d'hexanucléotides correspondant à toutes les combinaisons possibles. Ces derniers vont s'hybrider sur les brins, et un brin complémentaire sera synthétisé grâce à l'action d'une polymérase appelée fragment de Klenow. Cette synthèse est réalisée à partir de nucléotides (A, T, G, C) dont un est porteur de l'haptène (ou d'un fluorochrome), marquant ainsi le brin nouvellement créé.

Les sondes de peinture sont elles préférentiellement marqués par DOP-PCR (Degenerate Oligo Primed- Polymerase Chain Reaction). Le principe est cependant similaire : un nucléotide associé à un haptène est incorporé dans un brin d'ADN synthétisé à partir de petites amorces aléatoires se fixant sur différentes régions de fragments d'ADN déjà amplifiés par PCR.

1.2.3 Hybridation et révélation des sondes

Les sondes sont hybridées sur l'ADN cible après dénaturation préalable des sondes et des cibles par la chaleur en présence de Formamide.

La révélation des signaux est réalisée en couplant les haptènes incorporés dans les sondes à des anticorps, ou par affinité chimique : ainsi la biotine est révélée par la streptavidine qui présente une grande affinité pour celle-ci.

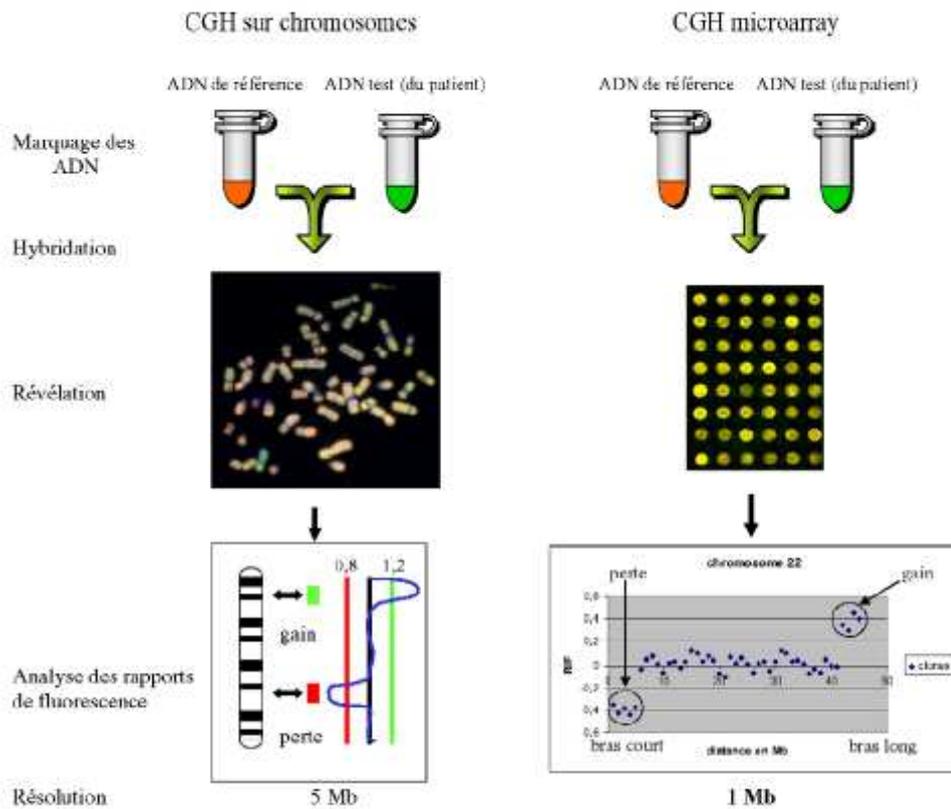


Figure A-II-5: Présentation des techniques de CGH sur chromosomes et CGH microarray (Sanlaville et al., 2006)

La streptavidine est elle-même couplée à un fluorochrome, et une amplification est possible en utilisant des anticorps spécifiques de la streptavidine. La digoxigénine est elle révélée par des anticorps anti-digoxigénine couplés à des fluorochromes. Une amplification est également possible en utilisant d'autres anticorps reconnaissant ceux couplés à la digoxigénine. Les différents signaux présents sur les spermatozoïdes sont ensuite visibles au microscope à fluorescence, et un comptage des différents types de noyaux peut être effectué. On obtient ainsi un profil de ségrégation des chromosomes pour un porteur d'inversion spécifique.

I.3 Hybridation de génome entier (Comparative Genomic Hybridization-CGH)

Mise au point au début des années 90, la technique CGH (Comparative Genomic Hybridization - Kallioniemi et al., 1992) consiste à hybrider sur les mêmes cellules métaphasiques normales de l'ADN génomique d'un individu normal et de l'individu à étudier. L'ADN « test » et l'ADN « contrôle » sont marqués par des fluorochromes différents. Une différence dans le nombre de copie entre ces deux sources d'ADN sera alors visualisée par une différence dans le rapport d'intensité entre les deux fluorochromes. Aujourd'hui, afin d'augmenter la résolution de détection des anomalies chromosomiques, les ADN test et contrôle ne sont plus hybridés sur des chromosomes entiers mais sur des fragments d'ADN contenus dans une puce (Figure A-II-5). C'est ce qu'on appelle la technique CGH microarray (Pinkel et al., 1998). Cette technique est très utilisée chez l'Homme pour la caractérisation cytogénétique de cellules tumorales, connues pour posséder de nombreux remaniements chromosomiques (Baik et al., 2009; Kallioniemi et al., 1992; Wang et al., 2009). Contrairement à la CGH « classique », elle permet de visualiser des micro-réarrangements, souvent responsables chez l'Homme de retards mentaux (Flint and Knight, 2003).

Les sondes utilisées dans l'analyse de CGH array étaient souvent des sondes de BACs (Sanlaville et al., 2005). D'autres fragments d'ADN sont maintenant utilisés comme sonde : il s'agit des SNP (Single Nucleotide Polymorphism), régions d'ADN contenant un polymorphisme d'une seule paire de base. La SNP-CGH permet alors de visualiser des anomalies chromosomiques à très haute résolution (Peiffer et al., 2006).

Cependant, malgré sa précision, la CGH ne permet pas de distinguer des anomalies chromosomiques équilibrées (par de différence d'intensité entre les deux fluorochromes).

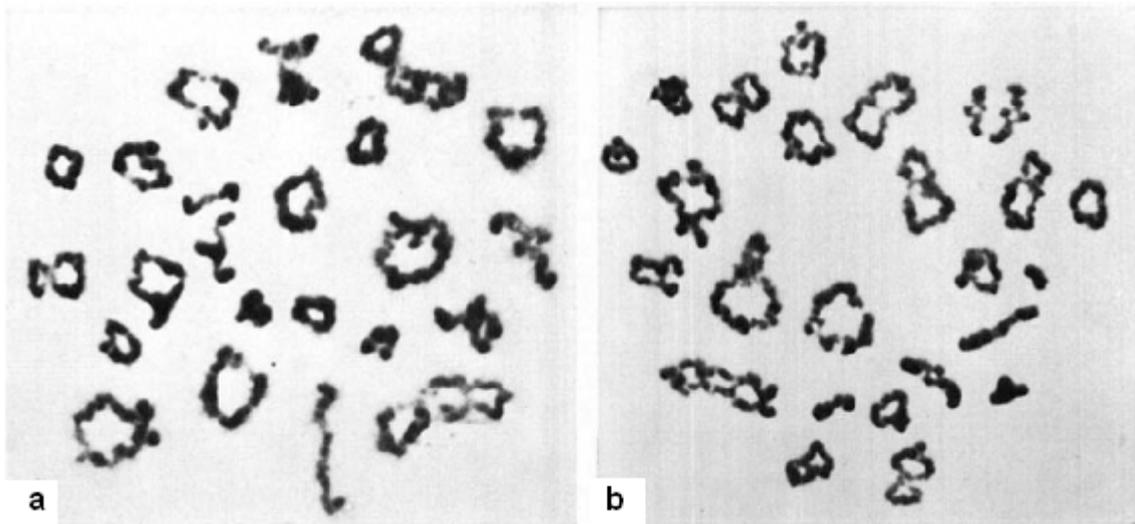


Figure A-II-6 : Visualisation du contenu chromosomique de cellules germinales à différents stades de la méiose par la technique d'air drying

a et b : spermatocyte I humain au stade diacinèse (Hulten, 1974)

c : spermatocyte II de souris au stade métaphase II (Evans et al., 1964)

II. Méthodes d'analyse des cellules germinales

II.1 Analyse des phases précoces de la méiose

II.1.1 L'air-drying

L'analyse de cellules méiotique peut être réalisée par la technique d'air-drying. Elle repose sur l'utilisation de solutions hypotoniques pour libérer plus facilement le contenu cellulaire. (Rothfels and Siminovitch, 1958). Evans et ses collaborateurs ont utilisé cette technique chez la souris et d'autres espèces, dont l'Homme.

Cette méthode permet d'étudier sur une seule lame des cellules méiotiques mâles à différents stades (Evans et al., 1964) (Figure A-II-6). Cette technique a ensuite été plusieurs fois modifiée (utilisation d'autres solutions hypotoniques) et appliquée à d'autres espèces ainsi qu'à l'étude des premiers stades de la méiose femelle (Eicher, 1966; Luciani et al., 1974; Luciani et al., 1971; Meredith, 1969; Peters et al., 1997).

Le principal avantage de la technique est qu'elle permet d'observer des cellules germinales à différents stades de la méiose. Ainsi, avant l'avènement des techniques d'immunohistochimie (détaillées par la suite), les premières analyses de recombinaison méiotique (analyse des crossing overs) ont été réalisées à partir de cellules en diacinèse (Figure I-48 a et b) (Hulten, 1974; Laurie and Hulten, 1985; Winsor et al., 1978). Cependant, la qualité des chromosomes obtenus n'est pas optimale et ces derniers sont difficilement analysables.

II.1.2 Utilisation de la microscopie électronique

Dans les années 1970, Counce et Meyer (1973) ont mis au point une technique permettant de visualiser les complexes synaptonémaux lors des phases précoces de la méiose, grâce à l'utilisation de la microscopie électronique (Figure A-II-7a).

Cette méthode, est basée sur un traitement hypotonique des cellules germinales, puis d'une coloration au nitrate d'argent. Les préparations doivent ensuite être étalées sur des grilles particulières destinées à l'analyse en microscopie. Cette technique a été utilisée pendant de nombreuses années pour l'analyse des cellules méiotiques en prophase de première division (par exemple Gabriel-Robez et al., 1988b; Moses et al., 1982).

Grâce à des anticorps couplés à des très fines particules d'or ou d'argent, il est aujourd'hui possible de visualiser différentes structures protéiques telles que MLH1 ou MLH3.

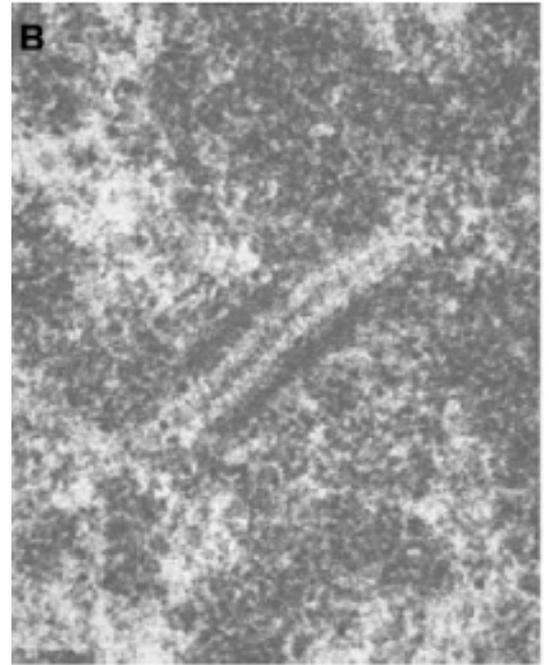
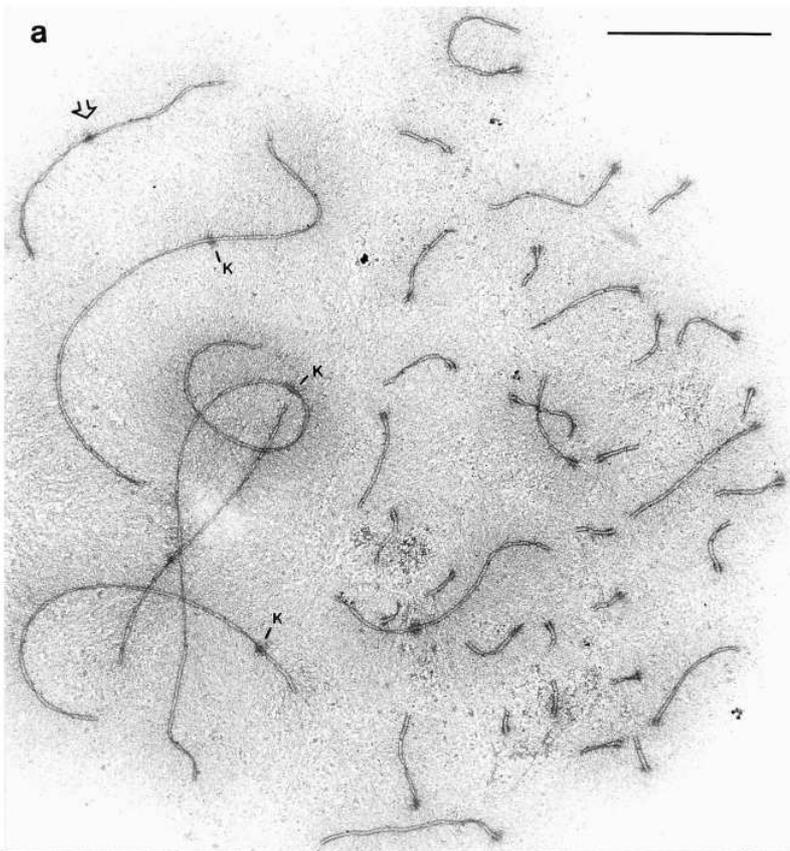


Figure A-II-7 : complexes synaptonémaux analysés en microscopie électronique.

a : image d'un spermatocyte complet au stade pachytène chez le pigeon (*C.livia*). Flèche : bivalent sexuel ZZ ; K : Kinétochores des principaux complexes ; barre : 10 μ m (Pigozzi and Solari, 1999).

b : Structure d'un complexe synaptonémal chez la souris (x 135000) (Svetlanov and Cohen, 2004).

La résolution obtenue par l'utilisation de la microscopie électronique permet de parfaitement distinguer les structures formant le complexe synaptonémal (Figure A-II-7b), et ainsi réaliser une analyse précise des appariements des bivalents.

Ces particules étant très petites, la résolution obtenue est souvent meilleure que lorsque des techniques immunohistochimiques (détaillées par la suite) sont utilisées (Moens, 2009). Malgré ces avantages, peu d'études des complexes synaptonémaux sont encore réalisés par microscopie électronique. En effet, la préparation des échantillons est fastidieuse et peu de cellules peuvent être analysées lors d'une expérimentation, car l'étude des images est très coûteuse en temps (Moens, 2009).

De récentes études, utilisant des systèmes de microscopie innovants, relancent néanmoins l'intérêt de l'étude de la structure des chromosomes par ces voies : une analyse tridimensionnelle des différentes structures composant la cellule est en effet maintenant possible (Carlton, 2008; Rouquette et al., 2010).

II.1.3 Techniques d'immunohistochimie

Actuellement, les techniques immunocytologiques constituent la méthode de choix pour l'analyse des appariements méiotiques et de la recombinaison sur spermatocytes. Elles consistent à déposer sur des cellules en prophase de première division méiotique des anticorps dirigés contre les principales protéines jouant un rôle dans l'appariement et la recombinaison des chromosomes. Ainsi l'utilisation d'anticorps dirigés contre les protéines SCP3, SCP1, MLH1 mais aussi l'histone γ H2AX ou des anticorps anti-centromères sont par exemple très largement utilisés.

L'utilisation de l'immunohistochimie a permis d'améliorer nos connaissances sur la fréquence et la localisation des événements de recombinaison chez l'Homme (par exemple Codina-Pascual et al., 2006; Lynn et al., 2004; Lynn et al., 2002) permettant par exemple la création de « cartes » de recombinaison (Sun et al., 2004; Sun et al., 2006).

Mais ces techniques sont aussi utilisées pour étudier les anomalies d'appariement et de recombinaison induites par la présence de remaniement chromosomiques, chez l'homme comme chez le porc (Oliver-Bonet et al., 2005; Pinton et al., 2009; Pinton et al., 2008; Sun et al., 2005).

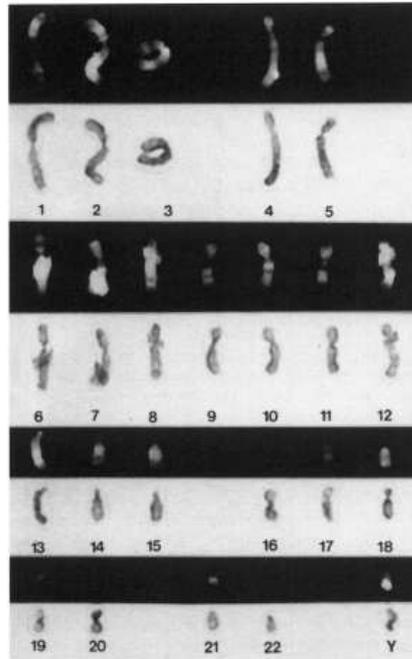


Figure A-II-8 : Caryotype d'un spermatozoïde humain (23,Y) obtenu après fécondation hétérospécifique dans un ovocyte de hamster (Martin et al., 1982).

Bandes noires : chromosomes marqués en bandes Q.

Bandes claires : chromosomes colorés au Giemsa.

Les principaux avantages de ces techniques par rapport à l'utilisation de la microscopie électronique sont la facilité d'utilisation (seul un équipement simple est nécessaire), la possibilité de visualiser simultanément plusieurs protéines, et de coupler l'immunohistochimie avec la FISH.

II.2 Méthodes d'analyse des produits de ségrégation méiotique

II.2.1 Chez le mâle

II.2.1.1 La fécondation *in vitro* hétérosécifique

L'analyse des ségrégations méiotiques mâle était initialement réalisée par fécondation *in vitro* hétérosécifique. En effet, bien que l'obtention de spermatozoïdes soit facile, l'accès au contenu chromosomique de ces cellules est lui beaucoup plus compliqué. En effet, lors de la spermiogénèse, l'ADN spermatique subit une importante compaction : les histones, entourant la double hélice d'ADN dans les cellules somatiques, sont remplacées par des protamines, riches en arginine et cystéines. Durant la dernière phase de maturation des spermatozoïdes, lors de leur passage dans l'épididyme, les cystéines des protamines se lient entre elles par des ponts disulfures (pour revue, Balhorn, 1982). L'ADN est alors compacté sous forme de « doughnut », et non plus sous la forme d'un solénoïde comme pour les autres types cellulaires (Braun, 2001; Ward, 1993). L'accès au matériel chromosomique n'est donc possible qu'après décondensation du noyau spermatique, par exemple à la suite de la fécondation d'un ovocyte. La technique de fécondation *in vitro* hétérosécifique entre des cellules humaines et de Hamster s'est donc développée dès 1976 (Yanagimachi et al., 1976). En 1978, Rudak et son équipe ont donc pu obtenir, pour la première fois, les chromosomes issus d'un spermatozoïde (Rudak et al., 1978).

Un caryotype peut donc être réalisé, car les chromosomes spermatiques sont facilement distinguables de ceux provenant du hamster. Cette méthode présente l'avantage de permettre l'analyse de l'intégralité du contenu haploïde du gamète (Figure A-II-8 - Martin et al., 1982). Cette technique est cependant lourde à mettre en place, difficile à maîtriser et ne permet l'analyse que d'un nombre réduit de cellules (Cozzi et al., 1995; Egozcue et al., 1997).

II.2.1.2 Le SpermFISH

Les premières expérimentations utilisant cette méthode datent de 1990 (Guttenbach and Schmid, 1990; Pieters et al., 1990). Contrairement à la fécondation *in vitro* hétérospécifique, la technique de SpermFISH est beaucoup plus facile à mettre en œuvre et permet l'analyse d'un grand nombre de gamètes (Egozcue et al., 1997). Elle consiste à hybrider *in situ* des sondes fluorescentes spécifiques de chromosomes entiers ou de régions chromosomiques sur les noyaux de spermatozoïde.

Une des principales «difficultés» du SpermFISH est l'accessibilité limitée à l'ADN cible. En effet, comme précédemment évoqué, l'ADN spermatique est très fortement compacté. Afin de permettre à la sonde de se fixer sur les chromosomes, il faut rendre la chromatine du spermatozoïde accessible. Cela n'est possible qu'en utilisant un agent chimique. L'agent le plus fréquemment utilisé est le Dithiothréitol (DTT) (par exemple Almeida Santos et al., 2002; Kawarasaki et al., 1996; Rens et al., 2001; Wyrobek et al., 1990), qui permet de réduire les ponts disulfures formés par les protamines (Bugno-Poniewierska et al., 2009; Cleland, 1964; Schultz et al., 2000).

Le DTT peut aussi être utilisé avec d'autres composés afin d'augmenter l'efficacité de la décondensation : dans le cas de l'espèce porcine, le DTT est couplé à la papaïne, dont les propriétés enzymatiques permettent la digestion des protéines du spermatozoïde (Massip et al., 2008; Pinton et al., 2004; Pinton et al., 2005; Zirkin et al., 1980).

Il peut aussi être utilisé en combinaison avec du sodium dodecyl sulfate (SDS) (Bugno-Poniewierska et al., 2009) ou du triton 100X (Nishikawa et al., 2000) dont les propriétés détergentes dénaturent les protéines. L'héparine, qui entre en compétition avec l'ADN pour se fixer sur les protamines, a aussi été utilisé en parallèle du DTT (Kobayashi et al., 1999).

D'autres études ont montré qu'il était possible d'obtenir une décondensation efficace en utilisant du glutathion (GSH) chez l'homme et le porc (Jager et al., 1990; Kawarasaki et al., 1995). Cet agent, naturellement présent dans les ovocytes, élimine lui aussi les liaisons disulfure entre les protamines (Perreault et al., 1988a; Perreault et al., 1988b).

Bien que le SpermFISH soit la technique de référence pour étudier le contenu chromosomique de gamètes, elle ne permet d'étudier qu'un petit nombre de chromosomes simultanément, contrairement à la fécondation *in vitro* hétérospécifique.

II.2.2 Chez la femelle : FISH sur métaphases II d'ovocytes maturés *in vitro*

La technique de FISH s'applique aussi bien aux gamètes femelles qu'aux gamètes mâles. Toutes les étapes précédemment décrites dans le cadre de la FISH (types et marquage des sondes, hybridation et révélation des signaux) sont aussi valables dans le cas des études chez la femelle. La difficulté de l'analyse repose sur les cellules étudiées : en effet, l'analyse des ségrégations méiotiques chez la femelle ne peut être réalisée qu'en étudiant les chromosomes provenant d'un ovule ou d'un embryon. La complexité de l'ovogénèse et le faible nombre d'ovules matures produits, et par conséquent d'embryons disponibles rend donc cette analyse délicate (cf « la méiose »).

C'est pourquoi les analyses réalisées chez la femme sont principalement menées sur des ovocytes II non fécondés après un cycle de fécondation *in vitro* ou sur leur premier globule polaire (pour revue, Vialard and Pellestor, 2008). Les chromosomes étaient au départ colorés de manière classique (par exemple Kamiguchi et al., 1993; Nakaoka et al., 1998; Pellestor et al., 2002), puis la technique de FISH a été utilisée (par exemple Anahory et al., 2003; Dailey et al., 1996; Requena et al., 2009).

Cependant, des doutes peuvent être émis quant aux résultats obtenus à partir d'ovocytes non utilisés pour mauvaise qualité dans des cycles de fécondation *in vitro* (pour revue, Vialard and Pellestor, 2008). Les ovocytes obtenus dans l'espèce porcine sont eux de meilleure qualité. C'est l'un des principaux intérêts à utiliser le porc comme espèce modèle.

Comme chez la femme, les chromosomes en métaphase II sont étudiés. Afin d'obtenir des ovocytes au bon stade de maturation (chromosomes au stade métaphase II), les ovocytes sont mis en culture pendant 48 h dans un milieu de culture complétement avec des facteurs de croissance (Epidemial Growth Factor – EGF).

La deuxième étape extrêmement délicate est l'étalement des chromosomes sur la lame. Les ovocytes après un traitement hypotonique, sont déposés sur lame puis fixés par dépôt de plusieurs gouttes d'un mélange méthanol/acide acétique, permettant de faire éclater les cellules et de libérer ainsi leur contenu chromosomique. Les chromosomes ovocytaires étant extrêmement condensés, il est cependant difficile d'obtenir des métaphases complètes et bien étalées : un dépôt de fixateur insuffisant ne permet pas un étalement correct des chromosomes, tandis que l'ajout de fixateur en trop grande quantité peut amener à la perte de chromosomes ou de métaphases entières.

La réussite extrêmement délicate des phases de maturation et d'étalement explique ainsi pourquoi un nombre important d'ovocytes prélevés ne sont généralement pas analysables (Pinton et al., 2009). Il est donc nécessaire d'avoir à sa disposition un pool d'ovocytes assez important pour pouvoir analyser un nombre conséquent de cellules.

A-III. Protocole détaillé des différentes techniques utilisées

III.1 Immunohistochimie

Préparation de l'échantillon

- ✓ Découper un échantillon d'un à deux cm² dans un testicule aussi rapidement que possible après abattage
- ✓ Dans une coupelle, verser quelques ml de PBS, puis le morceau de testicule. Placer la coupelle sur de la glace
- ✓ Dilacérer le plus possible avec des aiguilles (sous lampe binoculaire ou pas).
- ✓ Récupérer la suspension cellulaire à la pipette dans un tube 10 ml.
- ✓ Laisser décanter 5 à 10 min dans la glace et récupérer le surnageant dans un tube 10 ml, compléter avec du PBS.
- ✓ Répéter l'opération autant de fois que nécessaire
- ✓ Centrifuger le tube 5 min à 600 g
- ✓ Enlever le surnageant et rajouter quelques gouttes de PBS dans le culot, seulement si celui-ci est très important

Préparation de la solution de Fixation

- 25 ml eau
- 40 µl Triton x100
- 670 µl formaldéhyde (36.5%)
- ✓ Dans un bécher, mettre environ 20 ml d'eau.
- ✓ Ajouter le Triton, puis, sous la hotte, le formaldéhyde.
- ✓ Bien homogénéiser avec un barreau aimanté, et ajuster le pH à la soude jusqu'à 10 ou 11.

Etallement des lames

- ✓ Déposer 20 µl de solution cellulaire sur une lame
- ✓ Ajouter 120 µl de solution de fixation, mélanger avec la suspension cellulaire et répartir sur toute la lame
- ✓ Laisser 10 min sans que cela ne sèche (rajouter de la solution de fixation si besoin).
- ✓ Rincer quelques secondes dans de l'eau, laisser sécher à l'air libre.

Hybridation des lames

- ✓ Laisser les lames demi-heure avec 100 µl de PBT (sous lamelle).
- ✓ Enlever l'excédant et déposer 70µl d'une solution constituée de :
 - 10 µl d'anti SCP3
 - 10 µl d'anti SCP1 (facultatif)
 - 20 µl d'anti centromère
 - 10 µl γH2AX ou 20 µl MLH1
 - 950 ou 940 µl de PBT
- ✓ Laisser la nuit à T° ambiante dans une boîte bien humide.

Révélation des signaux

- ✓ Laver les lames 3x 6 min dans du PBS + Tween20 (500 µl dans 500ml)
- ✓ Déposer 70µl par lame de la solution d'anticorps suivante :
 - Donkey anti-rabbit Alexa 594 10 µl
 - Goat anti-mousse Alexa 488 10 µl
 - AMCA 14 µl
 - PBT 964 µl
- ✓ Laisser 1h 30 à 37°C en chambre humide.
- ✓ Laver 3 x 6 min dans du PBS + Tween 20.
- ✓ Laver les lames 1 à 2 min dans de l'eau, et laisser sécher.
- ✓ Mettre 20 µl de Vectashield par lame.
- ✓ Observer.

III.2 : FISH

Traitement des sondes

Marquage des sondes par Random Priming- Kit BioPrime

✓ *Utilisés dans ce kit :*

- 2.5X Random Primers
- Klenow fragment (Large Fragment of DNA Polymérase I) 40U/µl
- Stop Buffer (0.5mM EDTA)

Solutions à rajouter:

- 10X dNTP mixture (1mM dATP, 1mM dGTP, 1mM dCTP, 0.03mM dTTP dans 10mM Tris-Hcl (pH 7.5), 1 mM EDTA):

dATP 100mM(Invitrogen)	2,5µl
dGTP 100mM(Invitrogen)	2,5µl
dCTP 100mM(Invitrogen)	2,5µl
dTTP 100mM(Invitrogen)	0,75µl
Tris-Hcl 2M	1,25 µl
EDTA 250mM	1 µl
H2O	239,5 µl
	250 µl

- Solution de dUTP marqué (Biotine et Digoxigénine) à 1mM

✓ Réactions de marquage ($V_f = 50\mu\text{l}$) :

ADN + H ₂ O (1 μg)	20.5 μl
2.5X Random Primers	20 μl (1 mM final)
→ 5 min dans eau bouillante + 3 min dans glace	
10X dNTP Mixture (0.1 mM dATP, dGTP, dCTP, 0.03 mM dTTP)	5 μl
dUTP marqué (1 mM)	3.5 μl (0.07 mM final)
Klenow (40U/ μl)	1 μl (40 U)
✓ Incuber 7 h à 37°C	
✓ Arrêt de la réaction de marquage: 5 μl de Stop Buffer	

Précipitation de la sonde

Pour 165 ml d'ADN (6 sondes)

- ✓ Ajouter à la sonde purifiée 80 μl de Highblock porcin (1mg/ml)
- ✓ Ajouter 45 μl de Sperme de saumon soniqué (150mg/ml)
- ✓ Ajouter 15,60 μl de NaCl à 5M.
- ✓ Compléter avec 1 ml d'EtOH 100% froid
- ✓ Conserver à -20°C jusqu'à utilisation.

Préparation des sondes

- ✓ Centrifuger les sondes 30 min à 13 000t/ min à 4° C
- ✓ Emininer le surnageant
- ✓ Sécher le culot 5 à 6 min dans une cloche à vide
- ✓ Ajouter 30 μl par tube de solution d'hybridation à 50 % de formamide
- ✓ Mettre au bain marie à 37° C pendant au moins une heure

Précautions :

- Bien suspendre le culot dans la solution d'hybridation, ne pas hésiter à vortexer et centrifuger plusieurs fois

Dénaturation des sondes marquées

- ✓ Dénaturer les sondes 10 min à 100° C puis 3 min dans de la glace
- ✓ Centrifuger chaque tube
- ✓ Réaliser une pré-hybridation à 37°C (au minimum d'une demi-heure)

Traitement des lames

Préparation

- ✓ *Préparation de la solution de Dénaturation*
 - SSC 20x : 10 ml
 - Eau : 20 ml
 - Formamide : 70 ml

Précautions :

- Manipuler la Formamide sous la hotte, si possible avec les gants adéquats
- ajuster le pH à 7 avec de l'acide chlorhydrique concentré
- Mettre à chauffer en avance à 72° C

- ✓ *Préparation de la solution de lavage des lames*
 - SSC 20x : 28 ml
 - Eau : 112 ml
 - Formamide : 140 ml
- ✓ La Formamide est ajoutée au dernier moment, le reste de la solution peut être préparée la veille
- ✓ *Préparation des bacs d'éthanol 70%, 80%, 90%*
 - 70% : 140 ml éthanol + 60 ml d'eau = 200ml (pour deux bacs)
 - 80% : 160 ml éthanol + 40 ml d'eau = 200ml (pour deux bacs)
 - 90% : 180 ml éthanol + 20 ml d'eau = 200ml (pour deux bacs)
- ✓ *Préparation de la solution de fixation*
 - Acide acétique : 45 ml
 - Alcool : 135 ml
- ✓ *Préparation de la solution de décondensation*
 - Papaïne : 0.125 g
 - DTT : 0.0155 g
 - Tris HCl 0.2 M : 10 ml (1 ml de Tris HCl 2M dans 9 ml d'eau)

Bien homogénéiser la solution en vortexant

Fixation des lames (uniquement pour des étalements de spermatozoïdes)

- ✓ Fixer les lames 20 min
- ✓ Laisser les lames sécher à l'air libre

Décondensation des lames (uniquement pour des étalements de spermatozoïdes)

- ✓ Choisir les lames à la concentration en spermatozoïdes adéquate
- ✓ Ajouter sur les lames 400 µl de solution de décondensation, selon une gamme de temps (entre 4 et 7 min en règle générale) pour avoir différents degrés de décondensation.
- ✓ Une fois le temps écoulé, plonger les lames dans du PBS pour stopper la réaction
- ✓ Déshydrater les lames dans 3 bains successifs 70%, 80% et 90% éthanol
- ✓ Laisser sécher les lames à l'air libre

Dénaturation des lames

- ✓ Mettre les lames 2 minutes dans le bac de solution de Formamide préalablement chauffé à 72° C
- ✓ Plonger les lames dans 3 bains successifs 70%, 80% et 90% éthanol à -20°C pendant 2 min à chaque fois
- ✓ Laver brièvement les lames dans de l'éthanol 90% à température ambiante
- ✓ Sécher les lames au sèche-cheveux

Hybridation

- ✓ Déposer 20 µl de sonde / lame
- ✓ Sceller au Rubber Cement
- ✓ Laisser sécher le Rubber 10 min à 37°C (étuve)
- ✓ Mettre les lames dans une boîte humide fermée à l'étuve à 37° C pendant la nuit (ou au moins 12 h)

Révélation

- ✓ Préparation du PBS + Tween : 500 µl de Tween dans 500ml de PBS
- ✓ Préparation PBT : 500 µl de Tween + 0.75 g de BSA dans 500ml de PBS
- ✓ *Préparation des solutions d'anticorps*
 - Solution 1 :
 - Streptavidine Alexa 594 : 5 µl
 - Anti-digoxigénine de souris FITC : 4 µl
 - PBT : qsp 1000 µl
 - Solution 2 :
 - Anti-Streptavidine Alexa 594 2 µl
 - Anti-souris Alexa 488 : 2 µl
 - PBT : qsp 1000 µl
 - Solution 3 :
 - Anti-lapin d'âne Alexa 594 : 2.µl
 - Anti-souris de chèvre Alexa 488 : 2 µl
 - PBT : qsp 1000 µl

Lavage des lames

- ✓ Mettre à chauffer trois bacs de solution de lavage (Formamide 50%, SSC2X) à 42°C
- ✓ De même, mettre à chauffer 4 bacs de SSC 2X
- ✓ Enlever le Rubber Cement des lames
- ✓ Laver les lames dans du SSC2X 2x 30 min, sous agitation
- ✓ Laver 3 min dans chaque bac (3 de Formamide 50%, 4 de SSC2X)
- ✓ Laisser dans un bac de PBT jusqu'à la révélation des signaux

Ajout des solutions d'anticorps

- ✓ Ajouter 70 µl de solution 1/ lame
- ✓ Laisser incuber 1 h à 37°C en chambre humide
- ✓ Laver dans du PBS + Tween20 3x 6 min
- ✓ Saturer à nouveau dans du PBT
- ✓ Faire de même avec les solutions 2 et 3

Montage des lames

- ✓ Mettre dans un tube 210 µl de Vectashield + 2.5 µl de DAPI
- ✓ Bien vortexer
- ✓ Ajouter 20 µl de cette solution sur chaque lame, ajouter une lamelle

La lame est prête à être observée.

III. 3 FISH sur métaphases II d'ovocytes maturés in vitro

Préparation des milieux

PBS « ovocytes »

- | | |
|---|-----------|
| - PBS | : 1 L |
| - CaCl ₂ , 2H ₂ O | : 140 mg |
| - MgCl ₂ , 6H ₂ O | : 200 mg |
| - D-glucose SIGMA (G5146) | : 1000 mg |
| - Pyruvate SIGMA (P3662) | : 36 mg |
| - Gentamycine SIGMA (G1272) | : 5 ml |
| - BSA SIGMA (A9647) | : 0,5 g |

- ✓ Dans un bécher, verser 500 ml de PBS. Ajouter le Ca et le Mg, et laisser dissoudre.
 - ✓ Ajouter ensuite le glucose, le pyruvate et la gentamycine.
 - ✓ Verser dans une fiole jaugée de 1L, et faire le niveau .
 - ✓ Ajouter la BSA et laisser dissoudre (sous agitation)
 - ✓ Mesurer le pH : celui-ci doit être autour de 7.
 - ✓ Filtrer de manière stérile sous filtre 22µm et conserver au frais dans un flacon stérile.
- La solution peut être gardée 1 mois à 4°C.

Récupération des ovaires et ponction des ovocytes

- ✓ A l'abattoir, récupérer les ovaires et les conserver dans du sérum physiologique à 37°C.
- ✓ A l'arrivée au laboratoire, faire chauffer 2 à trois tubes de 50 ml de PBS « ovocytes » dans le bain-marie à 37°C.
- ✓ Lorsque le PBS est chaud, ponctionner les ovocytes à l'aide d'une seringue, et les déposer dans un tube contenant quelques ml de PBS « ovocytes ». En fonction du nombre d'ovaires, on peut faire deux tubes : l'un restera à 37°C pendant que l'autre sera utilisé.
- ✓ Quand tous les ovaires ont été ponctionnés, laisser décanter quelques minutes à 37°C.
- ✓ Centrifuger quelques secondes, puis enlever le surnageant.
- ✓ Reprendre le culot dans quelques ml de PBS « ovocytes » chaud.

Les étapes sont réalisées sous loupe binoculaire, à 37°C.

- ✓ En conditions stériles (sous hotte à flux laminaire), répartir les ovocytes en solution dans une boîte à screening (quadrillée), afin de les récupérer plus facilement.
- ✓ A l'aide d'une pipette, récupérer un maximum d'ovocytes dans une petite boîte de pétri ronde remplie de PBS ovocytes.
- ✓ Transvaser les ovocytes dans une autre coupelle remplie de PBS afin de les laver.

Préparation du milieu de culture

- | | |
|-------------------------------|--------|
| - 199 SIGMA (M4530) : | 10 ml |
| - EGF (10ng/ml) : | 100 µl |
| - Gentamycine SIGMA (G1272) : | 50 µl |
| - Cystéamine : | 10 µl |

- ✓ Faire chauffer préalablement le milieu 199 à 37°C.
- ✓ Ajouter les différents éléments, filtrer en conditions stériles sous filtre 22µm
- ✓ Répartir environ 0,5 ml dans chaque puit de la plaque de culture.
- ✓ Mettre environ 100 ovocytes dans les premiers puits, pour laver le PBS « ovocytes ».
- ✓ Transférer ensuite les ovocytes dans les autres puits.
- ✓ Laisser incuber 48h à 39°C.

Etallement des ovocytes

Préparation des solutions

Solution hypotonique :

Dissoudre sous agitation 10 g de citrate de sodium dans 100 ml d'eau.

Préparer autant de solution que nécessaire suivant le ratio : 10 ml de solution de citrate dans 110 ml d'eau (en règle générale : 2,75 ml dans 30 ml d'eau).

Fixateur :

3 volumes de méthanol pour 1 volume d'acide acétique.

Les premières étapes sont réalisées sous loupe binoculaire, à 37°C.

- ✓ Récupérer les ovocytes dans une coupelle remplie de PBS « ovocytes » préalablement chauffé à 37°.
- ✓ Laver les ovocytes dans trois gouttes (100 µl) de PBS « ovocytes » (Dans une même coupelle)
- ✓ Transvaser dans une dernière coupelle de PBS « ovocytes ».
- ✓ Prendre 4 à 5 ovocytes et les transférer dans la solution de citrate pendant 6 min (temps à ajuster en fonction de la réaction des ovocytes).
- ✓ Récupérer les ovocytes à la pipette et les déposer sur une lame Polylysine ou Superfrost +.
- ✓ Enlever le surplus de citrate, puis déposer 20 µl de fixateur.
- ✓ Souffler de l'air chaud sur la lame, et redéposer 20 µl de fixateur autant que nécessaire (jusqu'à avoir le meilleur étalement possible des métaphases).

Les ovocytes non étalés peuvent être conservés dans leur solution de citrate (après les 6 min de réaction) à laquelle on a ajouté 7 à 8 gouttes de fixateur. Les ovocytes peuvent être conservés ainsi plusieurs jours à 4°C.

Les lames étalées sont utilisées ou conservées à -20°C.

FISH sur métaphases

Le protocole est le même que pour la FISH.classique

Une étape de traitement à la protéinase K peut être réalisée pour éliminer le cytoplasme et avoir ainsi un meilleur accès de la sonde :

- ✓ Déshydratation classique
- ✓ Dénaturation classique (suivie d'une étape de déshydratation avec EtOH à -20°C)
- ✓ Protéinase K : 3 min à 37°C
 - Tris HCl 2M (pH 8) : 2,5 ml
 - Protéinase K : 1,2 µl
 - CaCl₂ : 0,5 ml
 - H₂O : qsp 250 ml
- ✓ Déshydratation classique

Molecular characterisation of peri- and paracentric inversions and analyses of their effects on meiosis of heterozygous carriers.

Inversions are structural chromosomal rearrangements, responsible of reproductive troubles for the carriers, due to spermatogenesis impairments and/or production of unbalanced gametes. Meiotic analyses of several inversions identified in the pig species (by FISH) showed a limited impact of these anomalies on reproduction, contrary to cases studied in Man. More, the production of unbalanced gametes is not correlated to a “gender” effect. Immunocytological studies showed that the chromosomal behaviour during meiosis can explain a low recombination rate in the inverted fragment, and can then explain also the low proportion of genetically unbalanced gametes estimated in previous analyses.

AUTEUR : Katia Julian

TITRE : Caractérisation moléculaire d'inversions péri- et paracentriques et analyse de leurs effets sur la méiose d'individus porteurs hétérozygotes

DIRECTEURS DE THESE : M. Alain Ducos et M. Alain Pinton

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT),
le 21 décembre 2010.

RESUME en français :

Les inversions sont des anomalies chromosomiques de structure pouvant être à l'origine de problèmes de reproduction chez les individus porteurs en raison de perturbations méiotiques conduisant à des troubles de la spermatogenèse et/ou à la production de gamètes génétiquement déséquilibrés. L'analyse méiotique de différentes inversions identifiées chez le porc (par FISH) a permis de montrer que ces dernières ont un impact très limité sur la reproduction, contrairement à ce qui est le cas chez l'Homme. De même, le sexe du porteur ne semble pas être un facteur déterminant pour la production de gamètes anormaux. D'autres études, par le biais de techniques immunocytologiques, ont montré que le comportement des chromosomes durant la méiose est responsable d'une faible recombinaison dans la région inversée et donc de la faible proportion de gamètes génétiquement déséquilibrés estimée.

MOTS-CLES :

Méiose, inversion, porc, FISH, immunocytologie, fertilité

DICCIPLINE ADMINISTRATIVE :

Génétique Cellulaire

ADRESSE DU LABORATOIRE :

UMR 444 INRA-ENVT Génétique Cellulaire, laboratoire de cytogénétique, 23, chemin des Capelles, 31076 Toulouse.