

ÉPIGÉNÉTIQUE DE LA SEMENCE BOVINE : ANALYSE MOLÉCULAIRE DE LA QUALITÉ DE LA SEMENCE ET IMPACT POTENTIEL SUR LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Thèse de Jean-Philippe **PERRIER**¹

Analyse de Jean-Paul **RENARD**²

Directeure de thèse : Hélène JAMMES, directrice de recherche INRA (Biologie du développement et reproduction)

Co-encadrant : Hélène KIEFER, chargée de recherche INRA (Biologie du développement et reproduction)

Le travail de thèse de Jean-Philippe Perrier montre que des variations de méthylation de l'ADN, un des marqueurs des variations épigénétiques de l'ADN des spermatozoïdes, peuvent être utilisés comme de nouveaux biomarqueurs de la qualité de la semence bovine.

Les variations épigénétiques désignent les changements moléculaires sensibles à des facteurs de l'environnement qui modifient l'expression des gènes sans mutation de l'ADN. Elles sont transmises transitoirement par divisions mitotiques ou méiotiques, notamment sous la forme de marques biochimiques apposées sur l'ADN. La méthylation des cytosines de l'ADN est la plus étudiée pour caractériser la répartition de ces marques dans le génome et mesurer les variations du taux de méthylation à partir de celui des séquences répétées (Ilots CpG). Ces marques sont profondément remaniées au cours de la gamétogénèse et au début de l'embryogénèse et la méthylation différentielle de l'ADN des génomes parentaux est requise pour la réalisation d'un programme complet de développement. Elles modulent l'expression des gènes et contribuent aux variations de leur niveau d'expression.

La prédiction toujours plus grande de la valeur génétique d'un animal rendue possible par la sélection génomique développée chez les bovins depuis 2009, permet de commencer à utiliser les très nombreuses informations épigénétiques associées à la méthylation globale de l'ADN d'un génome et aussi à la méthylation différentielle (entre individus) de séquences géniques régulatrices connues pour être impliqués dans l'expression de caractère complexes et peu héréditaires comme, par exemple, la fertilité. Autrement dit, la plus grande précision de la sélection génomique qui

¹ Thèse de doctorat de l'Université de Paris-Saclay, préparée à l'Agro-ParisTech (Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement) ED 581, Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé (ABIES), présentée et soutenue le 14 décembre 2017 à Jouy en Josas.

² Membre de l'Académie d'agriculture de France, (Section 3, Production Animale)

associe directement données génotypiques et phénotypiques permet de commencer à prendre en compte les informations disponibles sur le patron de méthylation d'allèles associés à un haplotype donné.

Le travail de thèse de Jean-Philippe Perrier montre que le taux de méthylation globale de l'ADN du spermatozoïde bovin est particulièrement faible, 45 %, par comparaison à celui des spermatozoïdes d'autres espèces (béliers, boucs, étalons, verrats, souris mâles et Homme, 57 % à 76 %) alors que le niveau élevé de méthylation des cellules sanguines n'est pas différent. L'hypo méthylation du génome chez le bovin apparait surtout concerner les cellules du sperme, elle pourrait être associée à la longueur des séquences répétées (ilôts GpG) du génome bovin.

Ce travail montre surtout que le taux global de méthylation du sperme varie selon les races des taureaux utilisées. Il est plus faible en race Holstein qu'en race Normande ou Montbéliarde et ce polymorphisme interracial semble concerner surtout les ilots CpG et leur taux de méthylation.

Il met enfin en évidence des différences de méthylation entre taureaux d'âges différents au moment de la collecte de leur semence et identifie quatre régions de leur ADN spermatique, différenciellement hypométhylées.

Pourquoi ces résultats sont-ils importants ?

Les gènes, dont les régions promotrices se révèlent hypométhylées, codent pour des processus biologiques connus comme essentiels pour la fonction de reproduction tels que l'adhésion et la migration cellulaire, la méiose, le transport des ARNs et la régulation des voies de signalisation. La prévalence de ces fonctions est aussi trouvée chez la souris et l'homme. Les longues séquences répétées hypométhylées particulièrement abondantes dans le sperme de taureau, sont, chez la souris, la signature de bouffées d'activités transcriptionnelles nécessaire à la formation de l'hétérochromatine au début du développement embryonnaire.

Pour caractériser le patron de méthylation de l'ADN, Jean-Philippe Perrier a utilisé plusieurs techniques de la plateforme du laboratoire d'accueil, techniques minutieuses dont les résultats croisés permettent une bonne représentation de la complexité moléculaire et de la dynamique épigénétique : luminométrie (LUMA) ; immunoprécipitation de l'ADN méthylé (MeDIP), puis repérage des sites méthylés par fluorescence (cyamines) avant hybridation avec les séquences ADN, séquençage après conversion par bisulfite des cytosines méthylées en uracile. Les séquences ADN hybridées, d'environ 3000 paires de bases chacune), sont celles de la région promotrice de 22 000 gènes disposées sur lame de verre (microarray).

Le mérite de ce travail de thèse est de montrer que l'épigénétique pourrait devenir un atout pour la sélection bovine. La reproduction de cette espèce est aujourd'hui largement assurée par insémination des femelles avec du sperme congelé, près de 9 millions par an en France, ce qui permet une large diffusion des gènes à partir d'un pool de mâles de haute valeur génétique. La sélection génomique mise en place il y a à peine dix ans, dès la réalisation du séquençage complet du génome bovin, est devenue plus précise pour tous les caractères d'intérêt, quel que soit leur héritabilité, donc plus efficace. Mais ceci à la condition que les informations sur les phénotypes

soient renouvelées et collectées à grande échelle pour pouvoir alors être utilisées pour l'étude des phénotypes complexes ou difficiles à prédire comme l'infertilité.

Jean-Philippe Perrier a pris toute la mesure d'exigence qui doit être apportée à l'organisation de ces informations, à leur exploitation à partir des techniques très sensibles qu'il a utilisées, à leur utilisation dans le cadre de la démarche expérimentale adoptée, enfin à l'évaluation de l'analyse critique de ces résultats. Cette rigueur est saluée par les deux rapporteurs. Les choix techniques retenues et les contrôles qualités utilisés à chaque étape intéresseront les acteurs de la sélection bovine pour une extension de ce travail au-delà du stade de la recherche.

Ce travail montre l'intérêt des bovins pour l'étude de la fertilité d'une population de mammifères. Des données recueillies à grande échelle sur les relations entre les caractéristiques de la semence et la fertilité individuelle des géniteurs mâles, sur la transmission de ces caractéristiques aux descendants mâles, sur l'impact de l'environnement (mode d'élevage des animaux, par exemple), deviennent disponibles.

La conservation des processus moléculaires de la gamétogénèse pourrait même être mise à profit pour d'autres espèces. Le recours aux bovins comme modèles de recherche pour l'étude moléculaire de cas d'infertilités humaines, associés à la qualité du sperme des donneurs en fécondation *in vitro*, par exemple, apparaît à la lecture du mémoire.

En conclusion, ce travail de thèse propose une approche novatrice pour caractériser l'infertilité de reproducteurs mâles bovins avec une dimension prédictive quand ces reproducteurs sont utilisés en sélection génomique. Il montre aussi que dans ce contexte, l'analyse du polymorphisme de la méthylation de l'ADN spermatique bovin pourrait être utilisée comme modèle pour des études épidémiologiques d'infertilité masculine et ouvrir une nouvelle voie de recherche sur la contribution de l'épigénèse à l'évolution d'une population domestiquée.

Je propose que l'Académie d'agriculture de France reconnaisse les enjeux de connaissances à la fois finalisées et fondamentales dont cette thèse est porteuse et que ce dossier soit en conséquence valorisé sur le site de l'Académie pour que cette reconnaissance puisse être effective.