

LES PETITS ARN NON CODANTS DU SPERMATOZOÏDE BOVIN : DE POTENTIELS BIOMARQUEURS DE LA FERTILITÉ MÂLE ?

Thèse d'Eliaou **SELLEM**¹

Analysé par Marc-Antoine **DRIANCOURT**²

Directrice de thèse : Hélène **JAMMES**, directrice de recherche, INRAE IdF-Jouy-en-Josas-Antony

Co-directeur de thèse : Laurent **SCHIBLER**, Responsable Développement et Innovation ALLICE

L'objectif général de cette thèse est d'évaluer le rôle des petits ARN non codants (Small non coding ARN : sncARN) dans la maturation des spermatozoïdes et l'acquisition de leur aptitude à la fécondation, et possiblement au développement embryonnaire précoce car ils peuvent être délivrés à l'ovocyte au moment de la fécondation. Le modèle expérimental choisi est le bovin et, sans surprise, cette thèse a été conduite *via* une collaboration entre Alice et plusieurs laboratoires de l'INRAE.

Les deux observations basant ce projet de thèse sont

- L'impact de ces petits sncARN dans des dysfonctionnements de la production spermatique ou des cas d'infertilité chez les rongeurs ou les humains respectivement étant bien établi, la typologie et le rôle possible de ceux-ci dans le contrôle de la production et la qualité des spermatozoïdes chez les bovins demande à être évalué.
- La typologie de la semence en sncARN pourrait permettre d'enrichir les outils de prédiction de la qualité de la semence. En effet, il est difficile avec les méthodes actuelles de prédire précisément la qualité de la semence car les paramètres « classiques » d'examen n'expliquent que 40% de la variabilité du potentiel fertilisant de la semence. L'utilisation en insémination artificielle (IA) d'éjaculats de taureaux hypo-fertiles diminue en effet l'efficacité de la sélection et induit des pertes économiques sérieuses. Le développement d'un outil plus performant entraînerait donc des conséquences

¹Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay, École doctorale n°581 Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé (ABIES), Spécialité de doctorat : Biologie de la reproduction, Unité de recherche: Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, 78350, Jouy-en-Josas, France. Référent : AgroParisTech, présentée et soutenue à Paris-Saclay, le 15/03/2021.

² Membre correspondant de l'Académie d'agriculture de France, section 3 « Production animale ».

significatives sur ces paramètres comme sur la gestion des taureaux dans les centres d'IA.

Cette thèse est organisée en quatre grandes sections. Elle commence par une revue bibliographique extrêmement bien documentée qui rappelle les principaux processus de formation d'un spermatozoïde dans le testicule, puis de sa maturation dans l'épididyme. Elle présente ensuite les caractéristiques des différents types de sncARN. Elle se termine en suggérant un lien entre sncARN et qualité de la semence sur la base des observations disponibles chez les rongeurs (KO de gènes) et chez l'homme. Les trois chapitres expérimentaux répondent ensuite chacun à une question précise :

- Quels sont les types de sncARN présents dans le spermatozoïde bovin éjaculé ?
- Quand apparaissent ces différents types dans le tractus génital mâle (testicule ou épididyme) ?
- Est-il possible d'utiliser un algorithme impliquant certains d'entre eux comme prédicteur de la qualité fertilisante d'un éjaculat ?

Ces trois études ont nécessité la mise au point d'un protocole robuste d'extraction des sncARN du spermatozoïde bovin, à partir d'individus en nombre adapté à chaque étude et si nécessaire de différentes races (chapitres 1 et 3), puis l'annotation des séquences obtenues.

Dans le premier chapitre expérimental, la diversité de l'expression des sncARN a été caractérisée à partir de 40 millions de spermatozoïdes congelés (deux doses d'IA) de 40 taureaux de fertilité normale représentant six races. Ces analyses y confirment la présence de [26% de piARN (PIWI-interaction RNA), 25% de rsARN (ribosomal small ARN), 20% de miARN (micro-ARN) et 14% de tsARN (transfer small ARN)]. Elles ont également permis de valider la présence d'environ 500miRNA déjà décrits et d'identifier un grand nombre (2000 environ) de nouveaux miARN. Parmi ceux-ci, 53 étaient fortement exprimés, avec une expression particulièrement remarquable pour bta-mir-100 et 148. Un nombre important de séquences, quelle que soit la famille de sncARN, est différentiellement exprimé selon la race, et, pour tous les types de sncARN, la race Montbéliarde se caractérise par des profils d'expression originaux (avec 63 miARN et 2089 rARN spécifiques), alors que les comparaisons Holstein vs Normande et Charolais vs Blanc Bleu Belge montrent des profils d'expression assez similaires.

Le second chapitre expérimental a cherché à déterminer l'origine des sncARN spermatiques en caractérisant, à partir des mêmes animaux, les répertoires de sncARN des spermatozoïdes testiculaires, épididymaires (tête, corps et queue) et éjaculés. L'hypothèse sous-jacente est alors que la localisation de certains sncARN sur des sites spécifiques pourrait suggérer leur rôle possible dans la spermatogenèse, la maturation finale du spermatozoïde ou le développement embryonnaire. Pour ce faire, trois éjaculats de taureaux Holstein ont été récoltés le jour de leur réforme, puis leurs testicules et épididymes ont été prélevés à l'abattoir, afin de collecter les spermatozoïdes du parenchyme testiculaire, de la tête, du corps et de la queue de l'épididyme. Cette étude montre clairement que la dynamique d'expression des sncARN change tout au long du tractus génital. Plus spécifiquement, dans le spermatozoïde localisé dans le parenchyme testiculaire, les piARN représentent plus de 80% des sncARN. Leur expression s'effondre dès l'entrée dans l'épididyme, où ils ne représentent plus que la moitié de l'expression des sncARN

dans la tête et moins de 20% dans la queue de celui-ci. Inversement, les expressions post-testiculaire des miARN, tsARN et rsARN augmentent, puisque l'expression relative des miARN passe de 1% dans le testicule à 38% dans la semence. Ces résultats suggèrent une contribution active des sncARN acquis dans l'épididyme aux fonctions du spermatozoïde acquises dans cet organe (mobilité, réaction acrosomique). Le rôle de ces sncARN, acquis durant le transit épидидymaire ou ultérieurement, est encore inconnu.

L'objectif du troisième chapitre expérimental a été d'explorer un éventuel lien entre la typologie en sncARN des spermatozoïdes obtenus de 54 taureaux Holstein et 100 taureaux Montbéliards connus pour leur fertilité (bonne ou un peu réduite), afin d'identifier des biomarqueurs significativement liés à la fertilité de ceux-ci.

Les principaux paramètres fonctionnels post-décongélation de la semence ont été analysés : viabilité (% de spermatozoïdes ayant une membrane intacte), développement énergétique (% de spermatozoïdes ayant une mitochondrie active (HMMP) et niveau de production énergétique (MYH), oxydation cellulaire (% de spermatozoïdes vivants oxydés et niveau d'oxydation) et motilité (% de spermatozoïdes mobiles, progressifs...), puis l'ARN total a été extrait des éjaculats et séquencé.

L'hypothèse testée est bien confirmée car l'expression de 76 sncARN (chez les taureaux Holstein) et 552 (chez les Montbéliards) a pu être reliée à la fertilité de ceux-ci. Parmi les 76 biomarqueurs de fertilité détectés chez les Holstein, 17 sont surexprimés chez les taureaux fertiles et 59 le sont chez les taureaux hypo-fertiles. Parmi ces 59, 22 sont des miARN dont bta-miR-146a,b et bta-miR-192. Contrairement aux Holstein où les proportions des différentes familles de sncARN étaient plutôt équilibrées, les rsARN représentent chez les Montbéliards une importante majorité (72%) des biomarqueurs, suivis par les piARN (15%). Parmi les 552 biomarqueurs de cette race, 218 sont surexprimés chez les taureaux fertiles et 334 le sont chez les taureaux hypo-fertiles. Seuls trois de ces sncARN sont communs aux deux races (2 rsARN et 1 piARN). Parmi les 628 biomarqueurs d'intérêt dans les deux races, 67% (51 sur 76) en race Holstein et 78% (427 sur 552) en race Montbéliarde correspondent à des sncARN acquis au cours du transit épидидymaire ou post-éjaculation, alors que seuls 12% des biomarqueurs identifiés sont d'origine testiculaire. Cela suggère que la subfertilité des taureaux résulterait majoritairement de dysfonctions post-spermatogenèse. Les résultats impliquant miR-192, miR-30d et miR-146a dans la modulation de la fertilité chez les bovins sont en accord avec des données chez l'homme décrivant un lien entre ces sncARN et l'infertilité ou l'asthénospermie.

Compte tenu du nombre bien plus élevé de marqueurs reliés à la fertilité chez les Montbéliards, l'étude de prédiction de la fertilité par un algorithme les prenant en compte s'est limitée à cette race. Celui-ci a considéré 183 sncARN parmi les 552 détectés. A partir d'une population comportant 13 mâles subfertiles et de 17 fertiles, l'algorithme a identifié avec succès 11 taureaux subfertiles sur 13 et 16 fertiles sur 17. La précision du modèle atteint donc 90%, sa sensibilité 85% et sa spécificité 94%.

Cette approche combinant algorithme et sncARN, certes prometteuse, présente cependant une limite : la prédiction, qui repose sur l'analyse d'échantillons de semence, nécessite un animal

ANALYSE DE THÈSE

pubère. Elle est donc tardive et ne permet pas d'éviter de recruter en centre de futurs reproducteurs subfertiles.

En conclusion, il est évident que l'auteur de cette thèse a réalisé un travail de grande qualité, qui a été reconnu comme tel par ses deux rapporteurs. L'auteur a publié deux articles correspondant aux deux premiers chapitres expérimentaux de sa thèse, est en train d'évaluer les possibilités de valorisations des résultats de son troisième chapitre et a présenté son travail à plusieurs reprises dans des congrès internationaux. Cette thèse est donc digne de figurer sur le site de l'Académie d'agriculture de France, car il s'agit d'un travail novateur, basé sur des méthodologies rigoureuses bien maîtrisées. Ses conclusions ouvrent la porte à des progrès significatifs dans la prédiction de la fertilité de la semence bovine.