

L'épigénétique et la construction du phénotype chez le bovin

INRAE Prod. Anim.,
2020, 33 (2), 109-124

Nathalie BEAUJEAN^{1,2,3}, Marion BOUTINAUD⁴, Ève DEVINOY⁵, Hélène JAMMES^{1,2}, Sandrine LE GUILLOU⁵, Fabienne LE PROVOST⁵, Christine LEROUX⁶, Lenha MOBUCHON^{5,6}, Maëlle PANNETIER^{1,2}, Eli SELLEM^{1,2,7}, Hélène KIEFER^{1,2}

¹ Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, 78350, Jouy-en-Josas, France

² École Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED, 94700, Maisons-Alfort, France

³ Adresse actuelle : Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm, INRAE, Stem Cell and Brain Research Institute U1208, USC1361, 69500, Bron, France

⁴ PEGASE, INRAE, Institut Agro, 35590, Saint Gilles, France

⁵ Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350, Jouy-en-Josas, France

⁶ INRAE, Université Clermont Auvergne, Vetagro Sup, UMRH, 63122, Saint-Genès-Champagnelle, France

⁷ Département R&D, ALLICE, 75012, Paris, France

Courriel : helene.kiefer@inrae.fr

■ De par leur rôle majeur en santé humaine, les marques épigénétiques font l'objet d'une attention croissante dans la littérature scientifique mais aussi dans les médias. Qu'en est-il du monde animal, et en particulier des animaux d'élevage ? Cette revue fait le point sur les connaissances acquises à INRAE concernant les mécanismes épigénétiques chez le bovin et les perspectives d'utilisations futures en élevage.

Introduction

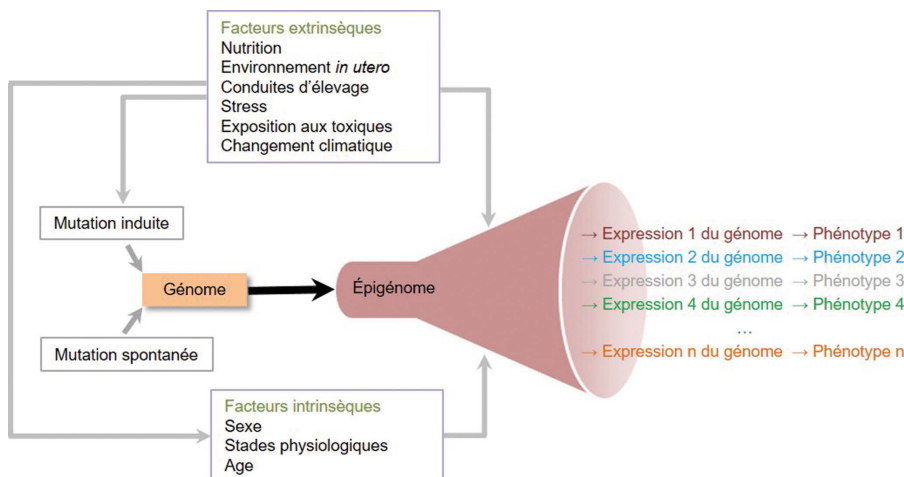
Pour les productions animales et en particulier chez les bovins, l'objectif est d'accroître la productivité tout en respectant la santé et le bien-être des animaux. D'importants efforts de sélection génétique ont été réalisés au cours des cinq dernières décennies, et de nombreux marqueurs génétiques ont été associés à la production laitière, la qualité de la viande, la reproduction et les caractères de croissance (Bouquet et Juga, 2013 ; Boichard *et al.*, 2016). Cependant, la génétique ne permet d'expliquer qu'une partie de la variabilité phénotypique des caractères d'intérêt pour l'éleveur ; les modifications épigénétiques contribuent également à cette variabilité.

Initialement utilisé pour décrire l'influence de l'environnement sur le développement des phénotypes, le terme « épigénétique » a beaucoup évolué depuis son introduction en 1942 par

Conrad H. Waddington. L'épigénétique se définit aujourd'hui comme l'ensemble des marques apposées sur le génome qui induisent des changements de l'expression des gènes sans altération de la séquence d'ADN (Berger *et al.*, 2009). Ces marques sont à la fois stables et héréditaires au cours des divisions cellulaires. L'épigénome d'une cellule est l'ensemble complet des marques épigénétiques, telles que la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, le remodelage de la chromatine, les ARN non codants et autres molécules qui peuvent transmettre des informations à travers la mitose en régulant l'expression génique.

L'épigénome est très dynamique tout au long de la vie, et est régi par une interaction complexe de facteurs génétiques et environnementaux (Kouzarides, 2007). En effet, toutes les cellules d'un individu possèdent le même patrimoine génétique qu'elles utilisent de façon variable en exprimant plus ou moins fortement des gènes

différents en fonction du stade physiologique et du type cellulaire. Cette information spécifique d'un état cellulaire donné est orchestrée par les marques épigénétiques, activatrices ou inhibitrices, qui ont la capacité de modifier l'expression génique et de définir des phénotypes spécifiques. De plus, les marques épigénétiques apposées sur le génome sont modifiables et/ou réversibles en fonction de l'environnement, et ces modifications peuvent aussi avoir des conséquences à long terme (figure 1). Le développement d'un individu (embryon, fœtus et nouveau-né ; mais aussi la différenciation et la maturation des cellules germinales) et de façon plus générale la période qui entoure la conception, représente une fenêtre de temps particulièrement sensible aux différents facteurs environnementaux. Le retour à la totipotence nécessaire à l'initiation du programme développemental implique en effet une grande plasticité des marques épigénétiques en terme de diversité, quantité et durée d'action. Ainsi, des variations

Figure 1. Contribution de l'épigénome à la variabilité des phénotypes.

Le génome évolue dans le temps sous l'influence de mutations intervenant de manière aléatoire ; celles-ci sont maintenues (ou pas) au sein des populations en fonction de leurs répercussions fonctionnelles. L'épigénétique permet une lecture spécifique de l'information génétique contribuant à la mise en place d'états transcriptionnels différentiels au sein de chaque type cellulaire dans chaque tissu. L'épigénome est aussi modifié sous l'influence de facteurs extrinsèques et intrinsèques, permettant une plasticité de l'expression du génome et une déclinaison des réponses phénotypiques.

environnementales se produisant au cours de la gestation peuvent avoir des conséquences sur le phénotype de la génération suivante, voire au-delà (Junien *et al.*, 2016).

Dans cet article, nous décrivons brièvement les processus épigénétiques, puis nous évoquons, à travers plusieurs exemples principalement issus de travaux menés à INRAE, le rôle majeur de l'épigénome dans la construction du phénotype chez le bovin, avec un accent particulier mis sur les caractères de fertilité, de développement, de santé et de production laitière.

1. Marques et mécanismes épigénétiques

■ 1.1. Méthylation de l'ADN

Au sein de la séquence d'ADN, les résidus de cytosine des dinucléotides CpG (pour « cytosine-phosphate-guanine ») peuvent être méthylés en 5-méthylcytosine (5mC ; *figure 2*). Cette méthylation de l'ADN est connue depuis plus de 50 ans, avec la découverte de la 5mC dans l'embryon d'oursin puis la mise en relation de cette marque épigénétique avec l'activité des gènes au cours du développement. Elle est présente chez presque tous les organismes vivants, mais chez les mammifères, seules 5 à

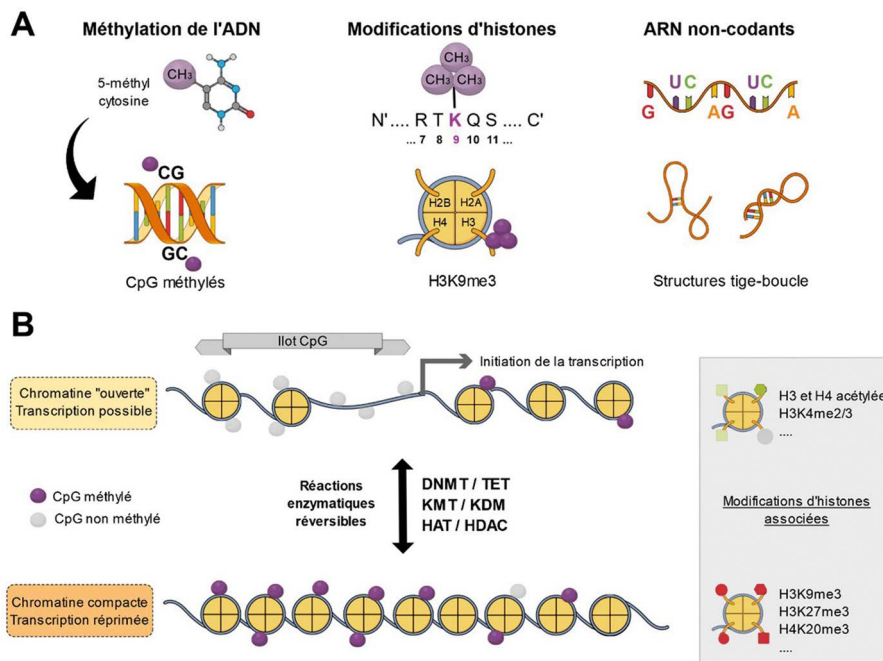
10 % des cytosines du génome sont méthylées. Ce pourcentage semble faible, mais rapporté aux dinucléotides CpG, il dépasse bien souvent 80 %.

Les sites CpG ne se répartissent pas de manière uniforme le long du génome. Les régions les plus denses en sites CpG sont nommées « îlots CpG » et sont en général méthylées lorsqu'elles sont associées aux éléments répétés du génome, tels que les rétrotransposons (éléments mobiles du génome, d'origine virale accumulés au cours de l'évolution) et les séquences satellites centromériques et péri-centromériques. La méthylation de l'ADN au niveau des rétrotransposons, est nécessaire pour prévenir leur réplication et protéger le génome contre leur invasion. La méthylation des séquences satellites péri-centromériques intervient quant à elle dans la formation de l'hétérochromatine constitutive, essentielle pour limiter les recombinaisons et ségrégations chromosomiques indésirables. Au niveau des régions flanquant les îlots CpG, la méthylation de l'ADN est particulièrement dynamique en fonction du type cellulaire, du stade de développement, de la physiologie de l'animal ou de l'environnement.

Associée à des éléments régulateurs ou à des promoteurs, la méthylation de l'ADN inhibe l'expression des gènes,

tandis qu'au niveau intragénique elle aurait un rôle activateur en limitant les démarrages de transcription illégitimes (Schubeler, 2015). La méthylation de l'ADN intervient également dans l'inactivation du chromosome X, qui permet de compenser le double dosage allélique chez les femelles, ainsi que dans les processus d'empreinte parentale décrits pour une centaine de gènes chez l'Homme et la souris. Les gènes soumis à empreinte s'expriment de manière mono-allélique en fonction de l'origine parentale de l'allèle ; cette expression mono-allélique est indispensable au bon déroulement du développement et à une croissance harmonieuse du fœtus. Ces gènes ne semblent pas complètement conservés entre espèces, et leur liste chez le bovin n'est à ce jour pas exhaustive.

Les fonctions de la méthylation de l'ADN sont médiées par des protéines nucléaires portant un domaine de liaison à l'ADN méthylé et capables de recruter des répresseurs transcriptionnels ou des enzymes de modification des marques d'histones. Les DNMT (ADN méthyltransférases) sont les enzymes qui catalysent le transfert des groupes méthyle sur la position 5 des cytosines à partir du métabolite S-adenosylméthionine (produit à partir d'acide folique apporté par l'alimentation). Les enzymes DNMT3A et DNMT3B sont impliquées dans la méthylation *de novo* qui se met en place lors des processus de différenciation cellulaire, mais également en réponse à un stimulus dans les cellules différenciées. L'enzyme DNMT1, qui reconnaît les sites CpG hémiméthylés issus de la réplication de l'ADN, assure le maintien et la propagation des patrons de méthylation à travers la division cellulaire (Lyko, 2018). La déméthylation peut ainsi résulter d'une absence d'activité de DNMT1, la méthylation de l'ADN étant progressivement diluée au cours des cycles cellulaires. Des mécanismes de déméthylation active de l'ADN sont également observés lors des vagues de reprogrammation épigénétique ayant lieu dans les précurseurs des cellules germinales et l'embryon préimplantatoire. Ces mécanismes mettent en jeu la conversion des 5mC par les enzymes TET en dérivés oxydés comme la 5-hydroxyméthylcy-

Figure 2. Régulation épigénétique de l'expression génique.

A. La méthylation de l'ADN sur les cytosines des dinucléotides CpG, les modifications d'histones au cœur des nucléosomes et les ARN non codants qui adoptent parfois des structures spécifiques appelées « tige-boucle » sont les principaux régulateurs épigénétiques présentés ici. Dans le cas des modifications d'histones, on citera d'abord l'histone ciblée, le résidu et sa position par rapport à la queue N-terminale puis le type et le nombre de modifications (par exemple H3K9me3 pour la tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine en position 9).

B. En fonction de l'environnement, différentes marques épigénétiques peuvent être présentes, notamment au niveau des îlots CpG en amont du site d'initiation de la transcription des gènes, conférant une structure plus ou moins « ouverte » à la chromatine. Les modifications épigénétiques sont réversibles. Ce processus est médié par plusieurs familles d'enzymes aux activités antagonistes : DNMT et TET pour la méthylation de l'ADN, KMT et KDM pour la méthylation des histones, HAT et HDAC pour l'acétylation des histones. Figure réalisée sur www.mindthegraph.com

tosine (5hmC), qui sont ensuite dilués pendant la réplication ou remplacés par des cytosines non méthylées par la machinerie de réparation de l'ADN (Wu et Zhang, 2017).

■ 1.2. Modifications post-traductionnelles des histones

Dans le noyau, l'ADN génomique est enroulé autour d'octamères de quatre types d'histones (H2A, H2B, H3 et H4) pour former le nucléosome (figure 2). Les histones sont de petites protéines basiques, ce qui facilite leur liaison à l'ADN, contenant également des queues N-terminales ciblées par différents types de modifications : acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitylation, sumoylation, ribosylation, désamination et isomérisation. Ces modifications touchent différents acides aminés, produisant ainsi des dizaines de variants post-traductionnels

avec des rôles fonctionnels différents. L'addition ou le retrait de ces modifications qui affectent directement l'accessibilité de l'ADN génomique par la machinerie de transcription, et donc l'activation ou la répression de l'expression génique (Kouzarides, 2007). La combinatoire des différentes marques d'histones (« code des histones »), en association avec la méthylation de l'ADN et la présence de certains facteurs de transcription ou de l'ARN polymérase, définissent des états chromatiniens associés à différents états transcriptionnels. Ces états chromatiniens sont transmis aux cellules filles, assurant la continuité de l'identité cellulaire à travers la mitose.

Les modifications d'histones reposent sur l'utilisation de métabolites issus de l'alimentation (acétyl-coA et S-adénosylméthionine) et sont contrôlées par une importante machinerie épigénétique, comprenant des

enzymes capables d'apposer, d'effacer et de lire ces marques. Les acétylations et désacétylations ont été décrites dès les années 1960 (Allfrey et Mirsky, 1964). Fruits de l'activité des histones acétyltransférases (HAT), les acétylations ont pour effet de neutraliser la charge positive de l'histone, d'augmenter son encombrement stérique et de diminuer la force de son interaction avec l'ADN. Les lysines acétylées permettent également le recrutement de protéines à bromodomaine qui interviennent dans le remodelage de la chromatine. Il résulte de ces différents modes d'action une ouverture de la chromatine (euchromatine) et une augmentation locale de l'activité transcriptionnelle (Mujtaba *et al.*, 2007). Les processus de désacétylation, qui ont une action opposée sur la transcription, font intervenir les histones désacétyltransférases (HDAC) et sont associés à la formation de l'hétérochromatine (chromatine compacte). Les méthylations, qui consistent en l'addition d'un ou plusieurs groupe(s) méthyle(s) sur les résidus lysines ou arginines des queues d'histones, sont catalysées par des histones méthyltransférases (KMT) tandis que les déméthylations résultent de l'activité des histones déméthylases (KDM) (Jenuwein, 2006). À la position H3K4, la triméthylation (H3K4me3) est une signature d'activité transcriptionnelle, en particulier lorsqu'elle est combinée avec une acétylation. À l'inverse, la méthylation est associée à une répression transcriptionnelle lorsqu'elle touche H3K27 et H4K20 et à l'hétérochromatine constitutive à la position H3K9, en association avec la protéine HP1 et la méthylation de l'ADN (Nishibuchi et Dejardin, 2017).

Enfin, il est important de noter qu'un type de cellule échappe à la structure en nucléosome : le spermatozoïde, où selon les espèces 85 à 99 % des histones sont remplacées par des protamines, protéines riches en arginine formant des structures en forme de tores avec l'ADN (Carrell, 2012). Le remplacement des histones par les protamines joue un rôle important dans la compaction de la chromatine du spermatozoïde, qui contribue à la réduction du volume nucléaire, à l'acquisition d'une morphologie hydrodynamique et permet de protéger le patrimoine génétique

paternel contre l'oxydation, notamment lors de la migration à travers l'épididyme et les voies génitales femelles.

■ 1.3. ARN non-codants

La découverte des ARN non-codants a bouleversé le dogme selon lequel chaque gène codait une protéine possédant une fonction cellulaire. Des recherches récentes ont mis en évidence de nombreuses formes d'ARN non-codants soulignant leurs rôles dans la physiologie et leurs implications dans de nombreuses pathologies (Bayoumi *et al.*, 2016). Les ARN non-codants sont divisés en sous-classes selon leur taille, leur fonction ou leur localisation génomique. Les petits ARN non-codants comprennent les ARN dont la taille est inférieure à 200 nucléotides, parmi lesquels les microARN (miARN, 19-24 nucléotides). Chez les mammifères, plus de 2 000 miARN par espèce sont actuellement répertoriés dans la base publique de référence miRBase. Au niveau génomique, les miARN peuvent être organisés en cluster (Griffiths-Jones *et al.*, 2008) ; ils partagent alors un promoteur commun et sont transcrits en large polycistrons (grand fragment d'ARN contenant plusieurs miARN). Les gènes de miARN peuvent également être localisés dans les introns de gènes codants ou non. Ces gènes de miARN introniques peuvent soit partager le même promoteur que leur hôte, soit utiliser un promoteur distinct ou même plusieurs sites d'initiation de la transcription (Monteys *et al.*, 2010).

La biosynthèse de miARN fonctionnels et l'assemblage du complexe RISC (« RNA-induced silencing complex ») font appel à une cascade de réactions enzymatiques se regroupant en cinq étapes : *i*) transcription du gène codant le miARN sous forme de miARN primaire (pri-miARN), *ii*) maturation du pri-miARN en précurseur (pré-miARN) au niveau nucléaire, *iii*) export du pré-miARN du noyau vers le cytoplasme, *iv*) maturation du pré-miARN en miARN mature et *v*) formation du complexe RISC. Ce complexe est guidé par le miARN vers ses transcrits cibles par homologie partielle de séquences entre les deux espèces d'ARN ; il peut induire

ensuite l'inhibition de la traduction ou la dégradation des ARN messagers. Un miARN peut ainsi cibler une centaine d'ARNm différents et un ARNm peut être ciblé par plusieurs dizaines de miARN différents. En participant à la régulation de l'expression génique, les miARN ont des rôles clés dans l'ensemble des fonctions biologiques chez les mammifères (Bushati et Cohen, 2007). Les fonctions des miARN dans la prolifération, la différenciation ou la mort cellulaire sont conservées au cours de l'évolution et entrent en jeu dans toutes les voies biologiques ; citons par exemple la réponse immunitaire, le rythme circadien ou encore le développement cérébral.

Les études de profils d'expression des miARN indiquent que la majorité d'entre eux est sous le contrôle de signaux développementaux et/ou tissus-spécifiques, comme miR-1 qui représente 45 % des miARN exprimés dans le cœur et miR-122 qui représente 72 % des miARN du foie (Lagos-Quintana *et al.*, 2002). Le contrôle précis du niveau d'expression des miARN est crucial pour maintenir les fonctions physiologiques de la cellule, et les dérégulations de leur expression sont souvent associées à des pathologies telles que le cancer (Landgraf *et al.*, 2007). Leur dérégulation peut jouer un rôle dans les processus d'initiation, de prolifération et d'invasion des cellules tumorales ; des travaux récents semblent également les impliquer dans les mécanismes de résistance à certains traitements anti-tumoraux. La dérégulation de l'expression des miARN dans le cancer peut également mettre en jeu des mécanismes épigénétiques affectant l'activité de leurs promoteurs (Choudhry et Catto, 2011).

Les miARN peuvent être sécrétés dans le milieu extracellulaire et circuler dans les fluides biologiques (Weber *et al.*, 2010). Dans de nombreuses situations pathologiques, des variations quantitatives voire qualitatives des miARN circulants au niveau du sérum (d'origine périphérique), des plaquettes ou des leucocytes et hématies ont été mises en évidence, qui les font apparaître comme des biomarqueurs potentiels.

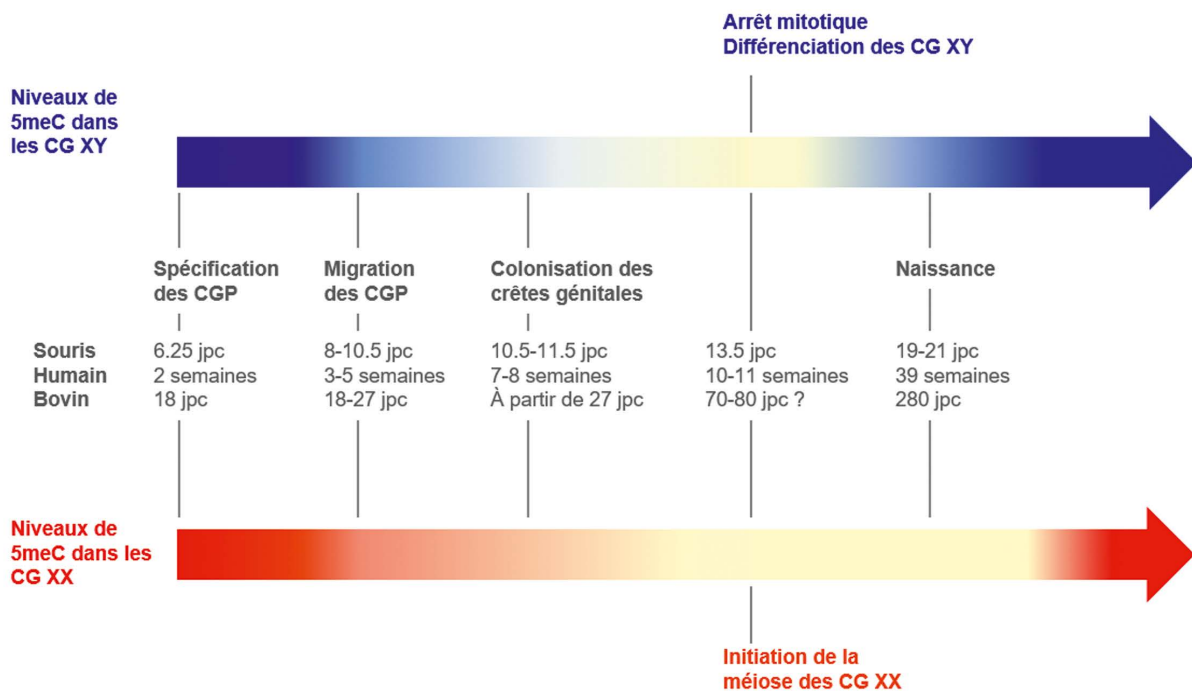
2. Fertilité, reproduction et développement

■ 2.1. Reprogrammation épigénétique dans les cellules germinales

La différenciation des cellules germinales prend place dans les gonades mâles (testicules) et femelles (ovaires). Au cours de la vie fœtale, les gonades apparaissent d'abord sous forme de crêtes génitales puis se différencient en ovaire ou testicule selon le sexe de l'individu. Cette orientation de la gonade vers une voie mâle ou femelle conditionne le devenir de la lignée germinale et la nature des remaniements épigénétiques associés. L'établissement des lignées germinales mâle et femelle requiert trois étapes successives : *i*) spécification des Cellules Germinales (CG) primordiales à partir de l'épiblaste embryonnaire en début de gastrulation, *ii*) migration vers les crêtes génitales, *iii*) différenciation en fonction de l'environnement testiculaire ou ovarien.

Alors que les CG mâles arrêtent de proliférer et entrent en quiescence (la méiose démarrant à la puberté), les CG femelles entrent en méiose dès la vie fœtale. Ces 3 étapes reposent sur un programme transcriptionnel spécifique au sexe et orchestré par des remaniements épigénétiques de grande ampleur. Le patron de méthylation de l'ADN caractérisant l'épiblaste embryonnaire est ainsi effacé sur l'ensemble du génome lorsque les CG primordiales colonisent la gonade ; la méthylation de l'ADN est ensuite réapposée selon une dynamique différente dans les CG mâles et femelles (figure 3).

L'essentiel des connaissances concernant la dynamique d'effacement de la méthylation de l'ADN repose sur les données issues du modèle murin et dans une moindre mesure, d'informations acquises chez l'Homme. L'effacement de la méthylation touche d'abord la majeure partie des îlots CpG dans l'ADN des CG primordiales en migration, puis des régions plus spécifiques du génome lors de la colonisation des crêtes génitales.

Figure 3. Évolution de la méthylation de l'ADN dans les cellules germinales (CG) au cours du développement.

L'intensité de couleur des flèches explicite les niveaux de méthylation de l'ADN des CG en fonction des stades de développement chez la souris. Ainsi, lors de leur migration, puis de la colonisation des crêtes génitales, les CG déméthylent progressivement leur génome, pour atteindre le niveau de méthylation le plus bas au stade précédent la méiose dans l'ovaire et l'arrêt des mitoses des CG dans le testicule. Chez les mâles une nouvelle méthylation est rapidement apposée, alors que chez les femelles, la méthylation de l'ADN de l'ovocyte débutera lors de la maturation ovocytaire des follicules en croissance. L'évolution de la méthylation de l'ADN dans les CG fœtales bovines n'est pas connue ; l'équivalence des stades de développement est mentionnée à titre indicatif. Jpc : Jour post conception ; CGP : CG Primordiales.

Cet effacement n'est pas total : certaines régions génomiques, comme les éléments répétés, conservent de la méthylation à un degré différent selon le sexe et l'espèce (Seisenberger *et al.*, 2012 ; Guo *et al.*, 2015). En parallèle de la déméthylation de l'ADN, les niveaux des marques d'histones répressives augmentent, afin d'éviter qu'une activité transcriptionnelle massive ne se mette en place suite à l'hypométhylation du génome (Gkountela *et al.*, 2015). La perte de 5meC, mais aussi de marques d'histones répressives et le gain en 5hmC sont essentiels à l'expression de gènes de la différenciation germinale et à la progression de la gamétogenèse, en particulier chez les femelles où elle précède de peu l'initiation de la méiose (Hill *et al.*, 2018).

La reméthylation de l'ADN des CG fait appel aux enzymes de méthylation *de novo* DNMT3A et 3B, mais aussi à DNMT3L, un cofacteur spécifique de la lignée germinale, dépourvu d'activité méthyl-transférase et guidant les DNMT3A et B vers les séquences à méthyler. Cette étape intervient à des

stades différents selon le sexe. Chez les mâles, la reméthylation commence dès la vie fœtale. Bien que la majeure partie de la méthylation dans les CG mâles ait été acquise pendant la vie *in utero*, il semble que des remaniements continuent après la naissance, et même lors de la spermatogenèse (Ly *et al.*, 2015). La dynamique de reméthylation de l'ADN n'est à ce jour pas connue chez le bovin mâle, mais est à l'étude à INRAE (Mandon-Pépin *et al.*, 2017). Chez les femelles, la reméthylation se fait progressivement après la puberté alors que l'ovocyte mature et grossit au cours de la croissance folliculaire. Les premiers signes de reméthylation apparaissent lors de la transition follicule primaire/ follicule secondaire, lorsque l'ovocyte a atteint 110 µm chez la vache (O'Doherty *et al.*, 2012). La reméthylation se poursuit ensuite jusqu'à l'ovulation.

Ainsi, la reméthylation de l'ADN des CG se fait principalement pendant la vie fœtale chez les mâles et majoritairement après la puberté chez les femelles. Les CG mâles ou femelles ne

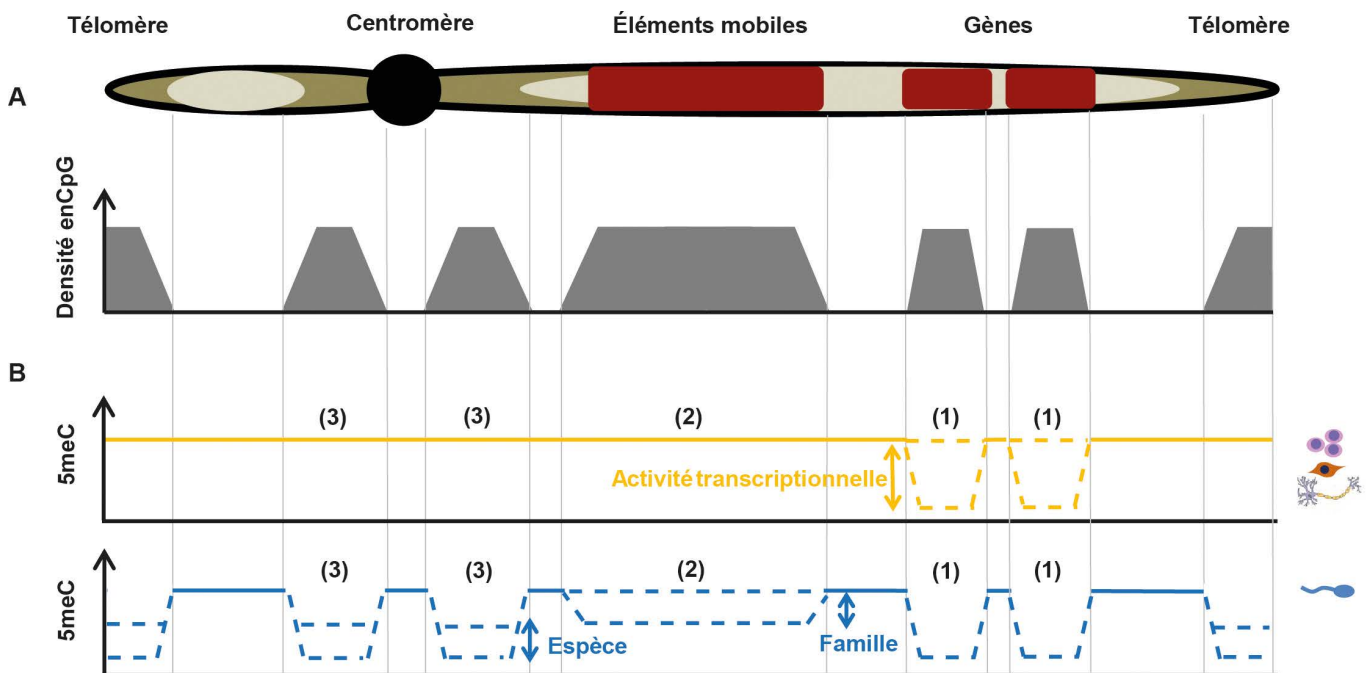
présentent donc pas la même sensibilité à l'environnement, notamment au cours de la gestation. Les conditions de vie de la mère peuvent avoir un impact sur la reprogrammation des CG mâles et l'épigénome spermatique à l'âge adulte, avec des conséquences physiologiques, notamment en terme de métabolisme, observables à la génération suivante (Radford *et al.*, 2014). Chez les bovins, le contrôle de l'environnement au cours de la gestation (en particulier l'alimentation des mères hautes productrices) pourrait donc s'avérer crucial pour assurer la future fertilité des taureaux.

■ 2.2. Épigénome spermatique

a. Méthylation de l'ADN

Nous avons montré que les spermatozoïdes bovins présentaient un taux global de 5meC particulièrement faible par rapport aux cellules somatiques bovines mais aussi à des spermatozoïdes de boucs, béliers, Homme, étalon, verrat et souris (Perrier *et al.*, 2018). Cette faible méthylation est observée pour l'ensemble des

Figure 4. Relations entre éléments fonctionnels du génome, densité en CpG et 5meC dans les cellules somatiques et les spermatozoïdes.



La densité en CpG (A) et la méthylation de l'ADN (B) pour différents éléments du génome sont schématisés le long d'un chromosome. En B, les lignes pleines illustrent l'hyperméthylation globale du génome, qui semble conservée entre espèces de mammifères et cellules différenciées, alors que la méthylation variable est représentée par des lignes pointillées (jaune : cellules somatiques ; bleu : spermatozoïde). Les marges et facteurs de variation sont représentés par des flèches. Les promoteurs des gènes (1), qui ont une méthylation variable en fonction de l'activité transcriptionnelle dans les cellules somatiques, sont déméthylés dans les spermatozoïdes transcriptionnellement inactifs. Les éléments mobiles du génome (2) et les séquences péri-centromériques (3), hyperméthylés dans les cellules somatiques, présentent une méthylation variable en fonction de la famille de rétrotransposons qui les constituent (2) et de l'espèce (3), respectivement. D'après (Kiefer et Perrier, 2019).

racés bovines étudiées à ce jour et ne semble pas affectée par le processus de congélation de la semence. Pour déterminer les séquences hypométhylées, nous avons comparé le méthylome spermatique avec celui de tissus somatiques bovins par des approches pan-génomiques. De nombreuses positions différenciellement méthylées ont été mises en évidence, dont 81 % sont hypométhylées spécifiquement dans les spermatozoïdes. Ces sites hypométhylés sont enrichis en gènes de la spermatogenèse ainsi qu'en séquences répétées de type satellite et ADN ribosomique (Perrier *et al.*, 2018). La surreprésentation de ces séquences répétées dans le génome bovin, ainsi que leur faible méthylation, pourraient expliquer pourquoi les spermatozoïdes bovins présentent un taux de 5meC global plus bas que les spermatozoïdes d'autres espèces de mammifères. Ce travail, associé à des études similaires dans d'autres espèces, nous a permis de proposer un profil-type du méthylome spermatique (Kiefer et Perrier, 2019 ; figure 4).

Les facteurs associés à des variations du méthylome spermatique sont à présent étudiés à partir d'une cohorte de 260 taureaux. La race (Holstein, Montbéliarde, Normande, Charolais, Blanc Bleu Belge et Abondance) semble moduler le méthylome spermatique (Perrier *et al.*, 2019). Un effet majeur de l'âge du taureau au moment de la collecte de semence a également été mis en évidence dans toutes les races étudiées. Cet effet suggère une plasticité inattendue de l'épigénome spermatique, qui était considéré jusqu'à peu comme stable à l'âge adulte puisque la vague de reméthylation *de novo* est alors achevée. Depuis 2017, plusieurs publications chez la souris, l'Homme et plus récemment chez le bovin (Lambert *et al.*, 2018 ; Takeda *et al.*, 2019), vont dans le sens de ces observations. Ceci génère des questions par rapport aux conséquences possibles des pratiques actuelles de collecte de semence, réalisées à un âge de plus en plus précoce dans les races laitières. Des approches d'intelligence artificielle sont actuellement en cours pour isoler les meilleurs

biomarqueurs prédictifs de fertilité mâle dans le méthylome spermatique.

Depuis l'avènement de la sélection génomique, la valeur génétique des reproducteurs est établie précocement à partir des génotypes, et de nombreuses pratiques visant à accélérer la maturité sexuelle, et donc la commercialisation des taureaux, sont testées. L'une d'elles consiste à administrer aux jeunes mâles un plan d'alimentation riche pendant les premiers mois de vie, ce qui a pour effet de déclencher la puberté avec un mois d'avance sans effet visible sur la qualité de la semence (Byrne *et al.*, 2018). Nous avons montré que les conséquences du régime et de la puberté avancée sur la méthylation de l'ADN spermatique sont relativement limitées mais existent (Perrier *et al.*, 2020). Ces données suggèrent que l'épigénome des spermatozoïdes contient une mémoire des événements passés, et que les premiers mois de vie du taureau représentent une fenêtre de sensibilité aux variations environnementales. Il serait important de déterminer dans quelle mesure ces

variations de méthylation peuvent altérer le développement et le phénotype de la descendance.

b. Petits ARN non-codants

Le contenu en ARN spermatiques a longtemps été considéré comme un vestige de la spermatogénèse. Plus récemment, des études ont montré que les ARN spermatiques étaient transférés dans l'ovocyte et contribuaient à la réussite de la fécondation et des premières étapes du développement de l'embryon. Les petits ARN non-codants (sncARN) en particulier pourraient constituer des biomarqueurs reflétant le bon déroulement de la spermatogénèse et/ou la fonctionnalité de la semence (Bissonnette *et al.*, 2009).

Une analyse exhaustive des profils d'expression des sncARN spermatiques sur une cohorte de 40 taureaux représentant 6 races (Holstein, Montbéliarde, Normande, Charolais, Blanc Bleu Belge et Abondance) a été réalisée (Sellem *et al.*, 2020). Outre des miARN (20 %), nous avons identifié des ARN interagissant avec PIWI (piARN, 26 %) mais aussi des fragments d'ARN ribosomiques (25 %) et d'ARN de transfert (14 %). Il est intéressant de noter que les fragments d'ARN de transfert associés à une glycine ou une glutamine sont très représentés parmi l'ensemble des ARN de transfert. Des variations de profils d'expression ont été observées entre races pour toutes les catégories de sncARN.

Seuls 26 % des miARN spermatiques identifiés dans nos données ont déjà été décrits, la grande majorité étant prédite et potentiellement spécifique de l'espèce bovine. Nous montrons aussi que 2 % des miARN sont très fortement exprimés dans le spermatozoïde, suggérant une importance fonctionnelle. Des études font état d'une potentielle corrélation entre le profil d'expression des miARN et la fertilité des taureaux (Govindaraju *et al.*, 2012 ; Fagerlind *et al.*, 2015). La présence de ces miARN pourrait favoriser une dépression en ARN messagers ovocytaires correspondant aux gènes cibles de ces miARN et une modification des premières étapes du développement embryonnaire. Suivre les conséquences d'une surexpression ou suppression de ces miARN

sur la cinétique et la qualité de développement des embryons permettrait d'explorer leur fonction.

■ 2.3. Épigénome de l'embryon

Après la fécondation, les génomes paternel et maternel sont reprogrammés afin de permettre le développement de l'embryon. Cette reprogrammation se caractérise par une série de modifications épigénétiques démarrant juste après la fécondation (Ross et Sampaio, 2018), en particulier pour le génome paternel. Les protamines présentes sur l'ADN paternel sont échangées avec les histones maternelles, qui sont rapidement méthylées en position H3K4 (marque activatrice). Au contraire, la chromatine maternelle comporte de nombreuses modifications d'histones répressives. Cette asymétrie entre génomes parentaux observable après la fécondation finit par s'estomper alors que développement embryonnaire progresse (Pichugin *et al.*, 2010 ; Boskovic *et al.*, 2012). Il a aussi été montré que le niveau global de 5meC diminue fortement dans les embryons au cours du développement préimplantatoire. À l'échelle de la séquence génomique cette diminution est associée à des vagues successives de déméthylation et méthylation *de novo* qui coïncident avec les grandes étapes du développement précoce (Jiang *et al.*, 2018). Comme chez la souris, la déméthylation est plus rapide et plus importante pour le génome paternel bovin et requiert l'expression des enzymes TET. Par ailleurs, alors que les enzymes DNMT1 et DNMT3A sont présentes, il semble que DNMT3B soit principalement responsable du contrôle des niveaux de 5meC dans les embryons bovins. Les gènes soumis à empreinte ne sont pas affectés par cette vague de déméthylation.

Ces remaniements épigénétiques participent au déclenchement de l'activation du génome embryonnaire (EGA). En effet, le génome de l'embryon nouvellement fécondé est d'abord transcriptionnellement inactif. Le développement embryonnaire dépend alors strictement du stock en ARN et en protéines accumulés dans l'ovocyte. L'EGA intervient au stade 8-cellules chez le bovin, soit 3 jours

après la fécondation, et se caractérise par une organisation unique de la chromatine. Ainsi, les niveaux globaux des marques d'histones répressives qui diminuent après la fécondation atteignent un niveau minimum à l'EGA pour se rétablir au stade blastocyste, siège de la première différenciation cellulaire. La marque H3K27me3, par exemple, est éliminée pendant les premières divisions embryonnaires par l'histone méthyltransférase KDM6B (Chung *et al.*, 2017). Lorsque l'on réprime l'expression de KDM6B, empêchant la diminution de H3K27me3, cela entraîne une altération de l'EGA ainsi qu'une réduction du taux de blastocystes. De telles expériences d'invalidation génique des enzymes catalysant les modifications d'histones confirment leur rôle essentiel dans remodelage de la chromatine après la fécondation et l'EGA.

Par ailleurs, de plus en plus d'embryons bovins sont produits après superovulation (stimulation hormonale utilisée pour augmenter le nombre d'ovocytes), maturation *in vitro* (MIV) utilisée pour obtenir des ovocytes avant Fécondation *In Vitro* (FIV), et culture *in vitro* des embryons. Ce mode de production n'est pas sans conséquences sur le profil épigénétique des embryons et individus à plus long terme (Beaujean, 2018). La superovulation semble affecter la mise en place des modifications épigénétiques ainsi que le transcriptome ovocytaire, ce qui pourrait impacter la capacité de développement des embryons produits dans ces conditions. Nous avons également montré que l'exposition d'ovocytes bovins à un choc thermique entraînait une accumulation de H3K9me3 et une formation d'hétérochromatine excessive dans les embryons obtenus par FIV (Camargo *et al.*, 2019), illustrant la sensibilité des ovocytes aux conditions de culture. Ces anomalies sont par ailleurs corrélées à une augmentation du taux d'apoptose des cellules embryonnaires et une diminution du taux de blastocystes.

Le stockage des gamètes et des embryons sont largement utilisés en association avec les biotechnologies de la reproduction. Les niveaux anormalement élevés de certaines modifications d'histones ont pu être observés dans

les ovocytes vitrifiés bovins. Dans les embryons bovins cryoconservés, l'expression de DNMT3A et les niveaux de 5meC semblent également être affectés (Stinshoff *et al.*, 2011). De telles études sont cependant assez rares chez les animaux d'élevage. À ce jour, aucune évaluation de l'impact potentiel de ces modifications épigénétiques sur le développement ultérieur de l'embryon et du nouveau-né, n'a été réalisée.

Enfin, le syndrome du gros veau a été la première preuve évidente de l'impact négatif des conditions de culture *in vitro* sur le développement anormal d'embryons de ruminants après leur transfert chez des receveuses (Heyman, 2005). Ce syndrome est caractérisé par un phénotype de prolifération et semble lié aux conditions historiques de culture de l'embryon (présence de sérum de veau foetal riche en facteurs de croissance et/ou addition de ces facteurs dans les milieux de culture), qui ont depuis été rectifiées. Ce phénomène a mis en évidence une persistance pendant la gestation des défauts induits par la période de culture, et touchant la méthylation de l'ADN, l'expression des gènes soumis à empreinte et l'acétylation des histones (Beaujean, 2018).

■ 2.4. Anomalies de l'épigénome et défauts de développement chez les clones bovins

L'obtention d'animaux clonés s'appuie sur une reprogrammation épigénétique majeure du noyau somatique assurée par la machinerie ovocytaire, qui permet de remplacer le profil d'expression de la cellule donneuse différenciée par un profil compatible avec le développement embryonnaire. En utilisant une lignée de fibroblastes dérivés d'une seule vache, il est possible d'obtenir plusieurs individus possédant le même génotype. Comme le transfert s'effectue dans des ovocytes dont l'origine est variable, chaque noyau somatique se trouve dans un environnement maternel différent. La reprogrammation épigénétique qui s'en suit peut présenter des erreurs et induire un large éventail de conséquences : arrêt immédiat du développement ou syndrome foetoplacentaire, limitant le succès du clo-

nage à 12 % d'individus viables et sains (Heyman, 2005).

a. Développement embryonnaire

L'élimination du profil épigénétique associé au type de cellule donneuse, et son remplacement par le profil épigénétique de l'embryon, semblent incomplets ou incorrects pour une proportion importante d'embryons. Une corrélation claire entre l'efficacité de la réorganisation de l'architecture nucléaire et notamment du profil de H3K9me3, et le pourcentage d'embryons clonés survivant aux premiers clivages embryonnaires a été démontrée (Pichugin *et al.*, 2010). Ces profils épigénétiques anormaux ayant un impact négatif sur le développement embryonnaire et foetal, différentes stratégies ont été utilisées pour tenter de corriger les erreurs épigénétiques et améliorer l'efficacité du clonage. Par exemple, la surexpression d'AID codant une enzyme impliquée dans la déméthylation active de l'ADN, réduit l'hyperméthylation des embryons clonés et améliore significativement les taux de clivage et de blastocystes chez le bovin (Ao *et al.*, 2016). Cependant, les blastocystes obtenus n'étant généralement pas transférés chez des receveuses, le recul sur l'impact à long terme de ce type de stratégie est limité.

b. Tissus extra-embryonnaires

Les conséquences du transfert nucléaire sur le développement des tissus extra-embryonnaires à des stades clé de la gestation, ont été analysées à partir de 124 conceptus clonés et témoins (Guillomot *et al.*, 2014). Outre des différences de taux de 5meC entre tissus et stades, cette étude a montré que le clonage provoquait une augmentation significative du taux de 5meC dans certains compartiments extra-embryonnaires. Cette différence est ensuite perdue aux stades plus avancés de la gestation, suggérant l'existence de mécanismes de compensation. Le taux de 5meC est toujours plus bas pour les foetus pathologiques arrêtés dans leur développement.

c. Foie périnatal

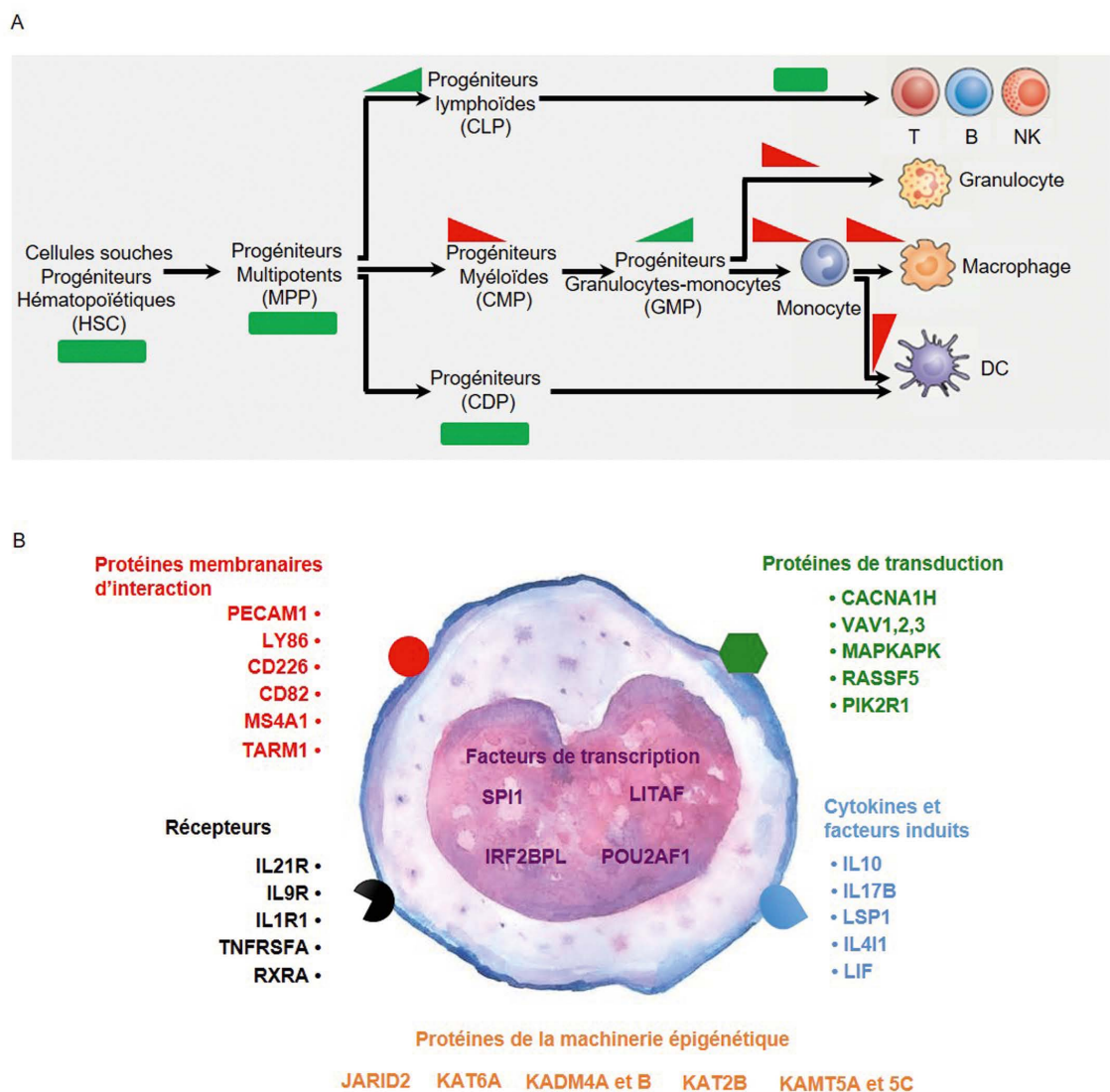
La présence d'anomalies épigénétiques dans le foie de clones bovins

morts en période périnatale a été rapportée (Kiefer *et al.*, 2016). Ces anomalies sont corrélées à des altérations majeures de la fonction hépatique chez ces animaux, comme une diminution de la réserve de glucose dans le foie. En temps normal cette réserve est constituée peu avant la naissance et est utilisée par les nouveau-nés jusqu'aux premiers apports alimentaires. Les anomalies épigénétiques touchent des gènes importants pour le métabolisme, et entraînent la dérégulation de l'expression de TCF7L2, un gène majeur de prédisposition au diabète chez l'Homme impliqué dans la production de glucose par le foie. On peut donc faire l'hypothèse que la reprogrammation du noyau somatique, lorsqu'elle est incomplète, altère la capacité de foetus clonés à s'adapter aux conditions d'alimentation post-natales. Au-delà de ses implications pour le clonage, cette étude (Kiefer *et al.*, 2016) montre qu'une attention particulière doit être portée au foie du foetus, de manière à mieux le préparer à la transition métabolique que constitue la naissance et ainsi optimiser les chances de survie du veau. Une alimentation qui réponde aux besoins de la mère en gestation tout en permettant la mise en place d'un épigénome hépatique favorable chez le foetus pourrait être envisagée comme levier d'action pour améliorer la fonction hépatique.

3. Santé et immunité : marques épigénétiques des cellules circulantes

La santé des animaux d'élevage est la clé de voûte de leur bien-être et de la réalisation de leur potentiel génétique. Le concept « animaux robustes et efficaces » englobe les notions de santé associées à une résistance aux pathogènes et/ou de réponse immune efficace, d'adaptation aux changements environnementaux (conduites d'élevage, nutrition, climat), de production de qualité et en quantité, tout en limitant les impacts sur l'environnement. Les analyses phénotype/génotype permettent à la sélection génomique d'identifier

Figure 5. Méthylation de l'ADN dans les cellules immunitaires.



A. Représentation des vagues de différenciation de la lignée hématopoïétique associées à un gain ou une perte de 5mC sur des loci spécifiques (d'après (Alvarez-Errico *et al.*, 2015)). Certaines cellules souches (« haematopoietic stem cells », HSC) entrent dans une phase de différenciation en générant des MPP (« multipotent progenitors »), qui se subdivisent en 3 sous-classes : CLP (« common lymphoid progenitors »), CMP (« common myeloid progenitors ») et CDP (« common dendritic progenitors ») en fonction du profil de méthylation acquis sous l'action de DNMT3A/B pour les CLP (gain de méthylation), et des TET pour les CMP (perte de méthylation). Les variations de méthylation caractérisant les étapes de différenciation ultérieures peuvent être importantes (monocytes, macrophages et granulocytes) ou subtiles (lymphocytes B et T, cellules NK).

B. Gènes bovins présentant un profil de méthylation spécifique dans les monocytes, et impliqués dans la différenciation et la fonction monocytaires (Jammes *et al.*, 2017).

de tels animaux. S'intéresser à l'épigénome immunitaire est une approche complémentaire. Les réponses immunes innée et adaptative sont les résultantes de processus complexes de différenciation cellulaire, mettant en jeu une succession de profils d'expression génique, régulés avec une grande précision spatio-temporelle par des facteurs de transcription spécifiques et des processus épigénétiques. Largement documenté chez l'Homme ou dans le modèle rongeur (Alvarez-Errico *et al.*, 2015), ce champ reste peu étudié chez le bovin.

■ 3.1. Hématopoïèse et méthylation de l'ADN

Les cellules progénitrices hématopoïétiques pluripotentes, présentes dans la moelle osseuse, sont caractérisées par un état basal de méthylation déterminant un profil transcriptomique en support à leur compétence de renouvellement. L'engagement de ces cellules dans les voies de différenciation myéloïde et lymphoïde est conditionné par une perte ou une augmentation de *loci* méthylés, respectivement. Les vagues de différen-

ciation en lymphocytes, granulocytes, monocytes, macrophages, éosinophiles, neutrophiles qui s'en suivent sont également sous contrôle épigénétique (Alvarez-Errico *et al.*, 2015) (figure 5A). Les mécanismes épigénétiques contrôlent non seulement la différenciation cellulaire, mais aussi la fonction et l'activation de chaque sous-population, et sont ainsi à la base de la plasticité de la réponse immunitaire. Chaque sous-population immunitaire peut donc être caractérisée par des *loci* discriminants porteurs d'une signature de méthylation spécifique.

Chez le bovin, différentes sous-populations de leucocytes circulants ont été décrites, ainsi que leurs variations en proportion avec l'âge, le stade physiologique et l'exposition aux pathogènes. Les sous-populations de monocytes en particulier pourraient expliquer la variabilité de réponse à l'infection, à l'inflammation et à la vaccination observée entre individus et en fonction du stade physiologique (Hussen et Schuberth, 2017). En comparant le méthylome de monocytes purifiés, de leucocytes circulants et de fibroblastes à l'aide d'analyses pan-génomiques (Jammes *et al.*, 2017), nous avons mis en évidence un profil de méthylation spécifique des monocytes touchant des gènes impliqués dans la fonction monocyttaire (figure 5B). Pour aller plus loin, des analyses complémentaires sont à mener afin d'identifier les mécanismes épigénétiques pilotant la différenciation des sous-populations monocytaires.

■ 3.2. Épigénétique de la réponse immune

Chez la vache laitière, les infections mammaires ou mammites sont principalement dues à deux pathogènes : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Une administration systémique de LPS (liposaccharide), composant majeur de la membrane des *E. coli*, induit les premières étapes de la réaction inflammatoire impliquant les médiateurs et les types cellulaires de la réponse immune innée. Chez les bovins, une exposition *in vivo* au LPS induit l'expression différentielle de gènes codant des enzymes de la machinerie épigénétique dans les leucocytes circulants (Doherty *et al.*, 2013). *In vitro*, l'exposition de fibroblastes au LPS entraîne une augmentation de l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires. Cette réponse est réduite en présence d'un inhibiteur des histones désacétyltransférases (Green et Kerr, 2014), qui, associé à des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN, limite également fortement la variabilité interindividuelle de la réponse au LPS. Ces résultats montrent que des processus épigénétiques sont impliqués dans la réponse immune innée.

Staphylococcus aureus induit un état de mammite subclinique difficile

à détecter. Des variations transcriptomiques sont observées dans les leucocytes de vaches laitières infectées (61 gènes différentiellement exprimés en réponse au pathogène) (He *et al.*, 2016). En particulier, l'augmentation de l'expression des gènes CD4 et IL10 impliqués dans la réponse immune est associée à une diminution du taux de la marque répressive H3K27me3 en amont du site d'initiation de la transcription de ces gènes.

La résistance à la tuberculose bovine, due à une infection par *Mycobacterium bovis*, fait appel à la réponse immune adaptative médiée par les lymphocytes CD4+. La méthylation de l'ADN contribue directement à moduler l'expression de certains gènes signant la réponse à l'infection dans les CD4+ (Doherty *et al.*, 2016), mais ne semble pas être impliquée dans la réponse à l'infection des macrophages pulmonaires (O'Doherty *et al.*, 2019). La caractérisation des méthylomes des différentes sous-populations de cellules immunitaires et leurs variations (interindividuelles, après exposition aux pathogènes, après vaccination) pourraient donc permettre de mieux estimer les capacités immunitaires des bovins.

■ 3.3. Biomarqueurs épigénétiques

Chez l'Homme, de très nombreuses études démontrent la possibilité d'identifier des positions différentiellement méthylées dans le génome des cellules du sang dans le cas de pathologies non immunitaires (cancers, diabète, autisme) et en fonction du style de vie et/ou des expositions aux toxiques, xénobiotiques ou stress (Dor et Cedar, 2018). Ainsi, chez les bovins, le méthylome des leucocytes circulants pourrait aussi être utilisé comme une image instantanée systémique reflétant la santé et l'historique de vie des individus. Le taux global de 5mC des leucocytes circulants augmente peu mais significativement au cours des deux premiers mois de lactation sans modification majeure des proportions des différentes sous-populations de cellules immunitaires (Gasselin *et al.*, 2020). Il est donc nécessaire de poursuivre une analyse fine de la distribution génomique

des modifications épigénétiques afin d'identifier les processus moléculaires en jeu et d'identifier des biomarqueurs du statut physiologique de la vache en lactation.

Récemment, Sevane *et al.* (2019) ont analysé le méthylome sanguin de races des nouveaux mondes (races des Amériques) et anciens mondes (3 races ibériques), en comparant des taureaux ibériques actuels à des taureaux créoles colombiens issus des fondateurs autrefois importés de la péninsule ibérique par Christophe Colomb. Les régions différentiellement méthylées entre races des nouveaux et anciens mondes sont associées à des gènes impliqués dans la réponse immune, le fonctionnement du système nerveux, le métabolisme énergétique, la résistance à la chaleur, la couleur de la peau et de la robe, suggérant une plasticité de ces fonctions et une adaptation aux conditions extrêmes. Cette étude pilote constitue un point de départ pour l'identification de biomarqueurs épigénétiques de la résilience, qu'il serait intéressant de comparer aux variations génétiques entre races.

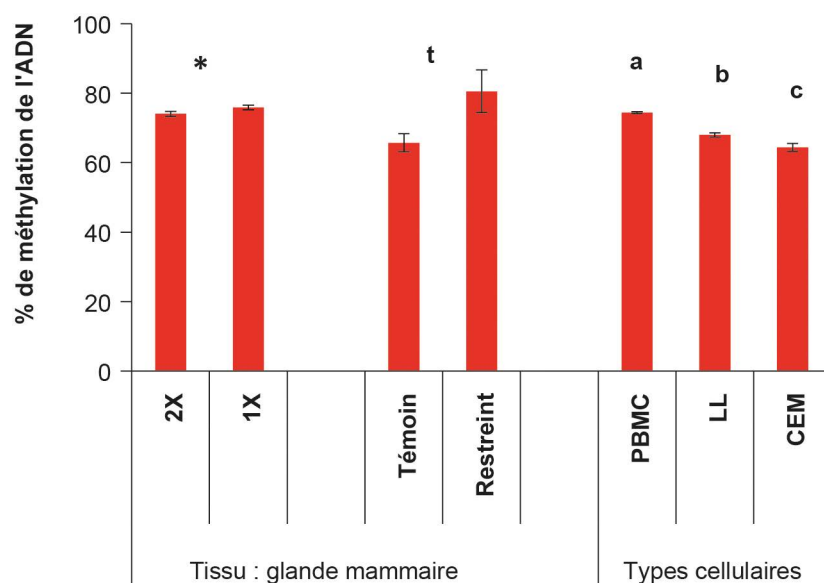
Ainsi, nous proposons d'explorer la variabilité épigénétique du système immunitaire comme nouveau phénotype de sélection des bovins, dans le but d'obtenir des animaux robustes et efficaces, pour lesquels les performances sont maintenues malgré des changements climatiques pouvant modifier la nature et la fréquence d'exposition aux pathogènes.

4. Production laitière

■ 4.1. Méthylation de l'ADN dans la glande mammaire

La glande mammaire est un organe qui subit des cycles de croissance, différenciation et régression au cours des périodes de puberté, gestation, lactation puis involution après le tarissement. Au cours de la lactation, la synthèse de lait par les cellules épithéliales mammaires est dépendante de l'expression de nombreux gènes ; des facteurs environnementaux liés à la conduite d'élevage (fréquence de traite,

Figure 6. Méthylation globale de l'ADN dans la glande mammaire et dans différents types cellulaires collectés au cours de 3 études chez la vache laitière.



Les tissus mammaires sont collectés chez des vaches primipares ($n = 7$) dont les mamelles sont traitées deux (2X) ou 1 fois (1X) par jour (Nguyen *et al.*, 2014) et chez des vaches multipares ($n = 7$) alimentées soit avec une ration couvrant 100 % de leur besoin (Témoins) soit avec une alimentation restreinte (Restreint) au cours des 11 premières semaines de lactation (Boutinaud *et al.*, 2016). Les leucocytes du sang (PBMC) et du lait (LL) et les cellules épithéliales mammaires du lait (CEM) sont collectés chez des vaches laitières primipares et multipares ($n = 24$) ; (Gasselín *et al.*, 2020). Les histogrammes représentent des moyennes par traitement \pm SEM. * pour $P < 0,05$; t pour $P = 0,07$ et a, b, c pour des valeurs significativement différentes, $P < 0,05$. De manière intéressante, les CEM et la glande mammaire présentent le même taux de méthylation globale.

alimentation) ou à la santé des animaux ont un impact sur cette expression ainsi que sur les niveaux de production de lait (Dessaige *et al.*, 2011 ; Boutinaud *et al.*, 2013). Des régulations épigénétiques pourraient également contribuer à la régulation de la production de lait. En effet, des études réalisées chez les rongeurs ou lagomorphes ont montré qu'une combinaison d'évènements épigénétiques (ouverture de la chromatine, formation de boucle de chromatine ancrée dans la matrice nucléaire, acétylation des histones, méthylation de l'ADN) à l'échelle globale ou au niveau de certains gènes intervient au cours du développement de la glande mammaire et sous-tend l'expression des gènes (Rijnkels *et al.*, 2010).

Dans la glande mammaire bovine, une région régulatrice distale en amont du gène de la caséine $\alpha 1$ (CSN1S1) est importante pour sa régulation en fonction du stade de développement ou de facteurs environnementaux. Cette région contient des sites de fixation du facteur de transcription STAT-5 impliqué dans la transduction du signal hormonal de la prolactine (Vanselow *et al.*, 2006).

Nous avons montré que cette région était moins méthylée pendant la lactation qu'à la puberté ou pendant la gestation, et que la réduction de la fréquence de traite à 1 traite par jour induisait une augmentation de la méthylation associée à une réduction de l'expression de CSN1S1. De manière intéressante, une augmentation de la méthylation globale dans les demi-mamelles qui produisent moins de lait après 1 traite par jour a également été observée (à ce stade, le tissu mammaire contient plus de 80 % des cellules épithéliales mammaires ; figure 6) (Nguyen *et al.*, 2014). Même si une tendance à une augmentation de la méthylation globale est observée, la méthylation et l'expression de CSN1S1 ne sont pas significativement affectées par une restriction alimentaire réalisée en début de lactation (ration à base de foin et d'ensilage d'herbe comparée à une ration à base d'ensilage de maïs et de luzerne déshydratée complémentée avec 30 % de concentré ; Dessaige *et al.*, 2011). La restriction alimentaire dans cette étude était pourtant responsable d'une baisse de 38 % de la production de lait et du taux de caséine K (Boutinaud *et al.*, 2016).

D'autres facteurs, comme l'état de santé de la mamelle, modifient ces marques épigénétiques. Une infection par *Escherichia coli* induit une augmentation de la méthylation de CSN1S1 et une condensation de la chromatine associée à une baisse d'expression (Vanselow *et al.*, 2006), tandis qu'une région située dans le gène CXCR1 codant une cytokine pro-inflammatoire et normalement hyperméthylée dans la glande mammaire saine, se trouve déméthylée en cas de mammite induite par *Staphylococcus aureus* (Mao *et al.*, 2015). Enfin, une étude a été réalisée chez des vaches clonées et des vaches témoins contemporaines, élevées dans les mêmes conditions, produisant sensiblement la même quantité de lait, mais de composition légèrement différente. Les vaches clonées comparées aux vaches témoins auraient un statut épigénétique particulier lié aux conséquences à long terme de la reprogrammation nucléaire. En effet, malgré un taux de 5meC similaire dans la glande mammaire, l'expression de DNMT1 est plus élevée chez les clones que chez les vaches témoins (Montazer-Torbati *et al.*, 2016).

■ 4.2. MicroARN dans la glande mammaire et le lait

a. miARN dans la glande mammaire

Chez le bovin, les premiers miRNomes mammaires ont été publiés à partir de 2012 (Li *et al.*, 2012b), permettant d'identifier de nouveaux miARN dont certains sont spécifiques de cette espèce (Le Guillou *et al.*, 2014). L'ensemble des miARN décrits chez les ruminants sont répertoriés dans la base de données spécifique RumimiR (Bourdon *et al.*, 2019). Des études portant sur la régulation de l'expression des miARN chez la vache laitière ont mis en évidence des miARN spécifiques du stade de lactation (Le Guillou *et al.*, 2014), des miARN dont l'expression diffère selon la race (Billa *et al.*, 2019) et l'alimentation (Mobuchon *et al.*, 2017).

Actuellement, les fonctions des miARN dans la glande mammaire bovine sont très peu décrites. Leurs modulations d'expression offrent des pistes d'investigation intéressantes

pour comprendre leur rôle dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le fonctionnement de la glande mammaire. Ainsi, miR-15a, miR-21-3p, miR-139 et miR-221 régulent l'expression de gènes impliqués dans la viabilité ou la prolifération des cellules épithéliales mammaires ; miR-16a, miR-21-3p, miR-27a, miR-34b, miR-130a, miR-181a, miR-224, miR-454 ciblent des gènes de la synthèse des triglycérides et du métabolisme des lipides du lait ; et miR-15a, miR-139, miR-486 ceux de la synthèse des caséines et autres constituants du lait. Les miARN de la glande mammaire ont aussi suscité un intérêt thérapeutique. Un ensemble de miARN ciblant le gène codant la β -lactoglobuline, un des allergènes majeurs du lait, a ainsi été utilisé pour produire un bovin transgénique sécrétant un lait mieux toléré (Jabed *et al.*, 2012).

b. miARN dans le lait

Les miARN sont présents dans les fluides biologiques, libres ou protégés dans des microvésicules ou par des protéines auxquelles ils sont associés. Les miARN sont des composants intrinsèques et stables du lait de vache, dont la majorité persiste après les procédés de transformation tels que la pasteurisation. Des miARN fortement représentés dans le lait total (Chen *et al.*, 2010) ou dans la fraction lipidique (Lago Novais *et al.*, 2016) pourraient ainsi constituer une source de biomarqueurs putatifs non-invasive et facilement exploitable. La comparaison des miRNomes du lait de vaches de race Holstein et Normande a montré que la proportion de certains miARN était différente dans ces deux races (Le Guillou *et al.*, 2019).

Des études sont encore nécessaires pour préciser les mécanismes d'action et les fonctions liées aux miARN du lait. La quantité de miARN absorbée par un consommateur de lait de vache semble en effet compatible avec une activité biologique (Baier *et al.*, 2014). De plus, les miARN bovins pourraient entrer dans les cellules mononucléaires périphériques et en affecter l'expression génique. Il a également été montré *in vitro* que les exosomes du lait bovin, porteurs de miARN, pouvaient entrer dans des cellules intestinales par endocytose (Wolf *et al.*, 2015). Cependant,

le transfert des miARN du lait et leur impact potentiel sur la santé du jeune ou du consommateur sont actuellement sujets de controverses. Par exemple, notre étude s'appuyant sur un modèle murin produisant un lait très enrichi en miR-30b n'a pas permis de montrer le transfert de celui-ci chez les petits nourris avec ce lait (Laubier *et al.*, 2015).

c. Impact des miARN sur la régulation des mécanismes épigénétiques

La surexpression de miR-152 dans des cellules épithéliales mammaires entraîne une forte diminution de l'expression de DNMT1 et du taux global de 5meC (Wang *et al.*, 2014), tandis que l'inhibition de l'expression de miR-29 provoque une augmentation de la méthylation des promoteurs des gènes liés à la biosynthèse des constituants du lait (Bian *et al.*, 2015). Par ailleurs, miR-29 et miR-148, qui sont présents dans la glande mammaire et le lait, répriment l'expression de DNMT3 et DNMT1, respectivement, et réduisent la méthylation de l'ADN chez l'Homme (Melnik et Schmitz, 2017).

d. Liens entre polymorphismes et miARN impliqués dans des caractères de production de lait

Plusieurs cas de polymorphismes de séquence pouvant perturber l'interaction miARN/ARNm et qui pourraient servir de marqueurs de sélection génomique ont été décrits chez les bovins. Par exemple, un polymorphisme dans le gène HMGB1 connu pour jouer un rôle majeur dans la réponse immune innée dans la glande mammaire, altère le site de fixation de miR-223-3p (Li *et al.*, 2012a). Les vaches présentant ce polymorphisme ont une expression plus forte de HMGB1 et seraient moins sensibles aux mammites. Les variants génétiques de miARN exprimés dans la glande mammaire pendant la lactation et qui sont localisés dans des QTL laitiers et des QTL de mammites ont été identifiés (Jiang *et al.*, 2019). L'impact de ces polymorphismes sur la fonction régulatrice de quelques miARN a été démontré *in vitro* très récemment (Bourdon *et al.*, 2020).

Conclusion

Bien que les recherches en épigénétique aient démarré plus tardivement chez les bovins que chez l'Homme ou les espèces modèles, leur nombre augmente de façon exponentielle si l'on en juge par le nombre de publications. À INRAE, la production de bovins clonés a été à la base de travaux pionniers en épigénétique. Le clonage, qui induit de la variabilité épigénétique à génome constant, a été et reste un très bon modèle pour faire la démonstration du rôle de l'épigénétique dans la construction du phénotype. Les exemples de travaux expérimentaux exposés dans cette revue, qu'ils s'appuient sur le clonage ou non, montrent que toutes les étapes de la construction du phénotype reposent sur des processus épigénétiques - y compris l'élaboration de caractères de production. Les potentialités d'utilisation des marques épigénétiques comme biomarqueurs sont nombreuses, en particulier pour la 5meC ou les miARN du sang, des cellules circulantes, de la semence et du lait.

Cette démonstration accomplie, comment franchir la distance qui sépare le laboratoire de la ferme ? Il faut désormais envisager les processus épigénétiques comme une des multiples sources de variabilité phénotypique pour généraliser une utilisation en élevage. Les bovins d'élevage possèdent en effet des génotypes variables et sont exposés à des environnements moins contrôlés que dans les fermes expérimentales d'instituts de recherche comme INRAE. Aujourd'hui, les génotypes peuvent être facilement déterminés : la technologie existe et est utilisée en routine en sélection génomique. L'impact de l'environnement est difficilement mesurable ; mais les variations épigénétiques peuvent justement refléter une partie des effets des facteurs environnementaux. L'estimation et la prise en compte des variations épigénétiques pourraient contribuer à diminuer la variance phénotypique non expliquée et ainsi améliorer la précision des estimations pour un certain nombre de caractères d'intérêt.

Des approches d'intelligence artificielle sont d'ores et déjà à l'étude pour intégrer l'ensemble des paramètres mesurables et améliorer ainsi la prédiction phénotypique. Les marques épigénétiques qui sont intégrées à ces modèles sont aujourd'hui mesurées avec des technologies « de laboratoire », trop coûteuses pour envisager une utilisation sur le terrain. En outre, la complexité et la multiplicité des marques épigénétiques potentiellement impliquées dans le contrôle des phénotypes rend impossible leur utilisation par des approches exhaustives. Nous anticipons qu'une étape impor-

tante vers l'élevage de précision sera franchie le jour où des technologies normées, permettant de quantifier les variations pour un sous-ensemble de marques épigénétiques, à moindre coût et en routine, pourront être déployées à grande échelle.

Remerciements

La majeure partie des travaux référencés et décrits dans ce texte ont été financés par APIS-GENE, l'ANR, l'Union Européenne, le Groupe Pilardière, le département PHASE et INRAE.

Les auteurs tiennent à remercier les membres de leurs équipes respectives, leurs collaborateurs ainsi que les entreprises de sélection Évolution, Umotest, Evajura, AWE, XR Repro. Les auteurs tiennent également à remercier tout particulièrement Jean-Paul Renard qui a été un précurseur concernant les recherches sur l'Épigénétique chez le bovin. Les données issues des travaux réalisés dans les laboratoires INRAE n'auraient pu être produites sans l'implication des personnels d'ALLICE, des plateformes et des unités et installations expérimentales. Qu'ils en soient ici remerciés.

Références

- Alfrey V.G., Mirsky A.E., 1964. Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Science*, 144, 559.
- Alvarez-Errico D., Vento-Tormo R., Sieweke M., Ballestar E., 2015. Epigenetic control of myeloid cell differentiation, identity and function. *Nat. Rev. Immunol.*, 15, 7-17.
- Ao X., Sa R., Wang J., Dao R., Wang H., Yu H., 2016. Activation-induced cytidine deaminase selectively catalyzed active DNA demethylation in pluripotency gene and improved cell reprogramming in bovine SCNT embryo. *Cytotechnology*, 68, 2637-2648.
- Baier S.R., Nguyen C., Xie F., Wood J.R., Zempen J., 2014. MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. *J. Nutr.*, 144, 1495-1500.
- Bayoumi A.S., Sayed A., Broskova Z., Teoh J.P., Wilson J., Su H., Tang Y.L., Kim I.M., 2016. Crosstalk between Long Noncoding RNAs and MicroRNAs in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 356.
- Beaujean N., 2018. Epigenetic features of animal biotechnologies. In: Niemann H., Wrenzycki C. (Eds). *Anim. Biotechnol.*, 2 Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92348-2_3
- Berger S.L., Kouzarides T., Shiekhattar R., Shilatifard A., 2009. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.*, 23, 781-783.
- Bian Y., Lei Y., Wang C., Wang J., Wang L., Liu L., Liu L., Gao X., Li Q., 2015. Epigenetic Regulation of miR-29s Affects the Lactation Activity of Dairy Cow Mammary Epithelial Cells. *J. Cell Physiol.*, 230, 2152-2163.
- Billa P.A., Faulconnier Y., Ye T., Chervet M., Le Provost F., Pires J.A.A., Leroux C., 2019. Deep RNA-Seq reveals miRNome differences in mammary tissue of lactating Holstein and Montbeliarde cows. *BMC Genomics*, 20, 621.
- Bissonnette N., Levesque-Sergerie J.P., Thibault C., Boissonneault G., 2009. Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: a potential tool to evaluate semen quality. *Reproduction*, 138, 65-80.
- Boichard D., Ducrocq V., Croiseau P., Fritz S., 2016. Genomic selection in domestic animals: Principles, applications and perspectives. *Comptes Rendus Biol.*, 339, 274-277.
- Boskovic A., Bender A., Gall L., Ziegler-Birling C., Beaujean N., Torres-Padilla M.E., 2012. Analysis of active chromatin modifications in early mammalian embryos reveals uncoupling of H2A.Z acetylation and H3K36 trimethylation from embryonic genome activation. *Epigenetics*, 7, 747-757.
- Bouquet A., Juga J., 2013. Integrating genomic selection into dairy cattle breeding programmes: a review. *Animal*, 7, 705-713.
- Bourdon C., Bardou P., Aujean E., Le Guillou S., Tosser-Klopp G., Le Provost F., 2019. RumimiR: a detailed microRNA database focused on ruminant species. *Database (Oxford)*, 2019.
- Bourdon C., Boussaha M., Sanchez M.P., Tribout T., Lefebvre R., Le Guillou S., Tosser-Klopp G., Le Provost F., 2020. Identification and characterization of microRNA genetic variants in dairy cattle, from their detection to the analysis of their biological impacts. In: *PAG XXVIII - Plant and Animal Genome Conference*. San Diego, USA.
- Boutinaud M., Gallo L., Lollivier V., Finot L., Wiart S., Esquerre D., Devinoy E., 2013. Unilateral once daily milking locally induces differential gene expression in both mammary tissue and milk epithelial cells revealing mammary remodeling. *Physiol Genomics*, 45, 973-985.
- Boutinaud M., Lollivier V., Dessauge F., Devinoy E., Singh K., 2016. Régulations épigénétiques et activation de la transcription lors d'une restriction alimentaire chez la vache laitière. In: *Journées d'Animation des Crédits Incitatifs du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage (JACI Phase 2016)*. Tours, France.
- Bushati N., Cohen S.M., 2007. microRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 23, 175-205.
- Byrne C.J., Fair S., English A.M., Cirot M., Staub C., Lonergan P., Kenny D.A., 2018. Plane of nutrition before and after 6 months of age in Holstein-Friesian bulls: I. Effects on performance, body composition, age at puberty, and postpubertal semen production. *J. Dairy Sci.*, 101, 3447-3459.
- Camargo L.S.A., Aguirre-Lavin T., Adenot P., Araujo T.D., Mendes V.R.A., Louro I.D., Beaujean N., Souza E.D., 2019. Heat shock during *in vitro* maturation induces chromatin modifications in the bovine embryo. *Reproduction*.
- Carrell D.T., 2012. Epigenetics of the male gamete. *Fertil. Steril.*, 97, 267-274.
- Chen X., Gao C., Li H., Huang L., Sun Q., Dong Y., Tian C., Gao S., Dong H., Guan D., Hu X., Zhao S., Li L., Zhu L., Yan Q., Zhang J., Zen K., Zhang C.Y., 2010. Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Res.*, 20, 1128-1137.
- Choudhry H., Catto J.W., 2011. Epigenetic regulation of microRNA expression in cancer. *Methods Mol. Biol.*, 676, 165-184.
- Chung N., Bogliotti Y.S., Ding W., Vilarino M., Takahashi K., Chitwood J.L., Schultz R.M., Ross P.J., 2017. Active H3K27me3 demethylation by KDM6B is required for normal development of bovine preimplantation embryos. *Epigenetics*, 12, 1048-1056.
- Dessauge F., Lollivier V., Ponchon B., Bruckmaier R., Finot L., Wiart S., Cutullic E., Disenhaus C., Barbey S., Boutinaud M., 2011. Effects of nutrient restriction on mammary cell turnover and mammary gland remodeling in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 94, 4623-4635.
- Doherty R., O'Farrelly C., Meade K.G., 2013. Epigenetic regulation of the innate immune response to LPS in bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 154, 102-110.
- Doherty R., Whiston R., Cormican P., Finlay E.K., Couldrey C., Brady C., O'Farrelly C., Meade K.G., 2016. The CD4(+) T cell methylome contributes to a distinct CD4(+) T cell transcriptional signature in *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Sci. Rep.*, 6, 31014.

- Dor Y., Cedar H., 2018. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet*, 392, 777-786.
- Fagerlind M., Stalhammar H., Olsson B., Klinga-Levan K., 2015. Expression of miRNAs in Bull Spermatozoa Correlates with Fertility Rates. *Reprod. Domest. Anim.*, 50, 587-594.
- Gasselin M., Boutinaud M., Prezelin A., Debournoux P., Fargetton M., Mariani E., Zawadzki J., Kiefer H., Jammes H., 2020. Effects of micronutrient supplementation on performance and epigenetic status in dairy cows. *Animal*, 1-10.
- Gkoutela S., Zhang K.X., Shafiq T.A., Liao W.W., Hargan-Calvopina J., Chen P.Y., Clark A.T., 2015. DNA Demethylation Dynamics in the Human Prenatal Germline. *Cell*, 161, 1425-1436.
- Govindaraju A., Uzun A., Robertson L., Atli M.O., Kaya A., Topper E., Crate E.A., Padbury J., Perkins A., Memili E., 2012. Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 10, 82.
- Green B.B., Kerr D.E., 2014. Epigenetic contribution to individual variation in response to lipopolysaccharide in bovine dermal fibroblasts. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 157, 49-58.
- Griffiths-Jones S., Saini H.K., van Dongen S., Enright A.J., 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.*, 36, D154-158.
- Guillomot M., Prezelin A., Champion E., Kiefer H., Beaujean N., Aguirre-Lavin T., Jammes H., 2014. Analysis of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine content and distribution in bovine placental and fetal tissues after somatic nuclear reprogramming. In: *Int. Fed. Placenta Assoc. Meet. Placenta* (Ed). Elsevier, Paris, France, A36-A37.
- Guo F., Yan L., Guo H., Li L., Hu B., Zhao Y., Yong J., Hu Y., Wang X., Wei Y., Wang W., Li R., Yan J., Zhi X., Zhang Y., Jin H., Zhang W., Hou Y., Zhu P., Li J., Zhang L., Liu S., Ren Y., Zhu X., Wen L., Gao Y.Q., Tang F., Qiao J., 2015. The Transcriptome and DNA Methylome Landscapes of Human Primordial Germ Cells. *Cell*, 161, 1437-1452.
- He Y., Song M., Zhang Y., Li X., Song J., Zhang Y., Yu Y., 2016. Whole-genome regulation analysis of histone H3 lysin 27 trimethylation in subclinical mastitis cows infected by *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics*, 17, 565.
- Heyman Y., 2005. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, 45, 353-361.
- Hill P.W.S., Leitch H.G., Requena C.E., Sun Z., Amouroux R., Roman-Trufero M., Borkowska M., Terragni J., Vaisvila R., Linnett S., Bagci H., Dharmalingham G., Haberle V., Lenhard B., Zheng Y., Pradhan S., Hajkova P., 2018. Epigenetic reprogramming enables the transition from primordial germ cell to gonocyte. *Nature*, 555, 392-396.
- Hussen J., Schuberth H.J., 2017. Heterogeneity of Bovine Peripheral Blood Monocytes. *Front. Immunol.*, 8, 1875.
- Jabed A., Wagner S., McCracken J., Wells D.N., Laible G., 2012. Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of beta-lactoglobulin-free, high-casein milk. *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A*, 109, 16811-16816.
- Jammes H., Gasselin M., Perrier J.P., Piumi F., Jouneau L., Al Adhami H., Prezelin A., Boutinaud M., Leroux C., Pires J., Weber M., Pount B., Jzawadzki J., Kiefer H., 2017. Methylation analysis in monocytes at post-partum period in dairy cattle. In: *PAG XXV - Plant and Animal Genome Conference*. San Diego, USA.
- Jenuwein T., 2006. The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J.*, 273, 3121-3135.
- Jiang Q., Zhao H., Li R., Zhang Y., Liu Y., Wang J., Wang X., Ju Z., Liu W., Hou M., Huang J., 2019. In silico genome-wide miRNA-QTL-SNPs analyses identify a functional SNP associated with mastitis in Holsteins. *BMC Genet.*, 20, 46.
- Jiang Z., Lin J., Dong H., Zheng X., Marjani S.L., Duan J., Ouyang Z., Chen J., Tian X.C., 2018. DNA methylomes of bovine gametes and *in vivo* produced preimplantation embryos. *Biol. Reprod.*, 99, 949-959.
- Junien C., Panchenko P., Fneich S., Pirola L., Chriest S., Amarger V., Kaeffer B., Parnet P., Torrisani J., Bolanos Jimenez F., Jammes H., Gabory A., 2016. Epigenetics in transgenerational responses to environmental impacts: from facts and gaps. *Med. Sci.*, 32, 35-44.
- Kiefer H., Perrier J.P., 2019. DNA methylation in bull spermatozoa: evolutionary impacts, interindividual variability, and contribution to the embryo. In: *Sci. C.J.o.A. (Ed), CSAS Symp. 2018 American Soc. Anim. Sci. (ASAS) and Canadian Soc. Anim. Sci. (CSAS) Annual Meeting and Trade Show*. NRC Research Press, Vancouver, Canada.
- Kiefer H., Jouneau L., Champion E., Rousseau-Ralliard D., Larcher T., Martin-Magniette M.L., Balzergue S., Ledevin M., Prezelin A., Chavatte-Palmer P., Heyman Y., Richard C., Le Bourhis D., Renard J.P., Jammes H., 2016. Altered DNA methylation associated with an abnormal liver phenotype in a cattle model with a high incidence of perinatal pathologies. *Sci. Rep.*, 6, 38869.
- Kouzarides T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128, 693-705.
- Lago Novais D., Pawlowski K., Pires J., Mobuchon L., Bes S., Leroux C., 2016. Milk fat globules as a source of mammary microRNA. In: *2016 JAM, Joint Ann. Meet., "Animals and Science: Big Solutions for Grand Challenges"*. Science J.o.A. (Ed). ASAS - Ame. Soc. Anim. Sci., Salt Lake City, USA, 401.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A., Meyer J., Lendeckel W., Tuschl T., 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.*, 12, 735-739.
- Lambert S., Blondin P., Vigneault C., Labrecque R., Dufort I., Sirard M.A., 2018. Spermatozoa DNA methylation patterns differ due to peripubertal age in bulls. *Theriogenology*, 106, 21-29.
- Landgraf P., Rusu M., Sheridan R., Sewer A., Iovino N., Aravin A., Pfeffer S., Rice A., Kamphorst A.O., Landthaler M., Lin C., Socci N.D., Hermida L., Fulci V., Chiaretti S., Foa R., Schliwka J., Fuchs U., Novosel A., Muller R.U., Schermer B., Bissels U., Inman J., Phan Q., Chien M., Weir D.B., Choksi R., De Vita G., Frezzetti D., Trompeter H.I., Hornung V., Teng G., Hartmann G., Palkovits M., Di Lauro R., Wernet P., Macino G., Rogler C.E., Nagle J.W., Ju J., Papavasiliou F.N., Benzing T., Lichter P., Tam W., Brownstein M.J., Bosio A., Borkhardt A., Russo J.J., Sander C., Zavolan M., Tuschl T., 2007. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 129, 1401-1414.
- Laubier J., Castille J., Le Guillou S., Le Provost F., 2015. No effect of an elevated miR-30b level in mouse milk on its level in pup tissues. *RNA Biol.*, 12, 26-29.
- Le Guillou S., Marthey S., Laloe D., Laubier J., Mobuchon L., Leroux C., Le Provost F., 2014. Characterisation and comparison of lactating mouse and bovine mammary gland miRNomes. *PLoS One*, 9, e91938.
- Le Guillou S., Leduc A., Laubier J., Barbey S., Rossignol M.N., Lefebvre R., Marthey S., Laloe D., Le Provost F., 2019. Characterization of Holstein and Normande whole milk miRNomes highlights breed specificities. *Sci. Rep.*, 9, 20345.
- Li L., Huang J., Zhang X., Ju Z., Qi C., Zhang Y., Li Q., Wang C., Miao W., Zhong J., Hou M., Hang S., 2012a. One SNP in the 3'-UTR of HMGB1 gene affects the binding of target bta-miR-223 and is involved in mastitis in dairy cattle. *Immunogenetics*, 64, 817-824.
- Li Z., Liu H., Jin X., Lo L., Liu J., 2012b. Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. *BMC Genomics*, 13, 731.
- Ly L., Chan D., Trasler J.M., 2015. Developmental windows of susceptibility for epigenetic inheritance through the male germline. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 43, 96-105.
- Lyko F., 2018. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat. Rev. Genet.*, 19, 81-92.
- Mandon-Pépin B., Allais-Bonnet A., André M., Calvel P., Sellem E., Le Danvic C., Prézélin A., Jammes H., Pailhoux E., Kiefer H., Pannetier M., 2017. Epigenetic reprogramming in the male germ cells of ruminants. In: *France Japan Epigenetics Workshop*. Paris, France.
- Mao Y.J., Zhu X.R., Li R., Chen D., Xin S.Y., Zhu Y.H., Liao X.X., Wang X.L., Zhang H.M., Yang Z.P., Yang L.G., 2015. Methylation analysis of CXCR1 in mammary gland tissue of cows with mastitis induced by *Staphylococcus aureus*. *Genet. Mol. Res.*, 14, 12606-12615.
- Melnik B.C., Schmitz G., 2017. MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators. *Best Pract Res Clin Endocrinol. Metab.*, 31, 427-442.
- Mobuchon L., Le Guillou S., Marthey S., Laubier J., Laloe D., Bes S., Le Provost F., Leroux C., 2017. Sunflower oil supplementation affects the expression of miR-20a-5p and miR-142-5p in the lactating bovine mammary gland. *PLoS One*, 12, e0185511.

- Montazer-Torbati F., Boutinaud M., Brun N., Richard C., Neveu A., Jaffrezic F., Laloe D., LeBourhis D., Nguyen M., Chadi S., Jammes H., Renard J.P., Chat S., Boukadiri A., Devinoy E., 2016. Differences during the first lactation between cows cloned by somatic cell nuclear transfer and noncloned cows. *J. Dairy Sci.*, 99, 4778-4794.
- Monteys A.M., Spengler R.M., Wan J., Tecedor L., Lennox K.A., Xing Y., Davidson B.L., 2010. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA*, 16, 495-505.
- Mujtaba S., Zeng L., Zhou M.M., 2007. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene*, 26, 5521-5527.
- Nguyen M., Boutinaud M., Petridou B., Gabory A., Pannetier M., Chat S., Bouet S., Jouneau L., Jaffrezic F., Laloe D., Klopp C., Brun N., Kress C., Jammes H., Charlier M., Devinoy E., 2014. DNA methylation and transcription in a distal region upstream from the bovine AlphaS1 casein gene after once or twice daily milking. *PLoS One*, 9, e111556.
- Nishibuchi G., Dejardin J., 2017. The molecular basis of the organization of repetitive DNA-containing constitutive heterochromatin in mammals. *Chromosome Res.*, 25, 77-87.
- O'Doherty A.M., O'Shea L.C., Fair T., 2012. Bovine DNA methylation imprints are established in an oocyte size-specific manner, which are coordinated with the expression of the DNMT3 family proteins. *Biol. Reprod.*, 86, 67.
- O'Doherty A.M., Rue-Albrecht K.C., Magee D.A., Ahting S., Irwin R.E., Hall T.J., Browne J.A., Nalpas N.C., Walsh C.P., Gordon S.V., Wojewodzic M.W., MacHugh D.E., 2019. The bovine alveolar macrophage DNA methylome is resilient to infection with *Mycobacterium bovis*. *Sci. Rep.*, 9, 1510.
- Perrier J.P., Kenny D.A., Chaulot-Talmon A., Byrne C.J., Sellem E., Jouneau L., Aubert-Frambourg A., Schibler L., Jammes H., Lonergan P., Fair S. and Kiefer H., 2020. Accelerating onset of puberty through modification of early life nutrition induces modest but persistent changes in bull sperm DNA methylation profiles post-puberty. *Front. Genet.*, 11, 945.
- Perrier J.P., Sellem E., Jouneau L., Boussaha M., Hozé C., Fritz S., Aubert-Frambourg A., Le Danvic C., Boichard D., Schibler L., Jammes H., Kiefer H., 2019. Genetic and non-genetic factors determine DNA methylation patterns in bull sperm. In: Annual meeting of the European Association for Animal Production (EAAP). (EAAP) E.F.o.A.S. (Ed), Ghent, Belgium, 48.
- Perrier J.P., Sellem E., Prezelin A., Gasselin M., Jouneau L., Piumi F., Al Adhami H., Weber M., Fritz S., Boichard D., Le Danvic C., Schibler L., Jammes H., Kiefer H., 2018. A multi-scale analysis of bull sperm methylome revealed both species peculiarities and conserved tissue-specific features. *BMC Genomics*, 19, 404.
- Pichugin A., Le Bourhis D., Adenot P., Lehmann G., Audouard C., Renard J.P., Vignon X., Beaujean N., 2010. Dynamics of constitutive heterochromatin: two contrasted kinetics of genome restructuring in early cloned bovine embryos. *Reproduction*, 139, 129-137.
- Radford E.J., Ito M., Shi H., Corish J.A., Yamazawa K., Isganaitis E., Seisenberger S., Hore T.A., Reik W., Erkek S., Peters A., Patti M.E., Ferguson-Smith A.C., 2014. In utero effects. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. *Science*, 345, 1255903.
- Rijnkels M., Kabotyanski E., Montazer-Torbati M.B., Hue Beauvais C., Vassetzky Y., Rosen J.M., Devinoy E., 2010. The epigenetic landscape of mammary gland development and functional differentiation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 15, 85-100.
- Ross P.J., Sampaio R.V., 2018. Epigenetic remodeling in preimplantation embryos: cows are not big mice. In: *Reproduction A.* (Ed), 32nd Ann. Meet. Brazilian Embryo Technol. Soc. (SBTE), Florianópolis, Brazil, 204-2014.
- Schubeler D., 2015. Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 517, 321-326.
- Seisenberger S., Andrews S., Krueger F., Arand J., Walter J., Santos F., Popp C., Thienpont B., Dean W., Reik W., 2012. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol. Cell.*, 48, 849-862.
- Sellem E., Marthey S., Rau A., Jouneau L., Bonnet A., Perrier J.P., Fritz S., Le Danvic C., Boussaha M., Kiefer H., Jammes H., Schibler L., 2020. A comprehensive overview of bull sperm-borne small non-coding RNAs and their diversity across breeds. *Epigenetics Chromatin*, 13, 19.
- Sevane N., Martinez R., Bruford M.W., 2019. Genome-wide differential DNA methylation in tropically adapted Creole cattle and their Iberian ancestors. *Anim. Genet.*, 50, 15-26.
- Stinshoff H., Wilkening S., Hanstedt A., Bruning K., Wrenzycki C., 2011. Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*, 76, 1433-1441.
- Takeda K., Kobayashi E., Nishino K., Imai A., Adachi H., Hoshino Y., Iwao K., Akagi S., Kaneda M., Watanabe S., 2019. Age-related changes in DNA methylation levels at CpG sites in bull spermatozoa and *in vitro* fertilization-derived blastocyst-stage embryos revealed by combined bisulfite restriction analysis. *J. Reprod. Dev.*, 65, 305-312.
- Vanselow J., Yang W., Herrmann J., Zerbe H., Schubert H.J., Petzl W., Tomek W., Seyfert H.M., 2006. DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the alphaS1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of alphaS1-casein synthesis during acute mastitis. *J. Mol. Endocrinol.*, 37, 463-477.
- Wang J., Bian Y., Wang Z., Li D., Wang C., Li Q., Gao X., 2014. MicroRNA-152 regulates DNA methyltransferase 1 and is involved in the development and lactation of mammary glands in dairy cows. *PLoS One*, 9, e101358.
- Weber J.A., Baxter D.H., Zhang S., Huang D.Y., Huang K.H., Lee M.J., Galas D.J., Wang K., 2010. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.*, 56, 1733-1741.
- Wolf T., Baier S.R., Zempen J., 2015. The Intestinal Transport of Bovine Milk Exosomes Is Mediated by Endocytosis in Human Colon Carcinoma Caco-2 Cells and Rat Small Intestinal IEC-6 Cells. *J. Nutr.*, 145, 2201-2206.
- Wu X., Zhang Y., 2017. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat. Rev. Genet.*, 18, 517-534.

Résumé

En élevage bovin, une part importante de la variance phénotypique échappe à la sélection génétique, car l'expression des gènes qui contrôlent les caractères d'intérêt est déterminée par des facteurs à la fois génétiques et environnementaux. Une meilleure maîtrise des mécanismes épigénétiques, qui traduisent l'impact environnemental au niveau du génome, permettrait ainsi de mieux contrôler le phénotype des animaux. Dans cette revue, nous décrivons brièvement les processus épigénétiques, puis nous évoquons, à travers plusieurs exemples principalement issus de travaux menés à INRAE, le rôle majeur de l'épigénome dans la construction du phénotype chez le bovin. Nous mentionnons en particulier la façon dont certains facteurs environnementaux modifient les marques épigénétiques, ce qui entraîne des effets variables sur les caractères de fertilité, de développement, de santé et de production laitière. Le potentiel d'utilisation de marqueurs épigénétiques dans le cadre d'un élevage de précision et en complément des analyses d'association entre génotype et phénotype menées en sélection génomique est également discuté.

Abstract

Epigenetics and the elaboration of phenotype in cattle

In cattle breeding and farming, epigenetic mechanisms are regarded as a potential source of phenotypic variance unaccounted by genetic selection and could be used to better control the environmental impact on the genetic potential of animals. In this review, we briefly describe epigenetic processes, and address, from research studies mainly conducted at INRAE, the major role of epigenetic factors in the elaboration of phenotype in cattle. Focus is given to environmental factors shaping the epigenome, leading to variable effects on fertility, development, health and dairy production. The potential for using epigenetic markers in precision farming and as a complementary approach to genomic selection is also discussed.

BEAUJEAN N., BOUTINAUD M., DEVINOY È., JAMME H., LE GUILLOU S., LE PROVOST F., LEROUX C., MOBUCHON L., PANNETIER M., SELLEM E., KIEFER H., 2020. L'épigénétique et la construction du phénotype chez le bovin. INRAE Prod. Anim, 33, 109-124.

<https://doi.org/10.20870/productions-animales.2020.33.2.4477>



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY 4.0).

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.fr>

La citation comme l'utilisation de tout ou partie du contenu de cet article doit obligatoirement mentionner les auteurs, l'année de publication, le titre, le nom de la revue, le volume, les pages et le DOI en respectant les informations figurant ci-dessus.