

## La monotraite induit la méthylation d'une région régulatrice distale en amont du gène de la caséine- $\kappa$ S1

NGUYEN M. (1), BOUTINAUD M. (2), PETRIDOU B. (1), CHAT S. (1), BOUET S. (3), LALOE D. (3), JAFFREZIC F. (3), GABORY A. (4), KRESS C. (1), GALIO L. (1), CHARLIER M. (1), PANNETIER M. (4), KLOPP C. (5), JAMMES H. (4), DEVINOY E. (1)

(1) INRA, UR1196, Génomique et Physiologie de la Lactation, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas

(3) INRA, UMR1313, Génétique Animale et Biologie Intégrative, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas

(4) INRA, UMR1198, Biologie du Développement et de la Reproduction, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas

(5) INRA, Plateforme bioinformatique Genotoul, UR875 Biométrie et Intelligence Artificielle, 31325 Castanet-Tolosan

### RESUME

La fréquence de traite induit des modulations à plus ou moins long terme de la production laitière, en régulant la synthèse et la sécrétion des produits du lait. Cette régulation fait appel à des variations d'expression d'un certain nombre de gènes. Nous avons émis l'hypothèse que cette variation de l'expression des gènes, notamment après une période de monotraite, pouvait être induite via une modification de la méthylation de l'ADN au niveau de régions régulatrices distales des gènes. Afin de tester cette hypothèse, nous avons choisi d'étudier la variation de méthylation de l'ADN au niveau d'une région distale du gène de la caséine- $\kappa$ S1 (*CSN1S1*). Nos résultats montrent que la monotraite induit une méthylation globale de l'ADN génomique avec une méthylation ponctuelle d'une région régulatrice distale du gène *CSN1S1*. Ces modifications, de nature épigénétique, peuvent expliquer les modulations de production laitière induites à long terme par la monotraite.

## Once daily milking induces the methylation of a distal regulatory region located upstream from the $\kappa$ s1 casein gene

NGUYEN M. (1), BOUTINAUD M. (2), PETRIDOU B. (1), CHAT S. (1), BOUET S. (3), LALOE D. (3), JAFFREZIC F. (3), GABORY A. (4), KRESS C. (1), GALIO L. (1), CHARLIER M. (1), PANNETIER M. (4), KLOPP C. (5), JAMMES H. (4), DEVINOY E. (1)

(1) INRA, UR1196, Génomique et Physiologie de la Lactation, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas

### SUMMARY

Milking frequency induces long term variations in milk production that are mediated by a regulation of milk product synthesis and secretion. In turn, these variations are related to the regulated expression of several genes. We hypothesized that this regulation, in particular after once daily milking, could be mediated by a variation in DNA methylation profiles of distal regulatory regions of genes involved in milk synthesis and secretion, as already frequently described in other models. In order to challenge this hypothesis, we studied the variation in the methylation profile of a distal regulatory region of the  $\kappa$ s1-casein gene (*CSN1S1*). The results show that once daily milking induces a global methylation of genomic DNA and a higher methylation level of the distal *CSN1S1* regulatory region. These epigenetic modifications can explain some long lasting effects induced by once daily milking.

## INTRODUCTION

La fréquence de traite induit des modulations de la production laitière, à plus ou moins long terme, en régulant la synthèse et la sécrétion des produits du lait (Rémond et Pomies, 2007). Ces régulations peuvent être médiées par un effet systémique lié à des variations hormonales induites lors de la traite ou/et par un effet local induit par l'accumulation de lait dans la mamelle. En particulier, la monotraite peut induire une inflammation modérée du tissu mammaire (Davis et Stelwagen, 1999). Les effets systémiques et locaux peuvent toutefois être dissociés lors d'une monotraite unilatérale d'une demi-mamelle alors que la demi-mamelle contra latérale est traite deux fois par jour (Boutinaud *et al.*, 2013).

La baisse de la production laitière est associée à une régulation de l'expression d'un certain nombre de gènes dans la glande mammaire, notamment après une période de monotraite unilatérale (Boutinaud *et al.*, 2013). Lors d'une inflammation plus importante du tissu mammaire induite par une mammite dans un quartier de mamelle, la baisse importante de production laitière observée est également associée à une diminution des transcrits de la caséine- $\alpha$ S1 (CSN1S1). Il a de plus été montré que cette diminution des transcrits CSN1S1 est elle-même due à une méthylation plus importante d'une région régulatrice distale du gène CSN1S1 (Vanselow *et al.*, 2006, Singh *et al.*). Nous avons émis l'hypothèse que la modulation de l'expression des gènes après une période de monotraite, pouvait être induite par une modification similaire de la méthylation de l'ADN au niveau de régions régulatrices distales des gènes impliqués dans la synthèse des produits du lait. Afin de tester cette hypothèse, nous avons choisi d'étudier la variation de méthylation de l'ADN au niveau de la région distale du gène CSN1S1, déjà décrite par Vanselow *et al.* (2006), après une semaine de monotraite unilatérale, par comparaison avec l'état de méthylation de la même région dans la demi-mamelle contra latérale, traite deux fois par jour. Ce modèle présente l'avantage de comparer les modifications épigénétiques chez un même animal, donc dans un contexte génétique identique soumis aux mêmes paramètres environnementaux à l'exception de la fréquence de traite.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1 ANIMAUX ET DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Huit génisses Prim'Holstein en première lactation, habituellement traites deux fois par jour, ont été étudiées entre le 53<sup>ème</sup> et le 74<sup>ème</sup> jour de lactation au cours de trois périodes d'une semaine. Période 1 (P1) : deux traites par jour des deux demi-mamelles de chaque génisse. Période 2 (P2) : traite différentielle des deux demi-mamelles : deux fois par jour pour la demi-mamelle droite et une fois par jour pour la demi-mamelle gauche. Période 3 (P3) : retour à deux traites par jour pour les deux demi-mamelles.

### 1.2 EVALUATION DE LA PRODUCTION LAITIERE

La quantité de lait produite a été évaluée pour chaque demi-mamelle, chaque jour pendant les 5 premiers jours de P1, tous les jours en P2 et au 3<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> jours de P3.

### 1.3 PRELEVEMENT DE BIOPSIES MAMMAIRES

Des biopsies ont été prélevées sur le quartier arrière de chaque demi-mamelle à la fin de la période 2 selon le protocole utilisé précédemment (Boutinaud *et al.*, 2013). Des aliquots de ces biopsies ont été fixés, colorés à l'hématoxyline et à l'éosine puis observés à divers grossissements (Hamamatsu Nanozoomer) comme indiqué précédemment (Galio *et al.*, 2013) afin de vérifier la représentativité de l'échantillon prélevé en tissu mammaire. L'effet de la monotraite sur la morphologie du tissu a

également été évalué par observation en microscopie électronique.

### 1.4 ANALYSE DES BIOPSIES

Dans les biopsies représentatives du tissu mammaire, les profils des ARNm et des ARN non codants, le profil global de méthylation de l'ADN au niveau des séquences cytosine-guanine (CpG) ainsi que celui plus précis de la région régulatrice considérée, au niveau de quatre séquences CpG particulières, ont été déterminés. Les techniques utilisées pour cela ont été le RNASeq, le pyroséquençage de l'ADN génomique, ou son clonage et son séquençage, après traitement au bisulfite (Nguyen *et al.*, en préparation).

### 1.5 ANALYSES STATISTIQUES

Les différences de niveau de production laitière ont été évaluées avec une analyse de variance (ANOVA), en utilisant la production laitière moyenne en P1 comme covariable, les différences entre les niveaux de transcrits ont été évaluées avec l'extension DESeq2 (version 1.0.0.) du software Bioconductor/R (version 3.0.3) (Anders et Huber, 2010). Les différences de méthylation de l'ADN ont été testées avec une ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey. Lorsque les p-values sont inférieures à 0.05, les différences ont été considérées comme significatives. Lorsque les p-values sont comprises entre 0.05 et 0.10, les variations peuvent être considérées comme tendant à être différentes.

## 2. RESULTATS

### 2.1 EFFET DE LA MONOTRAITE SUR LA PRODUCTION LAITIERE.

La monotraite d'une demi-mamelle (P2) induit une baisse de production laitière dans cette demi-mamelle alors que la production de la mamelle contra latérale n'est pas affectée. La différence de production laitière entre les deux demi-mamelles est alors de 6 kg/jour ( $p < 0,001$ ). Au retour à deux traites par jour (P3), la production de lait de la demi-mamelle ayant subi la monotraite est toujours significativement moindre par rapport à celle de la demi-mamelle contra latérale (1,1 kg/jour,  $P < 0,001$ ).

### 2.2 EFFET DE LA MONOTRAITE SUR LA MORPHOLOGIE DU TISSU MAMMAIRE

La morphologie globale du tissu mammaire (masse du tissu sécréteur et organisation des acini) n'est pas profondément remaniée entre les demi-mamelles traites une ou deux fois par jour. Toutefois des différences sont observées pour certains animaux notamment concernant l'abondance et la taille de gouttelettes lipidiques intracellulaires, sans qu'il soit possible de généraliser ces conclusions à l'ensemble des animaux.

### 2.3. EFFET DE LA MONOTRAITE SUR L'EXPRESSION DU GENE CSN1S1

La baisse de production laitière dans les demi-mamelles traites une fois par jour au cours de P2, est associée à une diminution significative dans ces demi-mamelles du nombre de certains transcrits qui codent pour les gènes des protéines du lait. Par exemple, le nombre de ceux qui codent pour les caséines (CSN1S1, CSN1S2, CSN2, CSN3) est réduit de façon plus ou moins significative selon les évaluations statistiques (p-value ajustée, respectivement :  $p = 0,096$  ;  $p = 0,065$  ;  $p = 0,029$  ;  $p = 0,078$ ) de 50 %.

### 2.4 EFFET DE LA MONOTRAITE SUR LA METHYLATION DE L'ADN

Le niveau global de méthylation de l'ADN, au niveau des séquences CpG, augmente dans les demi-mamelles soumises à la monotraite (P2) pour atteindre 75,9 %, par rapport aux demi-mamelles contra latérales (74,6 %), mais la différence n'est significative ( $P = 0,04$ ) que si on exclut une vache pour laquelle la qualité de la biopsie est remise en

question. Cette variation de méthylation de l'ADN est nettement plus marquée quand on l'étudie au niveau d'une région régulatrice distale du gène *CSN1S1*, choisie comme marqueur des effets de la monotraite. Deux des quatre séquences CpG étudiées sont plus fréquemment méthylées après une semaine de monotraite ( $P=0,02$ ).

**Vanselow J., Yang W., Herrmann J., Zerbe H., Schubert H.J., Petzl W., Tomek W., Seyfert H.M. 2006.** J. Mol. Endocrinol., 37, 463-77.

## CONCLUSION

La monotraite induit une méthylation globale de l'ADN génomique avec une méthylation ponctuelle de deux séquences CpG qui sont présentes dans une région régulatrice distale du gène *CSN1S1*. Ces modifications de nature épigénétique peuvent expliquer une baisse de transcription du gène *CSN1S1* et ainsi la plus faible accumulation observée pour ces transcrits dans les biopsies mammaires en fin de période P2. Des effets semblables pourraient affecter d'autres régions régulatrices du même gène mais aussi les régions régulatrices d'autres gènes des protéines du lait. Les profils de méthylation des régions régulatrices de ces gènes pourraient ainsi être utilisés non seulement comme des marqueurs à court terme de l'inflammation et des mammites (Singh *et al.*, 2012) mais également comme marqueurs des fréquences de traite auxquels l'animal a été soumis. Par ailleurs, la méthylation de l'ADN, qui induit dans le cas présent une baisse de l'expression du gène de la *CSN1S1* et une baisse de la production laitière, est considérée comme une marque épigénétique stable dans la plupart des tissus différenciés bien qu'un mécanisme de déméthylation ait été décrit dans l'embryon et certains tissus différenciés (Guo *et al.*, 2011 ; Kangaspeska *et al.*, 2008 ; Métivier *et al.*, 2008 ; Saito *et al.*, 2012). Une plus forte méthylation de régions régulatrices ou promotrices de gènes peut donc induire des effets à long terme. Ce mécanisme pourrait expliquer les effets rémanents au fil de la lactation en cours, après une semaine de monotraite intervenant lors du pic de lactation, notamment chez des primipares. Par contre, cette marque épigénétique peut être effacée lors des divisions cellulaires qui accompagnent notamment le remodelage du tissu mammaire entre deux lactations et cette déméthylation pourrait expliquer le faible impact déjà décrit, de la monotraite sur la lactation suivante (Rémond et Pomies, 2007).

*Ce travail a été financé par l'ANR et Apis-Gene (projet EpigRAni) ainsi que par un crédit incitatif INRA du département PHASE.*

**Anders S, Huber W. 2010.** Genome Biol., 11, R106.

**Boutinaud M., Galio L., Lollivier V., Finot L., Wiart S., Esquerré D., Devinoy E. 2013.** Physiol. Genomics, (doi:10.1152/physiolgenomics.00059.2013).

**Davis S.R.F., Stelwagen K. 1999.** Livest. Prod. Sci., 59, 77-94.

**Galio L., Droineau S., Yeboah P., Boudiaf H., Bouet S., Truchet S., Devinoy E. 2013.** Physiol Genomics, 45, 151-161.

**Guo J.U., Su Y., Zhong C., Ming G.L., Song H. 2011.** Cell, 145, 423-434.

**Kangaspeska S, Stride B, Metivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche R. P., Benes V., Gannon F., Reid G. 2008.** Nature, 452, 112-115.

**Metivier R., Gallais R., Tiffoche C., Le Peron C., Jurkowska R.Z. Carmouche R. P., Ibberson D., Barath P., Demay F., Reid G., Benes V., Jeltsch A., Gannon F., Salbert G. 2008.** Nature, 452, 45-50.

**Rémond R., Pomiès D. 2007.** Livest. Sci., 110, 192-195.

**Saitou M., Kagiwada S., Kurimoto K. 2012.** Development, 139, 15-31

**Singh K., Molenaar A.J., Swanson K.M., Gudex B., Arias J.A., Erdman R.A., Stelwagen K. 2012.** Animal, 6, 375-81.

