

Conséquences des biotechnologies de la reproduction : Modifications épigénétiques au cours du développement embryonnaire précoce chez le bovin.

Consequences of advanced embryo technologies : Epigenetic modifications during bovine early embryonic development.

BONNET-GARNIER A. (1,2), GALL L. (1,2), LAFFONT L. (1,2), RUFFINI S. (1,2), LE BOURHIS D. (1,2,3), LELIEVRE J.M. (1,2), ADENOT P. (1,2), BEAUJEAN N. (1,2).

(1) INRA UMR 1198 Biologie du Développement et reproduction, F-78350 Jouy en Josas, France

(2) ENVA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy en Josas, France

(3) UNCEIA Département R&D, 13, rue Jouet, 94703 Maisons-Alfort Cedex, France

INTRODUCTION

Les biotechnologies de la reproduction comportant l'insémination artificielle et le transfert d'embryons mais aussi la production *in vitro* d'embryons sont classiquement utilisées en race bovine afin de diffuser le progrès génétique et d'améliorer les rendements du schéma de sélection.

Le développement embryonnaire préimplantatoire est une période critique associée à de nombreuses modifications du patron d'expression des gènes. De nombreuses études (Mason et al., 2012) ont démontré que ces différents changements de profil d'expression (reprogrammation) sont gouvernés par des mécanismes épigénétiques. D'autre part, il est maintenant admis que l'apposition de marques épigénétiques sur la chromatine (méthylation de l'ADN, acétylation et méthylation des histones) participe à l'adaptation d'un organisme aux variations de l'environnement (Jaenisch R. & Bird A., 2003). Or les manipulations des ovocytes et des embryons *in vitro* sont des éléments perturbant leur environnement. Notre objectif est de déterminer dans quelle mesure ces modifications affectent l'établissement des marques épigénétiques au cours du développement embryonnaire précoce et quelles seront les conséquences sur le phénotype adulte.

1. MATERIEL ET METHODES

Les ovocytes sont récoltés par aspiration à partir d'ovaire d'abattoirs et maturés *in vitro* pendant 22h puis (a) fécondés *in vitro* (FIV) (b) énucléés et utilisés pour le transfert de noyau (fibroblaste). Les embryons sont cultivés *in vitro* dans 50 µl de SOF (Synthetic oviductal fluid) supplémenté en SVE (sérum de vache en oestrus) et BSA puis fixés dans du paraformaldéhyde 4% aux différents stades étudiés. L'immunomarquage est réalisé par incubation avec des anticorps primaires reconnaissant spécifiquement l'histone H2Ax phosphorylée (γ H2AX, Cell Signaling 20E3), l'H3K9me3 (Upstate 07-523) ou H3K27me3 (Upstate 07-449) et des anticorps secondaires fluorescents. Les embryons sont ensuite observés avec un microscope inversé (Apotome Zeiss Axiovert 200M) de la plateforme d'imagerie du centre de Jouy-en-Josas (MIMA2).

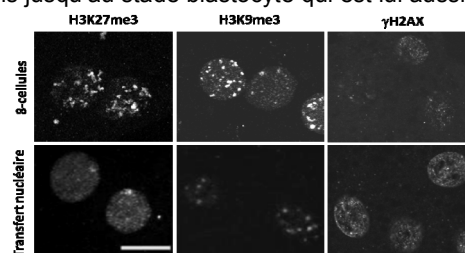
2. RESULTATS

Très peu d'études ayant été réalisées chez le bovin (Breton et al., 2010), nous avons dans un premier temps, examiné la distribution dans le noyau de différentes marques épigénétiques : l'histone 3 méthylée (H3K9me3 et H3K27me3) et un variant de l'histone 2A (γ H2A.x) par immunofluorescence en condition normale de culture puis dans un deuxième temps en utilisant la technique de transfert de noyau ou en modifiant les conditions de culture : (1) privation en sérum et (2) choc de température (10°C ou 42°C pendant 30 min).

2.1. DISTRIBUTION DES MARQUES EPIGENETIQUES APRES TRANSFERT NUCLEAIRE

Nous avons observés après transfert de noyau de cellule somatique que la distribution de ces marques est dans 50% des cas très différente de celle observée dans les noyaux

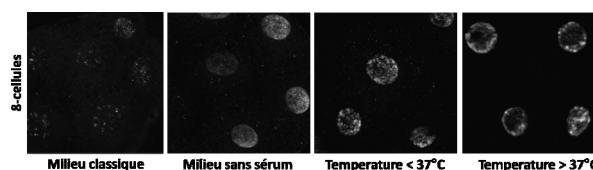
d'embryons obtenus par FIV (figure ci-après). Ainsi, la distribution de H3K27me3 est localisée sur le X inactif comme en cellule somatique après transfert nucléaire alors qu'elle est dispersée dans le noyau d'embryons normaux. La distribution sous forme de spots nucléaires d'H3K9me3 reflète un patron « somatique » mais celle de γ H2A.x est plus intense. Enfin, ces distributions anormales pourraient être corrélées avec le taux d'échec de développement des embryons jusqu'au stade blastocyte qui est lui aussi de 50%.



2.2. EFFET DE MODIFICATIONS DES CONDITIONS DE CULTURE

Nous avons ensuite déterminé la présence de γ H2A.x lorsque les conditions de culture varient afin de déterminer si cette marque pouvait être utilisée comme « indicateur » de l'effet de la culture *in vitro* sur la qualité de l'embryon ; cette marque étant apposée lors de réparation de l'ADN.

Au cours du développement embryonnaire précoce chez le bovin, la distribution du variant d'histone γ H2A.x est sous forme de spots nucléaires discrets (figure ci-dessous, exemples au stade 8 cellules). Lors de modifications importantes des conditions de culture (milieu appauvri, choc de température), on observe un marquage beaucoup plus intense de γ H2A.x dans les noyaux des blastomères attestant probablement de modifications de l'intégrité de l'ADN.



3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Ces premiers résultats montrent clairement que les conditions de culture ont un impact sur la distribution des marques épigénétiques et que γ H2A.x est un marqueur tout à fait pertinent. Toute fois nos connaissances sur les conséquences de ces perturbations, notamment sur le succès du développement embryonnaire chez le bovin sont encore trop parcellaires. Nous devons donc acquérir des données supplémentaires sur la distribution des marques épigénétiques chez le bovin et étudier l'influence des conditions de culture sur le taux de développement.

Mason K. et al., 2012. Anim. Reprod. Sci. 134, 45-55.

Jaenisch R, Bird A. 2003. Nat Genet. 33, 245-54.

Breton A. et al., 2010. J Reprod Dev. 2010 56, 379-88.