

Pourquoi l'épigénétique est important pour les producteurs laitiers – Les altérations de la méthylation de l'ADN sont impliquées dans la mammite sous-clinique bovine

Mengqi Wang^{1,2}, Mario Laterrière³, Pier-Luc Dudemaine¹, Nathalie Bissonnette¹, David Gagné³, Jean-Philippe Roy⁴, Marc-André Sirard², Xin Zhao⁵, Eveline M. Ibeagha-Awemu^{1*}

¹Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de Recherche et de Développement de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada; ²Département des sciences animales, Université Laval, Québec, Québec, Canada; ³Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de Recherche et de Développement de Québec, Québec, Canada; ⁴Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada; ⁵Département des sciences animales, Université McGill, Ste-Anne-De-Bellevue, Québec, Canada

* Correspondante: eveline.ibeagha-awemu@agr.gc.ca

Résumé:

(Objectifs) La mammite sous-clinique continue d'être problématique dans la plupart des fermes laitières, causant d'énormes pertes économiques. Au cours des dernières années, les programmes de sélection et l'amélioration des pratiques de gestion ont contribué à accroître la productivité du secteur laitier. Cependant, il existe une "boîte noire" dans la pratique traditionnelle de l'élevage laitier, à savoir que les effets du génotype et de l'environnement n'expliquent pas suffisamment les différences de productivité des vaches (par exemple, rendement laitier, pourcentage de gras et de protéines du lait, etc.). Des développements récents indiquent que l'épigénétique offre une fenêtre sur cette "boîte noire" en fournissant des voies supplémentaires pour étudier la diversité du phénotype inexpliquée par les valeurs génotypiques. La méthylation de l'ADN est un processus biologique par lequel des groupes méthyles sont ajoutés à la molécule d'ADN. C'est le mécanisme épigénétique le plus étudié. Ces modifications sur l'ADN influencent l'expression des gènes et ont un impact sur de nombreux processus biologiques, notamment la santé et la productivité des bovins laitiers. Fait intéressant, la méthylation s'installe sur l'ADN en réponse à divers facteurs environnementaux, notamment la sous-alimentation ou la suralimentation, le climat, les agents pathogènes, etc. Ces modifications épigénétiques ont pour conséquence de modifier l'expression des gènes. Leur étude fournit donc une couche d'information supplémentaire pour mieux expliquer les différences observées dans la production laitière et pour les traits de santé, y compris la mammite. Nos recherches et celles d'autres chercheurs ont associé des modifications de la méthylation de l'ADN à la santé et à la productivité des vaches laitières. Les objectifs de notre projet actuel sont de caractériser les altérations de la méthylation à l'ADN des cellules somatiques du lait de vaches atteintes de mammite sous-clinique causée par *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), de découvrir leurs effets sur la réponse immunitaire et la productivité des vaches et d'identifier des biomarqueurs indicateurs de la présence d'une mammite sous-clinique à *S. aureus*.

(Résultats et applications) Les profils de méthylation de l'ADN et du transcriptome des cellules somatiques du lait de 15 vaches atteintes de mammite sous-clinique à *S. aureus* et de 10 vaches en bonne santé provenant de fermes commerciales ont été déterminés respectivement par séquençage de la méthylation du génome entier et par séquençage de l'ARN. L'analyse via des pipelines

bioinformatiques standards a permis d'identifier des différences significatives dans les altérations de la méthylation de l'ADN entre les vaches positives à *S. aureus* et les vaches témoins, y compris environ 2,9 millions de sites différentiellement méthylés (sites d'ADN avec des groupes méthyles ajoutés) et 153,783 blocs d'haplotypes de méthylation différentielle (dMHB) (un bloc ou un groupe de sites d'ADN avec des groupes méthyles). Au total, 16,589 dMHB sont situés dans les gènes dont les expressions ont également été modifiées de manière significative. Cette observation suggère l'implication potentielle des dMHB dans la régulation de l'expression de leurs gènes associés. Les gènes associés aux dMHB sont impliqués dans de nombreux processus et voies biologiques liés au métabolisme (par exemple, le processus métabolique des lipides, le métabolisme et la biosynthèse des acides gras) et aux processus immunitaires (par exemple, la voie de signalisation des récepteurs des cellules B, la cytotoxicité médiée par les cellules tueuses naturelles, et l'interaction entre les récepteurs des cytokines et les cytokines, etc.) suggérant des effets possibles des dMHB sur la réponse de l'hôte (vache) lors de mammites sous-cliniques. De plus, huit dMHB (cinq hyper-méthylés et trois hypo-méthylés) sont avérés pouvoir différencier efficacement les vaches positives à *S. aureus* et les vaches témoins, et sont des candidats ici appelés biomarqueurs de mastite sous-clinique. Les niveaux de méthylation des huit biomarqueurs discriminants chez 200 vaches (100 vaches avec un nombre élevé de comptage de cellules somatiques (CCS) (> 200,000 cellules/mL) et 100 vaches avec un faible CCS (< 100,100)) ont été testés pour déterminer leur relation éventuelle avec la santé des vaches (CCS) et les caractéristiques de la production laitière. Le niveau de méthylation des huit dMHB a montré des différences significatives entre les deux groupes, et était également corrélé de manière significative avec le CCS des vaches. En outre, le niveau de méthylation des dMHB candidats était également significativement différent entre les vaches ayant un rendement laitier élevé (HMY, >40 kg/jour) et les vaches ayant un rendement laitier faible (LMY, <30 kg/jour). De plus, les cinq dMHB hyperméthylés présentaient un niveau de méthylation significativement plus élevé chez les vaches ayant un rendement laitier élevé (HMY), tandis que les trois dMHB hypo-méthylés présentaient un niveau de méthylation plus faible chez les vaches ayant un rendement laitier élevé (HMY).

En conclusion, les niveaux de méthylation de l'ADN des cellules somatiques du lait ont été significativement modifiés au cours de la mammité sous-clinique due à *S. aureus*. L'état de méthylation altéré de l'ADN a probablement induit les changements dans l'expression des gènes ayant un impact sur les processus biologiques, la réponse immunitaire et la productivité (rendement laitier). Les modifications de la méthylation de l'ADN identifiées et leur association avec les traits de santé et de production sont utiles pour lancer des discussions sur l'importance de quantifier les effets des variations épigénétiques sur la santé et la production du bétail, et sur l'inclusion de ces informations dans les stratégies de sélection actuelles pour améliorer la prédiction des valeurs d'élevage pour la résistance à la mammité. De plus, en s'inspirant de l'application des marqueurs de méthylation de l'ADN dans la gestion de la santé humaine (par exemple, les cancers), l'étude des altérations de la méthylation de l'ADN et les biomarqueurs identifiés méritent d'être approfondie afin de développer de nouvelles mesures de contrôle de la mammité (par exemple, méthodes de diagnostic, thérapie, etc.) et des stratégies d'élevage pour la résistance à la mammité et pour d'autres stratégies de gestion de l'élevage.

Mots clés: Altérations de la méthylation de l'ADN, blocs d'haplotypes de méthylation différentielle, expression génique, biomarqueurs candidats, mammité sous-clinique à *Staphylococcus aureus*.

Pourquoi l'épigénétique est importante pour les producteurs laitiers - Les altérations de la méthylation de l'ADN sont impliquées dans la mammite sous-clinique bovine

Mengqi Wang^{1,2}, Mario Laterrière³, Pier-Luc Dudemaine¹, Nathalie Bissonnette¹, David Gagné³, Jean-Philippe Roy⁴, Marc-André Sirard², Xin Zhao⁵, Eveline M. Ibeagha-Awemu^{1*}

¹Centre de Recherche et de Développement de Sherbrooke, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sherbrooke, Québec, Canada; ²Département des sciences animales, Université Laval, Québec, Québec, Canada; ³Centre de Recherche et de Développement de Québec, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Québec, Canada; ⁴Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada; ⁵Département des sciences animales, Université McGill, Ste-Anne-De-BelleVue, Québec, Canada



Contexte

- La mammite sous-clinique continue d'être problématique dans la plupart des fermes laitières, causant d'énormes pertes économiques.
- L'épigénétique fournit des voies supplémentaires pour mieux expliquer les différences observées dans la production laitière et pour les traits de santé, y compris la mammite [1-2].
- La méthylation de l'ADN est le mécanisme épigénétique le plus étudié influençant l'expression des gènes et impactant de nombreux processus biologiques, notamment la santé et la productivité des bovins laitiers (Fig 1).

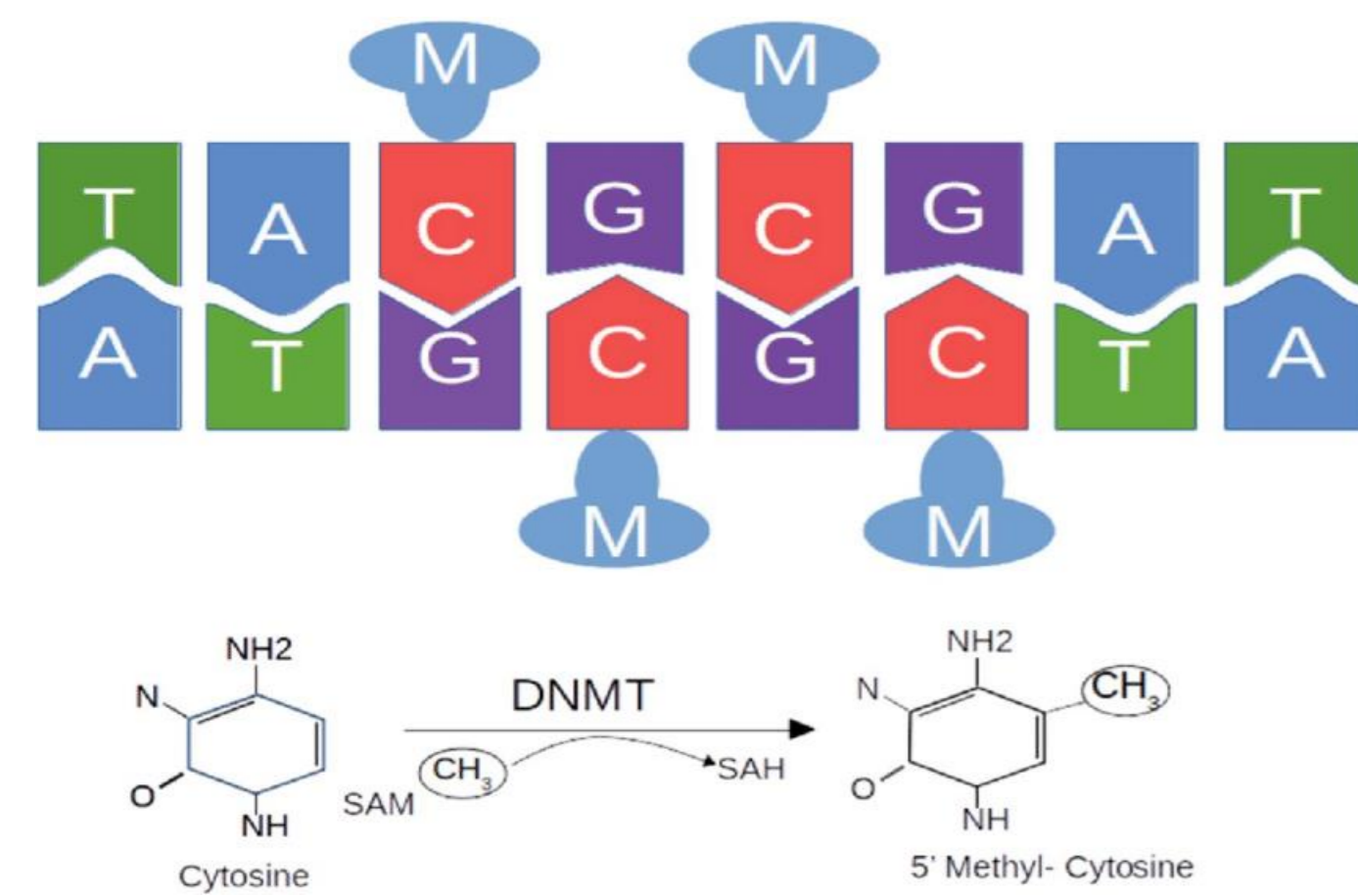


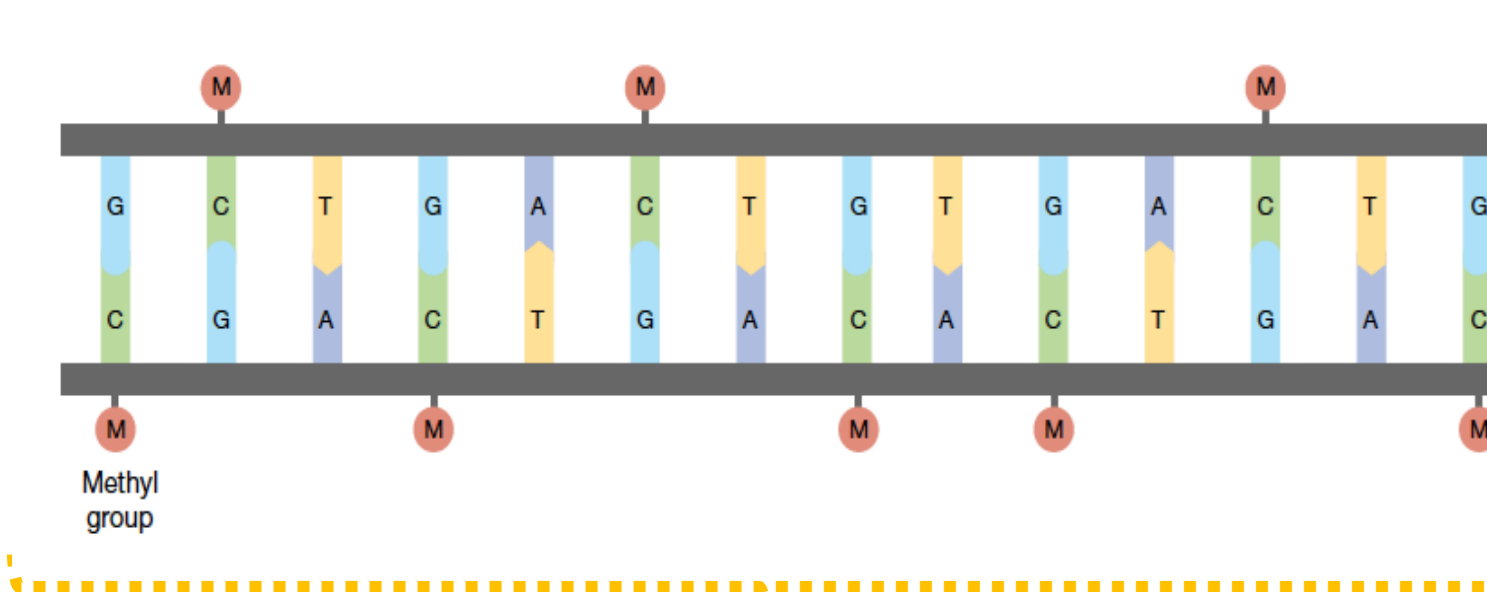
Fig 1. Méthylation de l'ADN.

La méthylation de l'ADN est un processus biologique par lequel des groupes méthyles sont ajoutés à la molécule d'ADN.

- La méthylation s'installe sur l'ADN en réponse à divers facteurs environnementaux (par exemple, la sous-alimentation ou la suralimentation, le climat, les agents pathogènes etc.) pour modifier l'expression des gènes et l'expression phénotypique [2-3].
- Nos recherches et celles d'autres chercheurs ont associé des modifications de la méthylation de l'ADN à la santé et à la productivité des vaches laitières [3-4].

Objectifs

- Caractériser les altérations de la méthylation de l'ADN des cellules somatiques du lait de vaches atteintes de mammite sous-clinique causée par *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).
- Découvrir les effets possibles des modifications de la méthylation de l'ADN au cours de l'infection.
- Identifier les biomarqueurs candidats (blocs d'haplotypes de méthylation différentielle, dMHB) de la mammite sous-clinique à *S. aureus*.



- Un MHB est un bloc ou un groupe de sites d'ADN avec des groupes méthyles.
- dMHB est un MHB avec un statut de méthylation significativement différent entre les vaches atteintes de mammite et les vaches en bonne santé

Fig 2. Un Bloc d'haplotype de méthylation (MHB)

Résultats 1: Altérations abondantes de la méthylation de l'ADN détectées

- La comparaison du profil de méthylation de l'ADN a révélé d'importantes altérations de la méthylation de l'ADN entre les vaches positives à *S. aureus* et les vaches en bonne santé.
- Globalement, le niveau de méthylation de l'ADN chez les vaches positives à *S. aureus* était plus élevé que celui chez les vaches en bonne santé (Fig 3).

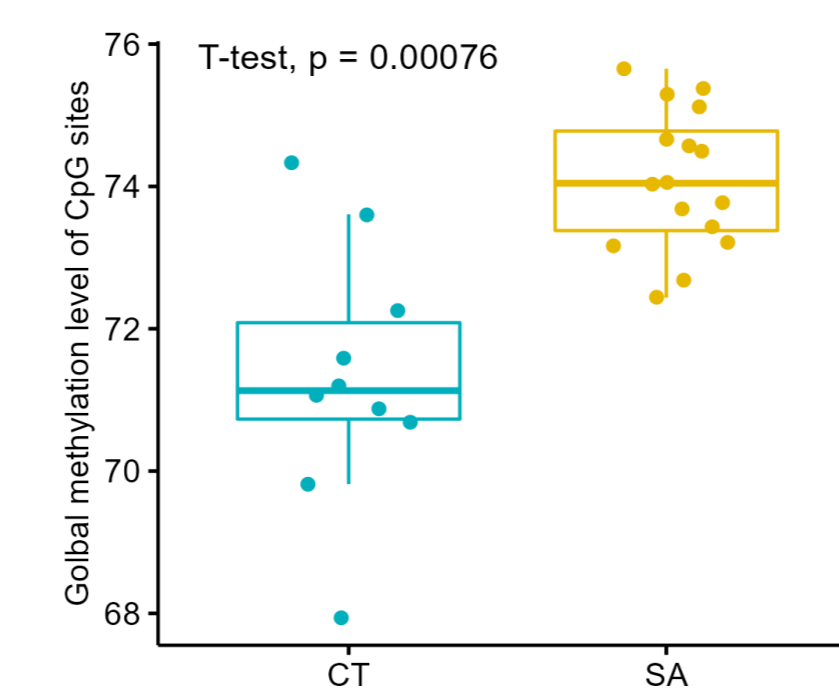


Fig 3. Comparaison globale

- ~ 2,9 millions de sites avec des niveaux de méthylation différentiels significatifs (Fig 4).
- 153,783 dMHB ont été identifiés montrant une différence nette entre les deux groupes (Fig 5).
- 16,589 (10.79%) dMHBs sont situés dans les gènes.

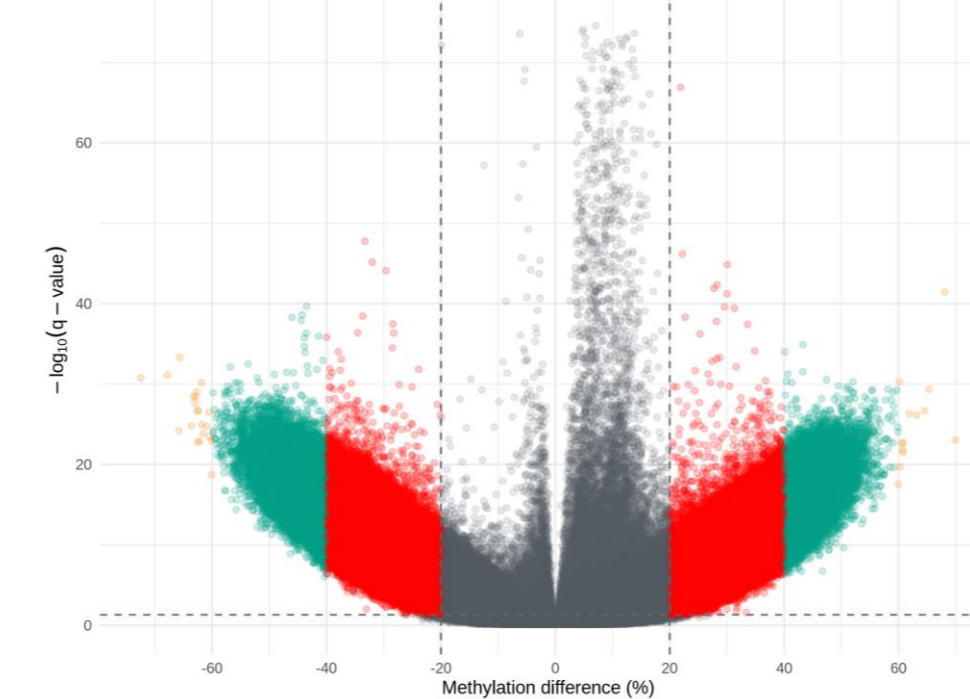


Fig 4. Sites de méthylation différentielle

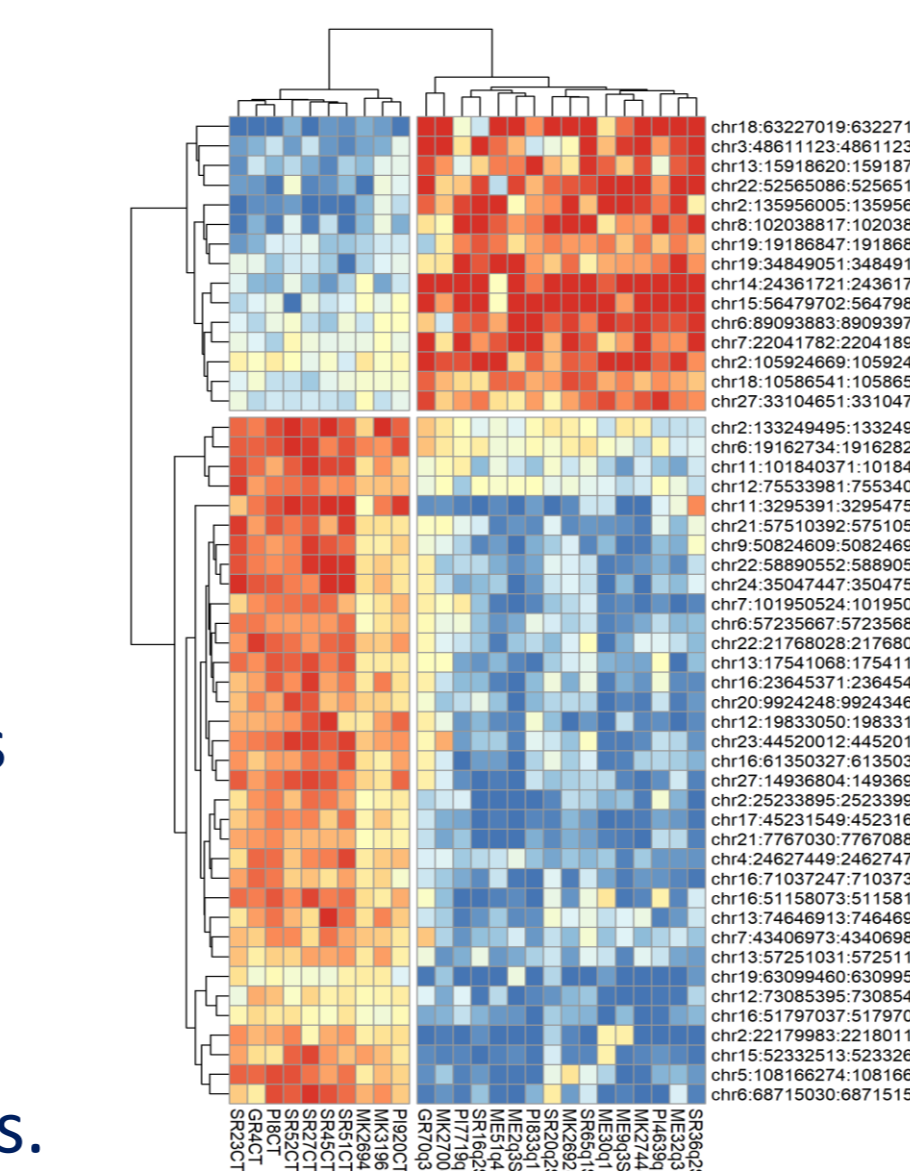


Fig 5. Les 50 premières dMHB variables

Conclusion

- Les niveaux de méthylation de l'ADN des cellules somatiques du lait ont été significativement modifiés au cours de la mammite sous-clinique due à *S. aureus*.
- L'état de méthylation de l'ADN altéré a probablement induit les changements dans l'expression des gènes ayant un impact sur les processus biologiques, la réponse immunitaire et la productivité, tels que la production de lait.

Résultats 2: Effets possibles des altérations de la méthylation de l'ADN

- Les gènes associés aux dMHB sont impliqués dans de nombreux systèmes biologiques:
 - le processus métabolique des lipides,
 - le métabolisme et la biosynthèse des acides gras,
 - la voie de signalisation des récepteurs des cellules B,
 - la cytotoxicité médiée par les cellules tueuses naturelles et l'interaction récepteur cytokine-cytokine (Fig 6)
- Suggérant des effets possibles des dMHB sur la réponse de l'hôte (vache) pendant la mammite sous-clinique.

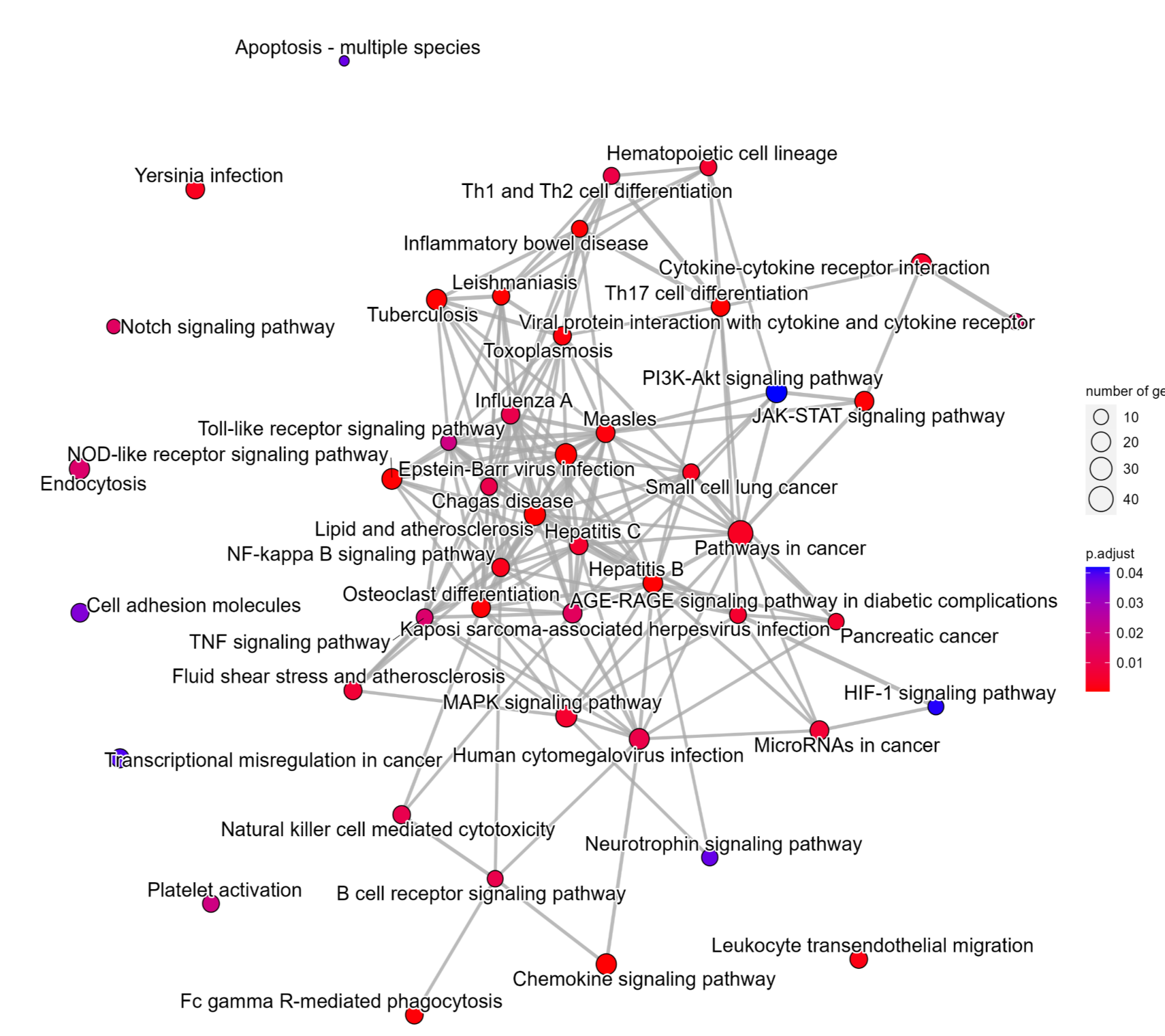


Fig 6. Voies KEGG enrichies par les gènes surexprimés en présence de sites dMHBs hypo-méthylés

Résultats 3: Analyse approfondie des huit dMHBs pour les troupeaux de grande taille

- Le niveau de méthylation des 8 dMHB diffère également significativement entre les vaches ayant un CCS élevé (CCS > 200,000 cellules/mL) et celles ayant un CCS bas (< 100,000 cellules/mL)

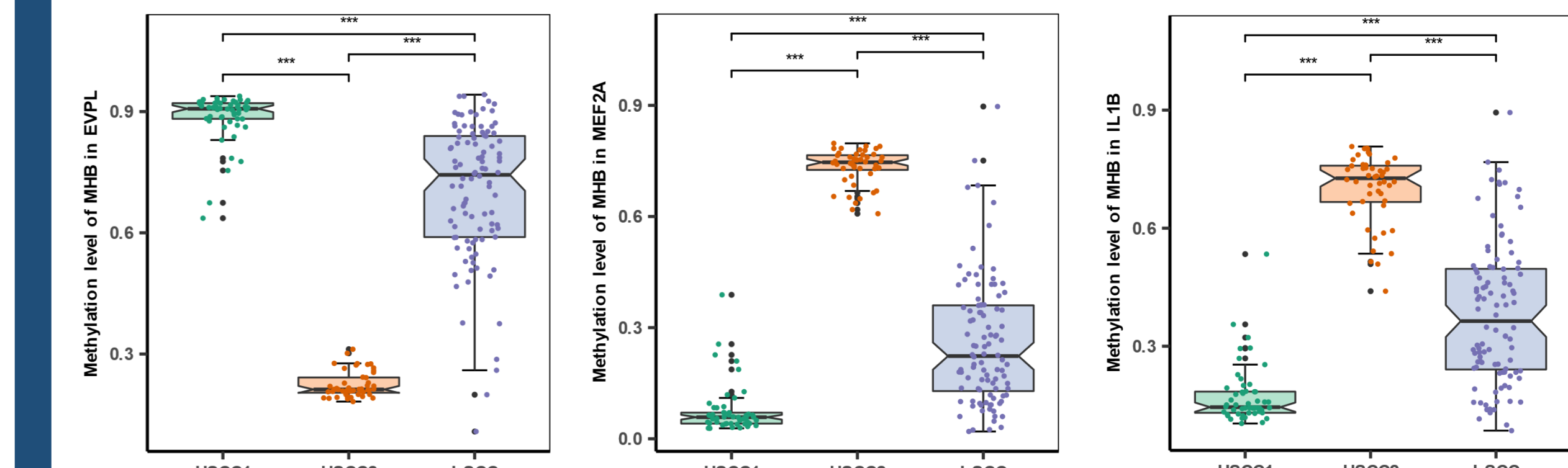


Fig 7. Différence des niveaux de méthylation des dMHBs de trois gènes entre les vaches ayant un CCS bas et élevé

- Le niveau de méthylation diffère également significativement entre les vaches ayant un test journalier en lait élevé (HMY, ≥ 40 kg) et celle ayant un test journalier en lait bas (LMY, ≤ 30 kg) (Fig 8).

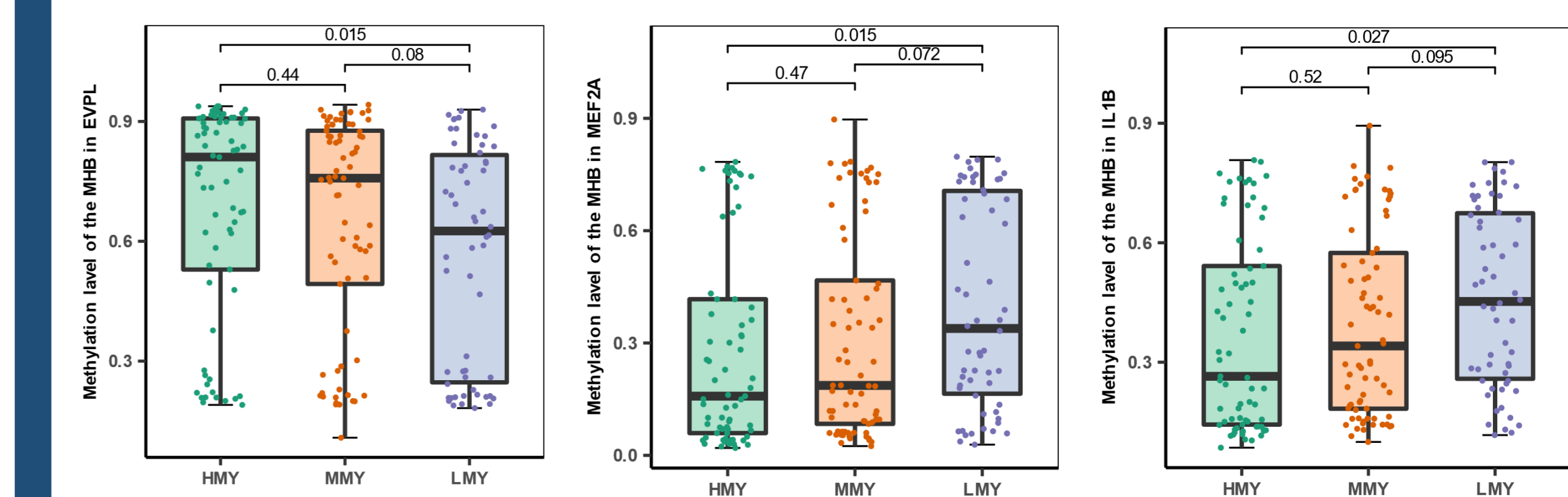
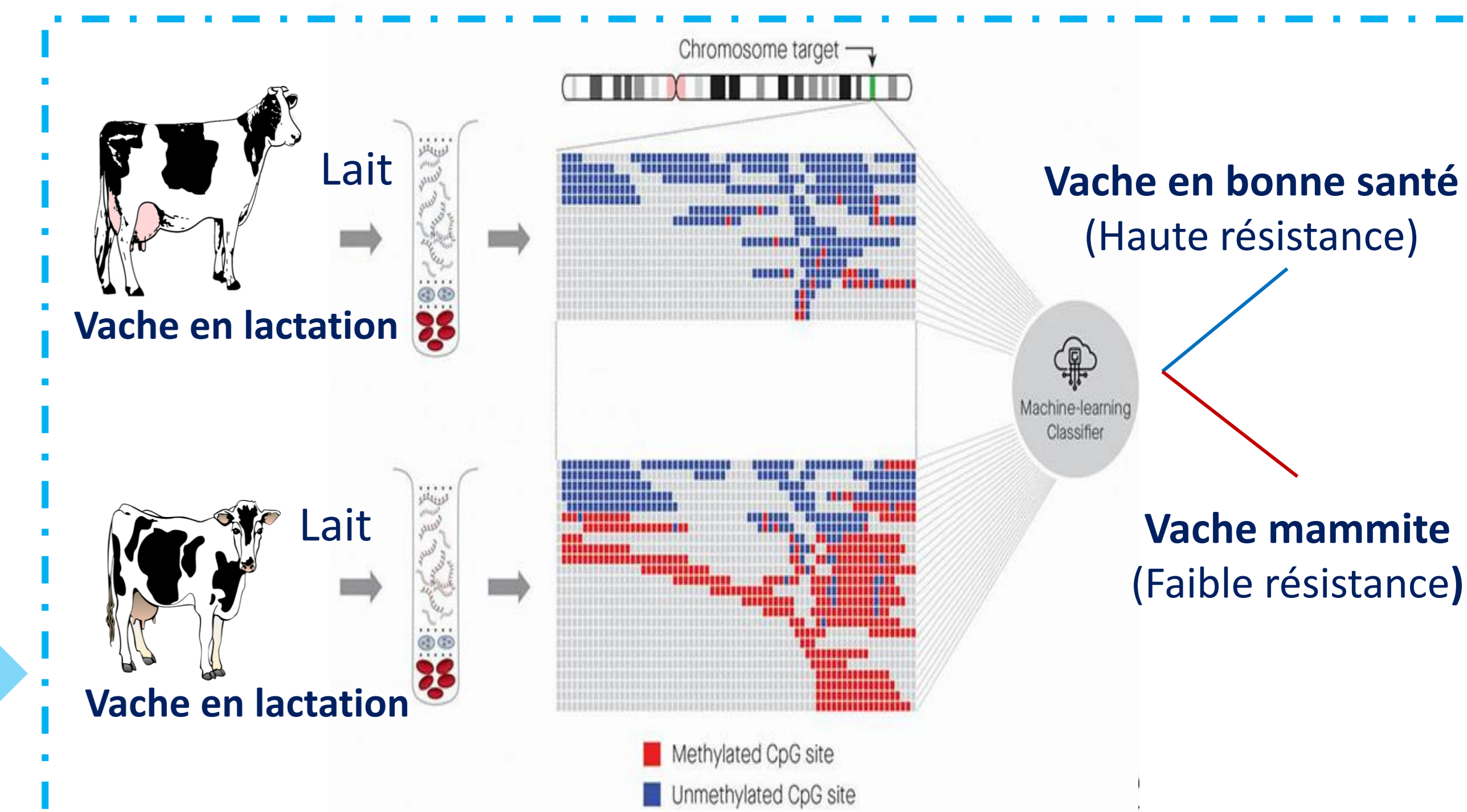


Fig 8. La différence dans les niveaux de méthylation des dMHBs de trois gènes entre les vaches ayant un test journalier en lait élevé (HMY) et bas (LMY)

Application potentielle et avantages pour l'industrie laitière

- L'étude approfondie des changements de méthylation de l'ADN identifiés démontre leur association avec les traits de santé et de production laitière.
 - L'étude des altérations de la méthylation de l'ADN et les biomarqueurs candidats identifiés mérite d'être approfondie afin de développer de nouvelles mesures de contrôle de la mammite
- Par exemple:
- Méthodes de diagnostic,
 - Thérapie,
 - Des stratégies d'élevage pour la résistance à la mammite, etc.

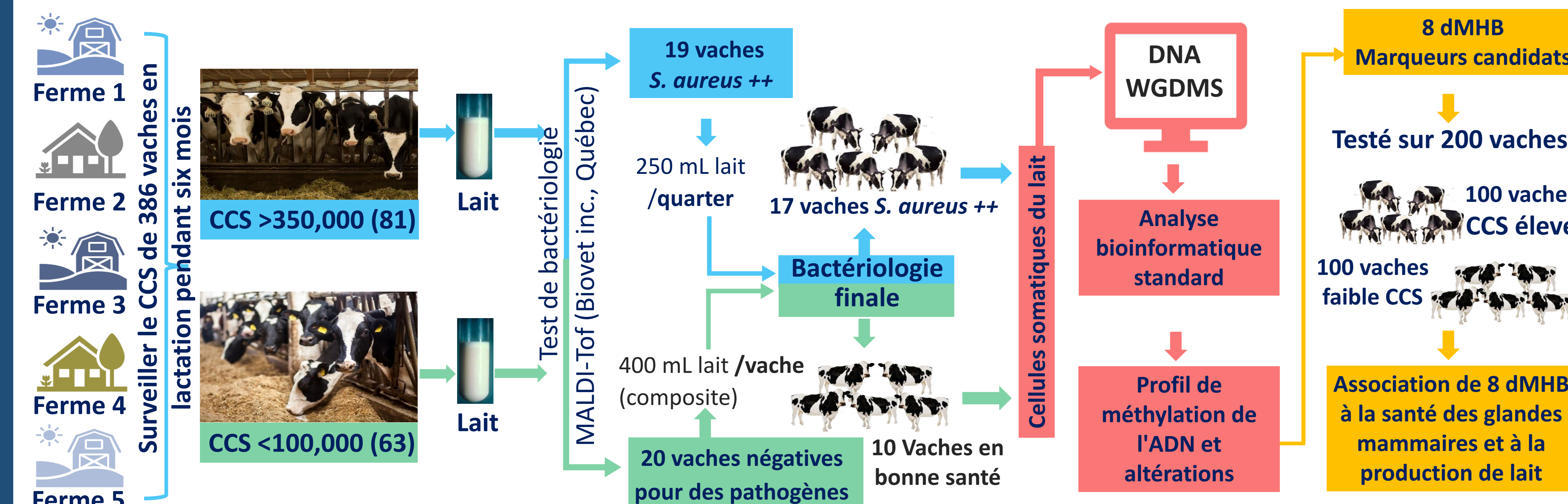
- L'inclusion de ces informations dans les stratégies actuelles de gestion et de sélection pourrait contribuer à améliorer la prédiction des valeurs de reproduction pour la résistance à la mammite.



Exemple : Application des biomarqueurs de méthylation de l'ADN pour le diagnostic de la mammite et l'évaluation des risques

Approche de recherche

Principales étapes de la collecte et de l'analyse des données : (1) Identification des vaches atteintes de mammite sous-clinique à *S. aureus*; (2) collecte de cellules somatiques du lait ; (3) isolement de l'ADN et séquençage de la méthylation de l'ADN à l'échelle du génome entier (WGDMS); et (4) séquençage d'appliquons bisulfites ciblés.



CCS: comptage de cellules somatiques

Littérature

- Ibeagha-Awemu, Eveline M., and Xin Zhao. Epigenetic marks: regulators of livestock phenotypes and conceivable sources of missing variation in livestock improvement programs. *Frontiers in Genetics* 6 (2015): 302.
- Ibeagha-Awemu, Eveline M., and Ying Yu. Consequence of epigenetic processes on animal health and productivity: is additional level of regulation of relevance? *Animal Frontiers* 11.6 (2021): 7-18.
- Wang, Mengqi, and Eveline M. Ibeagha-Awemu. Impacts of epigenetic processes on the health and productivity of livestock. *Frontiers in Genetics* 11 (2021): 613636.
- Wang, Mengqi, et al. Genome-Wide DNA methylation analysis of mammary gland tissues from Chinese Holstein cows with *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Frontiers in Genetics* 11 (2020): 550515.

Remerciements

- Agriculture et Agroalimentaire Canada pour avoir financé ce projet.
- Contributions et soutien de nos partenaires (Les Fermes Participantes, Génome Québec, Laboratoires Biovet)