

**INRAE**

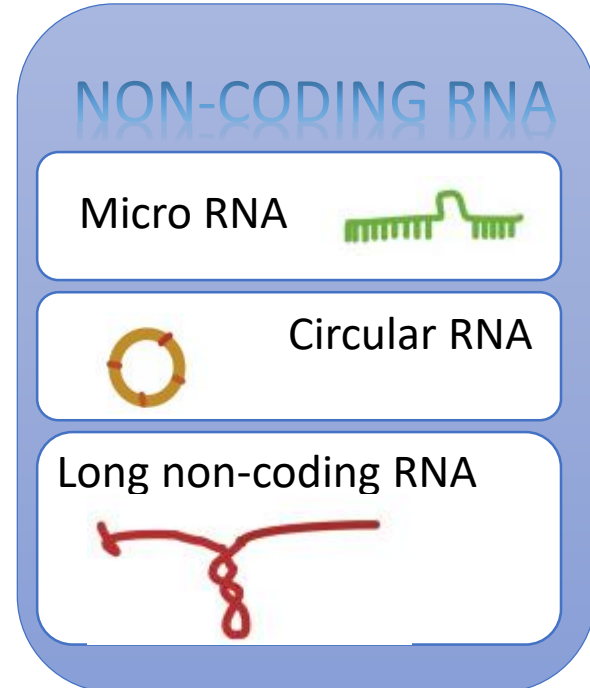
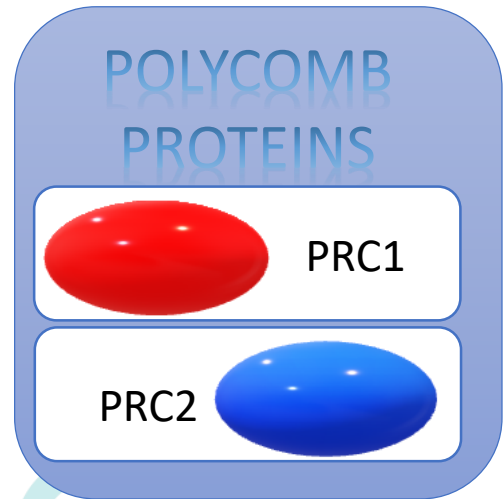
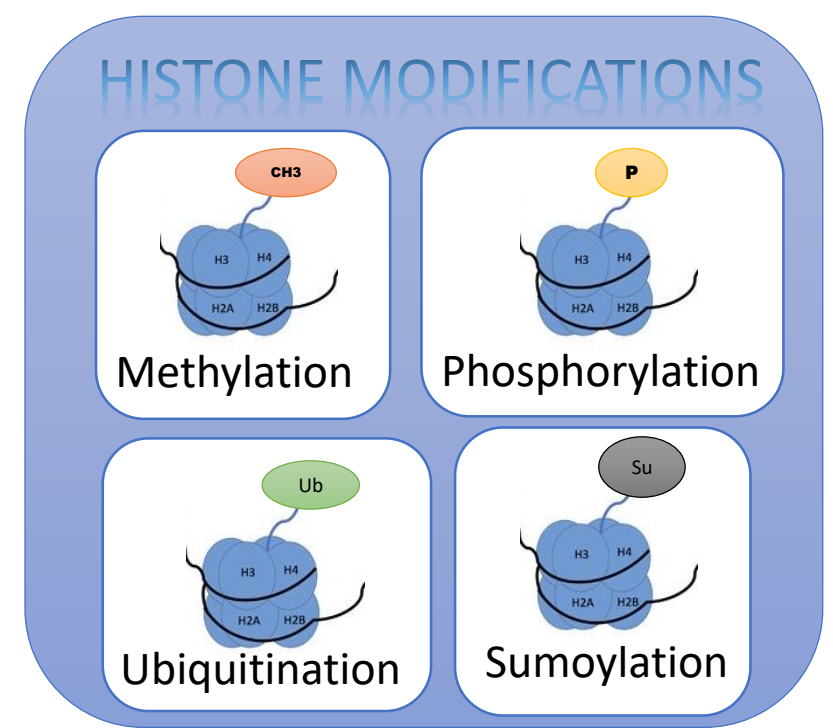
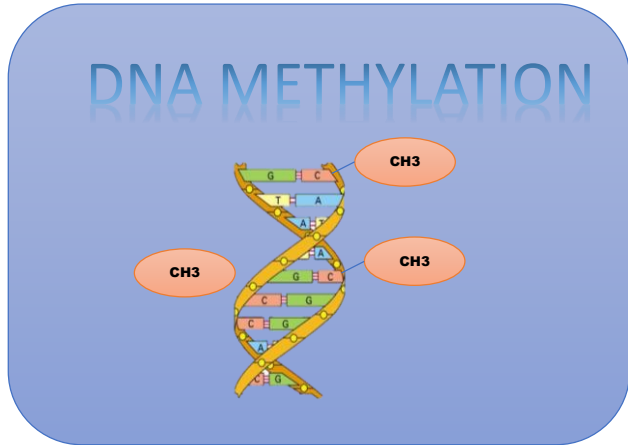


## ➤ Implication de la méthylation de l'ADN dans les lactations successives et l'inflammation mammaire

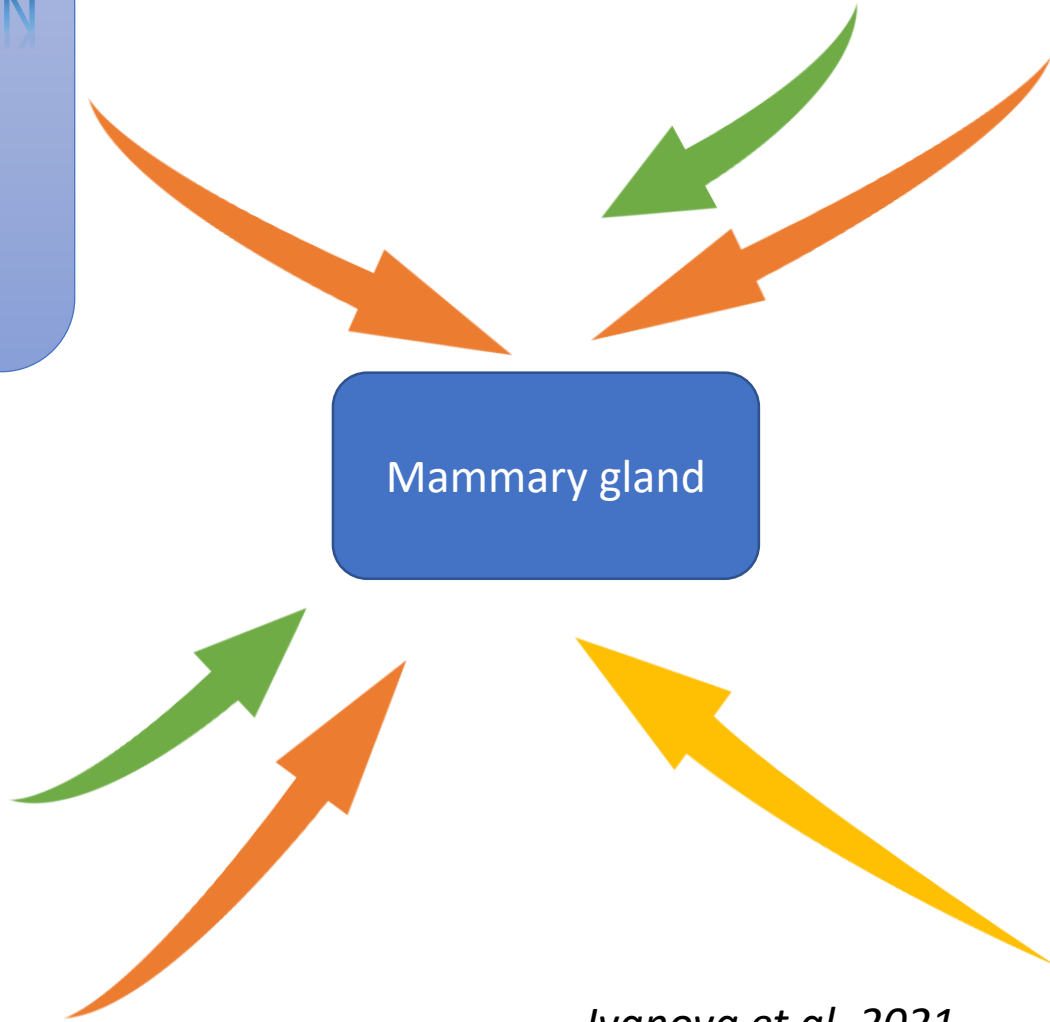
Elitsa Ivanova, Cathy Hue-Beauvais, Fabienne Le Provost

équipe GaLac, UMR GABI, INRAE

# ➤ Modifications épigénétiques de la glande mammaire

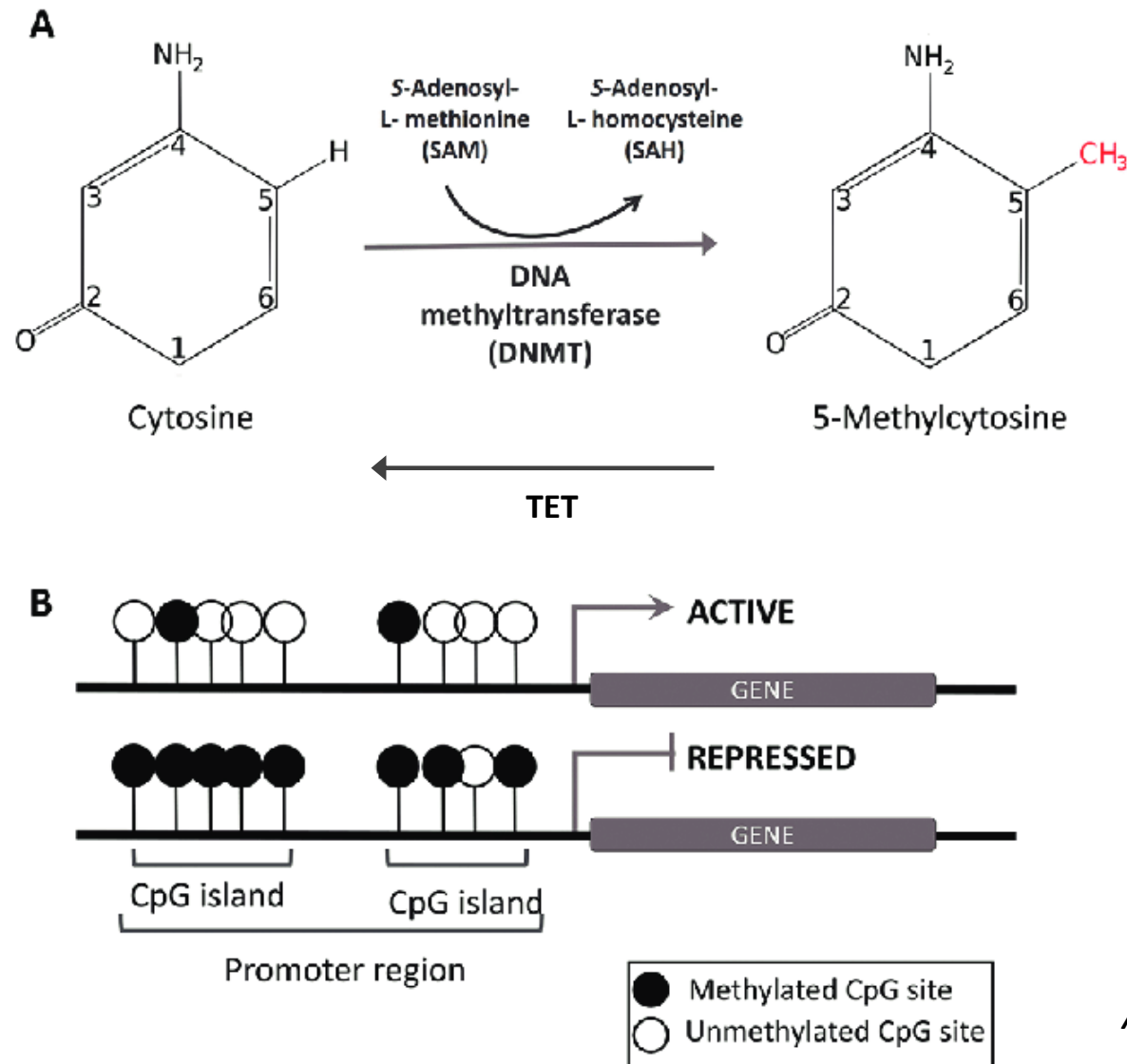


Mammary gland



Ivanova et al, 2021

## ➤ Régulateurs de la méthylation d'ADN



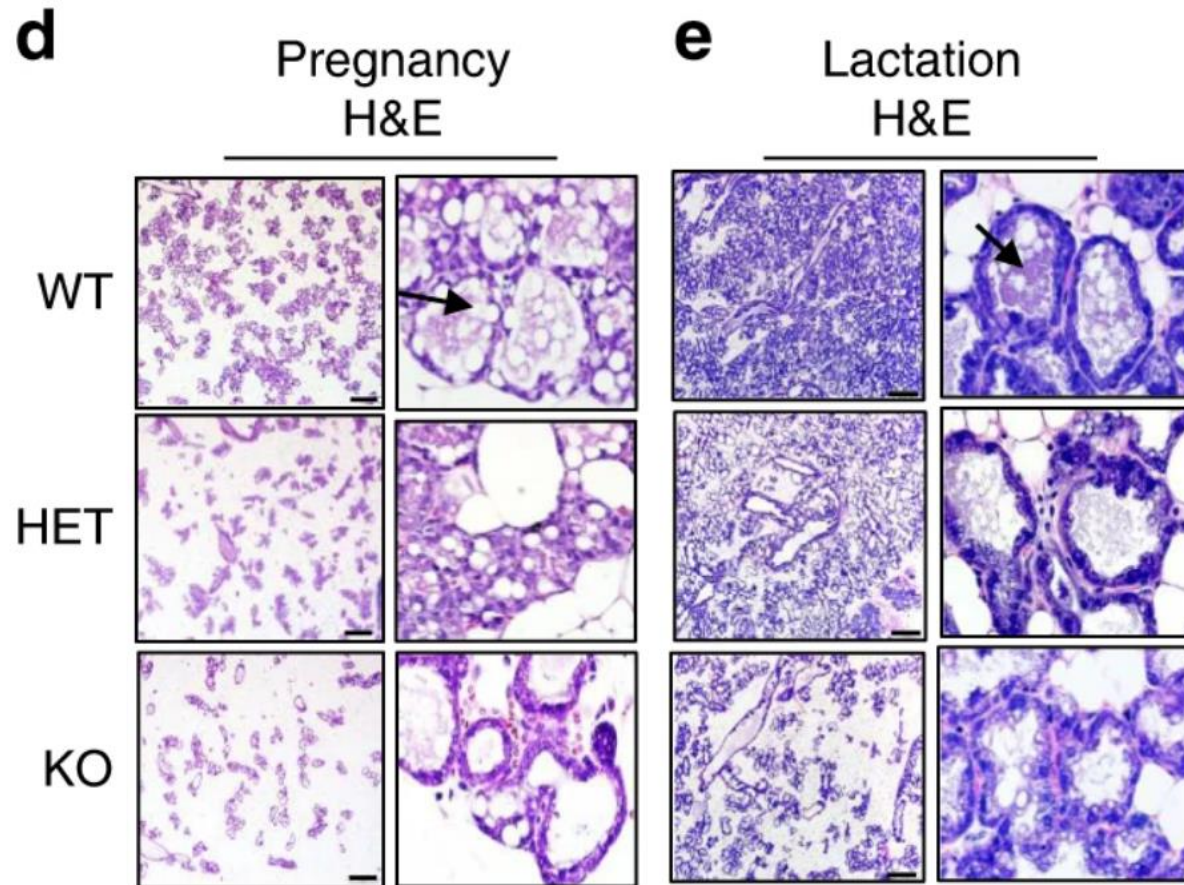
*Alarcon et al, 2017*

## ➤ Effet sur la lactation



Délétion de TET2 =>

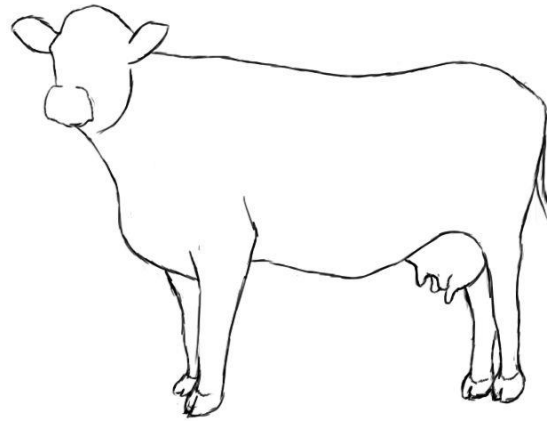
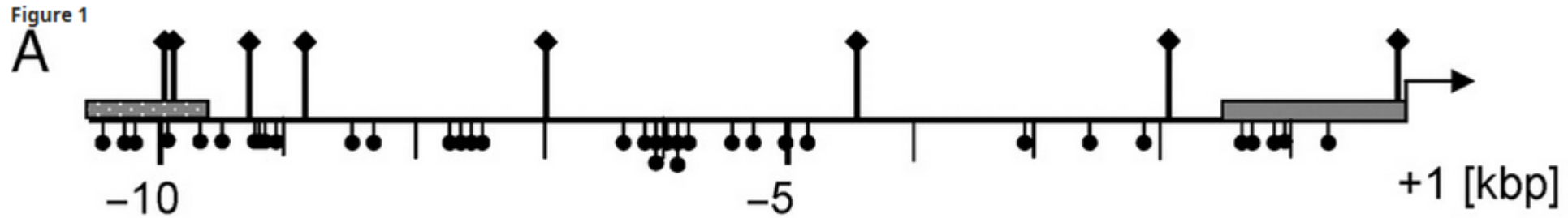
- ↑ ramification des canaux mammaires
- ↑ nombre et taille des TEBs
- ↑ fibrose et lésions dans la glande de souris vierges
- ↓ développement lobulo-alvéolaire
- ↓ gouttelettes lipidiques



**Production laitière**

*Kim et al, 2020*

## ➤ Effet sur la lactation et l'inflammation



*Csn1S1* => région de 10kb en amont du gène est hypométhylé ↓  
3 CpGs sont méthylés suite à une infection *E. Coli* ou *S. uberis* ↑  
ces mêmes CpGs sont méthylés pendant la gestation et après une période de 8 jours sans lactation ↑



**Expression de  $\alpha$ S1-caséine**

*Vanselow et al 2006*

*Singh et al 2012*

*Nguyen et al 2014*

# Epigénétique de la réponse immunitaire

WP3

Analyses de méthylation d'ADN sur génomes entiers

**3.1 Effet de l'âge sur l'épigénome et conséquences sur les fonctions des cellules/tissus à génome nucléaire identique**

- 3.1.1 Epigénétique et réponse immunitaire
- 3.1.2 Epigénétique et fonction endométriale



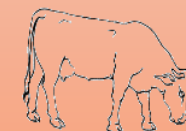
**3.2 Déterminisme génétique et interaction avec l'épigénétique**

- 3.2.1 Modèle bovin (WP2)
- 3.2.2 Modèle ovin (WP2)



**3.3 miRNAs et indicateurs de la réponse inflammatoire**

Modèle bovin



**3.4. Reprogrammation épigénétique à long terme**

Modèle murin - 1ère et 2ème lactation



**3.5 Reprogrammation épigénétique induite par les infections**

in vitro – cellules épithéliales mammaires

sur les lactations successives et l'inflammation mammaire

Ivanova

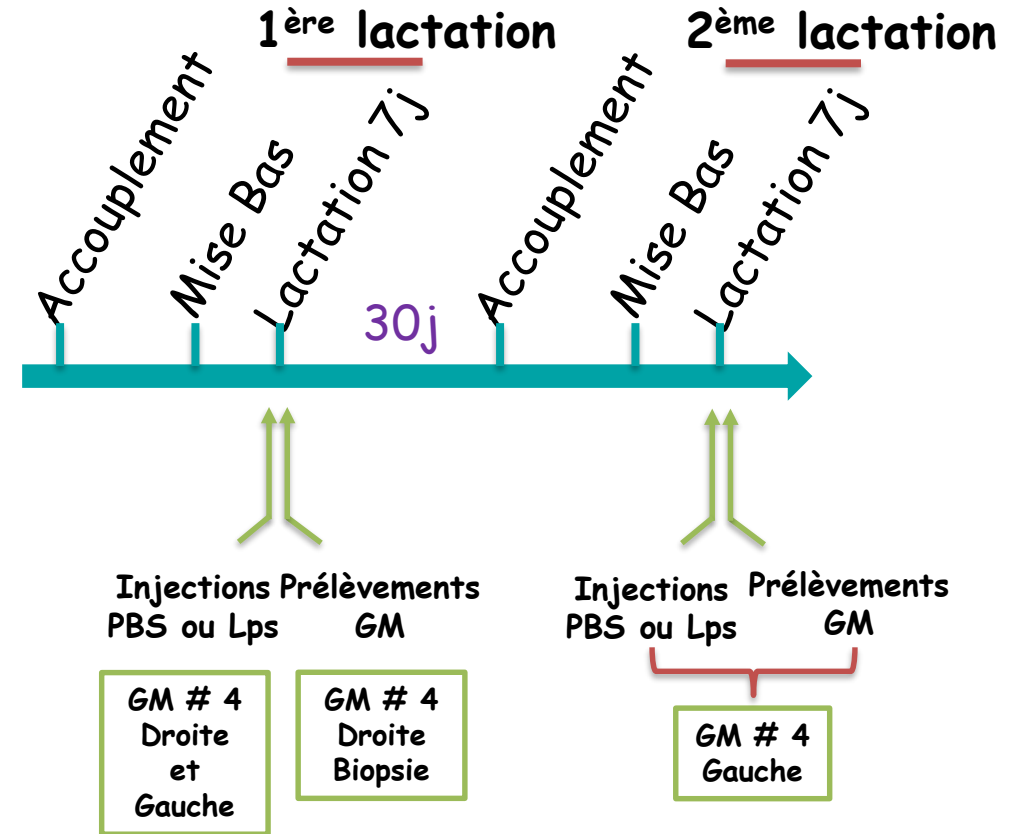




## ➤ Modèle expérimental



Souris FVB/N



INRAE

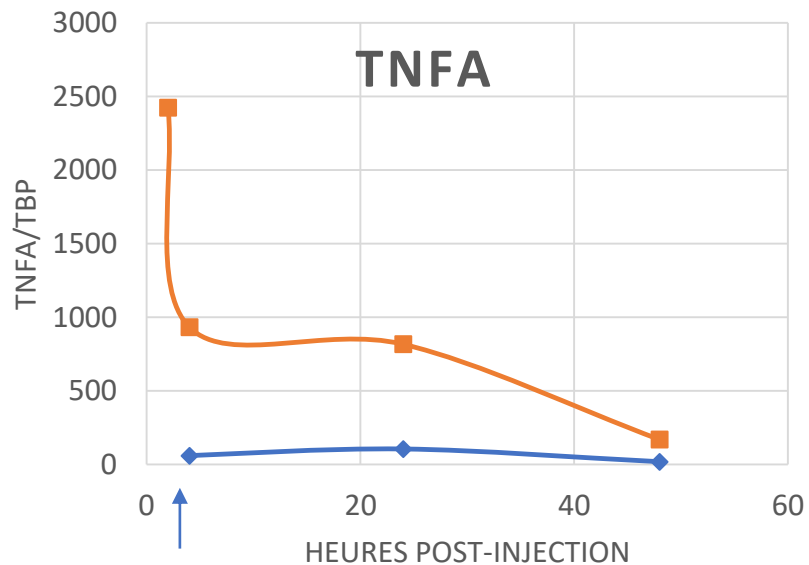
Implication de la méthylation de l'ADN dans les lactations successives et l'inflammation mammaire  
2 juin 2021 / Webinaire GalactInnov / Elitsa Ivanova



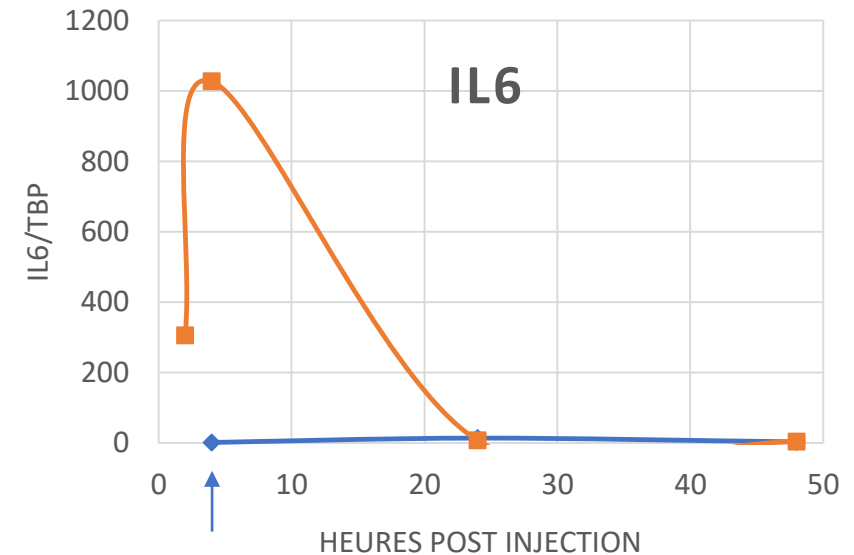


## ➤ Modèle expérimental

- I. Induction d'inflammation mammaire (Lps)
  - ✓ Échantillons: 4h post-injection sur 2 lactations successives
- II. Expression de cytokines inflammatoires locales (TNF $\alpha$ , IL6) dans le tissu mammaire



◆ Lps- ■ Lps+



Modèle murin de **l'inflammation mammaire locale et précoce** permettant de répondre aux questions sur la programmation épigénétique



## ➤ Les questions

Modèle murin d'inflammation mammaire sur 2 lactations successives (L1 et L2) permettant de répondre aux questions suivantes, concernant la méthylation de l'ADN :

	Lactation 1 (L1)	Lactation 2 (L2)
Lot 1	-	-
Lot 2	+	-
Lot 3	+	+
Lot 4	-	+

+: inflammation

-: sans inflammation

**Effet d'une inflammation en 1<sup>ère</sup> lactation**

**Effet d'une 2<sup>ème</sup> inflammation en 2<sup>ème</sup> lactation après une inflammation en 1<sup>ère</sup> lactation**

**Effet d'une inflammation en 2<sup>ème</sup> lactation sur animaux sans antécédent inflammatoire**

## ➤ Analyses effectuées

### I. Analyses transcriptomiques sur tissus mammaires (UMR 1282 Nouzilly)

- RT-qPCR Fluidigm



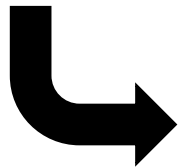
### II. Analyses épigénétiques sur tissus mammaires (UMR 1198 Jouy en Josas)

- RRBS

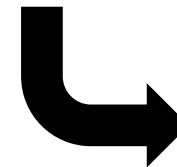


## ➤ Résultats : analyse transcriptomique

96 gènes au départ	
Développement mammaire	31
Machinerie épigénétique	22
Inflammation	40
Gènes de ménage	3



Nettoyage des données brutes
Elimination de 11 gènes non amplifiés
Elimination de 16 gènes dont l'efficacité <80% ou >110%
Elimination de 6 gènes pour lesquels les Tm sont variables ou pour lesquels l'efficacité n'est pas calculable



63 gènes analysables	
Développement mammaire	20
Machinerie épigénétique	13
Inflammation	27
Gènes de ménage	3

## ➤ Résultats : analyse transcriptomique

	Lactation 1 (L1)	Lactation 2 (L2)
Lot 1	-	-
Lot 2	+	-
Lot 3	+	+
Lot 4	-	+

+: inflammation  
-: sans inflammation

**Effet d'une inflammation en 1<sup>ère</sup> lactation**

**Effet d'une 2<sup>ème</sup> inflammation en 2<sup>ème</sup> lactation après une inflammation en 1<sup>ère</sup> lactation**

**Effet d'une inflammation en 2<sup>ème</sup> lactation sur animaux sans antécédent inflammatoire**

### Bilan gènes différentiellement exprimés

Famille	Gene			
DevGM	Acss1			
DevGM	Npt2b (Slc34a2)			
DevGM	Wnt4			
DevGM	Xdh			
epiG	G9a			
epiG	Hdac5			
epiG	HMTset7			
epiG	Prmt7			
epiG	suv39h2			
immu	CASPASE4			
immu	CATALASE			
immu	CD14			
immu	CXCL1			
immu	CXCL10			
immu	IL12p40			
immu	Il-6			
immu	S100A8			
immu	S100A9			
immu	TLR2			
immu	TLR4			

overexpressed for 1st condition

underexpressed for 1st condition

## ➤ Résultats : méthylation de l'ADN

- Extraction et purification de l'ADN génomique
- Construction des banques
- Séquençage
- Pipeline RRBS



# ➤ Résultats : méthylation de l'ADN

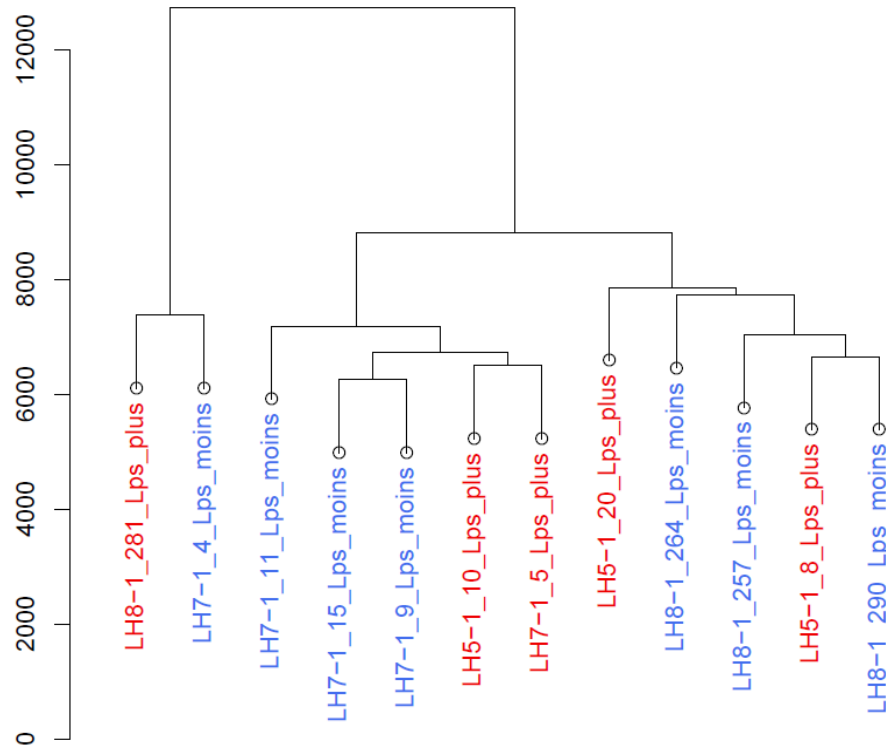
## Analyse descriptive

	Lactation 1 (L1)	Lactation 2 (L2)
Lot 1	-	-
Lot 2	+	-
Lot 3	+	+
Lot 4	-	+

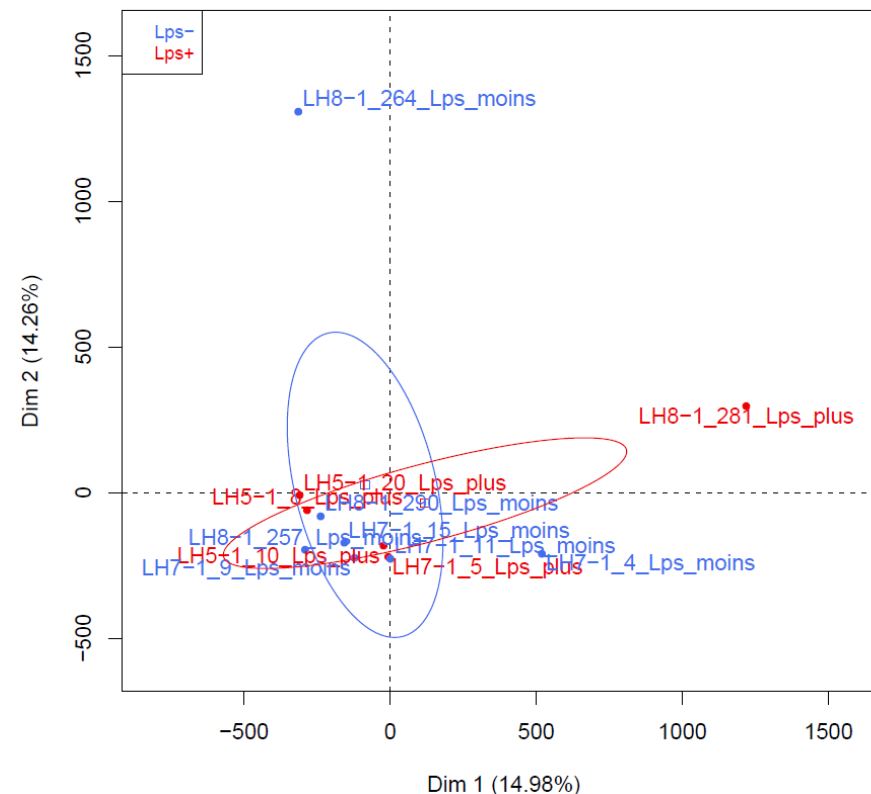
+: inflammation  
-: sans inflammation

Effet d'une inflammation en 1<sup>ère</sup> lactation

Euclidean clustering on plus-VS-moins



PCA on plus-VS-moins – Axis #1 & #2



Pas de distinction évidente entre les échantillons de 1<sup>ère</sup> lactation (Lps+ ou Lps-)

Dans toutes les comparaisons : impossibilité de discriminer les groupes expérimentaux



# ➤ Résultats : méthylation de l'ADN

## Analyse différentielle

	Lactation 1 (L1)	Lactation 2 (L2)
Lot 1	-	-
Lot 2	+	-
Lot 3	+	+
Lot 4	-	+

+: inflammation  
-: sans inflammation

DMC (Differentially Methylated Cytosines) = 25% différence de méthylation

DMR (Differentially Methylated Regions) = 3 DMCs à <100 pb

Comparaison	Nombre de DMCs	Nombre de DMRs
<b>Effet d'une inflammation en 1<sup>ère</sup> lactation</b>	508	30
<b>Effet d'une seconde inflammation en 2<sup>ème</sup> lactation après une inflammation en 1<sup>ère</sup> lactation</b>	378	17
<b>Effet d'une inflammation en 2<sup>ème</sup> lactation sur animaux sans antécédent inflammatoire</b>	412	13

## ➤ Expériences à venir

Analyse transcriptomique *a priori*  
Analyse d'expression de 63 gènes

Analyse de la méthylation de l'ADN



Analyse Ingenuity Pathway sur les gènes  
différentiellement méthylés

Validation d'une potentielle modification d'expression  
des gènes différentiellement méthylés par qPCR

Analyse de l'expression protéique de gènes



## ➤ Conclusions générales

Inflammation

Lactation

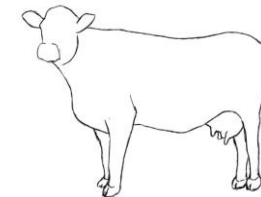
Analyse transcriptomique *a priori*

Analyse de la méthylation de l'ADN



Une inflammation n'a pas le même impact selon le rang de lactation dans lequel elle a lieu

Bientôt d'autres résultats !



# ➤ Merci de votre attention

UE IERP, Jouy

UMR BREED, Jouy

Hélène Jammes

Aurélien Chaulot-Talmon

Anne Aubert-Frambourg

UMR GABI, Jouy

Equipe GaLac

Equipe Modit

Fabienne Le Provost

Johan Castille

Cathy Hue-Beauvais

Johann Laubier

Etienne Aujean

UMR ISP, Nouzilly

Pierre Germon

Clémence de Casanove (M2)



INRAE



Implication de la méthylation de l'ADN dans les lactations successives et l'inflammation mammaire

2 juin 2021 / Webinaire GalactInnov / Elitsa Ivanova