



Emilie Derisoud

Après avoir fait un stage de master 2 sur la supplémentation en arginine chez la jument gestante, je débute ma 3^{ème} année de thèse à INRAE de Jouy-en-Josas sur les effets de l'âge, de la parité et de la lactation de la jument à l'insémination sur l'embryon, l'environnement utérin, le placenta, la croissance et la santé à long terme du poulain.

emilie.derisoud@inrae.fr

Partenaire(s)



Financier(s)



L'âge maternel modifie l'expression des gènes de l'embryon

Emilie Derisoud^{1,2}, Luc Jouneau^{1,2}, Catherine Archilla^{1,2}, Nathalie Daniel^{1,2}, Nathalie Peynot^{1,2}, Yann Jaszczyszyn³, Cédric Dubois⁴, Michèle Dahirel^{1,2}, Véronique Duranthon^{1,2}, Laurence Wimel⁴, Pascale Chavatte-Palmer^{1,2}

¹ Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED

² Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED

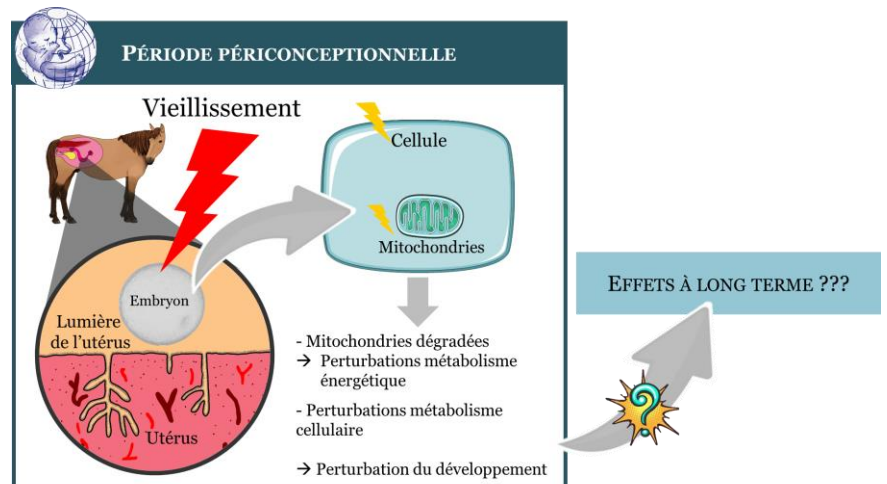
³ Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), UMR 9198 CNRS, CEZ, Université Paris-Sud

⁴ IFCE, Plateau Technique de la station expérimentale de Chamberet

Type de présentation : poster non présenté*

Ce qu'il faut retenir

La fertilité diminue rapidement avec le vieillissement de la jument. Ceci est en partie expliqué par une augmentation de la mort embryonnaire. L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet de l'âge de la jument sur la fonction embryonnaire. Pour cela, des jeunes juments (JM, 6ans) et des juments plus âgées (VM, 10-17ans) de race de selle et non suitées, ayant toutes déjà pouliné au moins une fois, ont été inséminées avec la semence d'un unique étalon Anglo-Arabe. A environ 8 jours post-ovulation, les embryons ont été collectés par lavage de l'utérus. L'expression des gènes des embryons a été étudiée, en fonction de l'âge maternel, dans le trophoblaste (futur placenta) et dans le bouton embryonnaire (futur poulain). L'âge de la jument, chez des juments de moins de 17 ans, affecte l'expression des gènes codant pour la fonction mitochondriale et l'équilibre des voies métaboliques de l'embryon équin. Le bouton embryonnaire est plus perturbé que le trophoblaste. Ces résultats pourraient expliquer l'incidence plus élevée de mortalité embryonnaire chez les vieilles juments. Dans la suite de ce projet, les effets à long de ces perturbations sur la santé du poulain seront en partie évalués.



© Emilie Derisoud

* En raison de la COVID19, le programme initialement prévu a dû être modifié et certaines présentations annulées

1 Contexte et objectifs

Dans la filière équine, la jument peut avoir une carrière sportive avant sa carrière de reproduction. Les poulinières produisent donc des poulains jusqu'à un âge avancé. De nombreuses études ont montré que la fertilité de la jument diminue en vieillissant et que ce déclin commence à un âge relativement jeune : une étude française a montré que si un seuil de 10% de réduction de la fertilité était utilisé pour arrêter la carrière reproductive des femelles, alors les juments de plus de 8 ans ne devraient pas être mises à la reproduction (Langlois and Blouin, 2004).

Afin de préciser l'origine de la réduction de la fertilité observée chez les juments âgées, des collectes d'embryons à deux stades différents ont été effectuées. Deux jours après l'ovulation, les collectes d'embryons dans l'oviducte montrent que les taux de fertilisation chez les jeunes juments fertiles et vieilles juments considérées comme infertiles sont similaires. Pourtant, lorsque des collectes sont effectuées à 14 jours post ovulation sur ces mêmes juments, les taux de gestation des jeunes juments sont supérieurs à ceux des vieilles juments (Ball et al., 1986). La mort embryonnaire précoce semble être la cause de cette baisse de fertilité.

Des embryons collectés au 4^{ème} jour post ovulation chez des jeunes juments fertiles et chez des vieilles juments infertiles ont été transférés dans des jeunes juments fertiles synchronisées. Quelle que soit la qualité des embryons, le taux de gestation à 14 jours était plus faible lorsque les embryons étaient issus de vieilles juments (Ball et al., 1989). L'embryon lui-même semble donc être responsable, au moins en partie, de la baisse de fertilité chez les juments âgées. Aucune différence morphologique n'a été observée entre les embryons issus de jeunes juments et ceux issus de juments âgées (Ball et al., 1989, 1986; Panzani et al., 2014) mais le développement des microcotylédons du placenta (zones d'échange entre la mère et le fœtus issues de l'embryon) est retardé lorsque la jument a plus de 10 ans (Bracher et al., 1996).

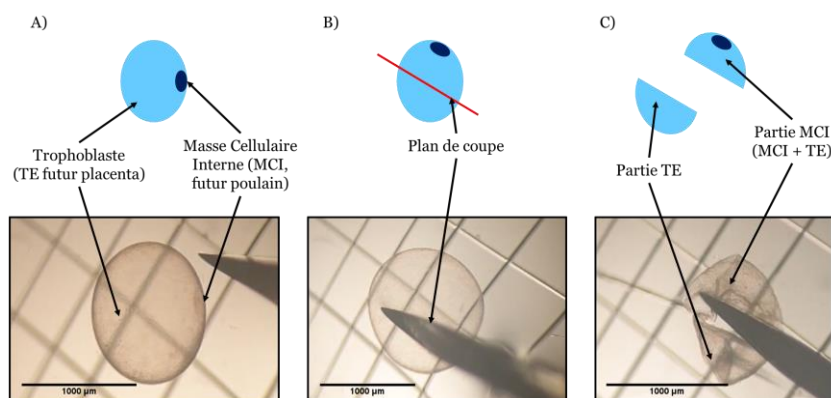
La thèse dans laquelle s'inscrit cette étude vise à explorer les effets de l'âge de la jument sur le développement embryonnaire, placentaire et post-natal du poulain. L'objectif de l'étude présentée ici est de déterminer les effets de l'âge de la jument sur l'expression des gènes de l'embryon à 8 jours post ovulation. Le bouton embryonnaire (futur poulain) et le trophoblaste (futur placenta) ont été analysés séparément.

2 Méthode

Pour ce protocole, des juments de selle (de race Anglo Arabe et Selle Français) de la station expérimentale de Chamberet, ayant pouliné au moins une fois et non suitées, ont été réparties en fonction de leur âge : les jeunes ($5,98 \pm 0,04$ ans), lot nommé JM et les plus âgées ($12,06 \pm 2,89$ ans), lot nommé VM.

Au printemps 2019, les juments ont été suivies par échographie transrectale. Lorsqu'un follicule atteignait 35mm de diamètre, l'ovulation était induite par injection IV d'hCG et les juments étaient inséminées avec la semence d'un unique étalon. Dans les 2 jours suivant, l'ovulation était confirmée. A $7,83 \pm 0,36$ jours post-ovulation en moyenne (ovulation estimée à 36 heures après injection d'hCG), les embryons ont été collectés par lavage de l'utérus. Sous loupe binoculaire, les embryons ont été rincés dans 4 bains de milieu de culture pour embryon (IMV) puis coupés en deux à l'aide d'un microscalpel (Figure 1).

Figure 1 : Coupe des embryons équins âgés de 8 jours post-ovulation en 2 parties, l'une contenant le bouton embryonnaire, aussi appelé la masse cellulaire interne (MCI) et l'autre partie contenant le trophoblaste (TE)



© Emilie Derisoud A) Identification de la MCI et du TE ; B) Définition du plan de coupe pour isoler la MCI ; C) Etape 3 : Coupe de l'embryon et séparation des deux parties (partie TE : trophoblaste pur et partie MCI : masse cellulaire interne + trophoblaste)

Après extraction des ARN de chaque héli-embryon, un séquençage non orienté, paired-end, a été effectué avec la technologie Illumina (NextSeq500). Les gènes exprimés ont été identifiés grâce à la base de données Ensembl EquCab3.o.97. L'expression différentielle de l'expression des gènes a été analysée (gènes considérés individuellement) avec un critère de $p < 0,05$ p après correction FDR (False Discovery Rate). De plus, une analyse d'enrichissement des réseaux géniques (Gene Set Enrichment Analysis ou GSEA) a été effectuée afin de comprendre quels réseaux de gènes sont affectés par l'âge de la jument.

3 Résultats

Un peu plus de 12 500 gènes sur environ 30 000 gènes (environ 40%) annotés dans le génome équin sont exprimés dans le bouton embryonnaire (MCI) et le trophoblaste (TE) de l'embryon équin.

3.1 Analyse différentielle

3.1.1 Dans la partie contenant la masse cellulaire interne (MCI)

Parmi les 12 874 gènes exprimés dans la MCI, 32 gènes (soit environ 0,2% des gènes exprimés) sont différentiellement exprimés entre les embryons issus des JM et des VM dans la partie contenant la MCI. Dix gènes sont up-régulés tandis que 22 sont down-régulés dans les MCI des embryons issus de VM.

Ces gènes sont principalement impliqués dans la fonction mitochondriale.

3.1.2 Dans la partie contenant le trophoblaste pur (TE)

Seulement 6 gènes sur les 12705 gènes identifiés (soit moins de 0,05%) dans la partie TE de l'embryon équin sont différentiellement exprimés entre les embryons issus des JM et des VM. Seulement deux gènes sont up-régulés tandis que quatre sont down-régulés dans les MCI des embryons issus de VM.

Tout comme dans la MCI, ces gènes sont principalement impliqués dans la fonction mitochondriale.

3.2 Analyse d'enrichissement des réseaux de gènes

L'analyse d'enrichissement des réseaux de gènes permet de mettre en évidence les ensembles de gènes dont l'expression est augmentée ou réduite dans le lot des vieilles multipares (VM) en comparaison des jeunes multipares (JM). Dans la partie MCI, une centaine de réseaux de gènes sont modifiés dans le groupe des juments âgées alors que dans le TE, seulement une trentaine de réseaux de gènes sont modifiés. Etant donné le nombre important d'ensembles de gènes perturbés par le vieillissement de la jument chez les multipares, nous avons décidé de nous concentrer sur les principaux (voir Tableau 1).

Tableau 1 : Principaux réseaux de gènes enrichis ou appauvris dans la masse cellulaire interne (MCI) et le trophoblaste (TE) des embryons issus de juments multipares âgées (VM) par rapport aux juments plus jeunes (JM).

Partie de l'embryon	Réseaux de gènes enrichis dans les embryons issus des juments VM	Réseaux de gènes appauvris dans les embryons issus des juments VM
MCI	Respiration cellulaire aérobie (mitochondries)	Biosynthèse des stéroïdes Morphogénèse des organes primaires Métabolisme du fructose et du mannose Biosynthèse des acides gras insaturés
TE	Respiration cellulaire aérobie (mitochondries)	Biosynthèse des acides aminés Régulation négative du processus de mort cellulaire programmé

4 Conclusions et applications pratiques

Une partie des gènes liés à la fonction mitochondriale est dérégulée dans les embryons des vieilles juments. De plus, la respiration cellulaire utilisant de l'oxygène (aérobie) est enrichie dans la MCI et le TE de leurs embryons. Elle s'effectue dans les mitochondries, qui sont des structures intra-cellulaires héritées de l'ovocyte maternel. Grâce à la respiration aérobie, les mitochondries synthétisent la majorité de l'énergie nécessaire pour la cellule. Cependant, la respiration cellulaire s'accompagne de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species), qui lorsqu'elles sont produites en trop grande quantité, induisent un stress oxydatif pouvant conduire à la mort des mitochondries et des cellules. On sait que le vieillissement de la jument induit des lésions membranaires dans les mitochondries des ovocytes. Ces lésions entraînent une diminution de l'efficacité de la production d'énergie par les mitochondries et accentuent la production des ROS (Rambags et al., 2014). Par conséquent, l'enrichissement de l'expression des gènes liés à la respiration cellulaire, observée dans notre étude, peut-être dû à une compensation au sein des mitochondries pour la production de l'énergie nécessaire au développement de l'embryon. Il est intéressant de noter que malgré une augmentation globale de l'expression des gènes de la respiration cellulaire, tous les gènes impliqués dans cette voie ne sont pas surexprimés. Or tous doivent être exprimés de manière coordonnée pour une activité optimale de la mitochondrie. Donc, chez les embryons des juments âgées, les mitochondries semblent être plus actives mais moins efficaces dans la MCI et le TE en comparaison de celles des embryons de jeunes juments.

Dans les embryons des juments VM, le réseau de gène lié à la synthèse des stéroïdes est appauvri et les gènes impliqués dans la production du cholestérol sont perturbés. Or, la synthèse des stéroïdes commence dans la mitochondrie par la production du cholestérol (Farese and Herz, 1998). De plus, le cholestérol est nécessaire à la synthèse des membranes plasmiques, des stéroïdes et pour l'activation de protéines hedgehog qui sont essentielles

dans la structuration et le développement de différents organes (Farese and Herz, 1998). Ainsi, cet appauvrissement pourrait être à l'origine ou la conséquence d'une efficacité réduite des mitochondries des embryons des vieilles juments dans la MCI et confirme donc notre hypothèse que les mitochondries des embryons issus des VM sont moins efficaces. Par ailleurs, le réseau de gènes lié à la morphogenèse des organes primaires est également appauvri dans la MCI des embryons issus des vieilles juments. Ces gènes étant responsables de la mise en place des différentes lignages cellulaires nécessaires au développement du fœtus, la diminution de leur expression pourrait être responsable d'un retard dans le développement. De plus, les cellules utilisent les acides gras, les sucres et les acides aminés comme substrats. Par conséquent, il est probable qu'il existe un lien entre l'enrichissement des réseaux de gènes liés à la respiration aérobie et l'appauvrissement des réseaux de gènes de la biosynthèse des acides gras insaturés, du métabolisme du fructose et du mannose, la biosynthèse des acides aminés. La perturbation de la production d'énergie par les mitochondries pourrait être à l'origine de la réduction de la biosynthèse de molécules essentielles au développement de l'embryon. Ce lien reste à être approfondi (travail en cours). En condition physiologique, il existe un équilibre entre la production de ROS et celle de molécules permettant leur dégradation. Le réseau des gènes impliqués dans la régulation négative du processus de mort cellulaire programmée, qui participe notamment à la régulation des ROS, est appauvri. Ce résultat suggère que dans le TE des embryons des juments multipares de plus de 10 ans, les ROS sont moins contrôlés et par conséquent, que les cellules subissent un stress oxydatif plus important conduisant potentiellement à l'apoptose, comparé aux embryons des jeunes juments. Ainsi, ce stress oxydatif dans le TE pourrait expliquer le retard de la mise en place des microcotylédons observé chez les vieilles juments (Bracher et al., 1996).

En conclusion, de nombreuses voies métaboliques sont perturbées chez les embryons issus de juments de plus de 10 ans (VM) par rapport à ceux obtenus chez de jeunes juments (6 ans), indiquant qu'il existe bien un effet délétère de l'âge de la jument, même en dessous de 17 ans, sur l'expression des gènes du métabolisme dans l'embryon. Le métabolisme et la production d'énergie par l'embryon semblent être moins efficaces chez les embryons des vieilles juments. Ces différences semblent être responsables d'un ralentissement du développement de l'embryon et pouvant expliquer l'augmentation de la mort embryonnaire chez les juments âgées. De plus, la partie de l'embryon destinée à devenir le placenta (trophoblaste ou TE) est aussi affectée, confirmant notre hypothèse que les effets placentaires déjà observés auraient, au moins en partie, une origine embryonnaire. Par conséquent, ces travaux confirment qu'il est préférable de mettre les juments à la reproduction lorsqu'elles sont jeunes et de ne pas attendre que la carrière sportive de la jument soit avancée pour réaliser des collectes d'ovocytes et d'embryons. Une meilleure connaissance des processus impliqués permettra d'explorer les possibilités de remédiation. Enfin, les effets à long terme des différences observées chez l'embryon, sur la fonction placentaire et la santé du poulain sont actuellement étudiés. Seules des études épidémiologiques permettront d'évaluer les effets potentiels sur la carrière sportive.

5 Pour en savoir plus

- Ball, B.A., Little, T.V., Hillman, R.B., Woods, G.L., 1986. Pregnancy rates at Days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to day 14 in normal and subfertile mares. *Theriogenology* 26, 611–619. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90168-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90168-8)
- Ball, B.A., Little, T.V., Weber, J.A., Woods, G.L., 1989. Survival of Day-4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. *Reproduction* 85, 187–194. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0850187>
- Bracher, V., Mathias, S., Allen, W.R., 1996. Influence of chronic degenerative endometritis (endometrosis) on placental development in the mare. *Equine Veterinary Journal* 28, 180–188. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1996.tb03771.x>
- Farese, R.V., Jr, Herz, J., 1998. Cholesterol metabolism and embryogenesis. *Trends in Genetics* 14, 115–120. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(97\)01377-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(97)01377-2)
- Hintz, R.L., Hintz, H.F., Vleck, L.D.V., 1979. Growth rate of Thoroughbreds. Effect of age of dam, year and month of birth, and sex of foal. *Journal of Animal Science* 48, 480–487.
- Langlois, B., Blouin, C., 2004. Statistical analysis of some factors affecting the number of horse births in France. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 583–595. <https://doi.org/10.1051/rnd:2004055>
- Panzani, D., Rota, A., Marmorini, P., Vannozzi, I., Camillo, F., 2014. Retrospective study of factors affecting multiple ovulations, embryo recovery, quality, and diameter in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology* 82, 807–814. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.06.020>
- Rambags, B.P.B., van Boxtel, D.C.J., Tharasanit, T., Lenstra, J.A., Colenbrander, B., Stout, T.A.E., 2014. Advancing maternal age predisposes to mitochondrial damage and loss during maturation of equine oocytes in vitro. *Theriogenology* 81, 959–965. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.020>
- Wilsher, S., Allen, W.R., 2003. The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. *Equine Veterinary Journal* 35, 476–483. <https://doi.org/10.2746/042516403775600550>