



AIP Bio-Ressources 2010 - Projet BioFoll

Agnès Bonnet

► **To cite this version:**

Agnès Bonnet. AIP Bio-Ressources 2010 - Projet BioFoll. Génomopole de Toulouse Midi-Pyrénées (GénoToul); SIGENAE. 2010. hal-02819437

HAL Id: hal-02819437

<https://hal.inrae.fr/hal-02819437>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Fiche AIP Bio-Ressources 2010

Nom-prénom du demandeur : Bonnet Agnès

Acronyme : BioFoll

Département : Génétique Animale

Description de la demande (3 pages maxi)

Enjeux et question scientifiques

En agronomie, la maîtrise de la fonction de reproduction des animaux d'élevage joue un rôle central dans la gestion des exploitations, pour la production mais également dans un souci du bien être animal (ex : limitation des tailles de portée extrêmes chez les brebis). En santé humaine, la compréhension des dysfonctionnements ovariens est également un enjeu important. Par exemple la défaillance ovarienne précoce est une pathologie responsable d'aménorrhées primitives ou secondaires qui touche 1% des femmes de moins de 40 ans). Deux processus indissociables, l'ovogenèse et la folliculogenèse déterminent le nombre et la qualité des ovocytes produits. Une réserve folliculaire (follicules primordiaux) est acquise au cours de la vie fœtale et va s'épuiser tout au long de la vie reproductive. En particulier, l'activation qui permet de faire sortir le follicule primordial de la réserve folliculaire est la première étape non réversible. En conséquence, elle conditionne la durée de reproduction et la fertilité.

Le bon déroulement de la première phase de la folliculogenèse (folliculogenèse basale) est donc une étape cruciale pour la fonction ovarienne. La petite taille de ces follicules et les faibles quantités d'ARN disponibles limitent les études des mécanismes contrôlant ces premières étapes. Un premier projet « REFOLLIS », financé par l'ANR Genanimal 2007 (90 000€), a permis de développer les technologies d'isolement et d'analyse des ARN provenant des différents stades de la folliculogenèse basale et des compartiments folliculaires chez la brebis.

L'objectif de ce projet est d'identifier les transcrits caractéristiques ou « biomarqueurs » de la croissance folliculaire basale chez la brebis à partir des échantillons du projet « REFOLLIS », en exploitant les nouvelles technologies de séquençage.

Les biomarqueurs mis en évidence devraient contribuer à l'amélioration du contrôle génétique de la reproduction et aux traitements des pathologies humaines. L'obtention de répertoires de transcrits pour les cellules de la granulosa à ces stades là est aussi un travail original qui permettra de mieux comprendre le dialogue moléculaire établi entre la granulosa et l'ovocyte. L'identification des transcrits ovins viendra compléter ou confirmer les données acquises chez les rongeurs et participera de manière plus générale à l'annotation du génome ovin en cours de séquençage.

Description du projet lui-même (état de l'art, positionnement des demandeurs, méthodologie, collaborations)

Etat de l'art : Les différentes étapes de la folliculogenèse basale sont contrôlées par l'expression spécifique de certains gènes ovocytaires. On peut citer par exemple les deux facteurs de transcription *FIGLA* et *NOBOX*, essentiels pour la formation des follicules primordiaux [1, 2]. La transition primordial-primaire fait intervenir les gènes *FOXO3A* [3] et *PTEN* [4]. Leur inactivation provoque un démarrage massif de la croissance et en conséquence un épuisement prématuré de la réserve. La transition primaire secondaire requiert l'expression des gènes *GDF9* et *BMP15*. Chez la brebis plusieurs mutations inactivatrices présentes à l'état homozygote dans ces deux gènes provoquent la stérilité des femelles par blocage du développement au stade primaire. Par contre chez les rongeurs, l'inactivation de *BMP15* n'entraîne qu'un taux d'ovulation légèrement réduit. **Dès les premiers stades de la folliculogenèse, un dialogue moléculaire très étroit se met aussi en place entre les cellules somatiques et les cellules germinales** dont les acteurs et les mécanismes sont encore mal connus. Au stade primaire des gènes ovocytaires comme *BMP15* et *GDF9* stimulent la prolifération des cellules de la granulosa et favorisent leur survie. En retour, les cellules de granulosa sécrètent la protéine KITLG qui avec son récepteur KIT présent dans l'ovocyte participent à la croissance ovocyttaire [5]. De la même manière l'AMH, sécrétée par les cellules de granulosa des follicules en croissance régule l'activation des follicules primordiaux [6].

Les études des mécanismes contrôlant ces premières étapes sont donc limitées à cause de la difficulté d'accès au matériel et concernent essentiellement les rongeurs, espèce poly-ovulante et l'ovocyte. Or, le rôle des gènes peut être différent entre espèces mono ou poly-ovulantes (ex *BMP15*) et les mécanismes ne peuvent pas à l'évidence être entièrement transposés. Parmi les mammifères mono-ovulants (homme, bovin, caprin, ovin ...), l'espèce ovine est un bon modèle expérimental car la folliculogenèse y est bien décrite, on peut disposer de modèles génétiques (*BMP15* ...) et les caractéristiques de la

folliculogenèse sont proches de l'espèce humaine. Le génome ovin est également en cours de séquençage (81% du génome séquencé) et un pré assemblage du génome est actuellement disponible.

Positionnement : Le présent projet est coordonné par A. Bonnet de **l'équipe de Génétique et Différenciation Ovarienne** (GDO) de l'UMR GC, spécialisée dans l'expression des gènes au cours de la folliculogenèse chez la truie et la brebis. L'équipe possède des compétences en génétique moléculaire [7], transcriptome [8-10] et interprétation des données biologiques [11, 12]. Elle est aussi impliquée dans des projets de pyroséquençage (CapriSnip, gène Lacaune). Une première étude de faisabilité « REFOLLIS » a permis d'isoler par microdissection à capture laser (LCM) les 4 stades de développement (primordial, primaire, secondaire et pré antral) et les 2 compartiments (ovocyte et cellules de la granulosa) (soit 8 conditions) en triples et d'extraire et amplifier les ARN correspondants. La qualité de la capture a été validée statistiquement en recherchant par qRT-PCR la présence de transcrits spécifiques d'un compartiment folliculaire (ovocyte : *BMP15*...; granulosa : *AMH*...). Des différences significatives d'expression au cours du développement ont été observées. La qualité des amplifications a été confirmée par hybridation sur puces Affymetrix bovines (publication en préparation).

Méthodologies :

Comme l'indice le schéma p 3, trois nouvelles captures par LCM et amplifications des ARN viendront compléter les échantillons épuisés du projet « REFOLLIS ».

Séquençage : Le couplage des deux technologies LCM et pyroséquençage avec la technologie 450 GS-FLX-Roche a déjà montré son efficacité sur le maïs pour isoler des transcrits rares ou spécifiques d'un type cellulaire [13]. Il génère des séquences assez longues (400pb) qui permettent une bonne identification des gènes et une meilleure localisation pour un génome non entièrement séquencé. Un run de séquençage permet de générer environ 1 million de séquences par échantillon et devrait révéler l'expression de 70% des gènes d'un génome de mammifère [14]. Enfin, le nouveau kit de séquençage commercialisé par Roche performant dès 500 ng d'ARN est particulièrement adapté à l'analyse des petites quantités d'ARN (contre 5µg pour une puce Affymetrix). Pour chaque condition, les ADNc des triplicats seront étiquetés avant d'être mélangés pour permettre leur reconnaissance lors de l'assemblage (réf schéma). Le pyroséquençage de chaque condition, permettra d'obtenir une description précise des différents répertoires de transcrits. La technique d'étiquetage (tagging) nous fournira également des indications sur la variabilité entre individus.

Traitement des données : Après nettoyage et assemblage, une première localisation des séquences sera effectuée sur le génome ovin disponible. Elle sera complétée par une localisation sur le génome bovin, actuellement génome de référence. L'assemblage permettra d'évaluer la couverture des gènes et les annotations s'effectueront à partir de la banque REFSEQ bovine. Enfin les profils d'expression seront déterminés par comptage des transcrits par gène.

Analyse des données : 1- La qualité de l'analyse quantitative du transcriptome obtenue par séquençage sera évaluée par comparaison avec les données existantes des puces Affymetrix (REFOLLIS). Les profils d'expression obtenus seront également comparés à ceux déjà connus dans la bibliographie. 2- Les biomarqueurs seront identifiés à partir des profils d'expression sur la base de leurs spécificités d'expression et en tenant compte de la variabilité entre individu. L'expression de ces biomarqueurs sera par la suite validée par qPCR et/ou hybridation *in situ*. 3- Afin de mieux comprendre l'organisation des gènes de la folliculogenèse basale chez la brebis nous nous proposons d'établir une carte dynamique des régions transcrites pour les 2 compartiments concernés. On sait en effet que les gènes d'expression spécifiquement ovocytaires qui s'organisent en cluster sur le génome de la souris ont tendance à se localiser près des télomères [15]. Cette cartographie fonctionnelle devrait apporter des éléments de réponse sur la relation entre position chromosomique des gènes et spécificité d'expression. Ces cartes seront intégrées dans le navigateur de génomes comparés « Narcisse » pour faciliter la comparaison entre espèces [16].

Collaborations : le pyroséquençage (454 GS-FLX Roche Titanium) sera effectué en collaboration avec la **plateforme Génomique (génopole Midi Pyrénées)** compétente en séquençage d'EST (PyrESAVI, AIP bio ressources 2007). Les séquences seront assemblées et annotées par **l'équipe Sigenae** à l'aide des outils déjà développés pour d'autres projets (PyrESAVI, séquençage systématique de la région candidate du gène FeCL chez la brebis Lacaune...). Au sein de **l'équipe de Biomathématiques** (UMR GC), M. San Cristobal participera aux analyses statistiques des données de séquençage avec l'appui de la plateforme biostatistique (génopole Midi-Pyrénées) et T. Faraut interviendra dans l'identification et la comparaison des clusters de gènes entre espèces. Il va participer par ailleurs à la validation de l'assemblage du génome ovin.

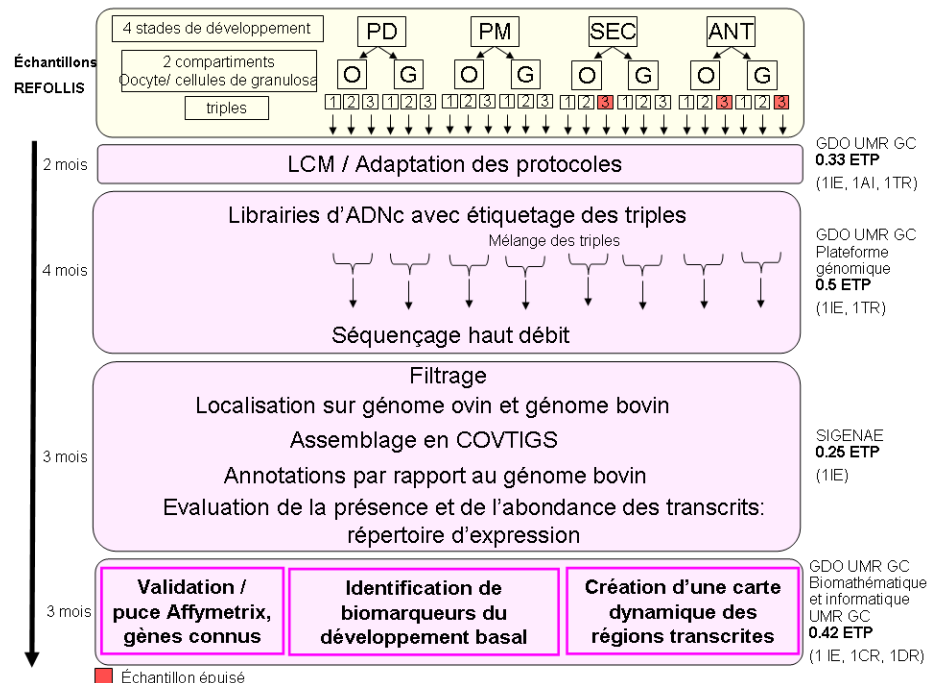
Résultats attendus : Obtention de répertoires d'expression au cours de la folliculogenèse basale chez une espèce mono ovulante. Identification de biomarqueurs qui pourront être utilisés pour contrôler la survie et le développement des follicules après cryopréservation du cortex ovarien d'agnelles et greffes (projet Cryovaire financé par la région centre, 2010-2013). Comparaison des clusters de gènes entre espèces. En complément, les séquences obtenues dans ce projet viendront enrichir les banques d'EST

actuelles (340000 séquences). Elles pourront être utilisées pour compléter le séquençage et l'annotation du génome ovin et améliorer la densité des microarrays ovins (actuellement de 15K).

1. Rajkovic, A., et al., *NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression*. Science, 2004. 305(5687): p. 1157-9.
2. Soyak, S.M., A. Amleh, and J. Dean, *FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation*. Development, 2000. 127(21): p. 4645-54.
3. John, G.B., et al., *Specificity of the requirement for Foxo3 in primordial follicle activation*. Reproduction, 2007. 133(5): p. 855-63.
4. Reddy, P., et al., *Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool*. Science, 2008. 319(5863): p. 611-3.
5. Thomas, F.H. and B.C. Vanderhyden, *Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth*. Reprod Biol Endocrinol, 2006. 4: p. 19.
6. Durlinger, A.L., et al., *Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary*. Endocrinology, 1999. 140(12): p. 5789-96.
13. Emrich, S.J., et al., *Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing*. Genome Res, 2007. 17(1): p. 69-73.
14. Mane, S.P., et al., *Transcriptome sequencing of the Microarray Quality Control (MAQC) RNA reference samples using next generation sequencing*. BMC Genomics, 2009. 10: p. 264.
15. Paillisson, A., et al., *Identification, characterization and metagenome analysis of oocyte-specific genes organized in clusters in the mouse genome*. BMC Genomics, 2005. 6(1): p. 76.

Réalisation

1. faisabilité sur 2010 : planning, ETP, gestion des données,



2. justificatif des coûts : nb-runs, coûts unitaires, coût total, co-financements,

Total : 85300 €

Adaptation des protocoles : Microdissection et amplification des ARN, conversion en ADNc et étiquetage: 4000 €

1 run de séquençage 454 FLX pour la mise au point des conditions : 8300 €

Séquençage : 8 runs de séquençage : 66400 €

Traitement et stockage des données sur la plateforme bio-informatique : 4000 €

Validation des biomarqueurs par PCR en temps réel (~20) : 2600 €

Références bibliographiques des équipes

7. Bodin, L., et al., *A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep*. Endocrinology, 2007. 148(1): p. 393-400.
8. Jaffrezic, F., et al., *Analysis of the real EADGENE data set: comparison of methods and guidelines for data normalisation and selection of differentially expressed genes (open access publication)*. Genet Sel Evol, 2007. 39(6): p. 633-50.
9. Bonnet, A., et al., *In vivo gene expression in granulosa cells during pig terminal follicular development*. Reproduction, 2008.
10. Bonnet, A., et al., *Identification of differential gene expression in in vitro FSH treated pig granulosa cells using suppression subtractive hybridization*. Reprod Biol Endocrinol, 2006. 4: p. 35.
11. Bonnet, A., et al., *Pathway results from the chicken data set using GOTM, Pathway Studio and Ingenuity softwares*. BMC Proc, 2009. 3 Suppl 4: p. S11.
12. Hedegaard, J., et al., *Methods for interpreting lists of affected genes obtained in a DNA microarray experiment*. BMC Proc, 2009. 3 Suppl 4: p. S5.
16. Courcelle, E., et al., *Narcisse: a mirror view of conserved syntenies*. Nucleic Acids Res, 2008. 36(Database issue): p. D485-90.