

AGENAE



Analyse du **GEN**ome des **Animaux** d'**Elevage**

Séminaire AGENAE 2006
28-29 mars au Futuroscope (Poitiers)

Thèmes principaux :
Fertilité et Résistance aux maladies

Comité d'organisation :

Claude CHEVALET, AGENAE Toulouse
Daphné FRULLINI, AGENAE Toulouse
Catherine CHRISTOPHE, AGENAE Paris
<http://www.inra.fr/agenae>

Sommaire

Programme séminaire AGENAE 2006.....	3
---	----------

Présentations orales

Utilisation des données de la génomique dans la Sélection Assistée par Marqueurs.....	5
Evaluation Génotypique et Phénotypique de la fertilité chez les bovins.....	7
Conduite d'élevage et Fertilité chez les Poissons.....	8
Fertilité mâle : le contexte et la recherche de QTL.....	10
Qualité des œufs chez la truite : contexte et résultats.....	11
Données génomiques et prédiction de la réponse à la superovulation.....	13
Qualité des Gamètes chez le poulet, recherche de gènes candidats.....	15
Le transcriptome de l'embryon précoce et ses conséquences.....	17
Les interactions entre métabolisme et reproduction dans le cadre de la baisse de fertilité chez les vaches laitières hautes productrices.....	18
Gènes des tissus somatiques contrôlant la compétence au développement de l'embryon : Altérations chez la vache laitière, relations avec les apports nutritionnels.....	19
L'analyse sérielle de l'expression des gènes (SAGE). Application à l'étude de la trypanotolérance chez les bovins.....	21
Approche protéomique dans le contrôle de la fertilité du gamète mâle.....	22
Exploration structurelle et fonctionnelle du microbiote intestinal humain.....	24
Application de la méthode SSH à l'étude moléculaire de la régression tumorale spontanée dans un modèle de mélanome porcin.....	26
Approches utilisées pour la sélection de poulets résistants aux salmonelles.....	28
EADGENE : un réseau Européen sur la génomique des interactions hôte-pathogènes.....	30
Génomique des interactions hôte/pathogènes chez les poissons.....	32
Interactions virus cellules : modèles cellulaires d'infection par un Herpès virus chez le porc et application à une étude d'impact de la sélection chez les porcs Large White.....	33
Utilisation des SNP pour éliminer les animaux sensibles à la tremblante.....	35
Résistance de la glande mammaire aux infections staphylococciques.....	36

Posters

GenOvul : Exploitation de la variabilité génétique intra et inter-espèces pour l'étude du déterminisme génétique du taux d'ovulation.....	38
FERTILITE : Déterminisme génétique et étude métabolique des problèmes de fertilité des vaches laitières hautes productrices.....	40
GENIFER : Mesures Phénotypiques et étude du polymorphisme de gènes candidats du QTL de fertilité femelle du chromosome 3 dans l'espèce bovine.....	42
MAMMIFERT : Utilisation des souris recombinantes congéniques pour le clonage positionnel rapide de QTL chez les mammifères : application aux QTL de fertilité chez la souris, le bœuf domestique et l'homme.....	43
TYPAGENAE : Améliorer l'efficacité de la sélection multicaractères par le typage de l'embryon.....	45
OVOGENAE : Génomique expressionnelle de l'ovocyte dans des situations physiopathologiques de reproduction bovine.....	46
Fertilité des vaches laitières : vers une définition fine des phénotypes.....	48
RESISAL : Identification par génomique expressionnelle de facteurs de résistance au portage des salmonelles, utilisables en sélection.....	49
Génotypage haute-résolution du gène BF1 (classe I) du MHC chez la Poule par pyroséquençage....	51
Mise au point de vecteurs permettant une expression fiable de gènes codant pour des ARN interférents et des microARN.....	52
CHRONOBOS : Domestication et diversité génomique (SNPs) actuelle et ancienne : Application au bœuf et aux petits ruminants.....	54
QUALVIVOL : Approche de génomique fonctionnelle et positionnelle pour l'identification des gènes responsables des variations de qualité technologique des viandes chez le poulet.....	55
QUALVIGENA : Détection et validation de gènes impliqués dans les qualités de la viande bovine des trois principales races à viande en France.....	56
Liste des participants.....	58

Programme séminaire AGENAE 2006

Thèmes : Fertilité et Résistance aux maladies

Comité de programme :

C.Beaumont, J.Bobe, P.Chardon, C.Christophe, P.Humblot, F.Lefèvre, F.Legac, P.Mermillod

Mardi 28 mars

10h Accueil des participants

12h Repas

- 13h15 Introduction**
13h30-15h15 Le contexte (chairman : A.Eggen)
13h30-14h Utilisation des données de la génomique dans la SAM (D.Boichard)
14h-14h15 Evaluation génotypique et phénotypique de la fertilité chez les bovins (P.Humblot)
14h15-14h30 Conduite d'élevage et fertilité chez les bovins (C.Disenhaus)
14h30-14h45 Conduite d'élevage et fertilité chez les poissons (J.Barossier)
14h45-15h15 Discussion

15h15-16h45 Pause + session posters

- 16h45 -18h15 Fertilité (1) : des gamètes à l'œuf (chairman : F.Legac)**
16h45-17h Fertilité mâle : le contexte et la recherche de QTL (X.Druart)
17h-17h15 Qualité des œufs chez la truite : contexte et résultats (J.Bobe)
17h15-17h30 Données génomiques et prédiction de la réponse à la superovulation (D.Monniaux)
17h30-17h45 Qualité des gamètes chez poulet, recherche de gènes candidats (E.Blesbois)
17h45-18h15 Discussion

20h Repas

Mercredi 23 mars

- 8h30-9h45 Fertilité (2) : l'embryon et son contexte (chairman : P.Mermillod)**
8h30-8h45 Le transcriptome de l'embryon précoce et ses conséquences (V.Duranthon)
8h45-9h Les interactions entre métabolisme et reproduction dans le cadre de la baisse de fertilité chez les vaches laitières hautes productrices (P.Monget)
9h-9h15 Gènes des tissus somatiques contrôlant la compétence au développement de l'embryon : altérations chez la vache laitière, relations avec apports nutritionnels (G.Charpigny)
9h15-9h45 Discussion

9h45-10h30 Pause

- 10h30-12h Méthodologies (chairman : M.Douaire)**
10h30-10h45 L'analyse sérielle de l'expression des gènes (SAGE). Application à l'étude de la trypanotolérance chez les bovins (J.Marti, D.Berthier)
10h45-11h Approche protéomique dans le contrôle de la fertilité du gamète mâle (J.Dacheux)
11h-11h15 Exploration structurale et fonctionnelle du microbiote intestinal humain (J.Doré)
11h15-11h30 Application de la méthode SSH à l'étude moléculaire de la régression tumorale spontanée dans un modèle de mélanome porcin (C.Geffrotin)
11h30-12h Discussion

12h30-14h Repas

Séminaire AGENAE 2006

- 14h-15h15** **Résistances aux maladies (1)** **(chairman : P.Chardon)**
14h-14h30 Approches utilisées pour la sélection de poulets résistants aux salmonelles
(C.Beaumont)
14h30-14h45 EADGENE : un réseau européen sur la génomique des interactions hôte-pathogène
(MH.Pinard)
14h45-15h Génomique des interactions hôte-pathogène chez les poissons (P.Boudinot)
15h-15h15 Interactions virus cellule : modèles cellulaires d'infection par un Herpès virus chez le
porc et application à une étude d'impact de la sélection chez les porcs Large White.
(F.Lefèvre)

15h15-15h45 pause

- 15h45-17h** **Résistances aux maladies (2)** **(chairman : P.Chardon)**
15h45-16h15 Utilisation des SNP pour éliminer les animaux sensibles à la Tremblante (JM.Elsen)
16h15-16h30 Résistance de la glande mammaire aux infections staphylococciques (P.Rainard)
16h30-17h Discussion

- 17h-17h15** **ANR 2006 (C.Chevalet)**
17h15-17h30 **Le mot de la fin**

17h30 : fin du séminaire

Liste des Posters

Posters Fertilité

- GENOVUL** : Exploitation de la variabilité génétique intra et inter-espèces pour l'étude du déterminisme génétique du taux d'ovulation, *P.Mulsant*
FERTILITE : Déterminisme génétique et étude métabolique des problèmes de fertilité des vaches laitières hautes productrices, *J.Dupont*
GENIFER : Mesures phénotypiques et étude du polymorphisme de gènes candidats du QTL de fertilité femelle du chromosome 3 dans l'espèce bovine, *P.Humblot*
MAMMIFERT : Utilisation des souris recombinantes congéniques pour le clonage positionnel rapide de QTL chez les mammifères : application aux QTL de fertilité chez la souris, le bœuf domestique et l'homme, *D.Vaiman*
TYPAGENAE : Améliorer l'efficacité de la sélection multicaractères par le typage de l'embryon, *P.Humblot*
OVOGENAE : Génomique expressionnelle de l'ovocyte dans des situations physiopathologiques de reproduction bovine, *R.Dalbies-Tran*
Fertilité des vaches laitières : vers une définition fine des phénotypes, *P.Lemezec*

Posters Résistances aux maladies

- RESISAL** : Identification par génomique expressionnelle de facteurs de résistance au portage des salmonelles utilisables en sélection, *B.Coudurier*
Génotypage haute-résolution du gène BF1 (classe I) du MHC chez la Poule par pyroséquençage, *B.Bed'hom*

Posters autres Genanimal 2005

- Vecteur shRNA** : Mise au point de vecteurs permettant une expression fiable de gènes codant pour des ARN interférents et pour des micro-ARNs, *F.Leprovost*
CHRONOBOS : Domestication et diversité génomique (SNPs) actuelle et ancienne : application au bœuf et aux petits ruminants, *S.Hughes*
QUALVIVOL : Approche de génomique fonctionnelle et positionnelle pour l'identification des gènes responsables des variations de qualité technologique des viandes chez le poulet, *J.Champagne*
QUALVIGENA : Détection et validation de gènes impliqués dans les qualités de la viande bovine des trois principales races à viande en France, *A.Malafosse*

Utilisation des données de la génomique dans la Sélection Assistée par Marqueurs

Auteur(s) : Didier Boichard, Sébastien Fritz, Tom Druet, Jean Jacques Colleau

Mots-clés : sélection assistée par marqueurs, marqueurs génétiques

Références biblio (5 maxi) :

Boichard D., Fritz S., Rossignol M.N., et al (2002). *7th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod.*, 22.03.

Colleau J.J. (1999a). *6th World Congr Genet Appl Livest Prod*, **25**:419-422

Colleau J.J. (1999b). *6èmes Renc Rech Rum*, 231-233

Ruane J., Colleau J.J. (1995). *Genet. Res.*, **66**:71-83

Ruane J., Colleau J.J. (1996). *J Dairy Sci.*, **79**:1666-1679

Résumé :

En sélection classique, la valeur génétique d'un candidat à la sélection (ce qu'il transmet en espérance à ses descendants) est estimée à partir de ses performances propres et/ou celles de ses apparentés. Deux types d'information sont donc utilisés, les phénotypes et les généalogies. La sélection assistée par marqueurs (SAM) introduit un troisième type d'information, les polymorphismes de l'ADN responsables de ou liés à la variabilité génétique des caractères d'intérêt.

L'information moléculaire permet en principe de jouer sur toutes les composantes du progrès génétique : en apportant une information, elle augmente la précision de l'évaluation génétique ; en ajoutant des étapes de sélection, elle permet une sélection plus intense ; enfin, en permettant une sélection précoce, elle permet de diminuer l'intervalle de génération.

La SAM ne constitue pas en général une alternative mais un complément : en effet, elle n'est techniquement efficace que lorsque le caractère n'est soumis qu'à un petit nombre de gènes qui expliquent une grande partie de la variabilité génétique ; elle n'est économiquement efficace que lorsque le coût global du génotypage est inférieur à celui du phénotypage. En général, un programme de sélection optimal utilisera les trois types d'information (généalogies, phénotypes, génotypes). La SAM est d'autant plus intéressante que la sélection classique est peu efficace, c'est-à-dire quand le phénotype est difficile, long ou coûteux à obtenir (caractère non exprimé dans un sexe, exprimé tardivement, ou imposant la mort de l'animal) ou qu'il est peu informatif (héritabilité faible, gène récessif).

Différents types de SAM (considérée au sens large du terme) sont envisageables, en fonction de l'information moléculaire disponible sur le déterminisme des caractères. Cette information moléculaire peut être de trois types de qualité croissante :

- dans un premier temps, les QTL (ou régions chromosomiques impliquées statistiquement dans la variabilité d'un caractère) sont localisés. Ces régions sont relativement grandes (plusieurs dizaines de cM) et peuvent contenir plusieurs centaines de gènes. Elles sont caractérisées par des marqueurs génétiques polymorphes qui permettent de suivre la transmission du segment chromosomique entre générations. Mais comme ces régions sont grandes et que la localisation exacte du ou des gènes incriminés est inconnue, les marqueurs et le QTL sont supposés en équilibre de liaison, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'association préférentielle entre les allèles des marqueurs et les allèles du QTL au niveau de la population.

- dans un second temps, les QTL sont finement cartographiés. La région contenant le gène est réduite et des marqueurs peuvent être en déséquilibre de liaison, partiel ou total au niveau de la population.

- enfin, le gène et le polymorphisme responsables de la variabilité du phénotype sont identifiés.

Ces trois situations permettent de réaliser une SAM, mais avec un coût et une efficacité très variables. La situation 3 (dite SAM de 3^{ème} génération, ou SAM3 supposant les mutations causales connues) est la plus favorable mais elle est limitée par nos connaissances actuelles, de sorte que les opportunités sont encore rares. Si le caractère est monogénique, la valeur génétique des candidats est prédite directement à partir de son génotype. Si le caractère est polygénique, elle est prédite en combinant le génotype au locus caractérisé et le phénotype.

Dans la situation 1, la SAM n'utilise que l'information de la transmission des QTL entre apparentés. D'une part, elle estime l'effet des QTL (essentiellement par contraste intra famille entre descendants avec phénotype ayant reçu des allèles QTL alternatifs), d'autre part elle transmet cette information aux candidats par l'information marqueurs. Cette SAM1, qui utilise une information moins précise, présente des limitations importantes : elle n'est efficace que si de nombreux apparentés du candidats disposent à la fois de génotypes et de phénotypes, ce qui présente des difficultés d'organisation et de coût ; elle ne tire pas parti, loin de là, de toute l'information disponible ; enfin elle est lourde et coûteuse à mettre en œuvre. On considère que le rapport d'efficacité économique entre la SAM3 et la SAM1 est de l'ordre de 8.

La situation 2 est intermédiaire. Bien que la mutation causale soit inconnue, elle peut être inférée de façon très efficace au niveau populationnel par la SAM2 de sorte que la différence d'efficacité technique entre SAM2 et SAM3 est souvent faible, au prix d'un coût de génotypage et d'interprétation plus élevé, mais sans coût de propriété industrielle.

En pratique, les applications SAM de grande échelle sont encore rares, en dépit de développements théoriques nombreux. Il convient de noter le programme de sélection de résistance à la tremblante ovine, impliquant annuellement plus de 100 000 typages de trois codons de la protéine Prp, ainsi que le programme SAM bovin laitier. Dès 2000 et suite à un important programme de détection de QTL, l'UNCEIA, l'INRA et Labogena ont mis en place un vaste dispositif de sélection assistée par marqueurs (SAM1) dans les races Holstein, Normande et Montbéliarde. Dès l'origine, 12 régions QTL affectant 7 caractères ont été suivies par 33 marqueurs. Dix mille individus sont typés chaque année, dont environ 5000 candidats à la sélection et 5000 autres individus aidant à l'estimation des effets de QTL. Le dispositif a progressivement évolué, avec un caractère et 2 régions supplémentaires, ainsi qu'un jeu de 45 marqueurs permettant une SAM2 pour certains QTL.

Dès le début, ce programme a affiché une double finalité : d'une part, fournir à huit unités de sélection bovine un nouvel outil de sélection des jeunes taureaux avant testage et de jeunes femelles mères à taureau avant leur première lactation ; d'autre part, fournir une grande population de référence bien caractérisée pour les programmes de cartographie fine de QTL. La synergie entre les deux aspects est évidente, la cartographie fine bénéficiant de la population typée tandis que la SAM tire parti des connaissances acquises.

Evaluation Génotypique et Phénotypique de la fertilité chez les bovins.

Auteur(s) : P Humblot et D Boichard

Mots-clés : Fertilité, Sélection, Bovins

Résumé :

Dans l'espèce bovine, l'héritabilité du caractère de fertilité femelle est très faible (0.01 à 0.02), rendant la sélection sur ce caractère particulièrement difficile. En dépit de cette très faible héritabilité, la variabilité génétique est importante (5 points de réussite d'écart type génétique, soit 10% de coefficient de variation génétique σ_g/μ comme pour la production laitière). La production laitière et la fertilité femelle sont deux caractères antagonistes (corrélation génétique de l'ordre de -0.3 entre la production laitière et le taux de réussite) et la sélection passée réalisée principalement sur les critères d'aptitude laitière a entraîné une diminution de la fertilité dans les principales races laitières françaises. On estime que la moitié de la baisse de fertilité observée (-1% par an en race Holstein) est due à la sélection pour la production laitière. En 1998, un index de fertilité femelle a été mis en place à partir du résultat de chaque insémination afin de disposer d'un outil efficace de sélection sur ce caractère et arrêter la baisse. Cet index a été intégré en 2001 dans l'Index de Synthèse (ISU) de telle sorte qu'une sélection sur cet ISU n'entraîne plus de baisse de fertilité. Le poids relatif de ce caractère dans l'index varie actuellement de 10 à 12.5% pour les trois grandes races. Le taux de réussite à l'IA est cependant un caractère global qui présente deux « défauts » : i) on doit, pour qualifier une IA (fécondante ou non), attendre soit l'IA suivante, soit un vêlage et ii) cette variable recouvre des aptitudes très diverses : aptitude à la fécondation, mortalité embryonnaire à des stades plus ou moins précoces.

Actuellement, des travaux sont en cours à l'INRA pour affiner le modèle d'indexation, avec notamment une prise en compte différente des données selon que la réussite à l'IA a été ou non validée par un vêlage suivant. Le faible pouvoir discriminant du taux de réussite à l'IA est aussi à l'origine d'une autre étude lancée par l'Institut de l'Élevage et l'UNCEIA, avec la collaboration de l'INRA. Ce travail, financé à la fois par le Ministère de l'Agriculture (action innovante CRITFER) et l'Onilait, vise entre autres à étudier l'ensemble des données disponibles sur le terrain qui pourraient préciser les performances ou enrichir le modèle d'évaluation de la fertilité. En premier lieu on s'intéresse aux constats de gestation, pratique de plus en plus courante sur le terrain. L'utilisation de ces données permettrait par exemple de « qualifier » une IA plus précocement ou de mieux identifier dans le taux de réussite ce qui relève de l'aptitude à la fécondation et ce qui est lié à la mortalité embryonnaire. En pratique, la seule façon de procéder pour bien séparer ces différentes composantes de la fertilité est de faire appel aux dosages hormonaux et aux constats de gestation plus tardifs qui permettent l'identification de femelles inséminées à un moment inadéquat (concentration de progestérone positive le jour de l'IA), non fécondées ou ayant présenté une mortalité embryonnaire précoce (concentration de progestérone négative 21 jours après IA) ou de mortalité embryonnaire plus tardive (utilisation du dosage de signaux embryonnaires plus tardifs et/ou échographie). Ces analyses/examens sont coûteux et difficiles à mettre en œuvre de façon généralisée mais peuvent être mis à profit dans les études de génomique (comme GENIFER) visant à identifier ou préciser l'action de marqueurs de fertilité.

Conduite d'élevage et Fertilité chez les Poissons

Auteur(s) : JF Baroiller, Cirad-EMVT

Mots-clés : maîtrise de la reproduction, qualité des gamètes, influence environnementale

Références biblio (5 maxi) :

Billard, R., 1992. Reproduction in rainbow trout : sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture*, 100: 263-298.

Guiguen, Y., Baroiller, J.F., Jalabert, B., et A., Fostier., 1996. Le contrôle du sexe phénotypique chez les poissons. *La Pisciculture Française*, 124: 16-19.

Baroiller, J.F., Desprez, D., Carteret, Y., Tacon, P., Hoareau, M.C., Mélard, C., and Jalabert, B., 1997. Influence of environmental and social factors on the reproductive efficiency in three tilapia species, *Oreochromis niloticus*, *O. aureus* and the red tilapia (Red Florida strain). In K. Fitzsimmons (eds.), *Proceedings of the fourth International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, 9-12 November 1997, Orlando, Florida. U.S.A., pp. 238-252.

Fostier, A., et Jalabert, B., 2004. Domestication et reproduction chez les poissons. *INRA Prod. Anim.*, 17 (3), 199-204.

Jalabert, B., 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod. Nutr. Dev.* 45: 261-279

Résumé

Avec plus de 200 espèces élevées aujourd'hui dans le monde, l'aquaculture se distingue des autres productions animales, notamment par une extrême diversification des espèces et des milieux d'élevage. Une partie de l'impressionnante diversité des modes de reproduction et sexualité des poissons se trouve donc représentée dans les espèces d'élevage.

Dans le milieu naturel, cette reproduction est synchronisée par des fluctuations de facteurs de l'environnement, saisonnières ou liées à des migrations de l'espèce. La photopériode et la température sont généralement considérées comme les facteurs majeurs synchronisant la période de reproduction et la reprise du cycle sexuel, les autres facteurs agissant plus en synergie pour ajuster la période de ponte.

En élevage, le contrôle de la reproduction peut d'abord répondre à des objectifs de production synchrone, décalée ou étalée des gamètes et des alevins. Chez de nombreuses espèces, la manipulation de la photopériode permet d'inhiber, déclencher ou décaler la reproduction, sous réserve de températures appropriées (manipulation « photothermique »). Chez la truite, l'utilisation de souches à saison de ponte décalée est également possible. L'ovulation peut être induite ou synchronisée par traitement hormonal dont l'efficacité repose toutefois sur l'état de maturité des femelles. Or il n'existe pas de critère totalement fiable d'appréciation de cet état de maturité.

Par ailleurs, qu'ils soient induits ou non, les géniteurs mâles comme femelles présentent une forte variabilité individuelle dans leurs dates d'ovulation et de spermiation, et dans la qualité de leurs gamètes. De fait la dynamique de la gamétogenèse, en particulier des étapes précoces (ontogenèse gonadique et recrutement des ovocytes) et de leurs dépendances environnementales restent mal connues. Chez des espèces comme la truite, les œufs peuvent alors rester dans la cavité coelomique et en l'absence d'un suivi régulier (stress) des géniteurs, des phénomènes de vieillissement des œufs se traduisent par une diminution de leur qualité. Une meilleure connaissance de la structure et composition de l'œuf et du liquide coelomique reste nécessaire.

Le contrôle de la reproduction permet aussi d'éviter les conséquences négatives (surpopulation, nanisme) de reproductions spontanées et parfois continues, et/ou de limiter les interactions croissance/reproduction, et/ou de bénéficier des meilleures performances d'un des sexes. Dans ces derniers cas, des populations monosexes et/ou stériles peuvent être produites par manipulations chromosomiques (triploïdes, utilisation de mâles XX ou YY, et de femelles ZZ ou WW chez les espèces à déterminisme monofactoriel). Chez certaines

espèces, la totale stérilité des triploïdes reste débattue. Enfin, la complexité du déterminisme du sexe aboutit souvent à l'apparition de sexe-ratios inattendus. La encore, une meilleure connaissance des étapes précoces de l'ontogenèse gonadique et de sa dépendance environnementale est nécessaire pour rechercher des alternatives acceptables par le consommateur.

Fertilité mâle : le contexte et la recherche de QTL.

Auteur(s) : B. BASSO (1), S. FRITZ (1), T. DRUET (2), F. GUILLAUME (2), M.N. ROSSIGNOL (3), Y. AMIGUES (3), R. GABRIEL (4), E. SELLEM (4), L. SALAS-CORTES (4), P. HUMBLLOT (4), X. DRUART (5).

(1) UNCEIA Département Fédéral, 149 rue de Bercy, 75595 Paris Cedex 12, France

(2) INRA Station de Génétique Quantitative et Appliquée, 78352 Jouy-en-Josas, France

(3) GIE LABOGENA, 78352 Jouy-en-Josas, France

(4) UNCEIA Département R&D, 13 rue Jouët, 94703 Maisons-Alfort, France

(5) INRA Physiologie de la Reproduction et des comportements, 37380 Nouzilly, France

Mots-clés : Taureau. Sperme. Fertilité mâle. QTL. SAM.

Résumé :

Chez plusieurs espèces de mammifères, des QTL ou des gènes directement impliqués dans la fertilité mâle ont été identifiés. Dans l'espèce bovine, et en particulier dans la race laitière de type Prim'Holstein, la fertilité présente une diminution constante depuis plusieurs années. S'il existe des données qui permettent d'expliquer en partie cette baisse de fertilité globale par une plus faible fertilité des vaches hautes productrices, l'impact des taureaux est mal connu. La valeur d'un taureau pour cette composante mâle de la fertilité est connue le plus souvent tardivement, après qu'un grand nombre d'IA ait été réalisé. De plus, l'héritabilité de la fertilité mâle est très faible. Il apparaît donc judicieux d'utiliser des indicateurs supplémentaires de la fertilité mâle comme les mesures de production ou de qualité de semence. Néanmoins, ces caractères sont parfois plus difficiles ou coûteux à mesurer. Dès lors, l'utilisation en sélection assistée par marqueurs d'éventuels QTL affectant les caractères de fertilité mâle pourrait être particulièrement bénéfique.

Un dispositif de détection de QTL de 515 taureaux prim'Holstein appartenant à 10 familles a donc été mis en place. Celui-ci s'intéresse à la fertilité mâle évaluée par différents Taux de Non Retour en chaleur (TNR) à 28, 56, 90 et 282 jours, à des variables de production de semence (volume, concentration et nombre de spermatozoïdes par éjaculat) et à des variables de qualité de semence (motilité, pourcentage de spermatozoïdes viables). Les paramètres génétiques estimés par la méthode du maximum de vraisemblance restreint (REML) confirment l'héritabilité très faible pour les TNR (0,005 à 0,008) alors que les héritabilités estimées des caractères de production et de qualité de semence (0,13 à 0,71) sont plus élevées. Les corrélations entre les variables de chaque catégorie (fertilité, production de semence et qualité de semence) sont toujours élevées. Certaines variables de laboratoire, en particulier les anomalies morphologiques des spermatozoïdes, semblent particulièrement intéressantes car génétiquement corrélées à la composante mâle de la fertilité. La détection de QTL a été appliquée avec une couverture de 150 marqueurs sur l'ensemble du génome. 1 à 3 QTL ont été détectés pour chacun des caractères et, sur les chromosomes 8, 11, 14, 15, 18, 20 et 23 des QTL ont même été détectés pour plusieurs caractères.

Cette étude de primo-localisation, avec des intervalles de confiance relativement larges, est la première étape de recherches visant à cartographier ces QTL et à déterminer leurs actions.

Qualité des œufs chez la truite : contexte et résultats

Auteur(s) : Julien Bobe, Emilie Bonnet et Alexis Fostier

Mots-clés : Ovule, Truite, Puce à ADN, PCR quantitative

Références biblio (5 maxi) :

Aegerter S, Jalabert B, Bobe J: Large scale real-time PCR analysis of mRNA abundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and post-ovulatory ageing. *Mol Reprod Dev* 2005, 72:377-385.

Bonnet E, Fostier A, Bobe J: Effect of photoperiod on rainbow trout egg quality: a genomic study. *Aquaculture, à paraître*.

Aegerter S, Jalabert B, Bobe J: Messenger RNA stockpile of cyclin B, insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor II, insulin-like growth factor receptor Ib, and p53 in the rainbow trout oocyte in relation with developmental competence. *Mol Reprod Dev* 2004, 67:127-135.

Résumé :

Les conséquences, sur la qualité des œufs et des embryons de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), de pratiques zootechniques courantes en salmoniculture, ont été évaluées en explorant les relations entre perturbations phénotypiques et modifications de l'abondance des ARN messagers (ARNm) maternels.

Trois pratiques, susceptibles de perturbations, ont été retenues : le décalage photopériodique de la saison de reproduction, la synchronisation hormonale des pontes, la limitation de la fréquence des tris des génitrices pour repérer les ovulations (conduisant à un vieillissement post-ovulatoire intra-coelomique des ovules). L'analyse phénotypique de la qualité des ovules comportait le suivi des mortalités précoces (aux stades oeillés et de résorption vitelline) et les taux de malformations des embryons. Les ARNm maternels ont été extraits des ovules, en se débarrassant de l'importante quantité de vitellus présente dans les ovocyte de salmonidés, pour analyse par PCR en temps réel et puces à ADNc homologues issues du programme Agenae.

Dans une première série d'expériences, les abondances des ARNm maternels (ARNm stockés dans l'ovocyte et l'ovule) d'une quarantaine de gènes, choisis d'après une étude bibliographique multi-espèces, ont été mesurées par PCR temps réel dans des ovules soumis ou non à un vieillissement post-ovulatoire intra-coelomique avant fécondation. Ce travail a permis de mettre en évidence que les niveaux intraovocytaires de certains transcrits codant notamment pour la Nucléoplasmine et les cyclines A1 et A2 étaient affectés par le vieillissement. De plus, une abondance différentielle de certains ARNm, tels que notamment nucléoplasmine, IGF1, tubuline beta et kératines 8 et 18 a été observée entre ovules de bonne et de mauvaise qualité.

Une étude plus systématique a ensuite été entreprise à l'aide de puces à ADNc (membranes de nylon) portant 10.000 gènes pour des ovules issus soit d'un décalage photopériodique de la date de ponte, soit d'une induction hormonale de l'ovulation. Après hybridation d'une trentaine de membranes, l'analyse statistique par SAM a permis d'identifier 26 transcrits dont l'abondance dans l'ovule était dépendante de la condition expérimentale subie par les femelles. De plus, l'analyse transcriptomique a mise en évidence 31 transcrits dont l'abondance dans l'ovule semble corrélée à la qualité, dans ce contexte expérimental.

En conclusion, et après validation par PCR temps réel d'une partie des candidats obtenus par analyse du transcriptome, nous avons pu mettre en évidence que le niveau de qualité des ovules peut être associé à des différences d'abondance de certains transcrits, faibles mais significatives. Actuellement, nous cherchons à préciser l'identité et la fonction (analyse ontologique) des transcrits repérés par analyse transcriptomique.

Données génomiques et prédiction de la réponse à la superovulation

Auteur(s) : Danielle MONNIAUX

Mots-clés : ovaire, folliculogénèse, ovulation, stimulation ovarienne

Références biblio (5 maxi) :

- Monniaux D, Chupin D, Saumande J, 1983 Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19:55-81.
- Monniaux D, Mariana JC, Gibson WR, Roux C, 1984 Cycles folliculaires et croissance terminale du follicule chez la vache au cours du cycle normal ou après stimulation. In: Colloque de la Société Française pour l'étude de la Fertilité "Période péri-ovulatoire": 23-24 septembre 1983; Paris, France; 69-84.
- Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Knight PG, Ireland JJ, 2005 Numbers of Antral Follicles During Follicular Waves in Cattle: Evidence for High Variation Among Animals, Very High Repeatability in Individuals, and an Inverse Association with Serum Follicle-Stimulating Hormone Concentrations. *Biol Reprod* 73:54-62.
- Ponsart C, Govignon A, Rohou A, Manciaux L, Delcroix P, Grisouard D, Humblot P, 2001 Effect of the paternal origin of the donor cow on embryo production after superovulation in the Prim Holstein and Montbeliarde breeds. *Theriogenology* 55:419.
- Peixoto MGCD, Pereira CS, Bergmann JAG, Penna VM, Fonseca CG, 2004 Genetic parameters of multiple ovulation traits in Nellore females. *Theriogenology* 62(8):1459-1464.

Résumé :

La production d'embryons est un outil essentiel de la diffusion du progrès génétique dans les élevages bovins. Elle est au cœur des schémas de sélection puisque 95% des taureaux actuellement en testage sont issus de transfert embryonnaire. Elle permet en outre le stockage d'embryons dans des cryobanques à des fins de conservation de la diversité génétique de l'espèce (avant sélection dans une race commune, ou dans un but conservatoire pour des races à petits effectifs). Cette méthodologie repose sur l'administration préalable d'un traitement de stimulation ovarienne par des gonadotropines visant à obtenir un nombre maximal d'embryons transférables par femelle traitée. Au cours des 20 dernières années, des efforts de recherche importants à l'échelle mondiale ont conduit, par l'amélioration des traitements, à une augmentation significative du nombre moyen d'embryons transférables (de moins de 3 à environ 6). Néanmoins, l'existence d'une forte variabilité individuelle de la réponse ovarienne à un tel traitement constitue toujours un frein très important au développement de cette méthodologie. En effet, 20 % des femelles ne produisent aucun embryon, et chez les femelles qui répondent au traitement, le nombre d'embryons transférables varie de 2 à 50. Actuellement, la réponse d'un animal à un traitement de stimulation ovarienne est difficilement prévisible, et de ce fait le coût de la production d'embryons reste très élevé.

Le nombre d'embryons transférables après stimulation hormonale de l'activité ovarienne est la résultante d'un ensemble de paramètres physiologiques, à savoir le nombre de follicules ovariens capables de se développer et d'ovuler en réponse à la stimulation, la « qualité » des ovocytes à l'ovulation, la « qualité » de la semence, et l'adéquation de l'environnement utérin au processus de fécondation. Certains de ces paramètres font l'objet de projets spécialement dédiés, en particulier deux projets de l'ANR « Genanimal » soutiennent actuellement l'étude de la qualité des gamètes mâle (projet « Fertilité mâle ») et femelle (Projet « Ovogenae »). Néanmoins, aucun projet n'a été développé concernant les populations de follicules ovariens capables de répondre à un traitement de stimulation hormonale.

De très nombreuses études ont montré depuis plus de 20 ans, chez la vache comme chez la femme, que l'état des populations de gros follicules à antrum au moment du traitement détermine la réponse, en termes de nombre d'ovulations, à ce traitement. Ce résultat n'est pas vraiment étonnant, puisque ces follicules sont les cibles directes du traitement, capables d'y répondre par un développement accéléré et d'ovuler en quelques jours. De façon plus inattendue, nous avons observé dans des travaux déjà anciens que les animaux à folliculogénèse très « active », caractérisée par des nombres élevés de follicules ovariens de toutes tailles et des vitesses de croissance folliculaire rapides, sont ceux qui présentent les meilleures réponses à un traitement de stimulation (Monniaux et al., 1983, 1984). Ce résultat n'est pas trivial car la durée de l'ensemble de la folliculogénèse étant de plusieurs mois, ce n'est pas l'ensemble des follicules présents dans un ovaire qui est capable d'ovuler en quelques jours suite à un traitement. Cette forte variabilité de fonctionnement ovarien entre animaux est « invisible » dans les conditions physiologiques normales (tous les animaux étudiés ont seulement 1 ovulation par cycle naturel), et le traitement de stimulation en fait office de révélateur. Récemment, une étude par échographie ovarienne journalière a confirmé l'existence d'une forte variabilité du niveau d'activité de la folliculogénèse terminale chez les bovins, et les auteurs ont montré l'existence d'une très forte répétabilité ($r = 0,95$) du nombre de follicules entre vagues folliculaires d'un même animal (Burns et al., 2005). Ce résultat indique de façon très intéressante que le niveau d'activité ovarienne est une caractéristique stable de chaque individu.

Une part de cette variabilité individuelle a vraisemblablement une origine génétique. Dans chacune des races où l'influence des facteurs génétiques des donneuses a été recherchée, des différences allant du simple au triple ont été observées entre groupes de filles issues de différents « pères » ou « grand-pères », en termes de réponse au traitement de stimulation ovarienne (Manciaux et al., 1999 ; Ponsart et al., 2001). Les données concernant l'héritabilité du nombre d'ovulations après traitement donnent des valeurs comprises entre 0,23 et 0,57 (Peixoto et al., 2004 ; Benyei et al., 2004). Néanmoins, la recherche des gènes impliqués dans le contrôle de ce caractère n'a pas été entreprise et aucun QTL n'est connu chez les bovins.

Disposer d'un outil prédictif simple de la capacité de réponse d'une femelle à un traitement permettrait d'améliorer l'efficacité des programmes de production d'embryons en diminuant leur coût sur le terrain. Cet outil pourrait être un marqueur génétique, mais les données actuelles des généticiens sont insuffisantes pour privilégier cette piste. En revanche, l'utilisation des outils de la génomique pourrait permettre d'identifier des facteurs ovariens dont la concentration sérique reflèterait, chez une femelle en cycle normal non stimulé, le niveau d'activité ovarienne. Dans cette perspective, il serait intéressant de comparer le transcriptome de cellules folliculaires provenant d'animaux « extrêmes », triés au préalable sur leur capacité de réponse à un traitement de stimulation ovarienne. Cette comparaison, réalisée à partir de cellules de granulosa de follicules sains, issus d'une population constituant une réserve stimuable (follicules de 3 à 5 mm de diamètre), permettrait de mettre en évidence, au-delà d'une simple différence de vitesse de prolifération, un ensemble de différences fonctionnelles au niveau cellulaire. L'étape suivante consisterait à rechercher et identifier, parmi les facteurs surexprimés par les cellules de « bonnes » répondeuses, ceux qui sont sécrétés de façon détectable dans le liquide folliculaire et le plasma. Ces facteurs constitueraient des candidats potentiels d'autant plus intéressants que, le nombre de follicules présents chez des bonnes répondeuses étant environ 10 fois plus élevé que chez des mauvaises, les différences de concentrations s'en trouveraient encore amplifiées au niveau plasmatique. Il resterait alors à développer les outils nécessaires (production de protéines recombinantes et d'anticorps) pour la mise en place d'un dosage sérologique suffisamment sensible pour permettre une discrimination des animaux sur les concentrations circulantes d'un tel facteur.

Qualité des Gamètes chez le poulet, recherche de gènes candidats

Auteur(s) : S. Elis, F. Batellier, M. Govoroun, P. Monget, E. Blesbois

Mots-clés : genes, transcriptome, ovocyte, fertilité, *Gallus gallus*

Résumé :

Chez le poulet, l'impact de l'origine génétique sur la qualité des gamètes a été très peu étudié. Du côté mâle, une subfertilité d'origine génétique a été rapportée dans plusieurs modèles dont les « simple crête » qui correspondent à un gène dominant entraînant la dégénérescence des spermatozoïdes dans les canaux déférents, les « crête en rose » inclus dans plusieurs standards de races anciennes et qui sont liés à une anomalie de la mobilité des gamètes, les « consommation résiduelle » (sélection des poulets de chair sur l'état d'engraissement) qui possèdent des anomalies du métabolisme mitochondrial. Du côté femelle, les lignées « consommation résiduelle » présentent aussi une subfertilité des femelles non directement liée au taux de ponte et différentes lignées produisant des taux élevés d' « œufs doubles » sont également subfertiles. D'une façon plus générale, la sélection accentuée des poulets de chair sur des caractéristiques de croissance a secondairement entraîné des chutes des performances de reproduction des femelles et des mâles sans que l'on puisse encore bien séparer les causes et conséquences des baisses de fertilité qui y sont reliés.

Afin de mieux comprendre les critères de fertilité liés à la qualité de l'ovocyte nous avons entrepris de rechercher les gènes impliqués dans la compétence ovocytaire à la fécondation et au développement précoce de l'embryon en nous appuyant sur l'existence du génome séquencé de la poule.

Une première approche a consisté à faire une étude cinétique de l'expression de gènes candidats. Ce travail a débuté par la recherche bio informatique de gènes candidats à partir de gènes murins exprimés spécifiquement ou préférentiellement dans l'ovocyte. Pour permettre cette recherche, les gènes ont été traduits en séquences protéiques, puis des alignements de séquences tblastn ont été réalisés. Les séquences présentant une homologie suffisante, c'est à dire avec un score de blast supérieur à 100, ont été conservées. Afin de vérifier que les séquences trouvées correspondent aux gènes orthologues des gènes murins, les séquences retenues ont été localisées et la conservation des synténies vérifiée.

D'autres gènes connus pour être impliqués dans le développement embryonnaire ont également été rajoutés à cette étude. Une vingtaine de gènes ont ainsi au total été retenus dont Bmp-15, Gdf-9, Zar-1, Dazl, Zp1, Zp2, Zp3, Bcl2, Npm-2, IGF-1, Vasa qui sont impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation, dans la régulation de l'apoptose... L'expression de ces gènes a été évaluée dans différents tissus afin de connaître leur spécificité d'expression. Parmi les orthologues aviaires des gènes murins, exprimés spécifiquement dans l'ovocyte, 11 gènes sont exprimés spécifiquement dans l'ovaire de poule comme Gdf-9, Mos, Daz L, Zp2, Zp3, Vasa, et 6 gènes sont exprimés préférentiellement dans l'ovaire comme Bmp 15, Zar 1, Mater, Fox L2. La cinétique d'expression par PCR en temps réel à différents stades de la croissance folliculaire et du développement embryonnaire précoce est en cours d'étude.

Les échantillons analysés diffèrent en fonction des animaux étudiés :

- Sur les lignées pondeuses, 12 stades de maturation ovocytaire et de développement embryonnaire précoce sont utilisés depuis le plus petit follicule jaune (F6) jusqu'au stade 6 du développement embryonnaire de la classification de Hamburger et Hamilton (1). Il s'agit dans ce cas d'une étude sur des pools d'échantillons.

- Cette étude est également réalisée entre des individus de fertilité différente provenant de lignées de type chairs et de type ponte, pour rechercher une éventuelle expression différentielle de gènes candidats. La différence de fertilité observée entre les différents individus est d'environ 20%. En ce qui concerne cette étude individuelle seulement 6 stades sont étudiés, afin de privilégier le nombre d'individus étudiés

Cette étude a l'avantage de permettre une comparaison phylogénique originale des gènes ovocytaires entre les espèces modèles poules et souris. En revanche ce type d'approche ne peut permettre de faire une étude sans a priori des gènes ovocytaires. Il est impossible par exemple d'étudier les gènes spécifiques de l'oiseau. C'est la raison pour laquelle il a été décidé de compléter cette approche par une étude systématique des gènes impliqués dans la fertilité et le développement embryonnaire précoce. La technologie des puces AFFYMETRIX a été retenue, car elle permet d'étudier 28000 gènes différents. Cette technologie est utilisée pour étudier l'expression différentielle des gènes entre des lignées divergentes présentant des différences de fertilité et de mortalité embryonnaire précoces. Cette approche devrait permettre de trouver de nouveaux gènes d'intérêt dont l'expression, corrélée à la fertilité, signerait la qualité de l'ovocyte.

1. Hamburger, V. and H. L. Hamilton (1992). "A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951." Dev Dyn **195**(4): 231-72.

Le transcriptome de l'embryon précoce et ses conséquences

Auteur(s) : Véronique Duranthon, Linh Chi Bui, Roger Léandri, Catherine Faure, Nathalie Peynot, Jean-Paul Renard.

Mots-clés : embryon mammifère, développement préimplantatoire, transcriptome, cDNA amplification, aRNA transcription, transition maternelle-embryonnaire.

Références biblio (5 maxi)

- Henrion G., Renard JP., Chesné P., Oudin JF., Maniey D., Brunet A., Osborne HB., Duranthon V. 2000. Differential regulation of the translation and the stability of two maternal transcripts in preimplantation rabbit embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 56 : 12-25.
- Brunet-Simon A., Henrion G., Renard JP., Duranthon V. 2001. Onset of zygotic transcription and maternal transcript legacy in the rabbit embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 58:127-136.
- Pacheco-Trigon S., Hennequet-Antier C., Oudin JF., Piumi F., Renard JP., Duranthon V. 2002. Molecular characterization of genomic activities at the onset of zygotic transcription in mammals. *Biol. Reprod.* 67: 1907-1918.
- Kanka J., Bryova A., Duranthon V., Oudin JF., Peynot N., Renard JP. 2003. Identification of differentially expressed mRNAs in bovine preimplantation embryos. *Zygote* 11:43-52.
- Bui LC., Léandri R., Renard JP., Duranthon V. 2005. SSH adequacy to preimplantation mammalian development: scarce specific transcripts cloning despite irregular normalisation. *BMC genomics* 6:155-163.

Résumé

Les toutes premières étapes du développement chez les mammifères sont caractérisées d'un point de vue morphologique par une succession de divisions cellulaires, d'un point de vue fonctionnel par une reprogrammation des génomes gamétiques aboutissant à la totipotence du zygote, puis à l'apparition de cellules multipotentes et des premières cellules différenciées de l'organisme au stade blastocyste.

Au cours de ces étapes, l'embryon présente un transcriptome très particulier à plusieurs titres.

Le développement est d'abord sous contrôle de l'information maternelle synthétisée au cours de l'ovogénèse. L'activation transcriptionnelle du génome embryonnaire nouvellement formé se fait progressivement au cours des premiers clivages. La chronologie relative des évènements cellulaires et de la « mise en route » du génome nouvellement formé varie selon les espèces. Mais dans tous les cas la période préimplantatoire est caractérisée par la coexistence de deux types d'informations codées par deux génomes distincts et dont l'expression est régulée à deux niveaux différents : post-transcriptionnel et transcriptionnel respectivement. Le transcriptome embryonnaire précoce comporte à la fois des séquences spécifiques de ces stades du développement et un réseau complexe de séquences ubiquitaires, dont le niveau d'expression peut être déterminant pour la mise en œuvre d'un développement harmonieux. Par ailleurs, le nombre de cellules transcriptionnellement actives et la quantité totale des transcrits dans l'embryon à ces stades sont en constante évolution.

A ces particularités biologiques s'ajoutent des contraintes techniques fortes puisque l'embryon à ces stades comporte seulement quelques dizaines de picogrammes d'ARN messagers. L'application des procédures de transcriptomique suppose donc une amplification préalable du matériel.

Nous analysons le transcriptome de cette période du développement chez deux espèces : le lapin et le bovin pour lesquelles nous avons construit des outils dédiés. Sur ces outils, nous montrons comment l'utilisation combinée de différentes procédures d'amplification du matériel biologique permet de mener à bien des criblages différentiels d'intérêt pour la compréhension des perturbations du transcriptome par le microenvironnement de l'embryon et pour l'analyse de la « reprogrammation » d'un génome somatique par le cytoplasme ovocytaire.

Les interactions entre métabolisme et reproduction dans le cadre de la baisse de fertilité chez les vaches laitières hautes productrices

Auteurs : Philippe Monget, Joëlle Dupont

Physiologie de la Reproduction et des Comportements
UMR 6175 INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux
37380 Nouzilly

Résumé :

La baisse de fertilité des vaches laitières hautes productrices (VLHP) est un problème zootechnique et économique mondial. Cette baisse de fertilité est fortement corrélée à la production laitière et à la mobilisation des réserves énergétiques qui en découlent. Elle est donc probablement en partie liée à une perturbation dans les interactions entre métabolisme énergétique et fonction de reproduction.

Ces interactions font intervenir des hormones telles que l'insuline et la leptine, mais également des peptides sécrétés par le tissu adipeux comme la résistine et l'adiponectine, ainsi que les métabolites énergétiques comme le glucose et les acides gras. Ces interactions se situent en partie au niveau central, dans la zone du Noyau du Tractus Solitaire (NTS) et de l'Area Postrema (APO) qui reçoivent des afférences vagues provenant des viscères, ainsi qu'au niveau de l'hypothalamus ventromédian, qui reçoit des afférences du NTS et de l'APO. Au niveau hypothalamique, le métabolisme énergétique est capable, entre autres, de moduler la sensibilité des neurones à la rétroaction positive ou négative de l'oestradiol.

Des travaux récents montrent que l'ovaire peut également être le siège des interactions métabolisme-reproduction. Cela avait largement été suggéré par les expériences de Flushing chez la brebis. On sait maintenant que l'entrée d'un follicule ovarien dans la phase de croissance terminale est dépendante d'une sensibilisation à la FSH par l'insuline et l'IGF-I. Depuis peu, on sait aussi que le follicule ovarien exprime de fortes quantités du récepteur aux acides gras à longue chaîne PPAR α , mais aussi de désaturases ainsi que de kinases AMP dépendantes. Des travaux sont en cours au laboratoire pour déterminer le rôle de chacun de ces facteurs dans le lien entre stress énergétique et fertilité.

Enfin les perturbations exercées par le métabolisme sur la reproduction peuvent également s'exercer au niveau endométrial et embryonnaire.

La « baisse de fertilité » des VLHPs en question correspond en fait au seul critère de retour ou de non retour en chaleur après IA. Il est donc prévu de caractériser le plus finement possible le phénotype de ces VLHPs à Nouzilly afin d'identifier le compartiment de l'axe hypothalamus-hypophyse-ovaire-endomètre-embryon qui est touché. Cette caractérisation phénotypique sera réalisée en parallèle de la tentative de clonage d'un QTL identifié sur le chromosome 3 bovin. L'ensemble de ce travail sera fait dans le cadre d'un programme financé par Genanimal.

Gènes des tissus somatiques contrôlant la compétence au développement de l'embryon : Altérations chez la vache laitière, relations avec les apports nutritionnels.

Auteur(s) :

- Equipe 1 UMR BDR, Equipe relations nutrition-reproduction chez les bovins
B. Grimard, A. Ponter, F. Nuttinck
- Equipe 2 UMR BDR, Equipe croissance et différenciation du blastocyste
G. Charpigny, collaboration S Degrelle
- Equipe 3 Physiologie placentaire et développement foetal
G. Germain
- Equipe 4 Service Recherche et Développement UNCEIA
P. Humblot, B. Leguienne

Mots-clés : fertilité, vache laitière, génomique, ovocyte, utérus, corps jaune, embryon, projet finalisé

Résumé :

L'objectif de ce programme est d'étudier les effets des apports nutritionnels sur l'expression des gènes dans les tissus contrôlant la compétence au développement de l'embryon (cellules du cumulus de l'ovocyte, oviducte, utérus, corps jaune) chez la vache.

Les travaux étaient répartis en 3 taches

Tache 1 : Etablissement d'un répertoire de transcrits différemment exprimés chez la vache laitière en bilan énergétique nul ou très négatif.

Les effets de la sous-alimentation sont explorés chez la **vache laitière Prim'Holstein** en début de lactation (UCEA INRA Bressonvilliers).

Dans un premier temps, 8 vaches laitières ont été réparties en 2 lots (grasses et correctement alimenté, maigres et sous alimenté) en début de lactation. Le tractus génital (oviducte, utérus) et les ovaires ont été recueillis par ovario-hystérectomie par voie paralombaire à J4, J8, J12 et J15 du cycle (J0 = jour des chaleurs, induites par un traitement de maîtrise des cycles à J80 post-partum). Les animaux ont été opérés entre le 05/01/05 et le 10/02/05. L'expression des gènes a été explorée sur membranes d'ANDc. L'analyse des échantillons sur mes lames bovines AGENAE aura lieu dès qu'elles seront disponibles.

Dans un deuxième temps, 10 vaches sont mises dans les mêmes conditions après vêlage. Une ponction d'ovocytes a lieu après super ovulation 80 jours post-partum soit avant maturation folliculaire, soit après maturation. L'expression des gènes dans les cellules du cumulus sera explorée. L'expérimentation est en cours, les ponctions auront lieu entre fin mars et début mai 2006.

Tache 2 : Effet de la modulation du rapport omega3/omega6 sur l'expression des gènes des tissus somatiques contrôlant la compétence au développement de l'ovocyte et de l'embryon

Les effets de la modulation des apports en acides gras sur l'expression des gènes sont explorés chez la **génisse laitière Prim'Holstein** (Station UNCEIA de Chateauvillain).

Une première série d'observation a eu lieu en 2005. 8 génisses ont été alimentées avec du soja extrudé (omega 6) et du lin extrudé (omega 3) pendant 6 semaines. L'alimentation modifie le profil des acides gras plasmatiques des animaux mais n'a pas influencé le nombre d'ovocytes collectés (2 ponctions par semaine pendant la période expérimentale, $\omega 6$: 10.5 ± 1.7 vs $\omega 3$: 8.81 ± 1.67), la qualité morphologique des ovocytes, ni leur aptitude au développement (Taux de développement : 13.53% vs 13.74% pour les lots $\omega 6$ et $\omega 3$ respectivement). Les animaux ont été synchronisés en inséminés en fin de période expérimentale puis abattus à J13. Le tractus génital (oviducte, utérus, ovaires) et les vésicules embryonnaires ont été recueillis à l'abattoir. Une deuxième série de 10 génisses est actuellement en cours d'expérimentation à Chateaufvillain.

Tache 3 : Expression des gènes identifiés dans les complexes ovocytes cumulus en liaison avec la fertilité chez la vache laitière

Les relations entre bilan énergétique, production et qualité des ovocytes, expression des gènes dans le complexe ovocyte cumulus ont été explorés chez la **vache laitière Prim'Holstein** en début de lactation (UNCEIA / INRA Bressonvilliers).

Trente deux vaches laitières (10 primipares et 22 multipares) ont été suivies. Chaque vache a fait l'objet de 6 ponctions d'ovocytes à raison de 2 fois par semaine avant la mise à la reproduction (début $53,9 \pm 0,3$ jours post-partum). Les vaches ont ensuite été synchronisées pour une insémination $82,9 \pm 0,3$ jours post-partum. La gestation a été mise en évidence par échographie à 35 jours après IA. Parmi les 32 vaches 17 ont été considérées comme fertiles (gestantes après 1 ou 2 IA).

L'analyse des données zootechniques et métaboliques (suivi des paramètres plasmatiques du métabolisme énergétique 2 fois par semaine) a montré que les vaches infertiles produisaient plus de lait au 1^{er} contrôle et qu'elles présentaient des taux d'IGF1 plasmatiques moins élevés que les vaches fertiles. L'analyse quantitative de l'expression hépatique de différents composés du système IGF (IGF-I, IGFR-I, IGFBP-2, IGFBP-4) n'a décelé aucune différence significative entre les vaches fertiles et infertiles. L'analyse des profils plasmatiques des IGFBPs est en cours de réalisation. Le nombre de follicules ponctionnés, la production d'ovocytes et la qualité morphologique des ovocytes n'ont pas été différents entre les vaches fertiles et infertiles (respectivement par séance de ponction $7,7 \pm 0,9$ vs $9,2 \pm 1,0$; $2,7 \pm 0,4$ vs $2,8 \pm 0,4$ et $q1+q2$ $1,1 \pm 0,2$ vs $1,0 \pm 0,2$). De même, les taux de clivage et de développement ont été identiques dans les 2 lots (fertiles 35,4 et 18,1% vs infertiles 31,7 et 22,0%) pour respectivement 140 et 99 ovocytes mis en culture.

La qualité des complexes ovocytes-cumulus (COCs) récoltés par OPU a été médiocre dans cette étude (nombreux COCs de qualité 3 et 4 présentant peu de cellules du cumulus) mais proche de celle déjà observée pour des vaches laitières au même stade physiologique. La quantité de tissu disponible (nombre de cellules du cumulus) ne permettra sans doute pas une approche globale de l'expression des gènes.

L'analyse sérielle de l'expression des gènes (SAGE). Application à l'étude de la trypanotolérance chez les bovins.

Auteur(s) : Jacques MARTI et David BERTHIER.

Mots-clés : transcriptome, SAGE, trypanosomose, bovins.

Références biblio (5 maxi) :

- Velculescu, V. E., L. Zhang, et al. (1995). "Serial analysis of gene expression." *Science* **270**(5235): 484-7.
- Claverie, J. M. (2005). "Fewer genes, more noncoding RNA." *Science* **309**(5740): 1529-30.
- Quere, R., L. Manchon, et al. (2004). "Mining SAGE data allows large-scale, sensitive screening of antisense transcript expression." *Nucleic Acids Res* **32**(20): e163.
- Saha, S., A. B. Sparks, et al. (2002). "Using the transcriptome to annotate the genome." *Nat Biotechnol* **20**(5): 508-12.
- Berthier, D., R. Quere, et al. (2003). "Serial analysis of gene expression (SAGE) in bovine trypanotolerance: preliminary results." *Genet Sel Evol* **35 Suppl 1**: S35-47.

Résumé :

Parmi les méthodes permettant de rendre compte du niveau d'expression des gènes, la méthodologie SAGE (Serial Analysis of Genes Expression) nous paraît particulièrement indiquée pour étudier les transcriptomes.

Cette méthodologie est régulièrement employée depuis son introduction il y a dix ans par Velculescu et al. (1995) pour explorer la plupart des transcriptomes eucaryotes. La méthode SAGE a contribué à révéler leur complexité, en montrant l'existence, outre les ARNm attendus, d'ARN non traduits (Claverie, 2005) et en particulier d'ARN en orientation inverse des ARN messagers (Quéré et al, 2004). Si les signatures de 14 nucléotides, obtenues par la méthode originale, s'avèrent suffisantes pour mesurer les niveaux d'expression des ARNm bien répertoriés, il peut s'avérer nécessaire d'obtenir des signatures plus longues (21 nucléotides, méthode LongSAGE) pour caractériser les ARN encore inconnus et améliorer ainsi l'annotation du génome (Saha et al. 2002).

Après avoir utilisé la méthode conventionnelle pour étudier le transcriptome du sang chez les bovins (Berthier et al, 2003), nous avons mis en œuvre la méthode LongSAGE pour permettre de compléter l'annotation du génome et du transcriptome. Nous montrerons comment nous avons utilisé cette approche pour étudier la réaction des bovins au cours de la trypanosomose, et nous discuterons les apports de la méthode SAGE à l'étude de la trypanotolérance et à l'annotation du génome bovin.

Approche protéomique dans le contrôle de la fertilité du gamète mâle

Auteur(s) : JL. Dacheux, C. Belleannée, M. Belghazi⁽¹⁾, V. Labas⁽¹⁾, F. Dacheux.
UMR 6175 INRA-CNRS, 37380 Nouzilly. (1) Service de Spectrométrie de Masse pour la Protéomique, INRA, 37380 Nouzilly.

Mots-clés : Protéomique, Spermatozoïdes, Fertilité, Epididyme,

Références biblio (5 maxi) :

Dacheux JL, Belghazi M, Lanson Y, Dacheux F. Human epididymal secretome and proteome. *Mol Cell Endocrinol.* 2006 Jan 19; [Epub ahead of print]

Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology.* 2005 Jan 15;63(2):319-41.

Résumé :

Le gamète mâle formé dans le testicule, n'acquière son pouvoir fécondant que dans les conduits extra gonadiques, principalement les tubes épидидymaires. La fertilité des animaux dépend donc en grande partie du bon fonctionnement de cet organe.

Les modifications que subissent les spermatozoïdes dans l'épididyme sont induites par des interactions multiples avec le milieu épидидymaire dans lequel transitent les gamètes. Ces interactions sont en grande partie liées à la présence de protéines spécifiques de l'épididyme. L'effet principal de cet environnement épидидymaire est de modifier profondément la surface des gamètes. Ces modifications membranaires ont pour conséquences l'activation de la mobilité des gamètes et la reconnaissance de la membrane pellucide des ovocytes, ces deux paramètres étant déterminant dans l'acquisition du pouvoir fécondant.

L'approche développée dans le projet Génanimal a été, dans un premier temps, de caractériser et d'identifier les protéines membranaires de la surface des gamètes qui subissent des modifications durant le transit épидидymaire. Une identification systématique des protéines du fluide épидидymaire environnant les gamètes a également été abordée.

L'étude a été développée sur plusieurs espèces domestiques (porcin, bovin, équin), le modèle porcin ayant permis la mise au point des différentes méthodes d'analyses protéomiques et des techniques de marquage et d'extraction différentielle des protéines de membrane de spermatozoïdes.

Trois approches ont été réalisées pour accéder aux différentes protéines de surface: (i) extraction des protéines liées par faible affinité à la membrane (libérées en présence de solution saline) (ii) extraction des protéines totales intrinsèques à la membrane (extraites par un détergent non ionique le NP40) (iii) extraction des protéines intrinsèques à la membrane de la région acrosomique du spermatozoïde (extraites à partir de membranes obtenues par cavitation).

Après marquage de surface des spermatozoïdes entiers avec de la biotine, les protéines extraites de spermatozoïdes matures et immatures ont été séparées par électrophorèse mono et bidimensionnelle.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'apparition et la disparition de nombreuses protéines de surface au cours du passage des spermatozoïdes dans le tube épидидymaire. Une méthode d'enrichissement par purification sur colonne d'affinité de ces protéines de surface minoritaires a été mise au point. L'identification des protéines a été effectuée par spectrométrie de masse (nano LC MS/MS, et MALDI-TOF).



Chez le verrat, Les protéines de surface des spermatozoïdes immatures (1) et matures (2) ont été purifiées sur colonne d'affinité et séparées sur gel monodimensionnel (figure. ci-contre).

Des bandes de gel de 1mm de largeur ont été systématiquement découpées. Après digestion « in gel », 82 protéines ont pu être identifiées. Plusieurs d'entre elles sont caractéristiques de l'état de maturation des gamètes; 42% de ces protéines ont déjà été décrites comme protéines de surface des spermatozoïdes telles que l'ACE (enzyme de conversion de l'angiotensine) ou l' α -mannosidase. Parmi ces protéines, 38% possèdent un ou plusieurs segments transmembranaires, 8% des protéines identifiées correspondent à des protéines hypothétiques.

Une analyse similaire d'identification de protéines membranaires est en cours de développement chez les bovins et les équins.

L'approche quantitative est actuellement en cours en utilisant notamment des techniques de marquages spécifiques permettant une quantification et une identification systématique par spectrométrie de masse (technique iTRAQ™).

En conclusion, en utilisant une approche protéomique dans l'analyse des protéines de surface des spermatozoïdes, il a été possible d'identifier plusieurs protéines qui, spécifiquement sont modifiées durant le transit épидидymaire. En utilisant l'approche comparative entre espèces il sera peut être possible de déterminer le degré d'homologie dans les mécanismes de maturation épидидymaire. Toutefois, l'implication de ces protéines et de leurs modifications dans l'apparition du pouvoir fécondant reste à déterminer.

Exploration structurelle et fonctionnelle du microbiote intestinal humain

Auteur : Joël Doré, UEPSD INRA CR-Jouy-en-Josas

Mots-clés : phylogénie, microbiote intestinal, métagénome

Références biblio :

1. Seksik, P., L. Rigottier-Gois, G. Gramet, M. Sutren, P. Pochart, P. Marteau, R. Jian, and J. Dore. 2003. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52:237-242.
2. Mangin, I., R. Bonnet, P. Seksik, L. Rigottier-Gois, M. Sutren, Y. Bouhnik, C. Neut, M. D. Collins, J.-F. Colombel, P. Marteau, and J. Doré. 2004. Molecular inventory of faecal microflora in patients with Crohn's disease. *FEMS Microbiology Ecology*. 50:25-36.
3. Lepage, P., P. Seksik, M. Sutren, M-F. De la Cochetière, L. Rigottier-Gois, R. Jian, P. Marteau, and J. Doré. 2005. The composition of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *IBD*. 11:473-480.
4. Lay C., L. Rigottier-Gois, K. Holmstrom, M. Rajilic, E. Vaughan, W. De Vos, M. D. Collins, R. Thiel, P. Namsollock, M. Blaut and J. Doré. 2005. Colonic microbiota signatures across five northern european countries. *Applied Environmental Microbiology*. 71: 4153-4155.
5. Manichanh C., Rigottier-Gois L., Bonnaud E., Gloux K., Pelletier E., Frangeul L., Nalin R., Jarrin C., Chardon P., Marteau Ph., Roca J., Dore J. 2006. Reduced Diversity of Fecal Microbiota in Crohn's Disease revealed by a Metagenomic Approach. *Gut*. *Sous presse*

Résumé :

Le tube digestif mature héberge environ 100 000 milliards de bactéries dans sa totalité. Celles-ci contribuent à la physiologie et au métabolisme intestinal, à la maturation du système immunitaire et à la protection contre les microorganismes pathogènes. De nombreux facteurs affectent la mise en place du microbiote intestinal humain après la naissance, aboutissant à un complexe microbien endosymbiotique qui semble se stabiliser au plan fonctionnel et structurel vers l'âge de deux ans. Les déterminants de la composition du microbiote intestinal dominant de l'adulte ne sont néanmoins pas identifiés de façon définitive à ce jour. Il est par ailleurs démontré aujourd'hui que seule une fraction du microbiote intestinal dominant est cultivable in vitro. La prise en compte du microbiote intestinal dominant en nutrition et en gastroentérologie exigeait donc un pas méthodologique significatif permettant une prise en compte de l'intégralité de la flore. L'analyse moléculaire de la diversité d'espèces dominantes a contribué à des observations inattendues. Ainsi, il est apparu que chaque individu héberge un complexe microbien qui lui est propre et qui reste remarquablement stable au cours du temps. Très peu d'espèces bactériennes dominantes semblent être partagées par différents individus. A la faveur d'études d'intervention nutritionnelle, le microbiote intestinal dominant se révèle très résistant à la modification. Par contre il est affecté par une prise d'antibiotique, démontrant ensuite une surprenante résilience, c'est-à-dire une aptitude à revenir à son profil d'équilibre initial.

La microflore intestinale contribue à la physiologie de l'hôte. Des travaux récents sur des modèles gnotobiotiques ont indiqué l'importance de la flore comme modulateur de l'expression génique au niveau des cellules eucaryote de l'épithélium intestinal (glycosylation du mucus) et au-delà (angiogénèse, fixation des lipides).

Si les progrès récents de l'écologie moléculaire ont permis d'avancer dans la description des constituants de la microflore intestinale dominante, l'analyse fonctionnelle globale de l'écosystème microbien intestinal n'est pas encore réalisée et les signaux moléculaires médiateurs des interactions procaryotes-eucaryotes restent essentiellement inconnus à ce jour.

Afin d'avancer vers la prise en compte fonctionnelle globale de l'écosystème intestinal dominant, nous avons mis en œuvre une approche métagénomique qui s'appuie sur le clonage de grands fragments de génomes des bactéries intestinales dominantes. Trois banques de clones métagénomiques ont ainsi été générées, représentant au total environ 3000 Mbases, soit un millier de génomes bactériens (clones fosmidiques porteurs d'inserts bactériens de 40Kb issus d'individus sains et de patients atteints de la maladie de Crohn). Les banques sont en partie exploitées par séquençage, dans le but de caractériser et organiser les gènes de ce microbiote. Cette approche nous a permis d'ores et déjà de valider la représentativité des banques en terme de diversité microbienne. Ces banques sont par ailleurs exploitées par une démarche de criblages fonctionnels et notamment l'étude de l'impact de clones métagénomiques sur des modèles de cellules eucaryotes en culture (CV1 et HT29). Le paramètre initial que nous avons choisi d'étudier est la prolifération cellulaire. L'impact de la présence de lysats de clones métagénomiques dans le milieu sur la croissance des cellules eucaryotes est évalué. Pour toutes les banques métagénomiques, nous avons ainsi mis en évidence des lysats stimulateurs et des lysats inhibiteurs de la croissance cellulaire (4 et 7% des clones testés sur CV1, respectivement ; aucun et 4% sur HT29). Les clones modulateurs identifiés appartiennent aux différents groupes phylogénétiques du microbiote intestinal. Les fragments d'ADN hétérologue portés par certains de ces clones ont été soumis à une mutagenèse aléatoire et ceci a permis d'identifier des mutants perdant leur effet modulateur de la croissance des cellules eucaryotes. Le séquençage des gènes interrompus chez les premiers mutants a permis d'identifier les gènes et les protéines candidates correspondantes. L'approche métagénomique offre pour la première fois la perspective d'identifier les signaux moléculaires du dialogue procaryote-eucaryote et de caractériser les mécanismes mis en jeu, ouvrant un potentiel de connaissance et d'innovation inestimable. L'utilisation de divers cribles phénotypiques permettra une analyse plus fine des réponses cellulaires. Par ailleurs, la validation in vivo d'effets modulateurs observés in vitro sera à terme nécessaire.

Application de la méthode SSH à l'étude moléculaire de la régression tumorale spontanée dans un modèle de mélanome porcin

Auteur(s): Florian Rambow, Ondrej Malek, Claudine Geffrotin et Silvia Vincent-Naulleau

Mots-clés : SSH, porc, tumeur, régression, expression différentielle

Références biblio (5 maxi) :

- 1-VINCENT-NAULLEAU S., LE CHALONY C., LEPLAT J.J., BOUET S., BAILLY C., SPATZ A., VIELH P., AVRIL M.F., TRICAUD Y., GRUAND J., HORAK V., FRELAT G., GEFFROTIN C. Clinical and histopathological characterization of cutaneous melanomas in the Melanoblastoma-bearing Libechev Minipigs Model. *Pigment Cell Res.*, 2004, 17, 24-35.
- 2-BOISGARD R., *VINCENT-NAULLEAU S., LEPLAT J.J., BOUET S., LE CHALONY C., TRICAUD Y., HORAK V., GEFFROTIN C., FRELAT G., TAVITIAN B. A new animal model for the imaging of melanoma : correlation of FDG PET with clinical outcome, macroscopic aspect and histological classification in Melanoblastoma-bearing Libechev Minipigs. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2003, 30, 826-834.

Résumé :

Objectifs

Dans le cadre de l'utilisation des modèles animaux pour la recherche biomédicale, nous développons un projet d'analyse moléculaire de la régression tumorale spontanée dans un modèle de mélanome porcin. Nous disposons au laboratoire d'un modèle de porc MeLiM (Melanoblastoma Libechev Minipigs), importé de République Tchèque, qui développent spontanément des mélanomes cutanés. Les tumeurs apparaissent avant l'âge de trois mois sur les diverses parties du corps et s'apparentent sur le plan clinique et histologique aux tumeurs mélaniques rencontrées chez l'homme. Elles peuvent donner des métastases et régresser spontanément, et sont de ce fait d'un intérêt considérable pour la recherche biomédicale.

Chez l'homme, une quarantaine seulement de cas de régressions complètes spontanées de mélanomes primaires ont été documentés. La régression partielle spontanée est un phénomène plus couramment observé. Comme pour les autres cancers, les causes de cette régression spontanée ne sont pas connues. Différents facteurs induisant ce mécanisme ont été décrits dans la littérature mais peu de recherche sont réalisées du fait de la rareté des cas chez l'homme. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués permettrait d'orienter les recherches pour développer des approches thérapeutiques.

Nous avons d'ores et déjà abordé l'étude de la régression tumorale sur le plan clinique et histologique, en collaboration avec des cliniciens et anatomopathologistes du mélanome humain (IGR et Centre Léon Bérard). La régression débute dans les mois qui suivent l'apparition de la tumeur et concerne les tumeurs primaires et les métastases. Elle se manifeste par une dépigmentation, une perte de volume et une formation cicatricielle. Histologiquement, le début de la régression s'accompagne d'une infiltration massive de cellules chargées de pigments (histiocytes ou cellules de mélanome différenciées) (Vincent-Naulleau S. et al. *Pigment Cell Res.*, 17, 24-35, 2004). La tomographie par émission de positons (TEP) avec le fluor 18-fluorodeoxyglucose (FDG) a permis de suivre de façon non invasive l'évolution des foyers d'intense prolifération cellulaire dans les tumeurs et les métastases, et révéla une corrélation entre les signaux observés et les signes cliniques de régression (Boisgard R. et al. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 30, 826-834, 2003). Devant la diversité des mécanismes potentiellement impliqués dans la régression tumorale, nous avons choisi une approche globale pour étudier la régression tumorale chez le porc MeLiM. Nous avons commencé par, l'hybridation soustractive suppressive (SSH), pour rechercher les gènes différentiellement exprimés entre des tumeurs en croissance et des tumeurs présentant les premiers signes cliniques et histologiques de régression. Nous avons également appliqué cette méthode aux cellules tumorales isolées de tumeurs en croissance et de tumeurs en début de régression, afin de faire la distinction entre les deux compartiments, cellule tumorale et stroma. Cette approche doit permettre de mettre en

évidence des molécules sur- ou sous-exprimées lorsque la régression débute, une première étape vers la compréhension des mécanismes impliqués. Nous avons aussi réalisé une SSH entre des cellules tumorales et les mélanocytes normaux d'un même animal, afin de repérer des gènes spécifiquement exprimés dans les cellules tumorales.

Méthodologie utilisée

1-Collecte des échantillons : les tumeurs ont été prélevées au cours de leur phase de croissance et dès les premiers signes cliniques de régression, lorsque la tumeur sèche et blanchit. L'histologie a permis de sélectionner le meilleur couple de tumeurs pour la SSH (contenus cellulaires semblables à l'exception de l'apparition de cellules chargées de pigment dans les tumeurs en début de régression). Pour chaque échantillon, la moitié de la tumeur a été utilisée pour préparer les ARN et l'autre moitié conservée pour l'histologie et l'hybridation *in situ* afin de confirmer les résultats *in vivo* et de définir les types cellulaires impliqués.

2-Culture de cellules: sur ces deux types de tumeurs, les cellules tumorales ont été mises en culture et les ARN ont été isolés dans les premiers passages lorsque la culture présentait un niveau de pureté d'au moins 90% de cellules tumorales. La culture de mélanocytes a été réalisée à partir de mélanocytes de peau normale.

3-Construction des banques SSH: la méthode permet d'amplifier sélectivement les gènes différentiellement exprimés entre 2 échantillons et d'égaliser l'abondance des ARN, augmentant ainsi la probabilité de cloner des ARN rares. Six banques SSH ont été construites à l'aide du kit « PCR-Select cDNA Subtraction kit » commercialisé par Clontech.

Ces 6 banques représentent :

- a- les gènes surexprimés dans les tumeurs en croissance versus régression
- b- les gènes surexprimés dans les tumeurs en début de régression versus croissance
- c- les gènes surexprimés dans les cellules tumorales isolées de tumeurs en croissance versus régression
- d- les gènes surexprimés dans les cellules tumorales isolées de tumeurs en début de régression versus croissance
- e- les gènes surexprimés dans les cellules tumorales isolées de tumeurs en croissance d'un animal A versus les mélanocytes du même animal
- f- les gènes surexprimés dans les mélanocytes de l'animal A versus les cellules tumorales du même animal.

Nous avons repiqué et congelé 1500 clones par banque et nous avons fait séquencer 1000 clones par banque (Millegen) grâce au contrat INRA obtenu en 2005. Un séquençage partiel de 100 clones de la banque « f » a révélé la présence très majoritaire d'ADNc d'origine murine provenant de la contamination de nos ARNm par des cellules nourricières utilisées pour la culture des mélanocytes. L'utilisation de cette banque a été abandonnée mais ce résultat montre la puissance de la SSH pour mettre en évidence des ARN différentiels même présents en faible quantité.

En collaboration avec Sigenae, nous avons d'ores et déjà les résultats des Blast des 1000 séquences pour les 2 librairies a et b et nous testons différents logiciels d'analyse pour classer les gènes différentiellement exprimés entre les 2 stades tumoraux. En parallèle, la technique de real-time PCR est mise au point sur les tumeurs pour vérifier les résultats obtenus par SSH.

Conclusion:

Ces séquences nous permettront de :

- fournir de nouveaux EST porcins à l'INRA et AGENAE pour la communauté scientifique travaillant dans cette espèce.
- décrire les molécules différentiellement exprimées et/ou spécifiques dans chaque situation.
- définir des fonctions potentiellement impliquées dans le développement ou la régression tumorale.

Approches utilisées pour la sélection de poulets résistants aux salmonelles

Auteur(s) : Philippe Velge et Catherine Beaumont

Mots-clés : *Salmonella*, poule, résistance génétique, sélection, réponse immune, QTL, génomique

Références bibliographiques :

BEAUMONT, C., PROTAIS, J., PITEL, F., LEVEQUE, G., MALO, D., LANTIER, F., PLISSON-PETIT, F., COLIN, P., PROTAIS, M., LE ROY, P., ELSEN, J. M., MILAN, D., LANTIER, I., NEAU, A., SALVAT, G. and VIGNAL, A. (2003). Effect of two candidate genes on the *Salmonella* carrier state in fowl. *Poultry Science* 82: 721-726.

MARIANI, P., BARROW, P. A., CHENG, H. H., GROENEN, M. A. M., NEGRINI, R. and BUMSTEAD, N. (2001) Localization to chicken Chromosome 5 of a novel locus determining salmonellosis resistance. *Immunogenetics* 53:786-791.

SADEYEN, J.R., TROTIEREAU, J., VELGE, P., MARLY, J., BEAUMONT, C., BARROW, P.A., BUMSTEAD, N., LALMANACH, A.C., 2004. *Salmonella* carrier-state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals. *Microbes and Infection*, 2004, 1278-1286.

SADEYEN J.R. . TROTIEREAU J., PROTAIS J., BEAUMONT C., SELLIER N., SALVAT G., VELGE P., LALMANACH A.C., 2006. *Salmonella* carrier-state in hens: study of host resistance by a gene expression approach. Accepté dans *Microbes and Infection*.

TILQUIN, P., BARROW, P.A., MARLY, J., PITEL, F., PLISSON-PETIT, F., VELGE, P., VIGNAL, A., BARET P.V., BUMSTEAD, N. and BEAUMONT C. (2005). A Genome Scan For Quantitative Trait Loci Affecting *Salmonella* Carrier-state In Chicken. *Genetics Selection Evolution*, 37, 539-561

Résumé

En France comme dans d'autres pays, les salmonelles demeurent la principale source de toxi-infections humaines et les produits à base d'œufs ou d'ovo-produits constituent la première source d'infection humaine par *Salmonella*, la plupart du temps parce que les poulets peuvent être porteurs asymptomatiques (c'est-à-dire rester contaminés par *Salmonella* pendant plusieurs semaines sans exprimer de symptômes qui puissent aider à leur détection). Ce sont ces porteurs sains qui sont le plus souvent impliqués dans la contamination humaine et leur existence complique nettement la prophylaxie de cette maladie. Augmenter la résistance génétique des volailles au portage de salmonelles renforcerait leur capacité à éliminer les salmonelles, améliorant la sécurité alimentaire. Cette résistance, mesurée à travers la durée et le niveau de la persistance de l'infection bactérienne après inoculation orale par *S. Enteritidis*, est partiellement sous contrôle génétique. En conséquence, nous avons démarré deux démarches complémentaires, de sélection expérimentale de modèles génétiques et de génomique en vue d'identification de marqueurs.

L'expérience de sélection a été effectuée à partir d'une population commerciale et deux séries de lignées divergentes ont été sélectionnées vis-à-vis de la résistance ou de la sensibilité au portage chez le jeune et la poule au pic de ponte (soit un total de quatre lignées). Cette expérience devrait déboucher sur des lignées génétiquement bien différenciées ; il est déjà possible d'utiliser les descendants de reproducteurs de valeurs génétiques extrêmes en tant que modèles génétiques de résistance et de sensibilité, en particulier chez l'adulte. L'ensemble des données recueillies a permis d'estimer les paramètres génétiques de différentes mesures de cette résistance. Toutes sont héréditaires et donc sensibles à la sélection. La valeur positive des corrélations génétiques estimées entre

les taux de contamination des rates, foies et caeca des poules confortent le choix qui avait été fait de sélectionner sur le taux global de contamination. Mais surtout, cette étude a montré les antagonismes génétiques existant, d'une part, entre taux et niveau de contamination du jeune poulet et, d'autre part, entre la résistance de l'adulte et celle du jeune poulet. Ce résultat sera à prendre en considération avant toute application.

Afin de simplifier et d'alléger la sélection, nous avons mené une recherche des gènes impliqués dans la résistance et ce par trois approches complémentaires. Nous avons commencé par tester des gènes dits candidats, dont les homologues ont un effet dans une autre espèce, la souris en l'occurrence. Nous avons montré le rôle chez la poule du gène *SLC11A1* (anciennement *NRAMP1*) impliqué dans la résistance aux germes intracellulaires (Beaumont et al., 2003). Cette approche a été élargie à une recherche systématique des zones du génome impliquées (recherche de Quantitative Trait Loci ou QTL). Celle-ci a été menée, en collaboration, sur deux croisements entre des lignées consanguines présentant de nettes différences de sensibilité au portage de salmonelles mais de par leur consanguinité une faible variabilité intra-lignées. Nous avons ainsi identifié un total de onze QTL à six positions différentes réparties sur cinq chromosomes (Tilquin et coll., 2005). Avec des typages de marqueurs microsatellites et SNP et grâce aux données et au matériel génétique accumulé lors de l'expérience de sélection, nous avons pu tester l'intérêt de ces QTL. Pour ce qui est de la résistance de l'adulte, les résultats confortent l'intérêt de quatre zones du génome, en particulier celle située à quelque distance du gène *SAL1* mis en évidence par Mariani et coll., (2001) pour son rôle sur la résistance à la maladie. Chez le jeune poulet, par contre, alors que l'âge et le modèle de contamination retenus sont ceux utilisés pour la recherche de QTL, nous ne retrouvons d'effet, pour l'instant du moins, que pour les marqueurs de deux chromosomes et ce à des niveaux de significativité modérés.

Nous avons également comparé les niveaux d'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire sur nos lignées consanguines sensible et résistante puis dans nos lignées en cours de sélection. Nous avons ainsi noté une réduction significative du niveau d'expression des gènes d'interféron-gamma (*IFN- γ*) dans les caeca des animaux sensibles. De plus chez le jeune comme chez l'adulte, nous avons observé une nette différence de niveaux d'expression caecale des gènes de défensines lesquels sont des peptides antimicrobiens synthétisés par les phagocytes et les entérocytes. Chez l'adulte, les expressions de *MIM1* et *IL8* étaient plus élevées dans les caeca chez les animaux résistants. De même, nous avons observé une expression précoce de *TLR4* chez les poules résistantes ce qui renforce la suspicion existant sur le rôle de ce gène (Beaumont et coll., 2003). Ce travail ouvre de nombreuses perspectives, fondamentales et appliquées. Il faut maintenant chercher à élargir la gamme de gènes étudiés pour mieux comprendre les mécanismes de résistance et les relier aux populations cellulaires impliquées (voir poster de Coudurier et al.).

EADGENE : un réseau Européen sur la génomique des interactions hôte-pathogènes.

(European Animal Disease Genomics Network of Excellence for Animal Health and Food Safety)

Auteur :

Marie-Hélène Pinard-van der Laan

UMR GDA – INRA 78352 Jouy-en-Josas cedex

Mots-clés :

Génomique – Résistance aux maladies – Interaction Hôte-Pathogène

Résumé :

Objectifs du Réseau d'Excellence EADGENE :

Le projet a pour objectif principal de coordonner et orienter les recherches européennes dans le domaine de la génomique et des maladies animales. Il utilise la génomique comme outil pour améliorer la santé animale, la qualité et la sécurité des aliments.

Ces approches en génomique s'attachent à développer et identifier de nouvelles cibles de vaccins, des outils de diagnostic moléculaire et à contribuer au développement de stratégies d'élevage.

Le projet vise à créer une intégration durable de la recherche européenne dans le domaine de la génomique des interactions hôte-agent pathogène et à obtenir un soutien financier important de la part des industriels et des institutions publiques.

Les projets de recherche innovants dans Eadgene se construisent en complémentarité des projets existants.

Programmes en génomique des interactions « hôte-pathogène » dans le Réseau d'Excellence EADGENE :

Le but est de comparer et d'exploiter ensemble la richesse des modèles déjà développés dans les différentes équipes (différents hôtes, pathogènes, modèles d'infection...) et en utilisant si possible des outils génomiques communs. Dans cette optique, trois groupes de travail ont commencé, avec notamment la participation de l'INRA : Génomique Fonctionnelle sur les Interactions « hôte-pathogène » sur :

- 1- les mammites (bovins, chèvre, mouton),
- 2- les salmonelles (cochon, poulet),
- 3- les E. Coli (bovins).

D'autres groupes vont démarrer :

- 4- Campylobacter (poulet),
- 5- Un virus (à définir) (Salmonidées)...

Ces recherches sont abordées au travers d'activités complémentaires du réseau

Structuration des activités dans le Réseau d'Excellence EADGENE :

Activités d'Intégration pour assurer un partage durable

- Création d'un laboratoire virtuel pour partager et créer de nouvelles ressources biologiques, technologiques, bio-informatiques et outils analytiques

(ex : partage et utilisation commune d'une puce oligo poulet distribuée par le CRB GADIE & ArkGenomics...)

- Mobilité (ex. séjour chez un partenaire sur projet de recherche commun ou nouvelle technique...)
- Intégration des Connaissances (ex. meilleur accès aux données génomiques)

Activités de Recherche sur la génomique des interactions « hôte-pathogène »

- Génomique Structurale (ex : Recherche gènes régulant mécanismes de résistance/virulence, comparaison orthologues, gènes miARN dans interactions hôte-pathogène...)
- Génétique des Populations (ex : Modèles pertinents – phénotypes résistance aux maladies – recherche QTL et expression des gènes – échange matériel)
- Génomique Fonctionnelle (ex : Expression des réseaux de gènes régulant, étude dialogue moléculaire hôte-pathogène...)
- Génomique Opérationnelle (ex : identification des pathologies les plus propices à une mise en application pratique / fort impact économique, sanitaire – outils génomiques disponibles...)

Activités de Dissémination pour favoriser les applications

- Transfert Technologique (liens avec les sélectionneurs, biotech, santé animale...)
- Cours / Formation (ex. soutien de cours sur les microarrays)
- Liens avec d'autres projets (Européens (ex : SABRE) et non Européens)
- Communication avec la société, les consommateurs (ex. acceptabilité de la génomique)
- ...

« Club of Interest »

- Partenariats privé

Informations sur le Réseau d'Excellence EADGENE :

Le réseau EADGENE coordonne les activités de **13 Partenaires de 10 pays :**

INRA (France)

Wageningen University (Pays-Bas)

ID Lelystad (Pays-Bas)

Roslin Institute (Grande-Bretagne)

Institute for Animal Health (Grande-Bretagne)

Danish Institute of Agricultural Sciences (Danemark)

Liège University (Belgique)

Ljubljana University (Slovénie)

Cordoba Veterinary Faculty (Espagne)

Norwegian School of Veterinary Science (Norvège)

Research Institute for the Biology of Farm Animals (Allemagne)

Parco Tecnologico Padano (Italie)

European Forum of Farm Animal Breeders (Pays-Bas)

Durée du projet : Septembre 2004 – Septembre 2009

Budget CE : **11.52 M€**

+ d'informations:

www.eadgene.org

www.eadgene.info

Génomique des interactions hôte/pathogènes chez les poissons

Auteurs : Abdenour Benmansour, Pierre Boudinot

Résumé :

Les micro-organismes pathogènes des Salmonidés, en particulier les virus, induisent des pertes économiques significatives en termes de mortalité et d'atteinte à la qualité des produits. Les gènes induits par le rhabdovirus de la Septicémie Hémorragique Virale (VSHV) – un des principaux agents pathogènes des salmonidés en France - ont été systématiquement recherchés chez la truite, par des techniques de soustraction de banques d'ADNc (SSH) sur différents tissus. Les transcrits complets correspondant à des séquences pertinentes ont été obtenus en combinant recherche *in silico* et 5'ou 3' RACE. Pour ces gènes, l'expression différentielle induite par le virus a été vérifiée par RT-PCR et northern blot. L'identification des homologues de ces gènes permet de les regrouper en classes fonctionnelles, et de formuler des hypothèses sur leur rôle dans la réponse antivirale. Ainsi, des gènes de la famille Bcl2 ont été retrouvés, qui sont probablement impliqués dans des mécanismes d'apoptose. Des expériences d'hybridation de macro/micro arrays génériques avec des sondes complexes ADNc pertinentes sont en cours pour conforter et étendre les résultats obtenus avec les banques soustraites. Afin de progresser dans la caractérisation fonctionnelle des gènes identifiés, l'étude a été poursuivie chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*), espèce modèle en génomique. Un morpholino ciblant l'IFN a été obtenu et les modifications de l'expression qu'il induit chez les embryons de danio incubés avec des virus pertinents ont été étudiées. Chez la truite, des expériences de RNAi ont été mises en place mais n'ont donné à ce jour que des résultats peu encourageant. Par ailleurs, les gènes induits de la famille TRIM-B32 ont été plus particulièrement étudiés à la fois chez la truite et chez le zebrafish. Ces protéines qui appartiennent à une famille comptant plusieurs membres qui interviennent dans la réplication virale et interfèrent avec elles, semblent très diverses chez les poissons et apparaissent comme des candidats particulièrement intéressants pour l'étude des relations hôte virus dans un contexte génomique complexe.

Interactions virus cellules : modèles cellulaires d'infection par un Herpès virus chez le porc et application à une étude d'impact de la sélection chez les porcs Large White.

Auteurs :

François Lefèvre¹, Laurence Flori², Valentina Mariani^{2, 5}, Marielle Cochet¹, Jean-Jacques Leplat², Jean Gogué³, Germaine Burgaud, Jean-Pierre Bidanel⁵, Claire Rogel-Gaillard², Patrick Chardon²

¹ Unité de Virologie et d'Immunologie Moléculaires, INRA, Jouy-en-Josas

² Laboratoire de Radiobiologie et d'Etude du Génome, UMR INRA-CEA 314, Jouy-en-Josas

³ Domaine Expérimental INRA de Bourges

⁴ Domaine expérimental du Magneraud, INRA, Surgères

⁵ Station de Génétique Quantitative et Appliquée, INRA, Jouy-en-Josas

Mots-clés :

Herpes virus, Aujeszky, réponse immunitaire, immunité innée, complexe majeur d'histocompatibilité, transcriptome, porc, cellules dendritiques, sélection animale, génétique

Références bibliographiques :

Flori L., Renard C., Urien C., Hu X. X., Fan B.L., Lecardonnel J., Ducroix Drey C., Piumi F., Hugot K., Bidanel J.P., Lefèvre F., Rogel-Gaillard C., Chardon P. 2006. Une puce à ADN ciblée sur la région du Complexe Majeur d'Histocompatibilité chez le porc : construction et premières exploitations, Journées Rech. Porcine, 38, 119-124.

Tribout T., Caritez J.C., Gogué J., Gruand J., Bouffaud M., Billon Y., Péry C., Griffon H., Brenot S., Le Tiran M.H., Bussièrès F., Le Roy P., Bidanel J.P. 2004. Estimation, par utilisation de semence congelée du progrès génétique réalisé en France entre 1977 et 1998 dans la race porcine Large White : résultats pour quelques caractères de production et de qualité de tissus gras et maigres. Journées Rech. Porcine, 36, 275-282.

Résumé :

La connaissance des gènes dont l'expression est modifiée en réponse aux agents pathogènes, plus particulièrement aux virus, et l'identification des fonctions de leurs produits revêtent une importance capitale pour la compréhension de la physiopathologie de l'infection, des mécanismes pathogéniques et des mécanismes de défense de l'organisme contre les infections. La mise en évidence des gènes et des protéines impliqués dans la physiopathologie de l'infection est encore très incomplète et peut tirer un parti considérable du séquençage systématique des génomes et de l'étude des transcriptomes animaux. Il faut souligner l'importance, dans l'évolution et l'issue de l'infection, des gènes impliqués dans la défense de l'hôte, en particulier les gènes de la réponse immunitaire innée, qui est mise en place précocement au niveau du site d'entrée du virus. Dans le contexte actuel d'émergence de nouvelles pathologies chez les animaux domestiques, il est important d'évaluer l'impact de la sélection sur la réponse immunitaire. En effet, pour l'espèce porcine notamment, la sélection a porté sur l'amélioration des caractères de production comme l'efficacité alimentaire, la croissance, la composition corporelle et, plus récemment, la prolificité et à la qualité de la viande (Tribout et al., 2004) mais aucune donnée n'est disponible quant à une possible modification de la réponse immunitaire des porcs sélectionnés.

Le projet générique présenté ici a débuté en 2004. Ses objectifs sont, d'une part l'étude *in vitro* des interactions virus-cellule dans des modèles cellulaires porcins impliqués dans la réponse innée à l'infection par le virus de la maladie d'Aujeszky ou virus de la pseudorag (PrV) et, d'autre part, l'exploitation d'un de ces modèles pour étudier l'impact de la sélection sur la réponse immunitaire chez

la race Large White. Une approche transcriptomique est en cours, afin d'analyser et de rechercher de manière globale l'ensemble des gènes cellulaires viro-régulés dans les cellules cibles primaires de l'infection virale.

Dans le cours du projet, un microréseau sur lame de verre a été produit et utilisé. Cette puce SLA2 (Flori et al., 2006) est dédiée à la région du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du porc (530 sondes), à laquelle ont été ajoutés des gènes porcins impliqués dans la réponse immunitaire (80 sondes ; I. Oswald, communication personnelle), l'ensemble des gènes du génome du PrV (80 sondes) et des gènes porcins choisis de manière aléatoire, pour la normalisation des données (1056 sondes).

Deux types cellulaires jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire innée antivirale *in vivo* : la cellule épithéliale polarisée et la cellule dendritique immature (CDi). Pour modéliser *in vitro* la cellule épithéliale polarisée, nous utilisons la lignée épithéliale rénale porcine PK-15. Les DCi, quant à elles, rares et disséminées dans l'organisme doivent être nécessairement différenciées *in vitro* à partir de leurs précurseurs sanguins (monocytes). Les monocytes sont sélectionnés à partir des leucocytes du sang périphérique par tri magnétique avec un anticorps spécifique (anti-CD172) et traités pendant 72 heures par deux cytokines porcines recombinantes, le Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor et l'interleukine 4. Nous avons confirmé la différenciation des monocytes en DCi par cytométrie en flux en utilisant des anticorps anti-CD1, anti-CD80/CD86 et anti-CMH classe II. Ces deux types cellulaires ont été utilisés comme modèles *in vitro* d'infection par le PrV.

Les cellules PK-15 et DCi ont été mock-infectées ou infectées avec une souche de PrV virulente (NIA3) à forte multiplicité d'infection. Nous avons vérifié que, dans ces conditions expérimentales, la totalité des cellules PK-15 et une grande majorité des DCi sont infectées. Dans le cas des cellules PK-15, l'analyse des transcrits a été effectuée à plusieurs temps post-infection (entre 0 et 12 heures). L'analyse du profil d'expression des gènes viraux indique qu'ils s'expriment de façon graduelle au cours du temps. Un premier groupe de gènes viraux est exprimé 1 heure post-infection et la totalité des gènes viraux après 12h. L'étude de l'expression différentielle des gènes cellulaires dans les cellules infectées et mock-infectées au cours du temps a permis de mettre en évidence, d'une part des groupes de gènes viro-induits et, d'autre part, des gènes dont l'expression varie avec le temps. Une étude approfondie est en cours pour confirmer ces résultats. Dans le cas du modèle DCi, l'analyse des transcrits a été effectuée 18 heures post-infection. L'analyse du profil d'expression des gènes montre que les gènes viraux ne sont pas tous exprimés à ce stade. Une analyse cinétique de l'infection des DCi est prévue, afin de mieux comparer les deux modèles cellulaires.

La partie appliquée du projet a pour but d'évaluer, toujours par une approche transcriptomique, l'effet possible de la sélection porcine sur la capacité des individus à se défendre contre les infections. L'analyse transcriptomique de l'ensemble des gènes modulés par le virus dans les DCi obtenues *ex vivo* à partir du sang d'individus peut permettre d'évaluer cette capacité. Pour répondre à la question posée, deux lots d'animaux ont été produits à partir de deux stocks de semence congelée issus de verrats Large White que 20 ans de sélection séparent (en 1977 et 1998), l'un représentatif d'individus ayant subi le processus de sélection (semences 1998), l'autre représentatif d'individus ne l'ayant pas subi (semences 1977). La caractérisation des haplotypes du CMH a été réalisée par des tests de cytotoxicité complétés par le génotypage de 17 microsatellites de la région pour des animaux issus de la 5^{ème} génération de ce dispositif expérimental. Dans chaque groupe, nous avons sélectionné cinq animaux homozygotes H01/H01. Des prélèvements sanguins ont été effectués sur ces 10 animaux afin de récupérer les leucocytes du sang périphérique et trois femelles de chaque groupe ont été choisies pour l'analyse transcriptomique des DCi après infection *in vitro* par le PrV. La comparaison des niveaux d'expression des gènes dans les DCi infectées ne montre aucune différence entre les deux populations pour ces six animaux.

Nos perspectives pour la suite du projet sont d'une part, l'étude comparée des cinétiques d'infection des deux modèles cellulaires, d'autre part, la poursuite de la comparaison des populations de porc 1977 et 1998, avec l'exploitation d'un plus grand nombre d'animaux (animaux nés en décembre 2005, dont le génotypage est en cours). Pour ces expériences à venir, nous continuerons à utiliser la puce SLA2 et élargirons les études transcriptome aux outils génériques à 10 000 gènes disponibles maintenant chez le porc.

Utilisation des SNP pour éliminer les animaux sensibles à la tremblante

Auteur(s) : JM Elsen et al

Mots-clés : Tremblante, PrP, Sélection, ovins

Références biblio :

- Z. G. Vitezica , C. R. Moreno, L. Bodin, D. François, F. Barillet, and J. M. Elsen (2006) No associations between PrP genotypes and reproduction traits in INRA 401 sheep. *J Anim sci.* (in press)
- Vitezica, Z.G., Moreno, C.R., Bouix, J., Barillet, F., Perret, G., Elsen, J.M. (2005) A study on associations between PrP genotypes and meat traits in French sheep breeds. *Anim. Sci.* 81: 325-330.
- Diaz C., Vitezica Z.G., Rupp R., Andréoletti O., Elsen J.M., 2005. Polygenic variation and transmission factors involved in the resistance / susceptibility to scrapie in a Romanov flock. *J. Gen. Virol.*, 86 : 849-857.
- Andréoletti O., Lacroux C., Chabert A., Monnereau L., Tabouret G., Lantier F., Berthon P., Eychenne F., Lafond-Benestad S., Elsen J.M., Schelcher F., 2002. PrPsc accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie : influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lam transmission. *J. General Virol.*, 83, 2607-2613.
- Elsen JM, Amigues Y, Schelcher F, Ducrocq V, Andreoletti O, Eychenne F, Vu Tien Khang J, Poivy JP, Lantier F, Laplanche J., 1999. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Archives of Virology*, 144 : 431-445.

Résumé :

Le gène PrnP qui code pour la protéine PrP possède un polymorphisme qui est lié chez différentes espèces (ovins, homme, souris) à la variabilité de la sensibilité aux encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST). La présentation donnera un point sur ce polymorphisme de PrP chez les ovins, le degré de sensibilité aux souches d'EST des différents génotypes en ce locus, la façon dont cette variabilité est exploitée à grande échelle dans différents pays pour améliorer la résistance à la tremblante, les techniques utilisées pour le génotypage. L'existence d'autres gènes impliqués dans la variabilité de la sensibilité aux EST chez les ovins, et le cas des autres espèces seront évoqués.

Résistance de la glande mammaire aux infections staphylococciques

Auteur(s) :

P. Rainard¹, C. Riollet¹, R. Rupp², P. Martin³, D. Bergonier⁴ & G. Foucras⁴

¹ IASP, INRA, 37380 Nouzilly

² SAGA, INRA, 31326 Castanet-Tolosan

³ GPL, INRA, 78350 Jouy-en-Josas

⁴ IHAP, INRA/ENVIT, 31076 Toulouse

Mots-clés : Mammite ; comptage de cellules somatiques CCS ; polynucléaires neutrophiles ; *Staphylococcus* ; cellules épithéliales mammaires ; sélection divergente

Résumé :

Malgré les mesures préventives qui ont été utilisées, les mammites constituent encore à l'heure actuelle un problème majeur en élevage des ruminants laitiers. En alternative aux méthodes traditionnelles de lutte, la sélection d'animaux plus résistants aux infections mammaires est pratiquée depuis plusieurs années dans les espèces ovine et bovine laitières, sur la base d'un critère indirect de résistance : les concentrations en cellules somatiques (CCS) du lait. Les mécanismes sur lesquels cette sélection agit restent à préciser.

Pour évaluer l'effet de la sélection sur le critère CCS, une sélection divergente de brebis laitières (race Lacaune) a été réalisée au domaine expérimental INRA de La Fage (Roquefort). Deux groupes de filles à numérations cellulaires respectivement faibles ('L' pour low CCS) et élevées ('H' pour high CCS) ont été produites par accouplement raisonné à partir des index CCS des parents.

L'analyse des données répétées des SCS (transformation logarithmique des CCS) collectées au cours de la première lactation, permet de conclure à une différence moyenne entre lignée de 1.66 point de score, soit 3,2 écart type génétiques, soit plus que le doublement des scores cellulaires entre la lignée CCS-L et la lignée CCS-H. Les données de cas cliniques et de bactériologie des laits recueillies au cours de la première lactation montrent une résistance aux mammites accrue chez les brebis de la lignée CCS-L par rapport aux brebis de la lignée CCS-H. En effet, les cas de mammite clinique enregistrés à ce jour ont concerné essentiellement des brebis de la lignée CCS-H. De la même façon, la proportion d'hémi-mamelles infectées a été significativement plus élevée dans la lignée H (36%) que dans la lignée L (24%), au cours de la première lactation. Cette différence a été particulièrement marquée pour les prélèvements réalisés à la mise bas : 42% versus 14% d'hémi-mamelles infectées dans les lignées 'CCS-H' et 'CCS-L', respectivement.

Dans le but d'éprouver la sensibilité/résistance des brebis de la sélection divergente à l'infection mammaire par des bactéries du genre *Staphylococcus*, et de produire le matériel biologique nécessaire aux analyses génomiques, nous avons développé un modèle expérimental de mammite par inoculation intra-citernale de souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* ou *S. epidermidis*), choisies parmi une banque d'isolats de mammites ovines, et caractérisées par leur profil de gènes de virulence.

Des sous-ensembles de brebis issues des deux groupes CCS-L et -H ont été choisis pour réaliser des épreuves d'infections expérimentales en contrôlant i) l'absence d'infection mammaire pré-existante et ii) l'absence de lien parental entre les animaux pour limiter la possibilité d'une confusion liée à un profil génétique familial au moment de l'analyse. Des examens bactériologiques et immunologiques ont été réalisés pour connaître l'évolution de l'infection chez les animaux des deux lignées. Dans les trois essais réalisés à ce jour (4 à 7 brebis/groupe), toutes les demi-mamelles inoculées ont présenté des mammites subcliniques à cliniques, de gravité variable et parfois associées à de la mortalité. Les résultats obtenus suggèrent des modalités de réponse immunitaire différentes en fonction des lignées et de l'agent pathogène inoculé. Des investigations sont en cours pour confirmer ces résultats et élucider les mécanismes associés.

L'analyse en RP-HPLC (C4) de laits de brebis, appartenant aux 2 groupes CCS-L et -H, collectés avant et après (1 et 7 jours) infection par *S. aureus*, confirme un changement radical dans la composition de la fraction protéique des laits prélevés au niveau de la demi-mamelle infectée. On

observe en particulier, une réduction importante de la teneur en caséine \square (probablement due à une forte protéolyse) qui 7 jours après infection dépasse les 40% chez les animaux CCS-H alors que chez les animaux CCS-L elle n'excède pas 12%. Inversement, une forte augmentation de la teneur en sérum albumine (x 9) chez les animaux CCS-H est enregistrée alors qu'elle ne s'accroît que d'un facteur 3 chez les individus CCS-L, ce qui signe une altération de la perméabilité de l'épithélium mammaire. Ces premiers résultats, qui devront être confirmés sur un plus grand nombre d'animaux, suggèrent une meilleure résistance à l'infection chez les brebis CCS-L. L'étude de la fraction peptidique (soluble en TCA 4%) par RP-HPLC, destinée à mettre en évidence de possibles marqueurs de l'infection, est actuellement en cours. Par ailleurs, une analyse différentielle de la fraction protéique mineure du lactosérum des animaux CCS-H et CCS-L a également été entreprise, pour rechercher d'éventuels facteurs (de nature protéique) de résistance à l'infection.

Plusieurs types cellulaires peuvent être à l'origine du déclenchement de la réponse immunitaire au moment de l'intrusion d'un germe dans la glande mammaire. La capacité des cellules épithéliales mammaires bovines (CEM) à participer à la reconnaissance de *Staphylococcus aureus* et à déclencher une réaction inflammatoire a été étudiée en mesurant la réponse des CEM à une stimulation par des bactéries vivantes (3 souches de *S. aureus* et une souche de *Escherichia coli*). L'expression des gènes spécifiant des cytokines pro-inflammatoires (TNF- \square et IL-1 \square) et de chimiokines (IL-8 et Gro- \square) augmente précocement (3 h) après co-culture avec *S. aureus*, mais, contrairement à la co-culture avec *E. coli*, la transcription de ces gènes diminue rapidement dans les heures qui suivent. De l'IL-8 et du TNF- \square sont détectables dans le milieu de culture à faibles concentrations par rapport à la stimulation par *E. coli*. Ces différences de réponse en fonction du pathogène vont dans le sens de ce qui est observé en cas d'infections mammaires, avec des réactions inflammatoires de plus faible intensité avec *S. aureus* qu'avec *E. coli*.

La réponse précoce des CEM à *S. aureus* a également été testée avec des surnageants de culture (récoltés en phase exponentielle de croissance) de 4 souches isolées d'infections mammaires. Seul un surnageant a induit une réponse de la part des CEM, ce qui indique que la plupart des protéines bactériennes du surnageant ne sont pas reconnues par les CEM. L'identité des protéines reconnues sera recherchée. Le surnageant stimulateur a été utilisé pour étudier la réponse précoce des CEM par analyse du transcriptome (microarray, travaux en cours).

En parallèle, la caractérisation et l'expression de récepteurs membranaires importants pour la migration des polynucléaires neutrophiles est étudiée. Les deux récepteurs (CXCR1 et CXCR2) pour les chimiokines de type (ELR)CXC ont spécialement retenu notre attention car d'une part une variabilité de séquence de l'un d'eux semble associée à la résistance aux mammites chez les bovins (Youngerman et al., 2004, J. Dairy Sci. 87 : 2442-2448), et d'autre part nous venons d'établir que l'un des facteurs chimiotactiques du lait est une de ces chimiokines, ligand de CXCR2. Des anticorps ont été préparés pour un des deux récepteurs, tandis que la séquence complète (ADNc) du deuxième a été obtenue par RACE-PCR. Leur clonage est en cours, et des études fonctionnelles seront réalisées à l'aide des 3 chimiokines recombinantes bovines que nous venons de produire. Des études d'immunohistologie sont prévues sur des coupes de tissu mammaire et des CEM en culture. D'autre part, la présence constitutive d'une chimiokine (ELR)CXC dans le lait à concentration active sur les PMN pourrait avoir d'importantes conséquences pour le déclenchement de la réaction inflammatoire et le recrutement de la première vague de PMN dans la mamelle. La recherche de la source de cette chimiokine et de ses rôles potentiels dans l'inflammation a débuté.

Ces premiers résultats confirment que les CEM sont des acteurs potentiels importants de la réaction immunitaire innée de la mamelle. La comparaison de la réponse des CEM des groupes CCS-L et -H à un stimulus bactérien permettra de tester si une part de la différence de comportement des brebis vis-à-vis des infections staphylococciques s'exprime à ce premier niveau d'interaction.

GenOvul : Exploitation de la variabilité génétique intra et inter-espèces pour l'étude du déterminisme génétique du taux d'ovulation

Auteur(s) : Gwenola TOSSER-KLOPP, Francis BENNE, Agnès BONNET, Loys BODIN, Martine BONTOUX, Thierry DELPUECH, Stéphane FABRE, François HATEY, Philippe MONGET, Danielle MONNIAUX, Philippe MULSANT, Christèle ROBERT-GRANIE et Magali SAN CRISTOBAL.

Mots-clés : Ovulation, génétique, variabilité, espèces, races

Références :

- Mulsant P et coll. 2001 Mutation in Bone Morphogenetic Protein Receptor-1B is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proceedings of National Academy of Science USA* 98 : 5104-5109
- Monget P et coll. 2002 Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*. 23 : 139-54
- Tosser-Klopp G et coll. 2002 Functional study and regional mapping of 44 hormono-regulated genes isolated from a porcine granulosa cell library. *Genetic Selection Evolution* 2001 33 : 69-87.
- Mulsant P et coll. 2003 Prolificacy genes in sheep: the French genetic programmes. *Reproduction, Supplement*. 61 : 353-359.
- Hanrahan JP et coll. 2004 Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction* 2004, 70 : 900-909.

Résumé :

Chez les mammifères, la folliculogenèse ovarienne qui conduit à l'ovulation d'oocytes matures est un processus long et complexe régulé à différents niveaux. Les mécanismes qui sous-tendent la sélection d'un ou plusieurs follicules dominants ainsi que la régulation du nombre de follicules ovulatoires sont très mal connus. Une possibilité pour explorer ces mécanismes est d'étudier le déterminisme génétique du taux d'ovulation et sa variabilité, au sein d'une même espèce (mouton) et entre espèces (bovins et porcins).

Nous proposons d'abord d'étudier le déterminisme génétique associé à la variabilité du taux d'ovulation chez la brebis en utilisant deux modèles génétiques présentant une augmentation du taux d'ovulation : Booroola et Lacaune. Dans le modèle Booroola, la mutation causale a été identifiée dans le récepteur BMPR-1B. Nous proposons ici d'identifier les cibles de BMPR-1B en comparant le transcriptome de cellules de la granulosa provenant de brebis porteuses ou non de la mutation, en présence ou en absence de ligands comme BMP4. Dans le modèle Lacaune, la présence d'un gène majeur au sein d'une région chromosomique de 2 Mb du chromosome 11 a été identifiée, mais aucune donnée n'est disponible ni sur le fonctionnement de l'axe hypothalamus-hypophyse-ovaire, ni sur les mécanismes qui sous-tendent l'augmentation du nombre de follicules ovulatoires. Pour explorer ce fonctionnement et ces mécanismes, nous allons d'abord recueillir des informations sur les profils endocrinologiques de ces animaux (sauvages ou homozygotes pour la mutation). Ensuite, nous identifierons, parmi les gènes présents dans cette région de 2 Mb, ceux qui sont exprimés dans l'hypothalamus, l'hypophyse ou les follicules ovariens et les séquencerons chez des animaux porteurs homozygotes ou non porteurs pour identifier la mutation causale. Nous comparerons les réponses à BMP-4, en terme de sécrétion de progestérone, des cellules de granulosa de brebis porteuses ou non. Enfin, nous générerons des animaux porteurs d'une ou plusieurs mutations, afin de tester l'additivité des effets de ces mutations.

Dans la deuxième partie de ce projet, nous allons comparer le transcriptome de follicules ovariens de porcins et de bovins car le déroulement de leur folliculogenèse et leur taux

d'ovulation sont très différents. Nous proposons de réaliser une analyse systématique, sinon exhaustive, de l'expression des gènes au niveau du transcriptome pendant la croissance folliculaire et l'atrésie dans ces deux espèces. La comparaison des résultats obtenus dans l'une et l'autre espèce nous permettra d'identifier les gènes dont les profils d'expression sont semblables - et correspondent probablement à des fonctions fortement conservées - ou au contraire différents - et sont sans doute impliqués dans des mécanismes responsables, au moins en partie, des différences de folliculogenèse entre ces deux espèces. De plus, cette comparaison nous permettra de tester différentes hypothèses comme celle d'une contribution différente du système de signalisation BMP dans les espèces mono- versus poly-ovulantes. Enfin, cette approche apportera de nouvelles informations sur la régulation de l'expression des gènes pendant la croissance folliculaire et l'atrésie.

FERTILITE : Déterminisme génétique et étude métabolique des problèmes de fertilité des vaches laitières hautes productrices.

Auteurs : Joëlle Dupont , Lucie Tosca (Thèse), Philippe Monget, Mathieu Gautier, André Eggen, Philippe Favardin, Sébastien Fritz et Alain Malafosse

Mots-clés : Vache, fertilité, lait, génétique, métabolisme

Références bibliographiques (5 maxi) :

Lemosquet S, Favardin P. 2001. Br J Nutr, 86, 359-69.

Gautier M, Hayes H, Eggen A. 2002. Mamm Genome. 13, 316-319.

Froment P, Holzenberger M, Monget P. 2001. Médecine /Sciences, 6-7, 816-817.

Fritz S, Boichard D, Druet T, Eggen A, Malafosse A, 2004. Elevage et insémination n° 324 pages 2-8

Tosca L, Froment P, Solnais P, Ferre P, Fougelle F, Dupont J, 2005. Endocrinology, 146, 4500-4513.

Résumé :

Depuis plusieurs années, la fertilité des vaches laitières hautes productrices (VLHPs) n'a cessé de se dégrader. Des travaux réalisés par les généticiens indiquent que cette baisse de fertilité est liée à l'intensité de la sélection sur la production laitière. En effet, ces VLHPs mobilisent de façon excessive leurs réserves énergétiques, ce qui les conduit à pénaliser leur reproduction. Un programme de détection de QTLs a permis d'identifier trois QTLs impliqués dans la baisse de fertilité, mesurée par le taux de réussite à l'insémination artificielle (IA). Ces QTLs sont localisés sur les chromosomes 1, 3 et 7.

Les objectifs de ce projet sont, d'une part, de poursuivre le travail visant à identifier les gènes et les mutations présentes dans les QTLs impliqués dans la baisse de fertilité, et d'autre part, compte tenu de la forte corrélation négative entre cette baisse de fertilité et l'intensité de la mobilisation des réserves énergétiques, d'étudier le rôle des voies métaboliques candidates (insuline, acides gras), dans la fonction de reproduction chez la vache. Les travaux se dérouleront en quatre étapes.

La première étape sera prise en charge par M. Gautier (équipe d'A. Eggen). Elle consistera à rechercher de nouveaux marqueurs dans la région du QTL de fertilité située sur le chromosome 3. Ces marqueurs permettront de se rapprocher le plus possible du gène en cause, en supposant qu'il est unique. **La deuxième étape** sera réalisée à la fois à Jouy en Josas dans l'équipe d'A. Eggen et à Nouzilly dans l'équipe de P. Monget. Elle aura pour but d'identifier parmi les gènes compris dans la région du QTL, ceux qui sont exprimés dans des tissus « candidats » au phénotype (tissus impliqués principalement dans la reproduction ou dans le métabolisme, axe hypothalamo-hypophysaire, ovaires, thyroïde, tissu adipeux, surrénales...) par une approche de type CREA (Chromosome Region Expression Array). **La troisième étape** sera consacrée à l'approvisionnement des animaux porteurs des haplotypes Fertile « -/- » et Fertile « +/+ » dans l'étable nouvellement construite à Nouzilly. En effet, afin de réaliser des études phénotypiques fines (mesure de la prise alimentaire, de la production laitière, de l'état corporel, étude de différents paramètres sanguins sans oublier des mesures du métabolisme et des observations du comportement social et sexuel) des femelles devront être identifiées. Ces animaux seront choisis sur la base des génotypes et des pedigrees en collaboration avec A. Malafosse et S. Fritz (UNCEIA). Enfin, **en dernière partie de ce projet**, nous proposons d'étudier le rôle d'un système métabolique candidat dans les interactions métabolisme/reproduction. En effet, ces vaches laitières hautes productrices mobilisent très fortement leurs réserves énergétiques pendant le pic de

lactation, ce qui entraîne des modifications des taux circulants de métabolites et d'hormones. Par exemple, nous observons une résistance à l'insuline qui pourrait contribuer à expliquer la plus forte fréquence de kystes ovariens chez les VLHPs. Nous avons identifié l'AMPK (AMP-activated protein kinase), une kinase impliquée dans les métabolismes lipidique (synthèse d'acide gras et de cholestérol) et glucidique (transport de glucose) dans l'ovaire de vache. Dans les cellules de la granulosa issues de petits follicules, nous montrons que cette kinase est activée en réponse à la Metformine, un agent sensibilisateur à l'insuline, fréquemment utilisé pour traiter la formation de kystes ovariens associé à une insulino-résistance chez la femme.

GENIFER : Mesures Phénotypiques et étude du polymorphisme de gènes candidats du QTL de fertilité femelle du chromosome 3 dans l'espèce bovine.

Auteur(s) : P Humblot, S Fritz, T Druet, B Grimard, M Gautier, Y Amigues, S Freret & C Ponsart

Mots-clés : Fertilité, QTL, sélection assistée par marqueurs

Résumé :

Dans l'espèce bovine, plusieurs QTL en relation avec les données de reproduction ont été détectés avec les index officiels de fertilité basés sur l'utilisation des données de non retour après insémination collectées en routine au niveau national. Aujourd'hui, le programme de Sélection Assistée par Marqueurs (34000 bovins génotypés en 4 ans) a permis de mettre en évidence que le QTL du BTA03 était le principal QTL de Fertilité en race Prim'holstein.

Dans le cadre de GENANIMAL, un programme (CARTOFINE) visant à préciser la localisation de principaux QTLs bovins est en cours et a permis de réduire l'intervalle de localisation de ce QTL. Les génotypages des taureaux sur 159 SNP de cette petite région sont en cours et devraient aboutir à l'identification de mutation en association avec le QTL : ensemble de mutations candidates. Dans le même temps, à partir des informations collectées en routine, des analyses statistiques ont pu préciser que ce QTL est détecté à partir des taux de non retour à 90 jours indiquant que ses principaux effets interviennent entre 0 et 90 jours après l'insémination.

Des données acquises dans lesquelles on combine l'enregistrement des données de non retour, des sources de variation des résultats et les informations issues de dosages hormonaux réalisés montrent que les différences de fertilité se manifestent sur des événements distincts (Absence de fécondation, Mortalité embryonnaire précoce (MEP), Mortalité embryonnaire tardive (MET), avortements plus tardifs) dont le poids sur le taux de mise bas est inégal et sur lesquels l'impact respectif des effets génétiques et d'environnement est variable. Actuellement tous ces événements sont confondus dans la composante fertilité estimée à partir de la seule analyse des taux de non retour. En se basant uniquement sur les taux de non retour, les erreurs dans l'identification des périodes d'œstrus provoquent un amalgame des situations dans l'estimation des fréquences des MEP et des MET qui résultent de processus physio-pathologiques différents. L'ensemble de ces imprécisions rend difficile voire quasiment impossible l'identification et la validation du (ou des) gène(s) sous-jacent(s) au QTL à ce stade de connaissance (après cartographie fine).

Ce projet repose sur un dispositif d'étude en ferme où la fertilité de filles de taureaux génotypés pour les mutations candidates du QTL sera suivie en utilisant les données de dosages hormonaux permettant l'identification des échecs aux différents stades de gestation.

Les informations récoltées permettront d'éviter les confusions éventuelles liées à des effets de facteurs génétiques et des facteurs d'environnement à différentes périodes. Ce programme est une suite logique au travail en cours de cartographie fine du QTL de fertilité du chromosome 3. De plus, l'ADN stocké et les informations collectées pourront être de nouveau utilisées pour étudier les mutations candidates d'autres QTL de fertilité (même si les travaux de cartographie fine de ces QTL sont moins avancés aujourd'hui).

Ce projet apparaît utile aux études de génomique fonctionnelle ultérieures projetées pour connaître l'impact d'un tel QTL sur des événements de reproduction (suite OVOAGENAE et prog Dupont). En effet, il permettra de caractériser le statut des animaux au QTL et également de mieux cibler les périodes où doivent être réalisées les études de génomique fonctionnelle.

MAMMIFERT : Utilisation des souris recombinantes congéniques pour le clonage positionnel rapide de QTL chez les mammifères : application aux QTL de fertilité chez la souris, le bœuf domestique et l'homme

Auteur(s) : David L'Hôte¹, Paul Laissue¹, Patricia Fauque¹, Philippe Monget², Patrice Humblot³, Mathieu Gautier⁴, Tom Druet⁵, Xavier Montagutelli⁶, Catherine Serres⁷, Daniel Vaiman^{1,8}

1Génomique et Epigénétique de la Pathologie Placentaire, Equipe 21, Institut Cochin, U567 INSERM-UMR8104 CNRS;

7Laboratoire de Biologie de la Reproduction., Faculté de Médecine Cochin-Port Royal; Université Paris V René Descartes, Paris

2Physiologie de la Reproduction et des Comportements UMR 6175 INRA-CNRS-Université de Tours Haras nationaux

3Département R&D, Union Nationale des Coopératives d'Élevage et d'Insémination Artificielle, Maisons-Alfort

4Laboratoire de Génétique biochimique et de Cytogénétique, UR339, 5Station de Génétique Quantitative et Appliquée, 8Département de Génétique Animale, INRA, Jouy-en-Josas

6Laboratoire de Génomique fonctionnelle de la souris, Institut Pasteur, Paris

Mots-clés : QTL, Fertilité, souris recombinantes congéniques (IRCS), Bovin

Résumé

Introduction

Les bases génétiques des infertilités chez les mammifères sont mal connues. Chez l'Homme, par exemple, moins de 10% des infertilités sont expliquées par des causes génétiques identifiées. De même, chez les bovins, des QTL de fertilité mâle et femelle ont été localisés dans de vastes régions chromosomiques, mais nécessitent une validation et une confirmation. Celle-ci pourrait par exemple émaner d'une autre espèce, et être étayée par la cartographie comparée.

But et approche expérimentale

Nous proposons d'utiliser 53 lignées de souris recombinantes congéniques (issues d'un croisement original *Mus musculus domesticus* [B6] * *Mus spretus* [SEG]) développées à l'Institut Pasteur pour une analyse de phénotypes de fertilité visant à localiser les QTL impliqués puis à identifier les gènes responsables en se servant de la souris comme point de départ vers une espèce d'intérêt agronomique majeur, le bœuf domestique, et l'homme d'autre part.

Méthodologie

Les paramètres phénotypiques suivants seront mesurés

- **Femelle :**
 - Paramètres morphométriques (poids et histologie des différents organes)
 - Taux d'ovulation après stimulation hormonale
 - Volet préimplantatoire: fécondation in vitro et analyse du développement des embryons jusqu'aux stades blastocystes
 - Volet postimplantatoire: Analyse in vivo du développement intra-utérin et comptage des fœtus et morphométrie de l'appareil génital femelle en ultrasonographie haute fréquence
- **Mâle:**
 - Paramètres morphométriques (poids et histologie des différents organes)
 - Aspects fonctionnels: nombre de spermatozoïdes épидидymaires, vitalité et morphologie des gamètes, induction de la réaction acrosomique

Résultats préliminaires

Chez la femelle, nous avons mis en place des systèmes de mesure en préimplantatoire et post implantatoire, validé la technique de fécondation in vitro et le suivi morphométrique des œufs en développement jusqu'au stade du blastocyte, mis en place l'échographie petit-animal sur les cornes utérines, validé la possibilité de suivi du développement in utero du stade 7 jpc à la naissance.

Chez le mâle, l'analyse comparative des phénotypes entre les lignées IRCS et la lignée parentale B6 est bien avancée, et nous avons cartographié plusieurs QTL

- De poids testiculaire : Chr 2, 6, 12, 13, 18 et 19
- D'anomalie de la Réaction Acrosomique : Chr 18
- D'anomalie morphologique de la tête des spermatozoïdes : Chr 2, 6 et 19

Ces résultats obtenus par comparaison des lignées ont été confirmés, et renforcés par une analyse basée sur les fragments chromosomiques. Pour ce faire, les souris IRCS possédant un allèle *spretus* commun ont été comparées à l'ensemble des individus ayant l'allèle B6. Nous sommes maintenant en cours d'établissement d'une ségrégation des fragments chromosomiques dans une population F2. Pour cela, nous nous sommes intéressé au QTL de poids testiculaire identifié dans la lignée 49A. Après croisement par des B16, 50 individus F2 ont été obtenus. Cinq individus parmi les 50 présentent des petits testicules. Ce résultat inattendu provient probablement d'une rupture d'épistasie que nous nous proposons d'étudier.

Conclusions:

Nos résultats préliminaires obtenus dans le modèle murin démontrent la validité de ce modèle pour « primo-localiser » rapidement et sans génotypage de marqueurs des QTL modulant la fertilité. Les prochaines étapes impliquent: (1) un choix des QTL les plus pertinents pour nos espèces « cibles », (2) un raffinement de la carte génétique et une identification non-ambiguë des fragments responsables de l'effet phénotypique, (3) une transposition cartographique vers les espèces « cibles », (4) un décryptage fonctionnel des régions identifiées qui permettra une identification rapide des gènes responsables, (5) des applications agronomiques (sélection) et médicales (conseil aux couples infertiles).

TYPAGENAE : Améliorer l'efficacité de la sélection multicaractères par le typage de l'embryon

Auteur(s) : D Lebourhis, Y Amigues, Y Heyman, F Guignot, X Vignon, B Leguienne, C Gonzales , JJ Colleau, P Mermillod, G Charpigny & P Humblot

Mots-clés : Sélection assistée par marqueurs, embryon, génotypage

Résumé :

Ce projet initié en 2004 et réalisé dans le cadre de GENANIMAL / AGENAE a pour objectifs de résoudre les principaux problèmes techniques associés à l'application du typage aux embryons bovins pour améliorer l'efficacité de la sélection multicaractères et de voir si cette méthode peut être opérationnelle dans le contexte des schémas de sélection. Ce projet dont l'UNCEIA est le maître d'œuvre associe plusieurs partenaires : INRA de Jouy en Josas (BDR et SGQA) INRA de Nouzilly (PRC), UMOTEST et LABOGENA.

Les tâches I et II du projet qui concernent respectivement la multiplication du matériel embryonnaire et le typage ont été l'objet des travaux les plus importants. Pour la tâche IV, les premières informations de simulations pour estimer l'intérêt d'un typage précoce pour les marqueurs de la SAM dans les programmes de sélection ont été rassemblées.

Deux scénarios étaient envisagés pour multiplier le matériel embryonnaire (Tâche I): Les premiers travaux conduits sur la multiplication de cellules issues de biopsies d'embryons ont montré que prélever par biopsie des cellules sur un embryon de 5 jours n'altère pas la survie ultérieure en culture. Le taux de survie de tels embryons est voisin de 90%. Les transferts nucléaires réalisés en vue de produire en plus grand nombre des cellules embryonnaires à typer ont donné 1,5 à 2 embryons reconstitués à partir de plus de 80% des biopsies initiales. Les manipulations ont été poursuivies en utilisant des taureaux connus pour donner de moins bons taux de développement in vitro de façon à avoir une estimation plus réaliste des rendements probables. Parallèlement à ces études sur le modèle in vitro, des séries de production de blastocystes à partir de cellules de morula (J6) produits in vivo ont été initiées. La culture pendant 8 jours des blastocystes issus de transfert nucléaire permet de fournir assez de cellules pour réaliser l'ensemble des typages nécessaires. Par contre, les résultats de développement des cultures cellulaires à partir de biopsies de blastocystes (équipes INRA 1 et INRA 2) ont été jusqu'à présent peu encourageants et cette voie est abandonnée. Enfin, la bissection des embryons, la biopsie de l'un d'entre eux pouvant être utilisé(e) pour les typages, est en train d'être testée. La bissection n'affecte pas les taux de développement et l'efficacité de cette technique semble fortement corrélée à la qualité de l'embryon développé après biopsie.

Le premiers essais de typage ont montré qu'il était possible de réaliser l'ensemble des typages nécessaires à la SAM de façon fiable et répétable à partir d'environ 200 cellules. Les essais de pré-amplification de l'ADN réalisés à l'automne 2005 montrent que le nombre de cellules pourrait être ramené à 8 ou 10 sans affecter la qualité des typages. Dans ces conditions le taux de génotypes indéterminés ou erronés (<5%) serait tout à fait compatible avec une utilisation dans les schémas. La simplification des opérations de typage rendrait celles-ci relativement faciles à intégrer dans les schémas à partir d'embryons produits in vivo pour lesquels le potentiel de survie après biopsie et transfert est connu et acceptable même dans l'hypothèse d'une congélation de l'embryon biopsé. Les travaux portant sur la congélation de tels embryons produits in vitro sont en cours (Tâche III).

OVOGENAE : Génomique expressionnelle de l'ovocyte dans des situations physiopathologiques de reproduction bovine

Auteur(s) : Rozenn Dalbiès-Tran¹, Svetlana Uzbekova¹, Sophie Pennetier¹, Aurore Thélie¹, Christine Perreau¹, Pascal Papillier¹, Pascal Mermillod¹, Philippe Monget¹, Sébastien Dade¹, Amélie Paillisson¹, Martine Bontoux¹, Véronique Duranthon², Yvan Heyman², Christophe Audouard², Christophe Richard³, Brigitte Leguienne⁴, Claire Ponsart⁴, Catherine Guyader-Joly⁴, Sylviane Ponchon⁴, Patrice Humblot⁴

(1) Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 6175 INRA/CNRS/Univ. de Tours/Haras Nationaux, 37380 Nouzilly

(2) Biologie du Développement et Reproduction, UMR 1198 INRA/ENVA, 78352 Jouy en Josas

(3) Unité commune d'expérimentation animale de Bressonvilliers, UE 331, 91630 Leudeville

(4) Union Nationale des Coopératives d'Élevage et d'Insémination Animale, département R&D, 94703 Maisons-Alfort

Mots-clés : bovin, fertilité, ovocyte, gènes marqueurs

Références biblio :

Pennetier, S., Perreau, C., Delaleu, B., Uzbekova, S., Mermillod, P., & Dalbiès-Tran, R. soumis à *BMC Developmental Biology*.

Uzbekova, S., Roy-Sabau, M., Dalbiès-Tran, R., Perreau, C., Papillier, P., Mompert, F., Thelie, A., Pennetier, S., Cognie, J., Cadoret, V., Royere, D., Monget, P., & Mermillod, P. (2006) *Reproductive Biology and Endocrinology* (sous presse)

Dalbiès-Tran, R., Papillier, P., Pennetier, S., Uzbekova, S., & Monget, P. (2005) *Molecular Reproduction and Development* 71: 414-421.

[Pennetier S, Uzbekova S, Guyader-Joly C, Humblot P, Mermillod P, Dalbies-Tran R.](#) (2005a) *Biol. Reprod.* 73:713-20.

Pennetier, S., Uzbekova, S., Mermillod, P., & Dalbiès-Tran, R. (2005b) *Biology of Reproduction, suppl. 1 (proceedings, 38th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Québec (Canada), 23-26 Juillet 2005)*

Paillisson, A., Dadé, S., Callebaut, I., Bontoux, M., Dalbiès-Tran, R., Vaiman, D., Monget, P. (2005) *BMC Genomics*, 6:76.

Dade, S., Callebaut, I., Bontoux, M., Dalbiès-Tran, R., & Monget, P. (2004) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324:547-553.

Pennetier, S., Uzbekova, S., Perreau, C., Papillier, P., Mermillod, P., & Dalbiès-Tran, R. (2004) *Biology of Reproduction*, 71:1359-1366.

Résumé :

Dans l'espèce bovine, la corrélation entre la fréquence des échecs de gestation après insémination et les caractéristiques génétiques de production laitière traduit l'impact défavorable sur la fertilité d'une sélection uniquement orientée sur ces caractères. L'impact économique annuel dépasse 2 millions d'euros dans les élevages laitiers français, auxquels s'ajoute une somme équivalente pour la branche insémination. La « qualité » des gamètes joue un rôle évident dans l'établissement de la gestation, et tout particulièrement la qualité de l'ovocyte du fait du rôle prépondérant des facteurs maternels au cours des premiers stades embryonnaires. Cette compétence à produire un embryon viable est associée à l'activation d'un répertoire caractéristique de gènes et à une régulation précise de la stabilité des transcrits. Ces dernières années, la génomique de l'ovocyte bovin a connu un essor spectaculaire, auquel a largement contribué le programme OVOGENAE.

Nous avons notamment mis en évidence plusieurs centaines de transcrits spécifiques ou surexprimés dans ce modèle cellulaire (Pennetier et al, 2005a) ; ils correspondent soit à des orthologues de gènes précédemment identifiés dans d'autres espèces, soit à des gènes

non encore répertoriés. Les ADNc de plusieurs gènes ont été clonés et leur expression restreinte à l'ovocyte démontrée individuellement : les orthologues bovins des gènes à effet maternel *Nalp5/Mater*, *Stella* et *Zar1*, le gène *NALP9*, découvert au laboratoire, *MELK* (Dade et al, 2004 ; Pennetier et al, 2004, 2005b ; Dalbiès-Tran et al. 2005 ; Uzbekova et al, 2006 ; Pennetier et al, soumis). Globalement, nos derniers résultats soulignent l'importance des processus post-transcriptionnels, et singulièrement de la déadénylation et de la polyadénylation cytoplasmique, sur le profil d'expression dans l'ovocyte.

En parallèle, le phénotype des animaux supports des études transcriptomiques comparatives a également été précisé, et des phénotypes extrêmes de qualité ovocytaire ont été mis en évidence (0-40% vs 80-100% de blastocystes).

Enfin, l'étude de l'héritabilité a été entreprise sur des femelles collatérales de deux animaux de phénotypes contrastés, et les ovocytes collectés par ovum pick up en vue de leur analyse transcriptomique.

Au cours de la dernière année du programme, l'expression d'un large répertoire de gènes sera analysée en association avec le potentiel de développement embryonnaire, dans le but de mettre en évidence des altérations de l'expression génique dans l'ovocyte dans des cas caractérisés de fertilité supérieure ou réduite.

Fertilité des vaches laitières : vers une définition fine des phénotypes.

Auteurs : P. LE MEZEC (1), C. PONSART (2), S. FRERET (2), F. GUILLAUME (1), S. MATTALIA (1) , S. MOUREAUX (1), P. PACCARD (1).

(1) Institut de l'Élevage, Département Génétique, 149, rue de Bercy, 75595 PARIS CEDEX 12

(2) UNCEIA, Département Recherche et Développement, 13, rue Jouët, 94704 MAISONS-ALFORT

Mots-clés : fertilité, insémination, constats de gestation, évaluation génétique.

Références biblio :

-Barbat A., Druet T., Bonaiti B., Guillaume F., Colleau J.J., Boichard D., 2005. Bilan phénotypique de la fertilité à l'insémination artificielle dans les 3 principales races laitières françaises. Renc. Rech. Rum, 12, 137-140.

-Boichard D., Barbat A., Briend M., 2002. Evaluation génétique des caractères de fertilité femelle chez les bovins laitiers. Journée AERA du 6 décembre 2002, 29-37

-Institut de l'Élevage, 2005. Les constats de gestation réalisés par les centres de mise en place en France. Situation au 01/10/2005. Compte rendu n°010579145, 18p.

Résumé :

La reproduction des vaches laitières se dégrade, mais il est difficile d'estimer avec précision la part de chacun des facteurs génétiques et environnementaux dans cette dégradation.

L'évaluation génétique des taureaux pour la fertilité de leurs filles est basée sur la réussite ou l'échec des inséminations, en terme de sanction ou non par un vêlage. Elle traite aussi des situations où le résultat est incertain : femelles sorties, inséminations réalisées depuis moins d'un an. Le caractère évalué est donc attaché au résultat final important : le vêlage ou sa présomption, mais il ne distingue pas la succession d'événements qui y conduit (aptitude de la femelle à être fécondée, fécondation, nidation, survie de l'embryon précoce, puis tardive, maintien de la gestation). Cette définition globale de la fertilité rend difficile son association à la recherche de QTL liés à des fonctions physiologiques précises.

La plupart des coopératives d'insémination proposent aux éleveurs un service de constat de gestation permettant d'indiquer dès 35 jours après l'insémination si une femelle est gestante ou non. Une enquête menée auprès d'eux fin 2005 par l'Institut de l'Élevage et l'UNCEIA montre que plus d'1,5 million de ces constats sont ainsi réalisés chaque année en France, et si leur valorisation première est individuelle et instantanée, la plupart sont enregistrés. 3 techniques sont utilisées : l'échographie pour 50% des actes, le palper rectal (40%) et le dosage de la PSPB (10%), dans le cadre de suivi reproduction des troupeaux ou suite à des demandes ponctuelles. L'Institut de l'Élevage et l'UNCEIA étudient maintenant une extraction de ces données, notamment la représentativité des femelles et des inséminations faisant l'objet d'un constat de gestation, afin d'en apprécier la pertinence pour une utilisation éventuelle dans l'évaluation génétique. La situation de réussite ou non de l'insémination qualifiée plus près de la date de l'acte serait un premier pas vers une dissociation des événements présents dans le caractère de fertilité tel qu'il est défini actuellement, et assurerait une connaissance plus précoce du résultat.

RESISAL : Identification par génomique expressionnelle de facteurs de résistance au portage des salmonelles, utilisables en sélection

Auteurs : COUDURIER Bernard, BEAUMONT Catherine, DOUAIRE Madeleine, KERBOEUF Dominique, PITEL Frederique, BESNARD Joel, VELGE Philippe.

Mots-clés : Microarray, *Salmonella*, poule, sélection, QTL, génomique fonctionnelle.

Références biblio :

- 1- Duchet Suchaux, M., F. Mompert, et al. (1997). "Differences in frequency, level, and duration of cecal carriage between four outbred chicken lines infected orally with *Salmonella enteritidis*." *Avian Dis* **41**: 559.
- 2- Beaumont, C., J. Protais, et al. (1999). "Genetic resistance to mortality of day-old chicks and carrier-state of hens after inoculation with *Salmonella enteritidis*." *Avian Pathology* **28**: 131.
- 3- Sadeyen, J. R., J. Trotureau, et al. (2004). "Salmonella carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals." *Microbes and Infection* **6**: 1278.
- 4- Tilquin, P., P. A. Barrow, et al. (2005). "A genome scan for quantitative trait loci affecting the Salmonella carrier-state in the chicken." *Genet Sel Evol* **37**(5): 539.
- 5- Sadeyen, J. R., J. Trotureau, et al. (2006). "Salmonella carrier-state in hens: study of host resistance by a gene expression approach." *Microbes and Infection* **sous presse**.

Résumé :

L'existence d'animaux porteurs asymptomatiques de salmonelles dans les élevages pose un problème de sécurité alimentaire et de santé publique. Il est en effet très difficile de repérer puis d'éliminer ces animaux. Malgré d'importantes mesures de prévention dans les élevages et la vaccination de certains animaux, la salmonellose reste une des premières causes de toxi-infections alimentaires collectives dans les pays industrialisés. La sélection génétique d'animaux résistants au portage intestinal représente un moyen de lutte alternatif à l'utilisation controversée des antibiotiques contre la persistance des salmonelles dans les élevages.

Un modèle d'infection expérimentale chez le poussin d'une semaine a été développé (1) et l'importance de la génétique dans la résistance de l'hôte au portage des salmonelles démontrée (2). Nous possédons ainsi des lignées de volailles consanguines présentant des différences phénotypiques importantes concernant le portage intestinal de *Salmonella Enteritidis* (3). Si l'effet de gènes candidats et de plusieurs QTL a été montré sur la résistance, la majorité des gènes impliqués reste inconnue et les mécanismes de résistance demeurent méconnus. Il apparaît important d'obtenir une vision globale des grands mécanismes de la réponse immunitaire impliqués dans la résistance et pour lesquels des résultats prometteurs ont déjà été obtenus (3, 5).

L'objectif de ce projet est d'identifier au niveau des populations cellulaires, par analyse sur micro-array, les gènes exprimés différemment chez les animaux sains et au cours du portage de *S. Enteritidis*.

La réponse des animaux sensibles ou résistants aux *Salmonella* sera également comparée.

Par une analyse globale du transcriptome, nous détecterons les gènes qui s'expriment de façon différentielle dans les différentes populations cellulaires. Celles-ci seront purifiées à partir d'animaux sains ou infectés expérimentalement grâce à un trieur de cellules à haut débit (MoFlo, Dakocytomation) qui permettra la purification des lymphocytes, des granulocytes, des entérocytes voir des fibroblastes à partir des "tonsilles caecales" et d'une partie des caeca (site de portage). Les résultats obtenus seront confrontés avec les

données de génomique positionnelle ce qui permettra de déterminer des gènes cibles impliqués dans le mécanisme de résistance au portage. Pour les gènes candidats identifiés grâce à cette double analyse (QTL et transcriptome), nous rechercherons des marqueurs polymorphes entre les deux phénotypes afin de pouvoir typer les animaux au plus près de la mutation causale. Enfin, le rôle des gènes d'intérêt sera validé sur les lignées consanguines puis sur des lignées commerciales en cours de sélection vis-à-vis de la résistance et de la sensibilité à la salmonellose.

L'ensemble de ce travail contribuera à une meilleure connaissance des mécanismes de résistance génétique de l'hôte au portage des salmonelles, et à l'identification de gènes importants pour la résistance au portage. Ces travaux permettront de préciser les possibilités d'une sélection génétique assistée par marqueurs.

Génotypage haute-résolution du gène BF1 (classe I) du MHC chez la Poule par pyroséquençage.

Auteur : Bertrand Bed'Hom

Mots-clés : MHC, diversité génétique, Poule, pyroséquençage, résistance aux maladies

Références biblio :

Entz P, Toliat MR, Hampe J, Valentonyte R, Jenisch S, Nürnberg P, Nagy M. New strategies for efficient typing of HLA class-II loci DQB1 and DRB1 by using Pyrosequencing™. *Tissue Antigens* 65: 67-80, 2005

Kaufman J, Milne S, Göbel TW, Walker BA, Jacob JP, Auffray C, Zoorob R, Beck S. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature* 401: 923-925, 1999

Ringquist S, Alexander AM, Styche A, Pecoraro C, Rudert WA, Trucco M. HLA Class II DRB high resolution genotyping by Pyrosequencing: comparison of group specific PCR and Pyrosequencing primers. *Human Immunology* 65: 163-174, 2004

Ruby T, Bed'Hom B, Wittzell H, Morin V, Oudin A, Zoorob R. Characterisation of a cluster of TRIM-B30.2 genes in the chicken MHC B locus. *Immunogenetics* 57: 116-128, 2005

Résumé :

Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (MHC) est une dense région génomique qui joue chez les Vertébrés un rôle central dans l'organisation de la réponse immunitaire, notamment par l'intermédiaire d'un ensemble de gènes codant pour les protéines responsables de la présentation antigénique.

Chez la Poule, le locus B du MHC a une influence majeure dans la réponse vaccinale ou anti-infectieuse à certaines pathologies aviaires majeures (maladie de Marek, coccidiose...). Cette région est la plus polymorphe du génome, et la caractérisation de ce polymorphisme est cruciale pour comprendre le rôle du MHC dans les interactions hôtes-pathogènes et proposer des schémas d'amélioration génétique de la résistance aux pathogènes. Or, les techniques actuelles de typage de cette région n'ont pas une résolution suffisante pour caractériser la variabilité rencontrée. En effet, la diversité génétique fonctionnelle, représentée en partie par les régions hautement variables des gènes encodant pour les antigènes de classe I et de classe II est difficile à explorer en raison de la forte densité de sites polymorphes.

Le génotypage de ces régions d'intérêts à l'aide de la technologie du pyroséquençage permet de caractériser avec une meilleure résolution la diversité fonctionnelle du MHC. Cette approche a été utilisée pour déterminer le génotype au gène BF1 (antigène de classe I) de lignées de Poule comportant des haplotypes MHC différents.

Mise au point de vecteurs permettant une expression fiable de gènes codant pour des ARN interférents et des microARN

Auteur(s) :

Fabienne Le Provost, Micaela Gallozzi, Gaëlle Tilly, Jean-Luc Vilotte *Laboratoire de Génétique Biochimique et Cytogénétique.*

Ashraf Sawafta, Dominique Thépot, Nathalie Daniel, Geneviève Jolivet, Louis-Marie Houdebine *Laboratoire de Biologie du Développement et de Reproduction.*

Jérôme Chapuis, Didier Vilette, Hubert Laude *Laboratoire de Virologie et Immunologie.*

INRA, JOUY-EN-JOSAS.

Mots-clés : Interférence aux ARN, microARN, transgénèse, vecteurs

Références biblio (5 maxi) :

Tilly G., Chapuis J., Vilette D., Laude H. and Vilotte J.L., 2003, Efficient and specific down-regulation of prion protein expression by RNAi. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 305 : 548-551.

Résumé :

Des études récentes ont montré que les petits ARN double brin de 21-23 pb appelés ARN interférents (siRNA) activent un système cellulaire qui induit une destruction sélective des ARN ayant une séquence exactement complémentaire. Les microARN (miRNA) sont des petits ARN simples brins codés par les génomes et qui inhibent spécifiquement la traduction des ARN messagers (ARNm) en formant des hybrides imparfaits avec la région 3'UTR. Les miRNA exercent par ailleurs un effet de type siRNA lorsqu'ils forment des hybrides parfaits avec leurs ARNm cibles. Les siRNA et miRNA regroupés sous le nom d'ARN formant des boucles en épingles à cheveux (shRNA) peuvent donc être exploités pour inhiber spécifiquement l'expression de gènes cellulaires ou viraux au niveau de leurs ARNm. Ces propriétés des shRNA sont exploitées de manière systématique chez des invertébrés modèles ainsi que chez les végétaux pour étudier les fonctions des gènes et pour créer des lignées de plantes résistantes à des virus. Ces opérations globalement appelées « knockdown » par analogie avec le « knockout » des gènes ne peuvent devenir effectives chez les animaux transgéniques que si les gènes codant pour les shRNA sont exprimés de manière appropriée à l'état de transgènes. En effet, les vecteurs existants permettant l'expression des shRNA sont basés sur l'action de promoteurs de type RNA polymérase III qui sont actifs dans des cellules transfectées ainsi que dans des clones cellulaires stables mais non chez les animaux vertébrés transgéniques obtenus par micro-injection. D'autre part, l'introduction de tels vecteurs dans des lentivirus ou par recombinaison homologue en simple copie dans des sites permissifs ne permet pas un contrôle tissulaire de leur expression. L'utilisation de longs ARN doubles brins induit par ailleurs des interférons cytotoxiques.

Ce projet se propose de définir des vecteurs permettant une expression fiable et contrôlée des gènes codant pour des shRNA (siRNA et miRNA) chez les animaux transgéniques. Les modèles utilisés pour cette étude sont des cellules en culture ainsi que des souris et des lapins transgéniques. Les gènes ciblés sont 1°) le gène Prnp allèle VRQ du mouton impliqué dans la survenue de scrapie ; 2°) le gène IE du virus responsable de la maladie d'Aujeszky chez le porc ; 3°) le génome du virus de la septicémie hémorragique du lapin (RHDV). Des siRNA capables d'inhiber leurs gènes cibles ont été définis dans les 3 laboratoires à l'aide de cellules transfectées par des vecteurs contenant des promoteurs de type RNA polymérase

III. La transposition aux animaux transgéniques dépend donc de la mise au point de vecteurs d'expression appropriés. Les premiers résultats préliminaires encourageants obtenus seront présentés et confrontés aux publications très récemment apparues dans ce domaine.

CHRONOBOS : Domestication et diversité génomique (SNPs) actuelle et ancienne : Application au bœuf et aux petits ruminants

AUTEURS : SANDRINE HUGHES¹, CATHERINE HÄNNI¹, FRANÇOIS POMPANON², PIERRE TABERLET², ANNE TRESSET³, JEAN-DENIS VIGNE³, EVA-MARIA GEIGL⁴

¹Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, CNRS UMR 5161 - INRA LA 1237, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie 69364 Lyon Cedex 07

²Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), CNRS UMR 5553 Univ. Joseph Fourier F-38041 Grenoble Cedex 9

³UMR 5197, Muséum nat. Histoire naturelle, Bat 56, 57 rue Cuvier, F-75231 Paris cedex 05

⁴Laboratoire de l'Expression du Génome et Chromatine, Institut Jacques Monod, CNRS UMR 7592 Universités Paris 6 et 7 Tour 43 - 2 Place Jussieu 75005 Paris

Résumé :

La diversité génétique d'une espèce conditionne la possibilité de sélectionner dans le futur des races selon des impératifs encore inconnus, par exemple la résistance à des maladies encore non déclarées. Il est donc important pour l'avenir de connaître la diversité actuelle afin de mieux la protéger dans le futur et de la maintenir à un niveau élevé. Si la diversité génétique de la plupart des mammifères domestiques actuels (à l'exception du mouton) est relativement bien connue en ce qui concerne l'ADN mitochondrial, elle l'est beaucoup moins concernant le génome nucléaire puisque pratiquement seuls des marqueurs neutres (microsatellites) ont été analysés.

Dans un premier temps, notre projet vise donc à identifier plusieurs marqueurs nucléaires variables selon les races chez les bovins, les ovins et les caprins, qui ont pu être sélectionnés selon des critères phénotypiques ou de résistance. Cette étape nous permettra d'obtenir une meilleure image de la diversité génomique actuelle. Ainsi, des gènes candidats seront étudiés, et éventuellement séquencés sur un large échantillonnage de bovins, incluant notamment des races rustiques, afin de mettre en évidence des SNP diagnostiques. Ceci sera également appliqué aux moutons et aux chèvres dans un but comparatif.

Dans un second temps, nous proposons une approche innovante : utiliser la paléogénétique pour tenter d'évaluer la diversité passée des espèces domestiques à la fois dans le temps et l'espace, notamment depuis les débuts de la domestication au Proche-Orient il y a 11 000 ans jusqu'à sa diffusion en Europe au Néolithique (VIIe-IVe millénaires av. J.-C.) par les voies danubienne et méditerranéenne, voire africaine pour le boeuf. L'approche paléogénétique a une plus grande chance d'aboutir quand le nombre de copies de l'ADN analysé est élevé, comme c'est le cas pour l'ADN mitochondrial. Pour cette raison, nous commencerons par compléter les études de la diversité mitochondriale déjà réalisées chez les bovins et initiées chez les petits ruminants. Cette étude nous permettra d'identifier des échantillons dont l'ADN est relativement bien conservé, et donc de regarder ensuite la diversité nucléaire présente chez ces espèces par le biais des marqueurs nouvellement déterminés (SNP). Cette approche de paléogénétique s'effectuera en étroite collaboration avec des archéozoologues, puisqu'elle nécessite de travailler sur des fossiles dont l'espèce et la forme (sauvage ou domestique) a été clairement établie et sur des sites archéologiques pertinents pour la question posée.

L'objectif de ce projet est donc d'améliorer nos connaissances de la diversité des espèces domestiques afin qu'elle puisse être mieux prise en compte pour la conservation et la sélection de nouvelles races. Ce projet propose pour cela une approche innovante et très interdisciplinaire basée sur la complémentarité de 4 équipes spécialisées en génétique des populations actuelles, paléogénétique et archéozoologie.

QUALVIVOL : Approche de génomique fonctionnelle et positionnelle pour l'identification des gènes responsables des variations de qualité technologique des viandes chez le poulet.

Auteur(s) : Cécile Berri, Vonick Sibut, Michel Duclos, Elisabeth Le Bihan-Duval, Javad Nadaf, Frédérique Pitel, Véronique Santé-Lhoutellier, Yves Jégo, Vérane Brunel, Jean Champagne

Mots-clés : muscle, potentiel glycolytique, transcriptome, QTL, viande, qualité, poulet

Résumé :

Chez le poulet, les réserves musculaires en glycogène disponibles au moment de la mort (mesurées au travers du potentiel glycolytique ou PG) constituent un élément déterminant de la qualité technologique *via* leur effet sur le pH ultime de la viande. Nous avons obtenu dans une population commerciale de poulets une très forte corrélation génétique (-0,97) entre PG et pH ultime, ce dernier étant génétiquement fortement corrélé à plusieurs indicateurs de qualité des viandes (couleur, pouvoir de rétention en eau et texture). Si ces résultats soulignent les possibilités offertes par la sélection pour améliorer la qualité, sa mise en œuvre est aujourd'hui freinée par la nécessité d'abattre les animaux pour estimer la qualité ce qui implique des coûts de mesures importants et une diminution de l'efficacité de la sélection. Disposer de marqueurs moléculaires permettrait donc d'accroître les efforts de sélection sur la qualité de la viande. Identifier les gènes impliqués doit aussi permettre, *via* l'étude de leurs régulations, d'optimiser les pratiques d'élevage des animaux pour améliorer la qualité. Le programme de recherches consistera, dans une première étape, à établir le profil d'expression des gènes dans le muscle du filet pour des groupes d'animaux à fort ou faible potentiel glycolytique. Cette démarche sera menée à la fois sur un modèle de lignées expérimentales (sélectionnées pour ou contre l'engraissement abdominal) mais aussi sur une population commerciale, toutes caractérisées en terme de PG et de qualité de la viande. Les analyses du transcriptome seront réalisées de façon globale grâce à l'usage de puces à ADN. A l'issue de cette première étape, une partie des gènes identifiés comme différentiels sera sélectionnée en fonction des informations disponibles sur leur fonction ou leur co-localisation éventuelle avec des régions chromosomiques impliquées dans les variations du pH ultime (identifiées grâce à des analyses génétiques en cours au laboratoire). Une mesure individuelle de l'expression de ces gènes (10 à 15) sera alors réalisée par RT-PCR quantitative sur des animaux extrêmes en terme de PG, issus d'un dispositif expérimental de type F2 entre les lignées expérimentales. Cette étape permettra de préciser sur un plus grand nombre d'animaux les relations entre données d'expression des gènes candidats et caractéristiques de qualité des animaux. En collaboration avec les généticiens, les données d'expression seront alors mises en relation avec les données de marqueurs microsatellites (déjà acquises sur le dispositif étudié), dans le but de cartographier plus finement les régions régulatrices du PG et de la qualité de la viande chez le Poulet. Ces premiers résultats devront ensuite être validés dans une population commerciale en cours de sélection. Par ailleurs et en fonction de l'avancée des travaux, l'étude des régulations des meilleurs gènes candidats (à la fois fonctionnels et positionnels) par d'autres facteurs tels que l'alimentation pourra être envisagée.

QUALVIGENA : Détection et validation de gènes impliqués dans les qualités de la viande bovine des trois principales races à viande en France

Auteurs : A.MALAFOSSE UNCEIA, G.RENAND INRA SAGA, V. DODELIN I.E, L.JOURNAUX I.E., C.DENOYELLE I.E., J.F HOCQUETTE INRA UGMA, J.LEPETIT INRA, S. ROUSSET INRA, H.LEVEZIEL UGMA

Résumé

Le projet QUALVIGENE vise à la détection et la validation de gènes impliqués dans les qualités de viande bovine des trois principales races en viande en France. L'objectif est de constituer un puissant outil d'analyse du déterminisme génétique des qualités de viande indispensable au développement de méthodes de sélection basées sur des informations moléculaires. En sus de la variabilité polygénique, le dispositif expérimental permettra de valider tout marqueur génétique découvert en France ou à l'étranger et d'entreprendre des recherches de nouveaux gènes candidats ou de régions hébergeant des QTL.

Ce projet utilise le dispositif de contrôle sur descendance des aptitudes bouchères sur jeunes bovins dans les races bouchères spécialisées, Charolaise, Limousine et Blonde d'Aquitaine. Il associe un grand nombre de partenaires tant techniques et scientifiques que professionnels. Il consiste dans un premier temps à réaliser en sus des contrôles classiques des mesures de qualités de viande sur des échantillons de viande prélevés sur le *longissimus thoracis* des jeunes bovins abattus. Les analyses portent sur l'analyse sensorielle réalisée par des jury entraînés et des mesures physiques et biochimiques. Au total 3380 jeunes bovins issus de 114 pères seront concernés entre 2004 et 2006. Une banque d'ADN est aussi constituée à partir de tous les taurillons, de leur père et de leur mère.

Pour des raisons budgétaires le projet a été présenté et accepté lors de plusieurs appels à projet du réseau Genanimal :

- Qualvigene (N° 23-03/03 Genanimal 18) a permis de prélever les échantillons biologiques et réaliser les mesures de qualité de viande sur les 1712 premiers jeunes bovins du programme et de mettre au point les premiers marqueurs moléculaires pour des gènes possiblement intéressants (1 000 000 €)
- QualvigenA (F 01 Genanimal 05) va permettre d'une part de réaliser les prélèvements sur les jeunes bovins abattus en 2006, de réaliser les mesures de qualité de viande sur les animaux abattus en 2005 et de continuer la mise au point des marqueurs moléculaires (500 000 €)

Des soutiens très importants ont été obtenus par ailleurs au près :

- Du Fonds National de l'Élevage pour compléter les financements nécessaires à l'encadrement et au prélèvement des animaux abattus en 2005 non financés par Genanimal
- De l'Ofival pour l'encadrement la logistique et la réalisation des génotypages à l'aide des marqueurs mis au point

Au total l'ensemble du projet Qualvigene mobilisera près de 8.5 millions d'euros dont 4.5 en autofinancement de la part de l'UNCEIA et un peu plus de 4 millions, dont 2 millions sollicités auprès de Génanimal, en tenant compte d'une nouvelle tranche de financement à venir.

Les opérations ont été conduites dans de bonnes conditions permettant la réalisation des mesures prévues sur le quasi-totalité des 2524 jeunes bovins prélevés à ce jour en 2004 et 2005. Les mesures complètes de qualité de viande n'ont pu être réalisées que sur les

animaux abattus en 2004. En effet les retards administratifs importants retardent la mise en place des crédits donc le démarrage des travaux financés sur Genanimal.

C'est ainsi que les mesures de la première série n'ont pu être achevées et interprétées que fin 2005 et qu'une seule publication scientifique a pu **toutefois** être rédigée en vue d'une présentation au congrès mondial de génétique : « *Genetic variability of meat quality in the french charolais, limousin and blonde d'aquitaine beef cattle* » (Renand et al 2006).

Plusieurs articles de vulgarisation ont été rédigés dans plusieurs journaux professionnels.

En revanche la réalisation des génotypages a été effectuée conformément aux prévisions et les fréquences des allèles concernés sont disponibles.

Ce projet, qui a fortement mobilisé toute la profession, se déroule conformément aux objectifs et ne connaît de perturbation que les retards administratifs. La restitution des résultats finaux seront décalés en conséquence.

Liste des participants