

AGENAE



Analyse du GENome des Animaux d'Elevage

Lettre AGENAE n°2 - juillet 2004

Sommaire

Le Centre de Ressources GADIE
Le projet séquençage truite
Le projet muscle bovin
Pour en savoir plus ...

Le Centre de Ressources Biologiques GADIE

(Génomique des Animaux d'Elevage et d'Intérêt Economique)

<http://www-crb.jouy.inra.fr/>

Le centre de ressources GADIE est ouvert à Jouy en Josas depuis 2001. Il assure la conservation, la gestion centralisée des collections de clones bactériens contenant des fragments d'ADN des espèces d'intérêt, et la fabrication et la distribution d'outils génomiques (membranes, microarrays) pour l'ensemble de la communauté.

l'équipe

Karine Hugot (Dir.), Patrick Chardon (Dir. Sci.), François Piumi (Dir.Tech.), Céline Ducroix, Annie Chastellier, et Jérôme Lecardonnel (Tech.), André Neau (Informaticien).

les missions du CRB

- ✍ Gérer et distribuer les **banques de grands fragments (BAC, YAC)** et les **banques de cDNA** sur 8 espèces : bovin, porc, truite, poulet, mouton, lapin, cheval et chèvre.
- ✍ Réorganiser les banques (repiquage, réplication, réarrangement)
- ✍ Préparer et distribuer des membranes à haute densité (clones grands fragments et cDNA)



- ✍ Produire à partir des collections de clones cDNA des fragments d'ADN (**fragments PCR**), en évaluer la concentration, en vérifier la qualité pour les dépôts sur membranes et sur lames. Une **démarche qualité** a été mise en œuvre (procédure qualité, gestion informatisée, traçabilité).

les ressources actuelles

Les collections produites pour l'essentiel par des laboratoires de l'INRA ont été enrichies avec des clones construits par des équipes étrangères. Il existe **2 à 3 copies de chaque collection**, dont une est stockée dans un lieu autre que le CRB. A terme, chaque banque sera dupliquée et conservée au

Centre National de Ressources Génomiques Végétales (**CNRGV**) à Toulouse.

Toutes ces ressources sont d'une aide précieuse pour l'étude de la structure des génomes, la construction des cartes génétiques ou le clonage de position et sont à la base des recherches sur l'expression des gènes. Le CRB gère aujourd'hui plusieurs centaines de milliers de clones

l'organisation

Le fonctionnement du CRB est coordonné par un comité mis en place par AGENAE. Il est chargé du suivi de l'état des équipements et des nouveaux investissements indispensables à la conduite des travaux. La compatibilité des développements bio-informatiques et la mise en place de plans de formations font partie de ses attributions. Le comité procède aussi à l'évaluation de la faisabilité des projets soumis au programme AGENAE, compte tenu des moyens technologiques disponibles.

les projets 2004

la fabrication de ressources génériques est prévue cette année pour les espèces AGENAE : puce bovine "BOV1.0", produits PCR "10K" pour les puces "truite", "porc" et "poule".

espèce	nb de clones par espèce (en millier)		
	INRA	autre	
Banques BAC et YAC	porc, bovin, cheval	100	200 (USA)
	lapin, mouton, chèvre	80	--
	poulet		50 (NL)
	porc (YAC)	33	20 (D+UK)
Banques ADNc	bovin	100	230 (USA)
	truite	54	65 (USA)
	porc	37	100 (USA)
	poulet, mouton	25	--



BAC : Bacterial Artificial Chromosome YAC : Yeast Artificial Chromosome
PCR : Polymerase Chain Reaction cDNA : complementary DNA

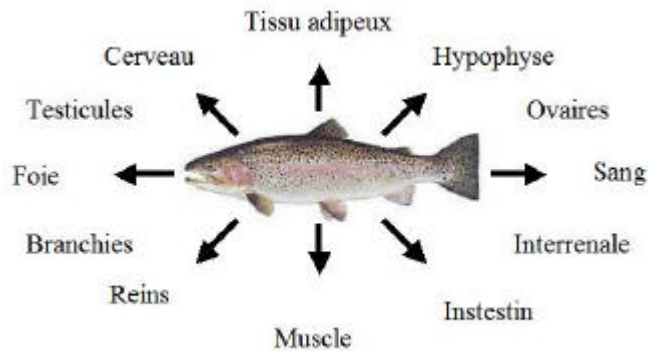
Lettre AGENAE n°2 - juillet 2004

Bilan du séquençage d'une collection de "gènes exprimés" chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*

Marina Govoroun, Anne-Sophie Goupil, Florence Le Gac et Yann Guiguen
INRA-SCRIBE, Campus de Beaulieu, RENNES

Un Contexte, un Choix de Méthode

La génomique fonctionnelle doit s'appuyer sur l'analyse simultanée des profils d'expression de plusieurs milliers de gènes.



Pour permettre cette démarche génomique plusieurs collections de "gènes exprimés" (banques d'ADN complémentaires : testiculaire, ovarienne et « multi-tissus ») ont été construites chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). La collection "multi-tissus" a fait l'objet d'efforts particuliers. Elle a été conçue pour être la plus représentative possible de nombreux tissus (foie, interrenale, cerveau, muscle, sang, intestin, organes sexuels, tissu adipeux, hypophyse, et rein) et de situations physiologiques variées (stades physiologiques, situations de stress, traitements ...). Ces collections de gènes exprimés ont été réalisées suivant le protocole « banques normalisées / soustraites » (Bonaldo et al., 1996) permettant des soustractions itératives des clones déjà connus. Cette approche permet d'éviter les redondances de séquençage par élimination progressive des gènes déjà connus.

Bonaldo MF, Lennon G, Soares MB, 1996. Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res.* 6(9):791-806.

Un Effort de Séquençage Significatif



Banques	Multi-tissus	Testicule	Ovaire	Total
Clones	65 664	13 824	5 376	84 864
Séquences	88 704	13 824	5 376	107 904
	en 5'	65 664	13 824	84 864
	en 3'	23 040	0	23 040
Séquences publiées	78 449	12 542	4 936	95 927

TIGR Indice

<http://www.tigr.org/tdb/tgi/>








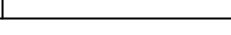
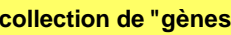
UniGene Index

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/uniGene/>

Quelques chiffres sur le séquençage des collections de gènes exprimés de truite dans AGENAE.

L'effort de séquençage important produit par l'INRA dans le cadre du projet AGENAE (et par nos collègues de l'USDA aux USA) a permis de placer la truite parmi les espèces de poissons les plus riches en séquences de « gènes exprimés ». Une conséquence positive pour nos recherches en génomique est la prise en compte de la truite dans les bases de données internationales (UniGene et TIGR).

Comparaison multi-espèces du nombre de gènes différents découverts en fonction de l'effort de séquençage.

Espèces	Gènes trouvés pour 100 séquences (max 40)	(séquences, groupes)
<i>Scus scrofa</i>		(173 395, 63 420)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>		(137 305, 47 965) (dont 85 000 AGENAE)
<i>Bos Taurus</i>		(327 664, 89 722)
<i>Gallus gallus</i>		(453 722, 11 742)
<i>Oryzia latipes</i>		(102 410, 22 587)
<i>Xenopus laevis</i>		(354 323, 75 750)
<i>Dario rerio</i>		(402 257, 77 692)
<i>Mus musculus</i>		(3 883 910, 669 402)
<i>Homo sapiens</i>		(5 175 170, 843 782)

Des Collections de Qualité

L'analyse des séquences a permis de vérifier la forte complexité des collections, la quasi absence d'éléments vides, la faible taille des extrémités polyadénylées et la bonne insertion directionnelle. Enfin la représentation des différents tissus a été vérifiée par la détection de gènes dont les expressions leur sont spécifiques.

La qualité de ces collections se traduit par la découverte d'un grand nombre de gènes différents pour un effort de séquençage plus modeste que dans le cas d'autres espèces. Ceci souligne à la fois la bonne qualité des collections et l'efficacité de la stratégie normalisation / soustractions itératives.

Cette importante collection de "gènes exprimés" permet maintenant l'analyse simultanée d'un très grand nombre de gènes différents (étude d'expression, polymorphisme, cartographie ...)

Remerciements : Ces travaux ont bénéficié de l'aide du CRB GADIE et de l'équipe bioinformatique SIGENAE, ainsi que du soutien financier du Ministère (programmes "Séquençage 2001" et "GenAnimal 2003") et du programme AGENA -INRA.



Le transcriptome et le protéome au service de la qualité sensorielle de la viande bovine

JF Hocquette, B Picard, A Lustrat, I Cassar-Malek,
Unité de Recherches sur les Herbivores (URH), Equipe Croissance et Métabolisme du Muscle, Theix, INRA
avec le CRB GADIE (Jouy-en-Josas), l'équipe SIGENAE et la Plate-forme Protéome du Centre de Clermont-Ferrand/Theix.

Les travaux sur le **transcriptome** (thèse de K Sudre) et sur le **protéome** (thèse de J Bouley) du muscle de bovin ont porté sur la construction de la qualité de la viande tout au long de la vie de l'animal, de sa conception à l'abattage, voir aussi : http://www.toulouse.inra.fr/lgc/agenae/muscle_vache.ppt

L'analyse du transcriptome

Transcriptome : ensemble des ARN messagers que produit le génome (ADN) à un moment et dans un état donnés (stade de développement, type de cellule, conditions physiologiques, ...)
ADNc (ou cDNA) : ADN complémentaire, copie d'un ARN par transcription inverse. L'ADNc est plus stable que l'ARN, il peut être copié, séquencé et stocké.

L'étude a porté sur un muscle lent oxydatif, le *rectus abdominis*, (bavette de flanchet) et un muscle rapide glycolytique, le *semitendinosus* (rond de gîte) à différents stades de vie fœtale (à 110, 180, 210 et 260 jours) et à 15 mois d'âge post-natal

Elle a permis d'étudier la mise en place des caractéristiques du muscle au cours de son développement fœtal et postnatal, et de confirmer qu'une sélection génétique sur le potentiel de croissance musculaire a des effets sur les caractéristiques du muscle (dispositif **VACHOTRON** coordonné par G Renand, INRA, Jouy-en-Josas).

Environ 110 gènes se sont exprimés différemment aux différents stades. Des gènes dont le rôle dans la myogenèse du muscle de bovin n'avait pas été décrit ou des gènes aux fonctions biologiques inconnues ont été identifiés [3]. En cela, cette étude ouvre de nouvelles pistes de recherches. Ce sont les premiers travaux publiés du transcriptome du muscle de bovin. Toutefois, ils ont été réalisés avec des ADNc de gènes humains fournis par C Auffray (CNRS, Villejuif, projet **ROGER** coordonné par P. Martin, INRA, Jouy-en-Josas).

Une nouvelle **banque d'ADNc** a été construite à partir de muscles bovins oxydatifs et glycolytiques d'animaux abattus à différents âges et issus de races françaises laitières ou à viande [4].

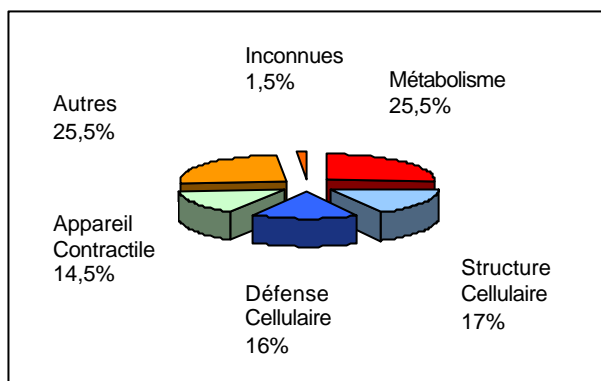
Il est montré qu'une sélection en faveur du potentiel de croissance musculaire s'accompagne :
- d'un **renforcement** des caractéristiques musculaires rapides glycolytiques (favorable pour la tendreté)
- d'une **diminution** des caractéristiques lentes oxydatives des fibres (défavorable pour la flaveur).

L'analyse du protéome

Protéome : ensemble des protéines exprimées dans la cellule à un moment et dans des conditions donnés. Les protéines sont produites à partir de la maturation et de la traduction des ARN messagers.

Sur le muscle de bovin, une première carte des protéines du muscle a été établie [1].

129 protéines, produits de 75 gènes différents, ont été cartographiées



Cette carte est complétée progressivement, au fur et à mesure des études.

Une analyse différentielle a été appliquée à la recherche de marqueurs de l'hypertrophie musculaire à partir de taurillons de race Blanc Bleu Belge (culards ou normaux).

Parmi les différences observées, citons :

- une **sur-expression** de l'enzyme **Phosphoglucomutase**,
- une **sous-expression** des isoformes lentes de la **Troponine T squelettique** dans le muscle de bovin présentant une hypertrophie musculaire [2].

Le même type d'analyse est en cours pour identifier des marqueurs de la tendreté (voir **MUGENE** en page 4).

1. Bouley J, Chambon C, Picard B, Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2004 ; 4 : 1811-1824.
2. Bouley J, Meunier B, Chambon C, De Smet S, Hocquette JF, Picard B, Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics*, 2004 : accepté pour publication.
3. Sudre K, Leroux C, Piétu G, Cassar-Malek I, Petit E, Lustrat A, Auffray C, Picard B, Martin P, Hocquette JF, Transcriptome analysis of two bovine muscles during ontogenesis. *J Biochem* 2003 ; 133 : 745-756.
4. Sudre K, Leroux C, Cassar-Malek I, Hocquette JF, Martin P, A collection of bovine cDNA probes for gene expression profiling in muscle. *Mol Cell Probes* 2004 : in revision.



Le projet MUGENE

MUGENE sera conduit en partenariat entre des équipes INRA de Clermont et de Jouy, une UMR INRA-Université de Limoges, et l'ENITA de Clermont (Ecole Nationale des Ingénieurs des Travaux Agricoles).

MUGENE vise à **identifier et analyser des gènes déterminant les caractéristiques musculaires et la qualité de la viande**.

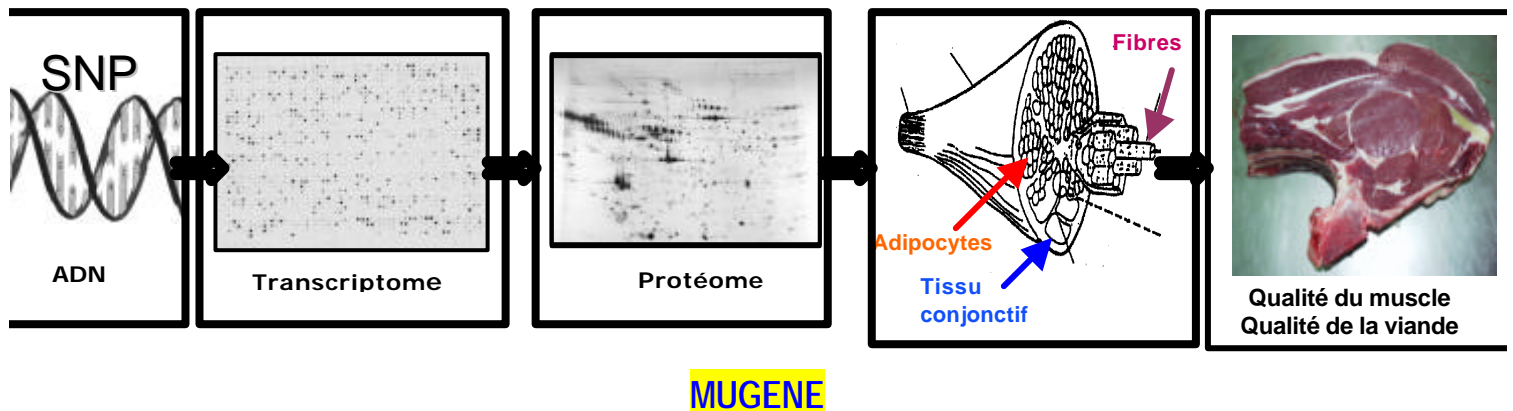
Deux lignées de bovins Charolais du dispositif **VACHOTRON** seront conduites dans 2 systèmes de production (jeunes taurillons vs bœufs au pâturage).

On testera conjointement l'influence du potentiel de

croissance musculaire et du mode de production sur la qualité de la viande.

Le projet **MUGENE** permettra d'identifier des gènes ou des protéines différemment exprimés, qui seront alors considérés comme de nouveaux **indicateurs de la qualité**.

Ces gènes seront étudiés plus finement en terme de polymorphisme et de structure. L'intérêt de ces marqueurs moléculaires sera testé dans le projet **QUALVIGENE** en partenariat avec **APIS-GENE**. Ils seront alors potentiellement utilisables en sélection ou pour l'amélioration des conditions d'élevage.



Pour en savoir plus :

sur les CRB :

<http://www.crb-france.org>

sur puce et transcriptome :

<http://tagc.univ-mrs.fr/bioinfo/pascal/puces.pdf>

sur protéome et transcriptome :

<http://interstices.info> rechercher transcriptome

sur Qualvigene :

<http://www.midatest.fr/2000-actualites.php?id=39>

sur le transcriptome du muscle :

<http://www.ofival.fr/vpc/9jsmtv/9g-com3.pdf>

... et deux glossaires :

http://www.infobiogen.fr/services/deambulium/fr/bioinfo_glossaire.htm

<http://www-helix.inrialpes.fr/IMG/pdf/termesbiomol.pdf>

Des nouvelles d'AGENAE

✍ L'appel d'offres **GENANIMAL 2004** :

9 projets finalisés et 17 projets génériques ont été soumis.

Les projets ont été évalués par des experts extérieurs (3 à 5 par projet), le comité scientifique se réunit début juillet pour une sélection finale.

✍ La lettre **SIGENAE** est accessible sur le site AGENAE (lettre n°7, juillet 2004).

✍ **BioPorc** a rejoint le GIS AGENAE en 2004.

BioPorc est le regroupement de 6 OSP (Organisation de Sélection Porcine) et de 11 CIA (Centre d'Insémination Artificielle).

Secrétariat du GIS AGENAE

Daphne.Frullini@toulouse.inra.fr

Melanie.Garcia@toulouse.inra.fr

INRA Toulouse 05 61 28 54 56

<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/agenae/>

