

Etude du méthylome spermatique porcin par des approches MeDIP-seq et pyrosequençage

Séminaire Plateforme Génomique Toulouse
Hervé Acloque, UMR444 INRA-ENVT
herve.acloque@toulouse.inra.fr



Notre objectif:

Rechercher de nouveaux
marqueurs pour prédire les
problèmes de fertilités chez les
animaux d'élevage



ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

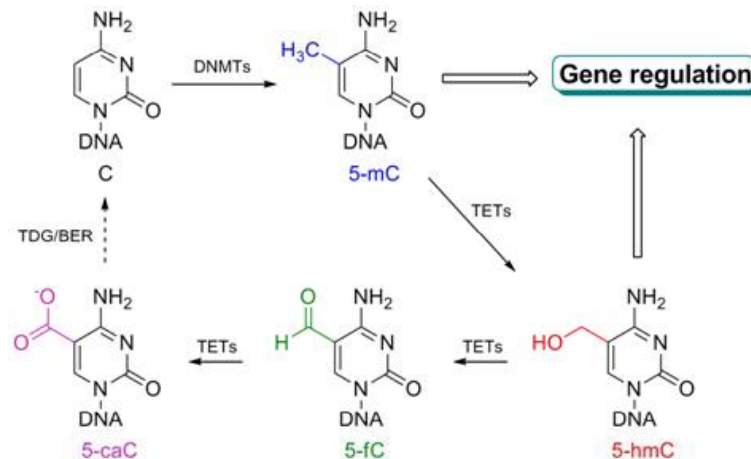


La méthylation de l'ADN

Comment coder le code

Une marque épigénétique directement liée à l'ADN

La méthylation de l'ADN est la plus ancienne marque épigénétique décrite, dès 1950 pour la 5-méthylcytosine (Wyatt, Nature) et dès 1953 pour la 5-hydroxyméthylcytosine (Wyatt and Cohen Biochem J).



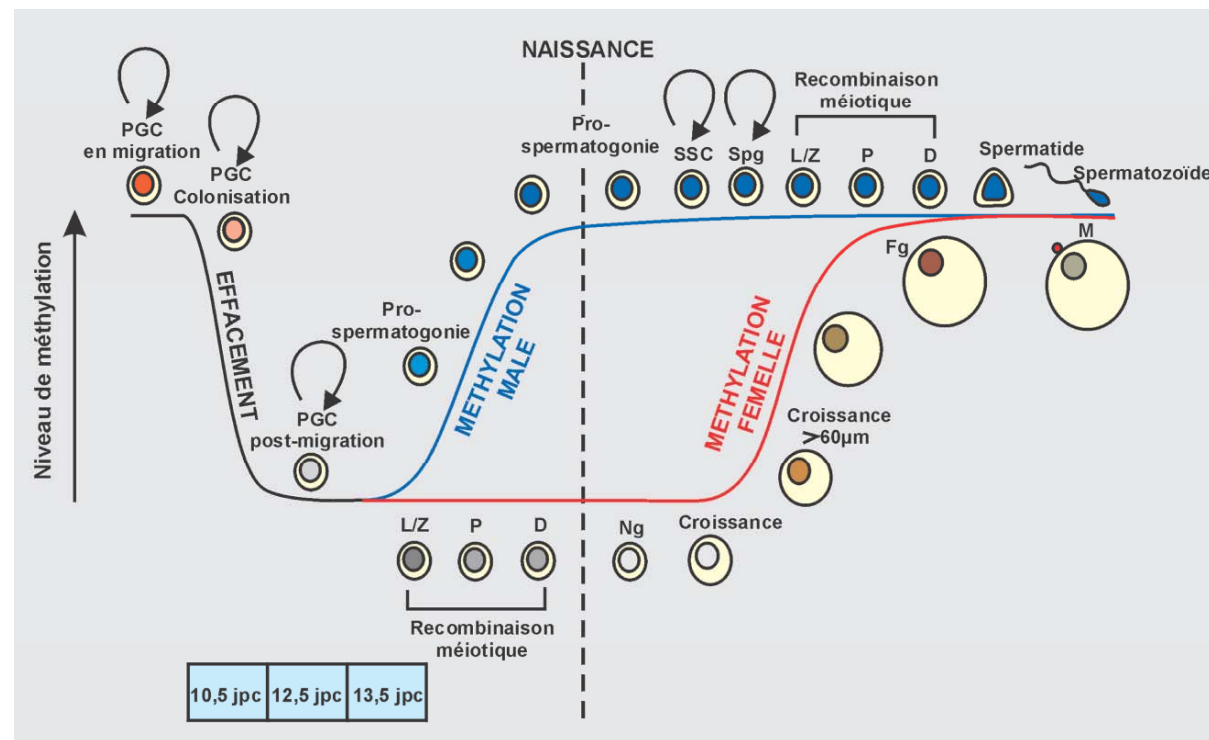
La méthylation des cytosines est essentiellement décrite comme une marque répressive, des régions fortement méthylées étant transcriptionnellement inactives (cas des éléments mobiles du génome). Ce dogme est actuellement fortement remis en question, méthylation des corps géniques et transcription étant corrélée positivement.

La méthylation de l'ADN

Comment coder le code

Une marque épigénétique directement liée à l'ADN

Dynamique de méthylation de l'ADN dans des cellules germinales humaines

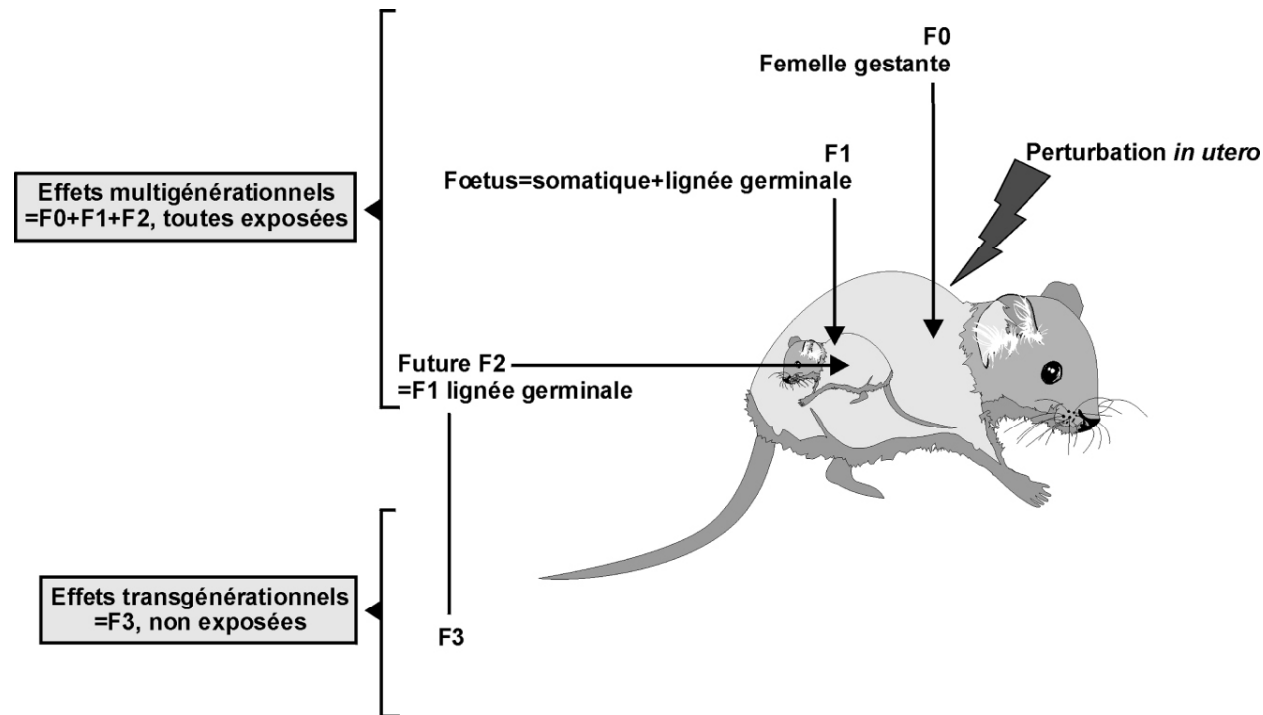


La méthylation de l'ADN

Comment coder le code

Une marque épigénétique directement liée à l'ADN

Des modifications du méthylome peuvent moduler les phénotypes et sont transmises entre génération



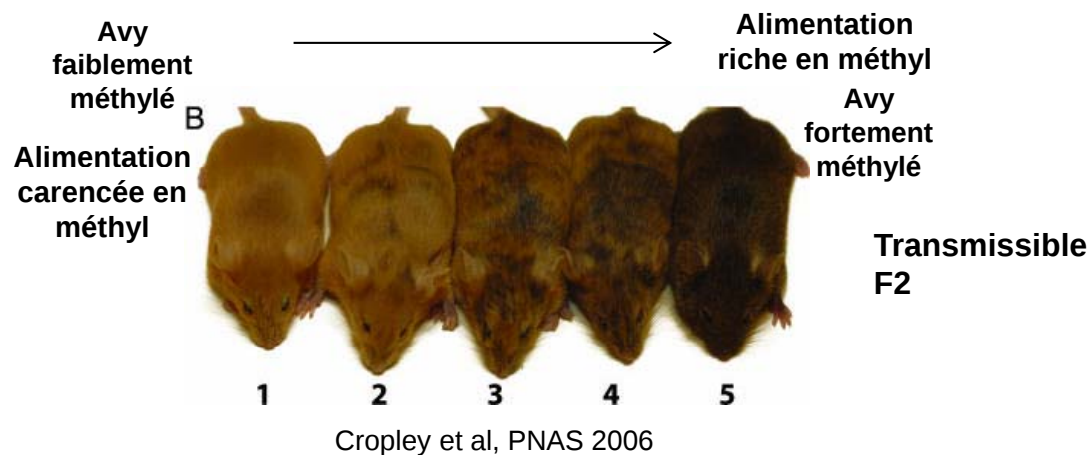
<http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/222/Sommaire.html>

La méthylation de l'ADN

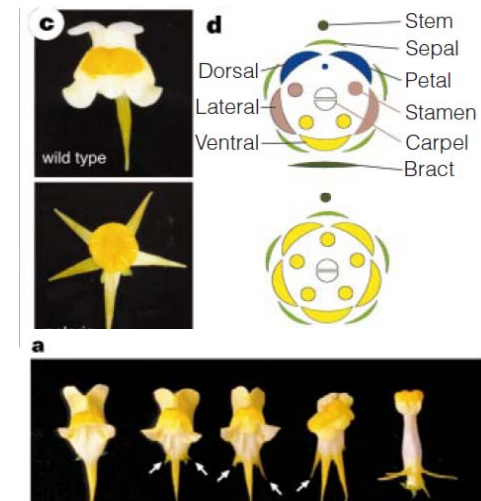
Comment coder le code

Une marque épigénétique directement liée à l'ADN

Des modifications du méthylome peuvent moduler les phénotypes et sont transmises entre génération



Cubas et al. Nature 1999



Des anomalies de méthylation dans la semence peuvent affecter le phénotype des descendants sans affecter la séquence nucléotidique

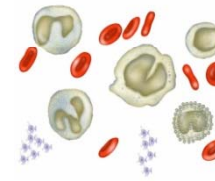
Niveaux de méthylation de l'ADN spermatique chez des animaux infertiles à qualité de semence dégradée

Verrats infertiles

Caryotypes normaux ou porteurs d'anomalies chromosomiques



Spermatozoïde



Sang

Approche moléculaire



Analyse locale
Conversion Bisulfite
Pyroséquençage

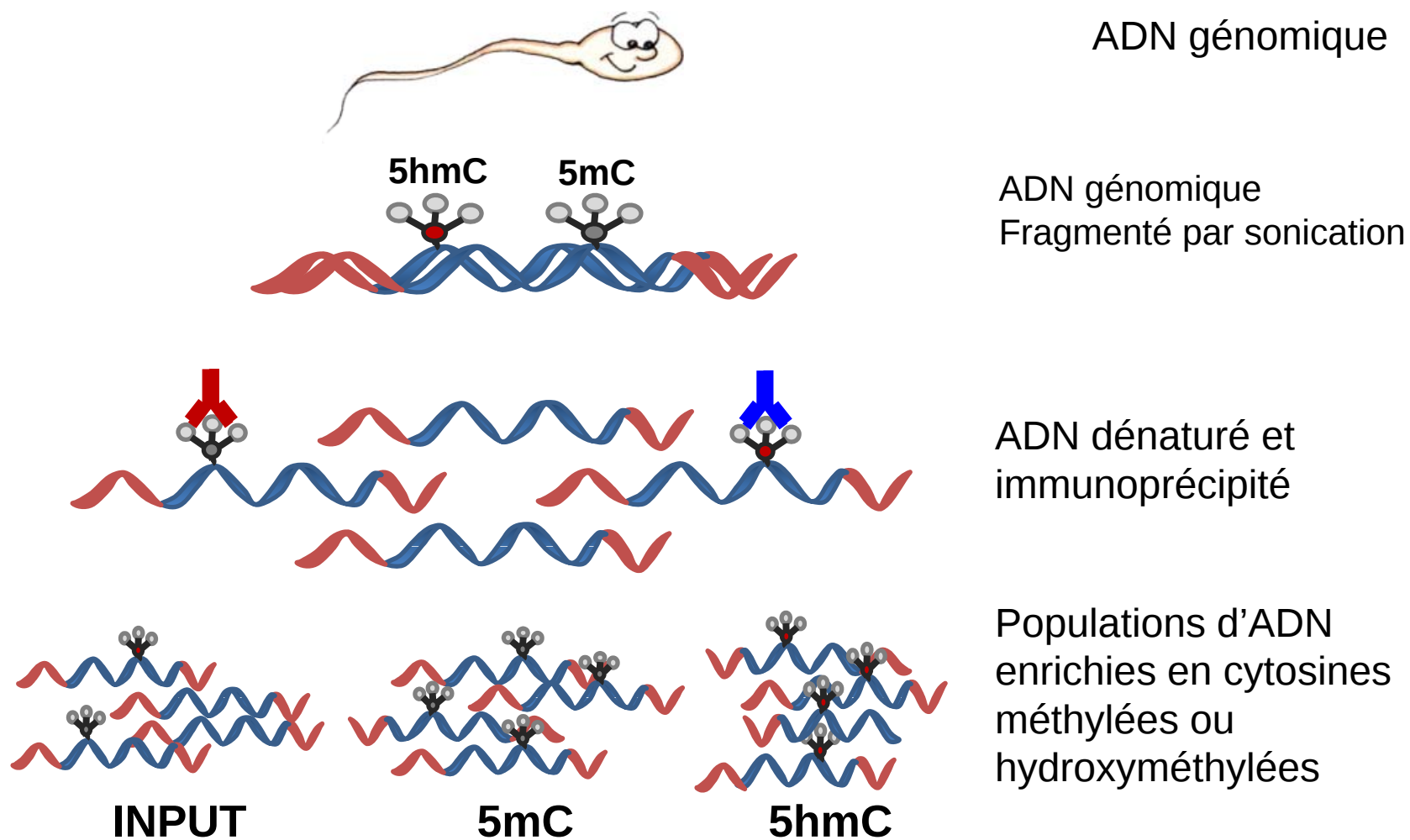


Analyse locale
MeDIP + QPCR



Méthylome
(Me-DIP-Seq)

Analyse de la méthylation de l'ADN par la technique d'immunoprécipitation de l'ADN méthylé



Analyse locale des niveaux de méthylation de l'ADN spermatique chez des animaux normaux et fertiles

Analyse par immunoprécipitation de l'ADN méthylé et QPCR



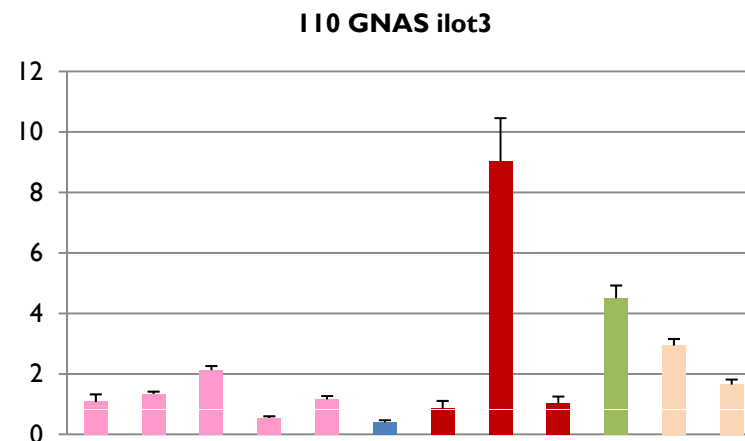
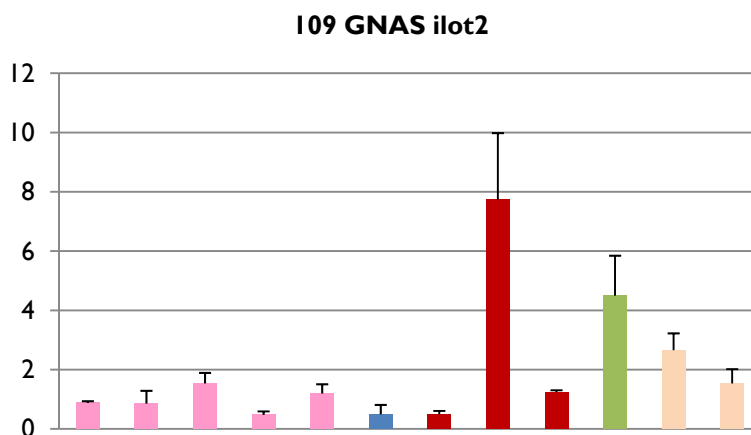
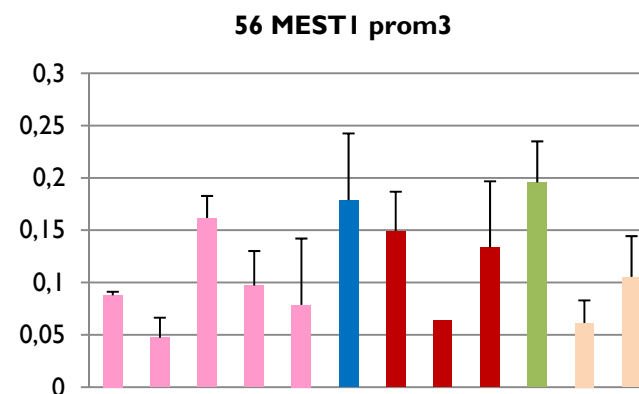
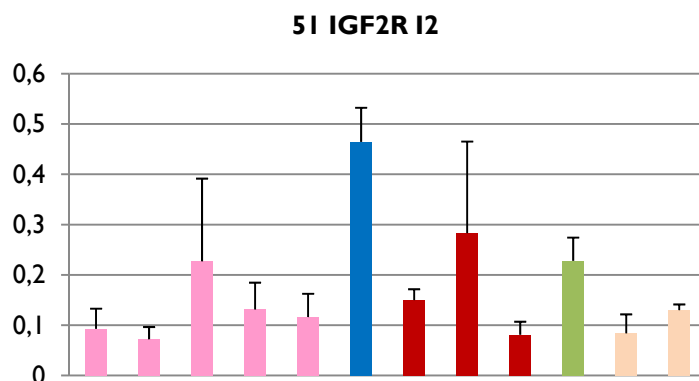
Nous avons testé 153 couples d'amorces correspondant à 31 gènes soumis à empreintes, 6 gènes du développement embryonnaire précoce et 3 gènes contrôles (40 gènes au total).

Sur ces 153, nous avons validé 67 couples d'amorces correspondant à 26 gènes soumis à empreinte, 5 du développement précoce et 3 gènes contrôles (34 gènes au total).

L

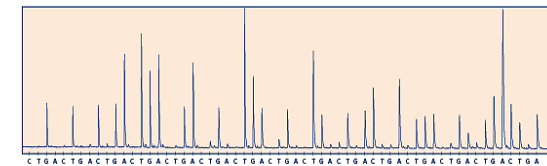
La majorité des loci ne présente pas de différence entre animaux

Analyse locale des niveaux de méthylation de l'ADN spermatique chez des animaux normaux et fertiles



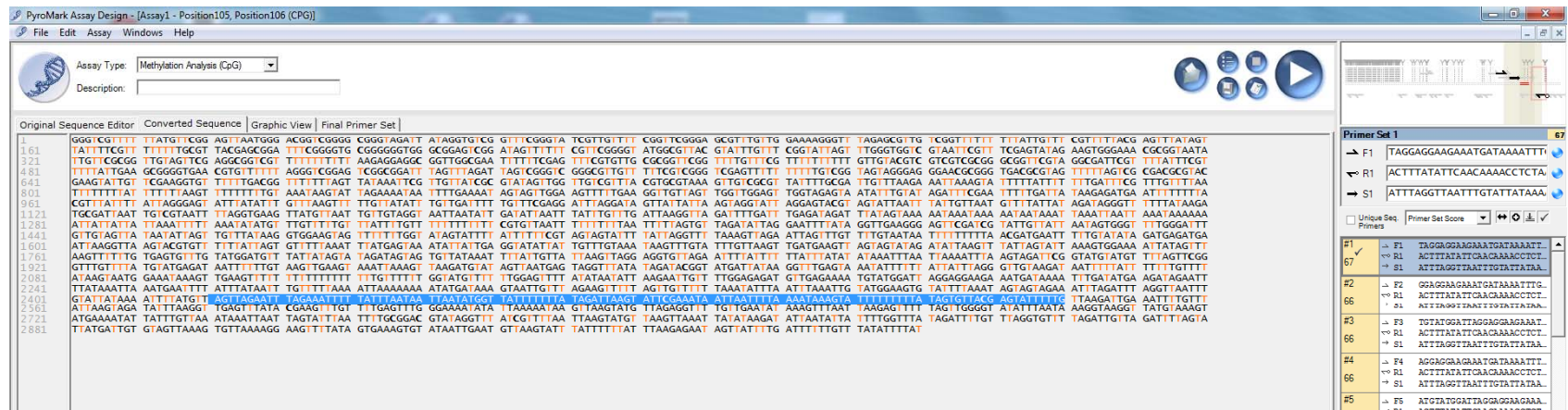
Dans certains cas, des différences semblaient significatives sur deux réplicats expérimentaux. Mais une validation par une autre technique nous semblait nécessaire de part la grande variabilité des données

-
- The diagram illustrates the bisulfite conversion of DNA. It shows three horizontal strands representing DNA. The top strand is the original DNA with bases T, C, T, C, G. The middle strand is the result of bisulfite treatment, where the C at the second position has been converted to U. The bottom strand is the result of PCR amplification, showing two strands: the top strand has bases T, T, T, C, G and the bottom strand has bases A, A, A, G, C. An arrow labeled 'bisulfite' points from the top strand to the middle strand. An arrow labeled 'PCR' points from the middle strand to the bottom strand.

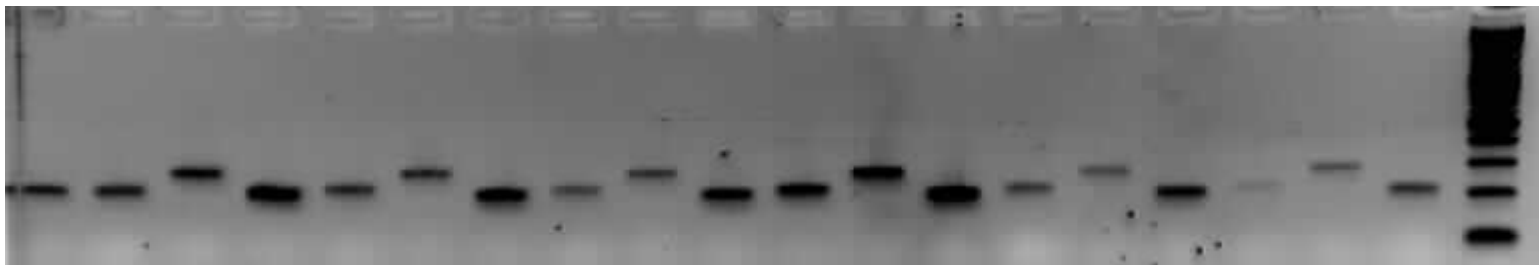


Notre expérience du Pyromark

Dessin des amorces pour la PCR avec le software PyroMark Assay Design 2.0

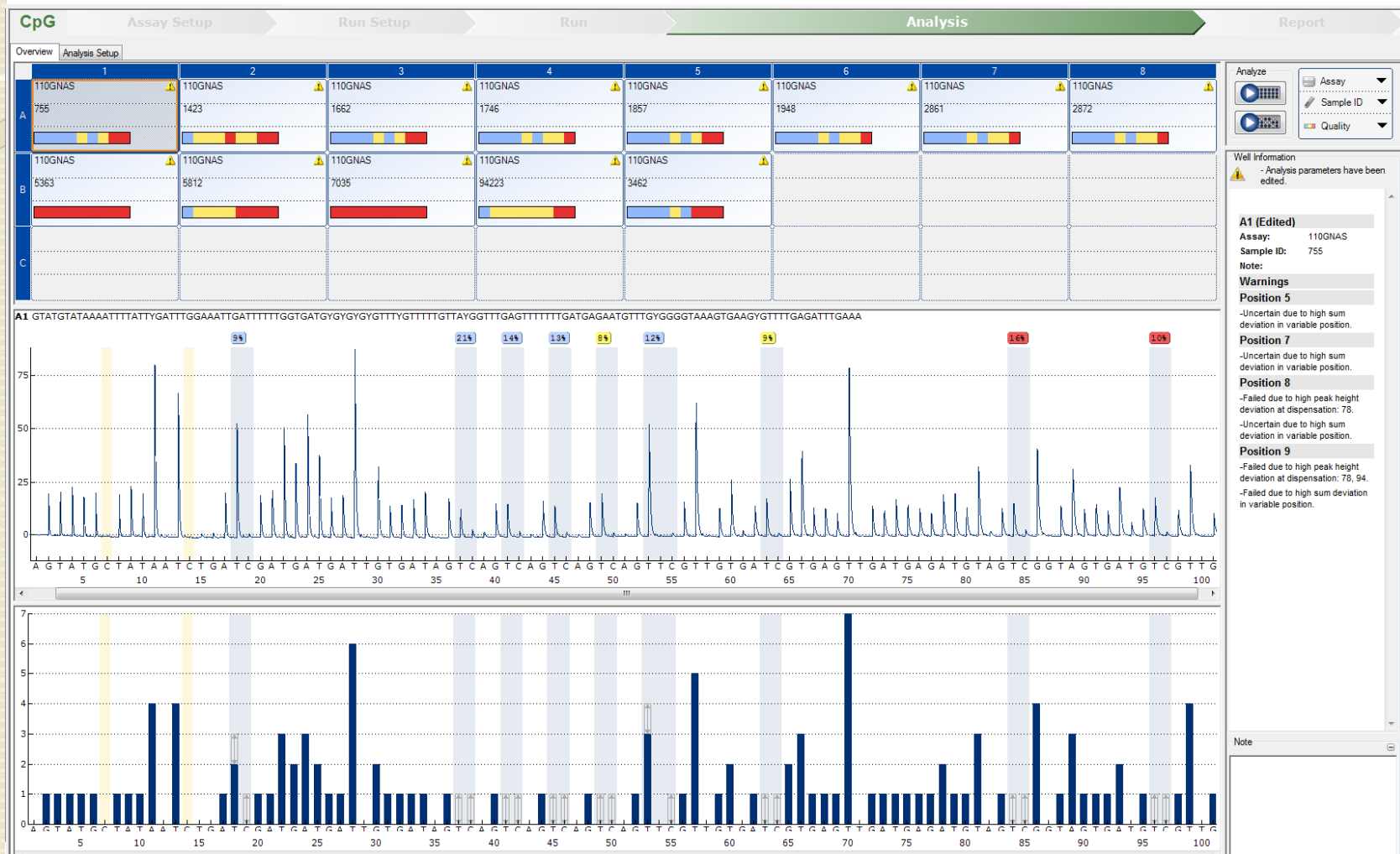


100 % des amorces dessinées avec ce software ont fonctionné



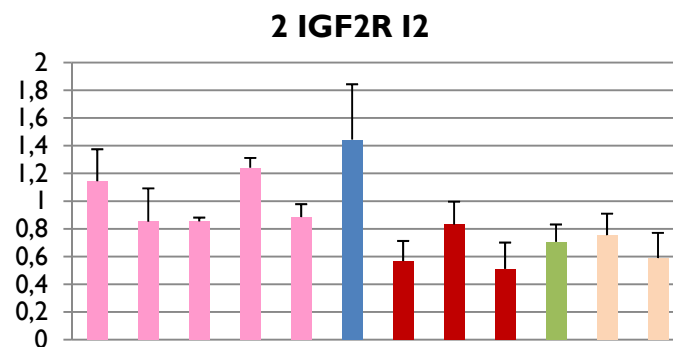
Notre expérience du Pyromark

Analyse qualité d'un «Run»

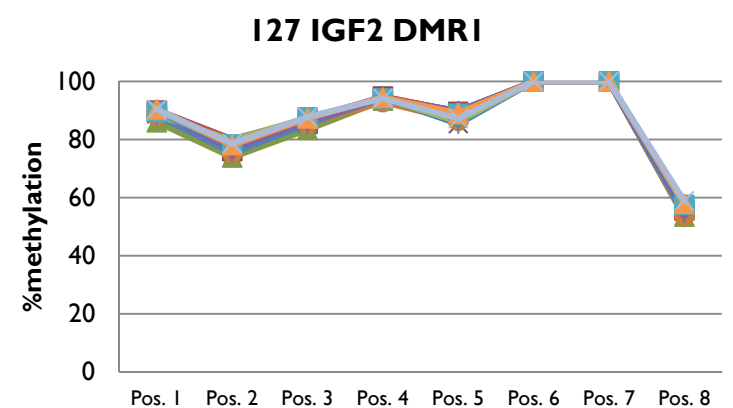
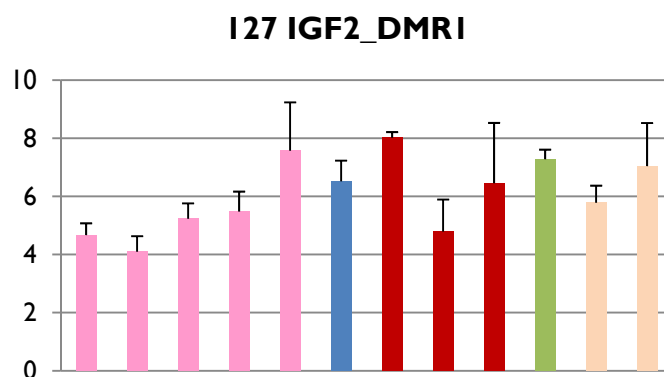
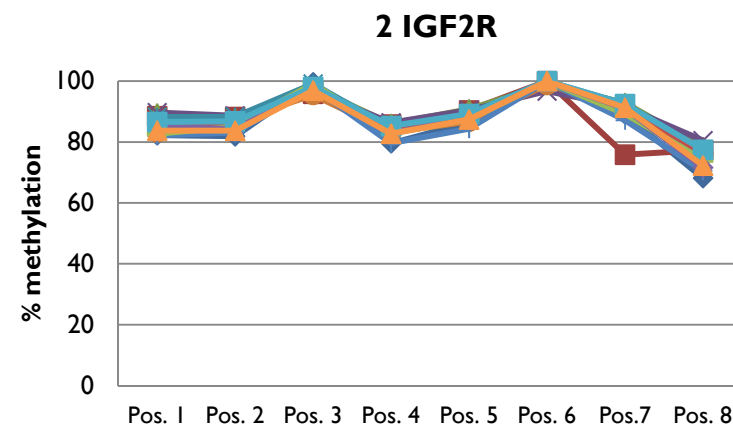


Quelques résultats

MEDIP+ QPCR



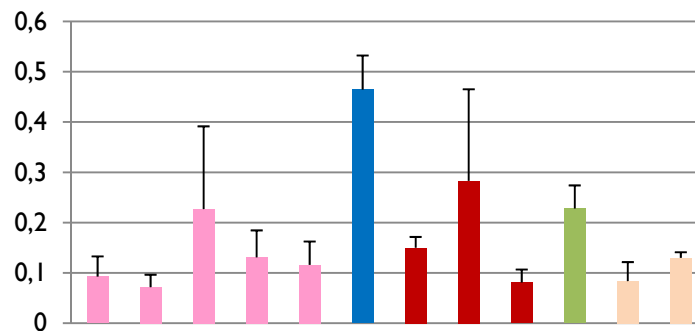
BS + Pyrosequençage



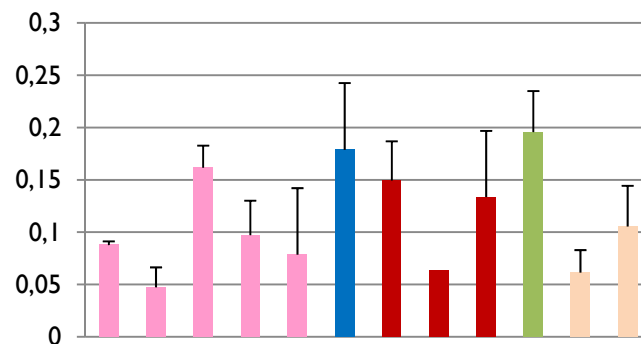
Quelques résultats

MEDIP+ QPCR

51 IGF2R I2

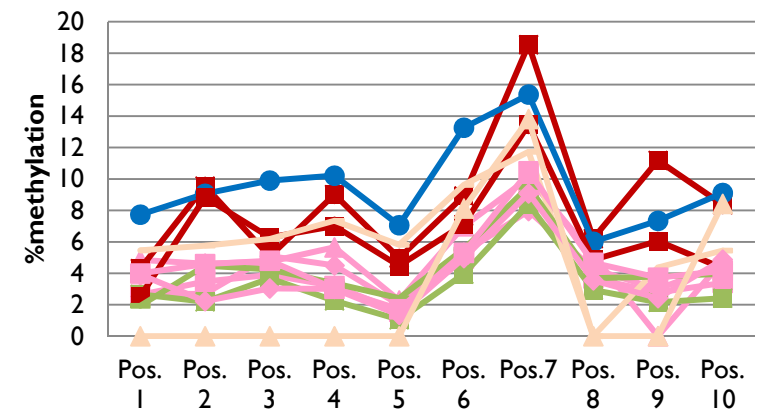


56 MEST1 prom3

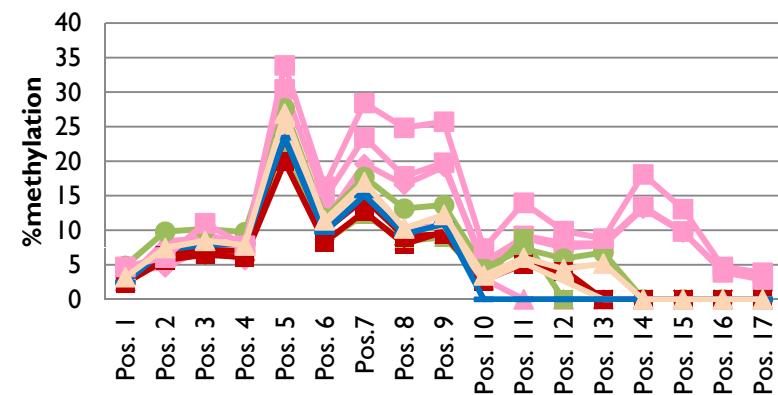


BS + Pyrosequençage

51 IGF2R

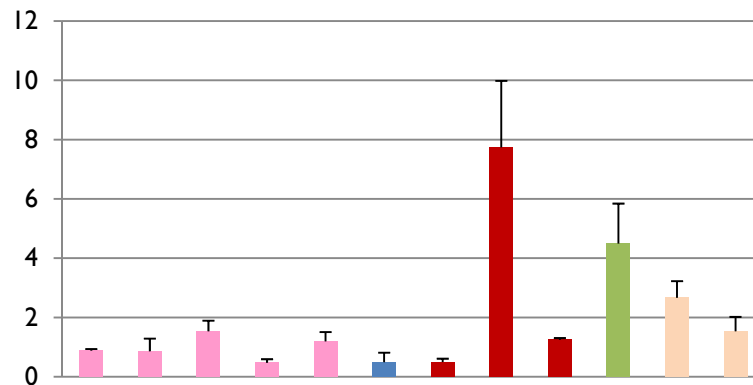


56 MEST1 prom

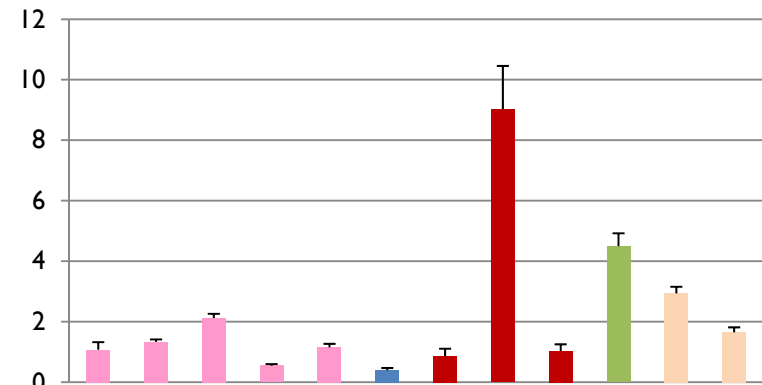


Quelques résultats

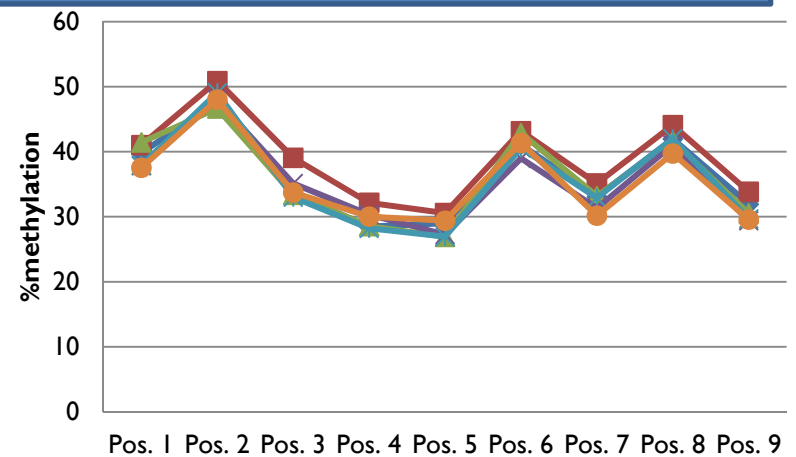
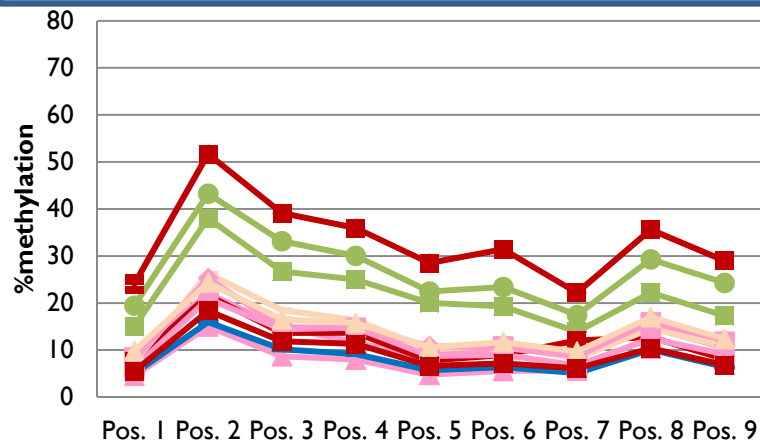
109 GNAS ilot2



110 GNAS ilot3



One imprinted locus is reproducibly hypermethylated in 3 OAT animals (from which two are carriers of chromosomal abnormalities)



Carte tout-génome des niveaux de méthylation de l'ADN spermatique chez des animaux fertiles

Etape 1 : MeDIP et séquençage



5hmC

2 animaux contrôles
Large White



Préparation des librairies (kit Bioo Scientific NEXTflex™ Methyl-Seq) avec des adaptateurs **non méthylés**

MeDIP

Amplification, quantification et chargement

Séquençage
Séquençage pair-end sur 2 lignes correspondant à 400 millions de séquences (40Gb)



Plateforme Génomique
Olivier Bouchez
Emeline Lhuillier



Carte tout-génome des niveaux de méthylation de l'ADN spermatique chez des animaux fertiles

Etape 2 : Analyse des données

1

Sequence Quality (Plateforme Génomique: Gerald Salin, Frédéric Escudié)

- FastQC: reads quality, GC%, N content, Length, Duplication level ,K-mer profile, overrepresented sequences
- ContaminationSearch (bwa)
- InsertsSizes(Picard tools)

2

Reads alignment to Reference genome (Sus scrofa 10.2)

- bwa

Alignment quality

- Samtools flagstats

Cleaning of improperly mapped reads (command bamfilter Sylvain Foissac)

- keep pairs only if both reads are mapped
- keep pair if both reads map on the same chromosome
- keep pairs with inward reads only ($\rightarrow \leftarrow$)
- remove duplicates

Reads visualization using Seqmonk

3

Methylation analysis

MACS 1.14 ou 2.0 versus MEDIPS package

MeDIP quality analysis (CpG coverage, local analysis)

Annotations coverage

Pluripotency and imprinted genes analysis

Carte tout-génomique des niveaux de méthylation de l'ADN spermatique chez des animaux fertiles

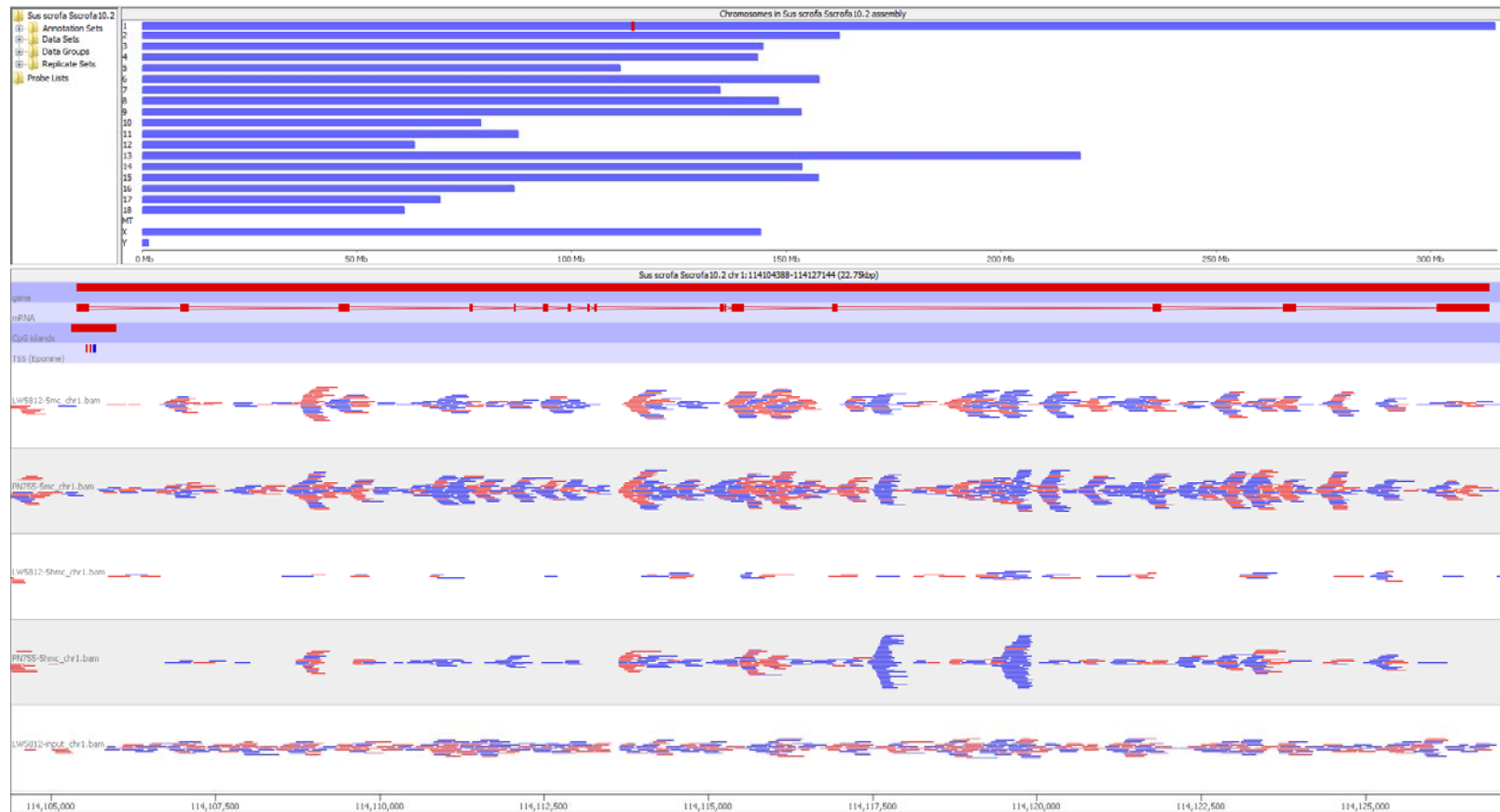
Etape 2 : Analyse des données: alignements

Sequencing and alignment statistics								
Samples	Number of sequences	%GC	Median Insert size	Mean Insert size	% Properly paired	% Mate paired on other chromosomes	% Duplicated reads	% All test OK
Pig 1 5hmC replicate 1	29 102 947	47	345bp	315bp	67	5	41	31 (9 021 913 reads)
Pig 1 5hmC replicate 2	38 554 329	47	331 bp	305bp	68	5	60	14 (5 783 149 reads)
Pig 1 5mC replicate 1	38 585 806	45	281 bp	284bp	80	4	9	72 (27 781 780 reads)
Pig 1 5mC replicate 2	40 921 540	46	286bp	289bp	80	4	9	72 (29 463 120 reads)
Pig 1 input	45 678 930	41	271bp	278bp	79	5	2.5	77 (35 172 776 reads)
Pig 2 5hmC replicate 1	37 039 726	43	263bp	270bp	75	2	10	65 (24 075 821 reads)
Pig 2 5hmC replicate 2	25 284 578	44	270bp	276bp	77	2	7	70 (17 699 204 reads)
Pig 2 5mC replicate 1	65 381 423	44	238bp	241 bp	82	1.3	5	77 (50 343 695 reads)
Pig 2 5mC replicate 2	43 569 927	44	258bp	262bp	82	1.4	4	78 (33 984 543 reads)
Pig 2 input	42 064 159	40	241 bp	244bp	82	1.2	1.5	80 (33 651 327 reads)

Carte tout-génomique des niveaux de méthylation de l'ADN spermatique chez des animaux fertiles

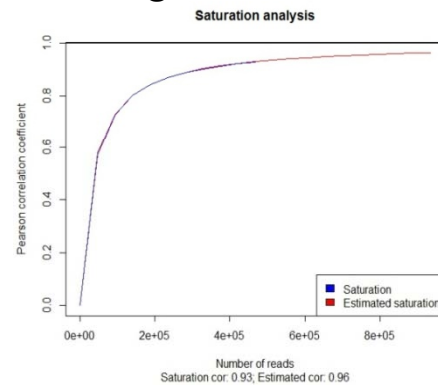
Etape 2 : Analyse des données: visualisation des alignements (seqmonk)

Gene: Poll

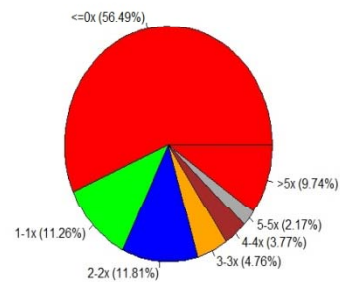


Contrôle qualité avec le package MeDIPS

Pig1 5hmC chr.1



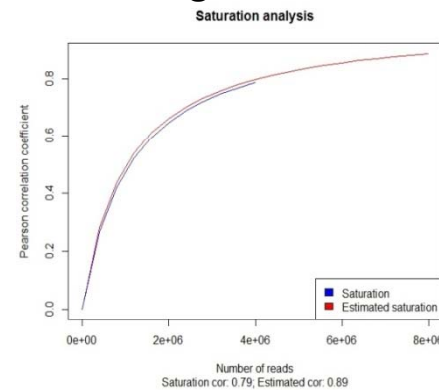
Total number of CG's: 2715927



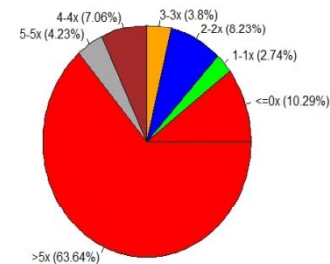
177581 of 1558661 reads (11.39%) do not cover a pattern

Enrichment.score= 1.04

Pig1 5mC chr.1



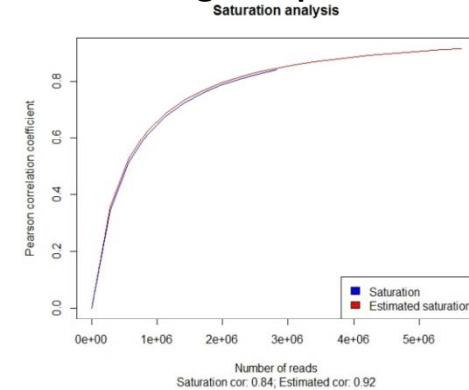
Total number of CG's: 2715927



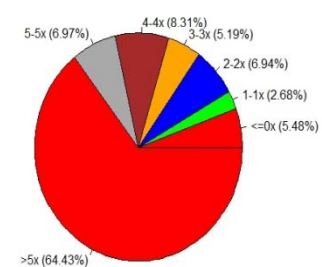
349938 of 5422062 reads (6.45%) do not cover a pattern

Enrichment.score= 1.18

Pig1 input chr.1



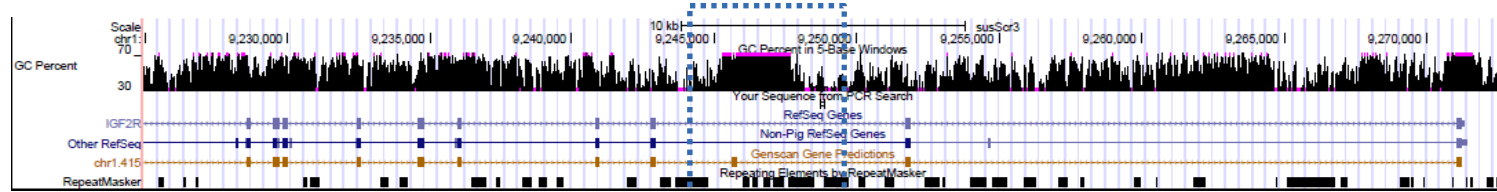
Total number of CG's: 2715927



1680215 of 7989052 reads (21.03%) do not cover a pattern

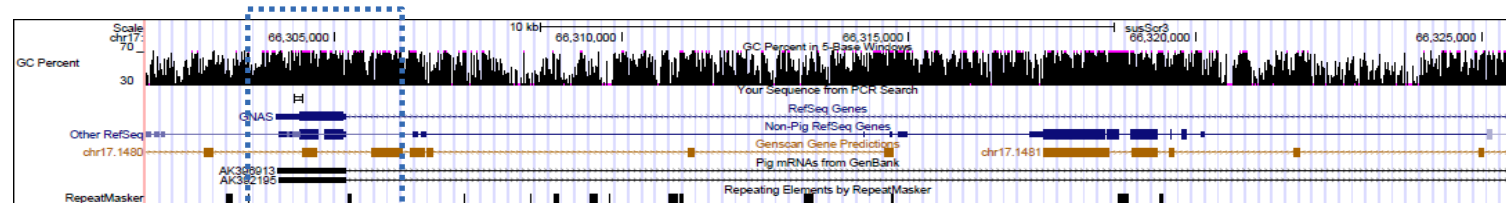
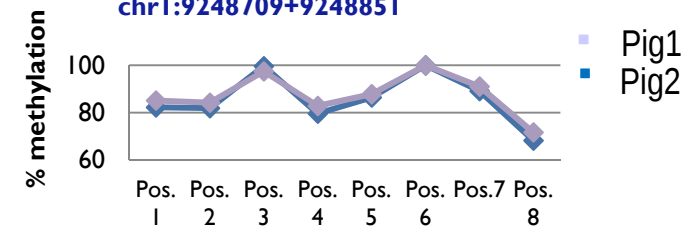
Enrichment.score= 0.80

Contrôle qualitatif sur les loci IGF2R et GNAS par pyroséquençage

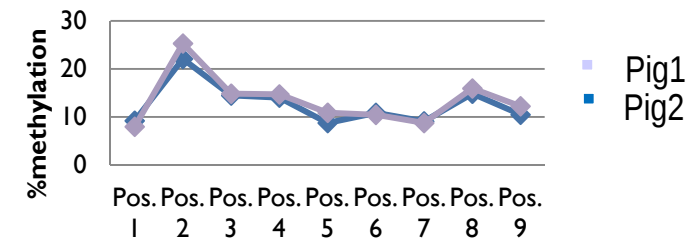


2 IGF2R:

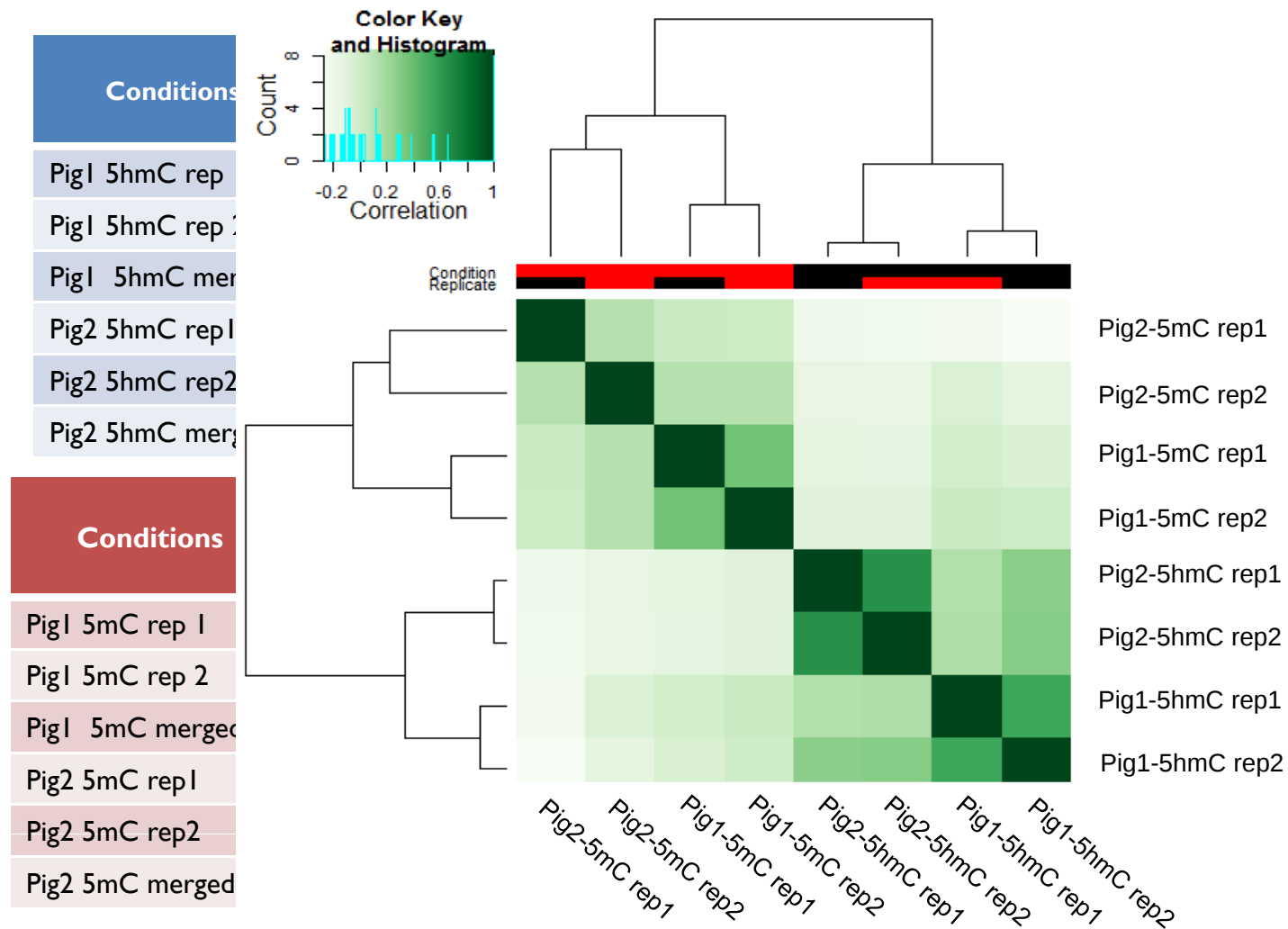
chr1:9248709+9248851



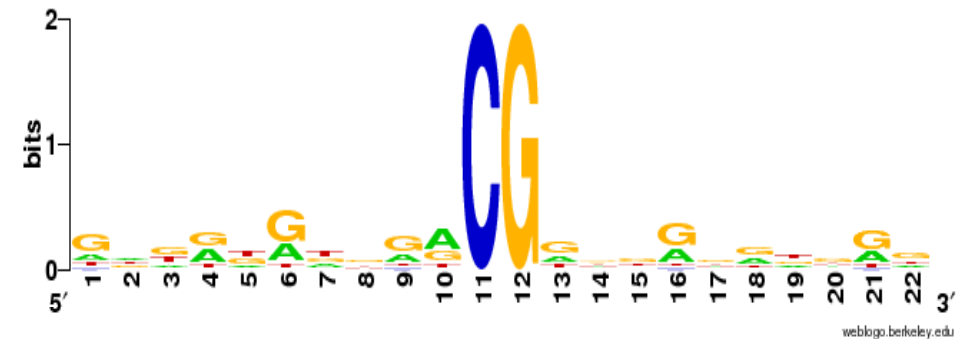
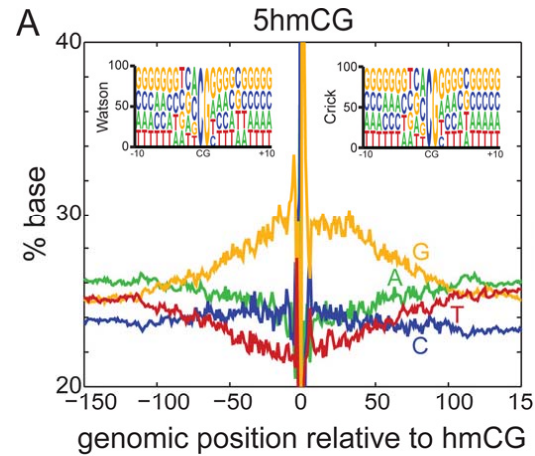
110 GNAS: chr17: 66306603-66306705



Analyse des profils de méthylation avec MACS

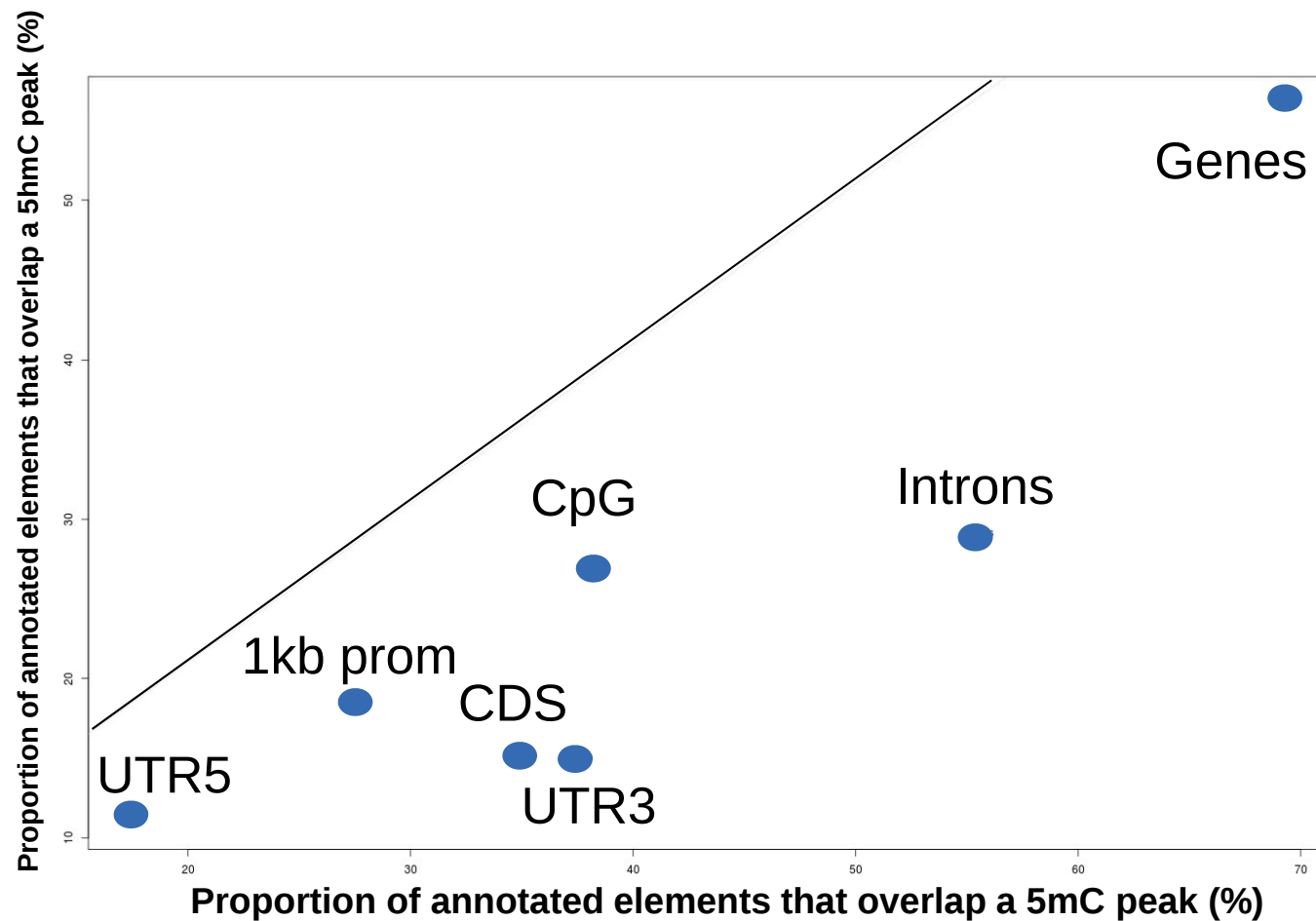


5hmC est enrichie sur les brins enrichis en G

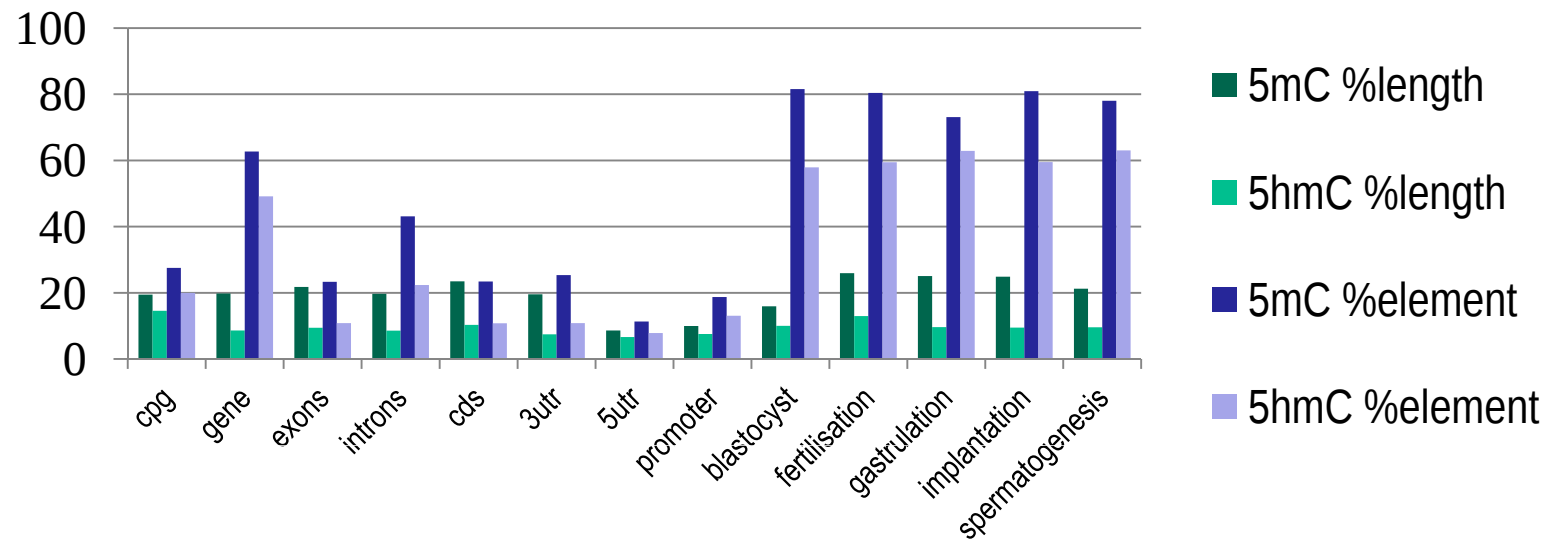


5hmCG deviation
in hESCs
Yu et al. 2012

Proportion of annotated elements in 5hmC vs 5mC



5hmC and 5mC marks are enriched in early development and germ cells related genes



Merci de votre attention!!!

Remerciements:

Equipe Cytogénétique (Annabelle Congras)

LGC: Sylvain Foissac, Florence Vignoles,
Frédérique Pitel et Juliette Riquet

GenESI (Stéphane Ferchaud)

PlaGe: Olivier Bouchez, Emeline Lhuillier, Cécile
Donnadieu