

Identification de « biomarqueurs » de la croissance folliculaire basale chez la brebis

Agnès Bonnet

Julien Sarry, Nathalie Marsaud, Cedric Cabau



7 Octobre 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA



Plan

- Contexte scientifique
- Méthodes mises en œuvre
- Résultats

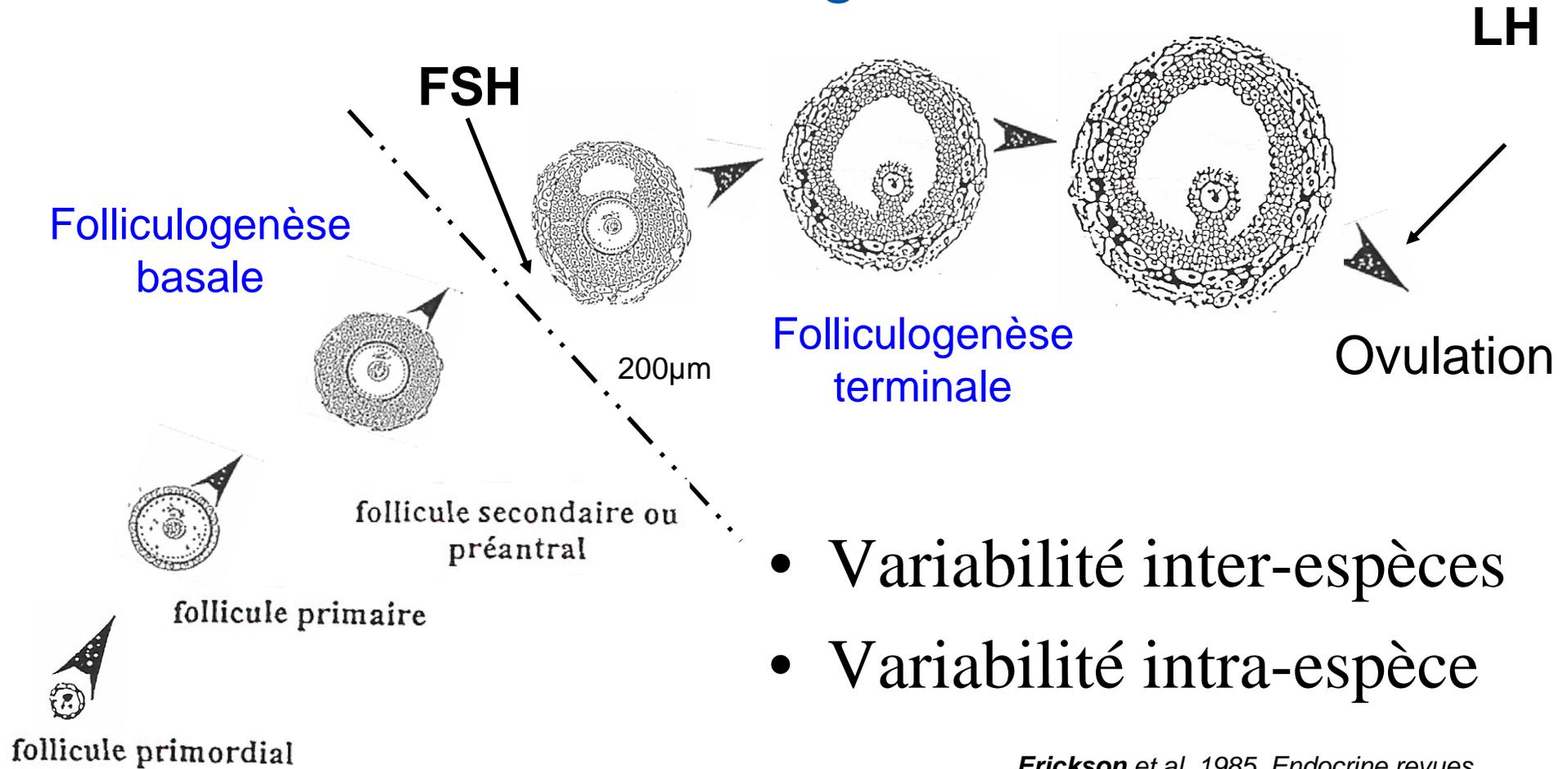
7 Octobre 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA

Contexte scientifique

La folliculogenèse :



- Variabilité inter-espèces
- Variabilité intra-espèce

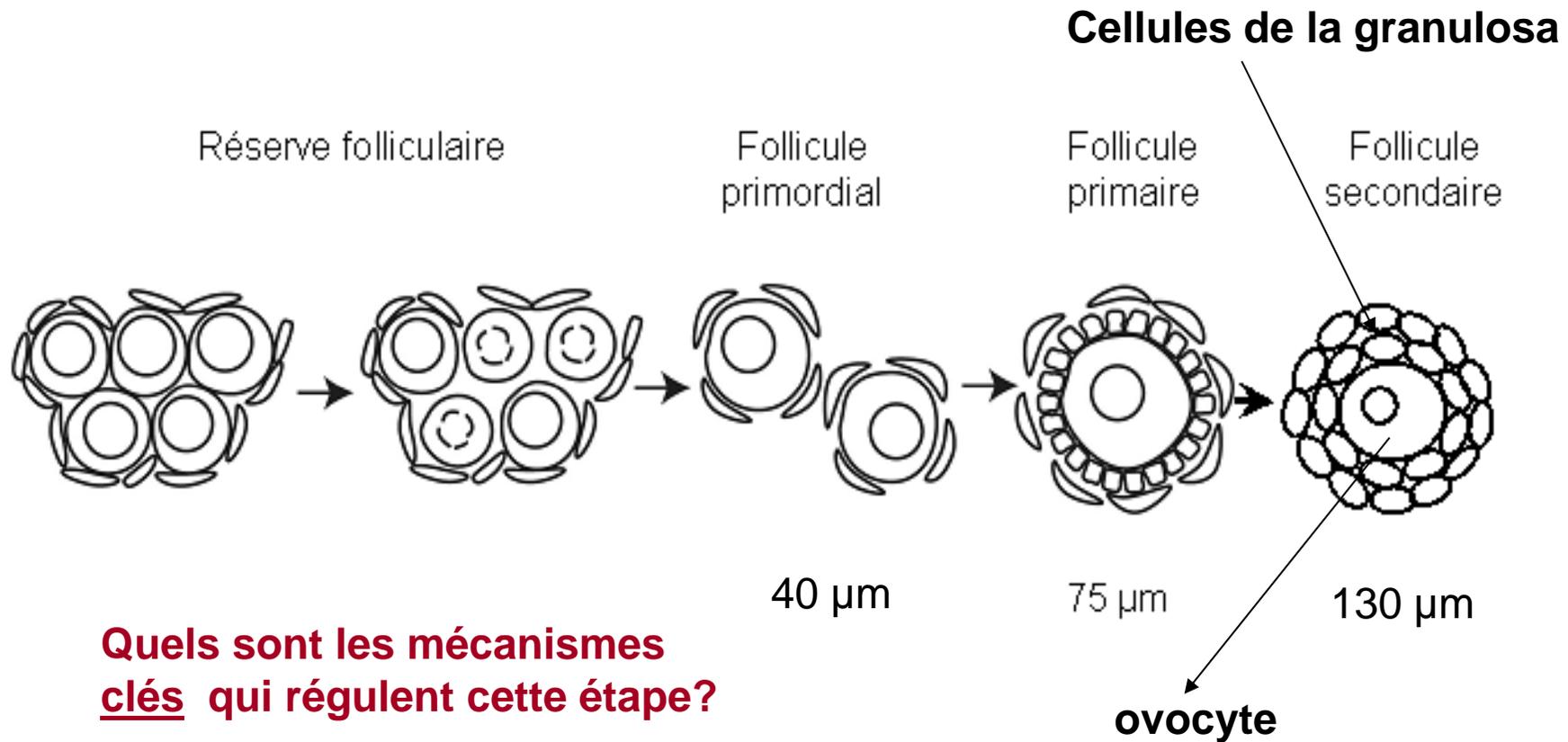
Erickson et al, 1985. Endocrine reviews

7 Octobre 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA

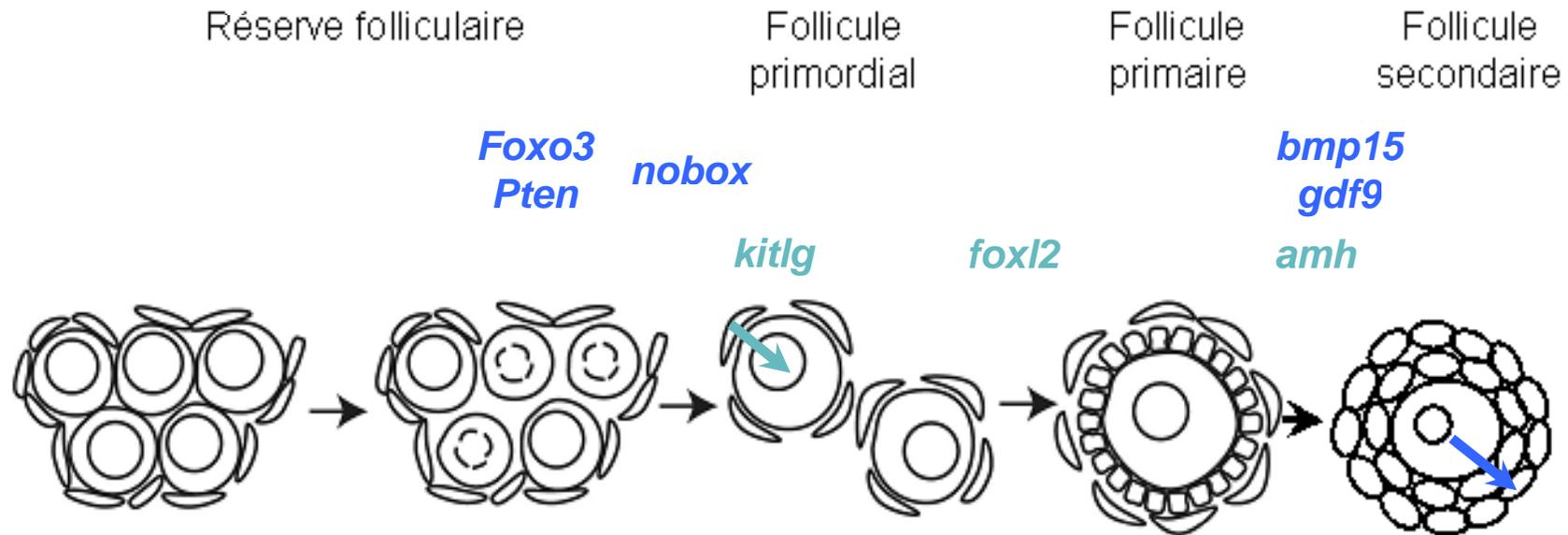
La folliculogenèse basale:



Lundy *et al*, 1998

Des gènes d'expression spécifique

Un dialogue moléculaire entre les compartiments



Gènes à effets majeurs

Thomas, 2006. Reproductive Biology Endocrinology

7 Octobre 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT



Objectifs

- Identification des répertoires d'expression au cours de la folliculogénèse basale chez une espèce mono ovulante : la brebis.
- Identification des transcrits caractéristiques (« biomarqueurs » de compartiments ou de stades)
- Comparaison de l'expression de biomarqueurs entre espèces mono et poly-ovulante (brebis/truie)

7 Octobre 2011

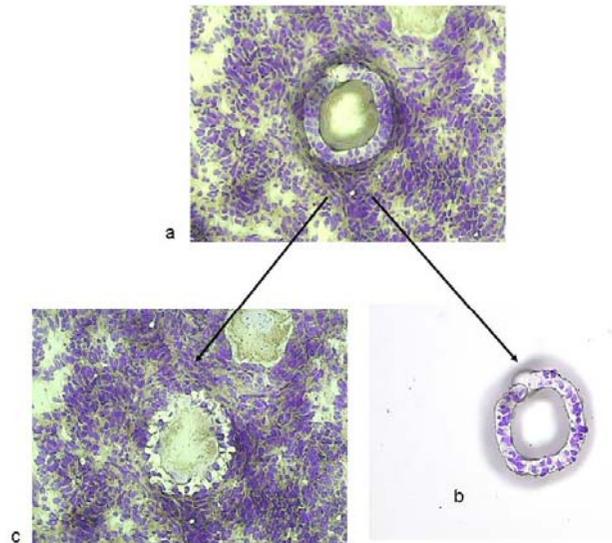
ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA

Méthodes

Un projet exotique:

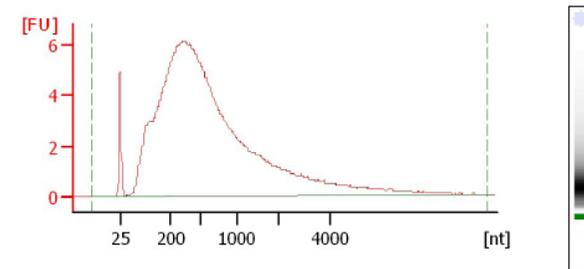
Isolement des différents stades et compartiments



Microdissection à Capture Laser (100x) :

- a) selection des cellules de granulosa
- b) Cellules de granulosa prélevées
- c) Follicule après la capture

Double amplification des ARNs



Mise en évidence de l'expression génique

Vue globale :
RNA-seq

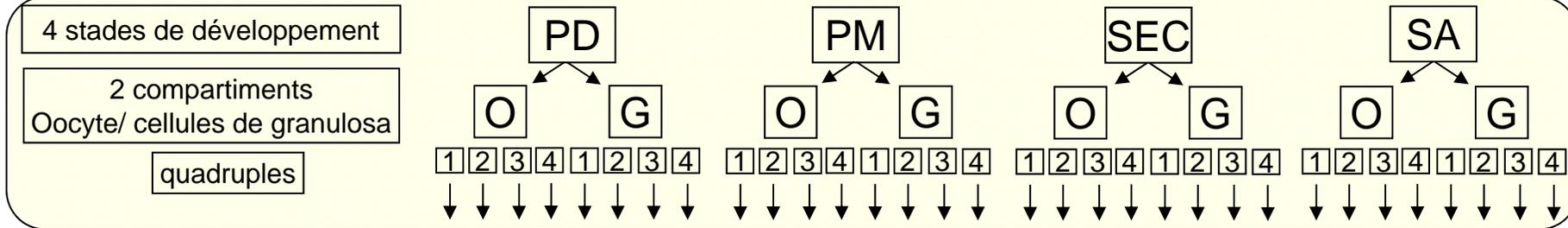
7 Octobre 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA

Résultats:

LCM (Bonnet et al, 2011; BMC genomics)



Séquençage « paired-end » HiSeq 2000

32 banques avec étiquetage des quadruples (200 ng d'ARNa)

3 échantillons en mélange aléatoire/ ligne; 4 runs

Run 1	Run 2				Run 3				Run 4	
ligne1	ligne1	ligne2	ligne3	ligne4	ligne1	ligne2	ligne3	ligne4	ligne1	ligne2
pool 1	pool 2	pool 3	pool 4	pool 5	pool 6	pool 7	pool 8	pool 9	pool 10	pool 11
PDO6 d-9	SECO5 d-9	PMO6 d-9	ANTO1 d-9	PDO3 a-1	ANTO2 b-6	PDO4 b-6	SECO6 b-6	SECO10 c-8	PDO5 c-8	ANTG5 c-8
SECG6 a-1	PDG2 b-6	SECG8 c-8	PMO3 a-1	ANTG2 b-6	PMO5 c-8	ANTG3 d-9	SECG4 d-9	PDG6 d-9	PDG5 a-1	ANTO5 a-1
ANTO3 c-8	ANTG4 a-1	SECO9 a-1	PDG4 c-8	PMG7 d-9	PDG6 d-9	PMG2 c-8	PMG6 a-1	PMO7 b-6	SECG9 b-6	PMG1 b-6

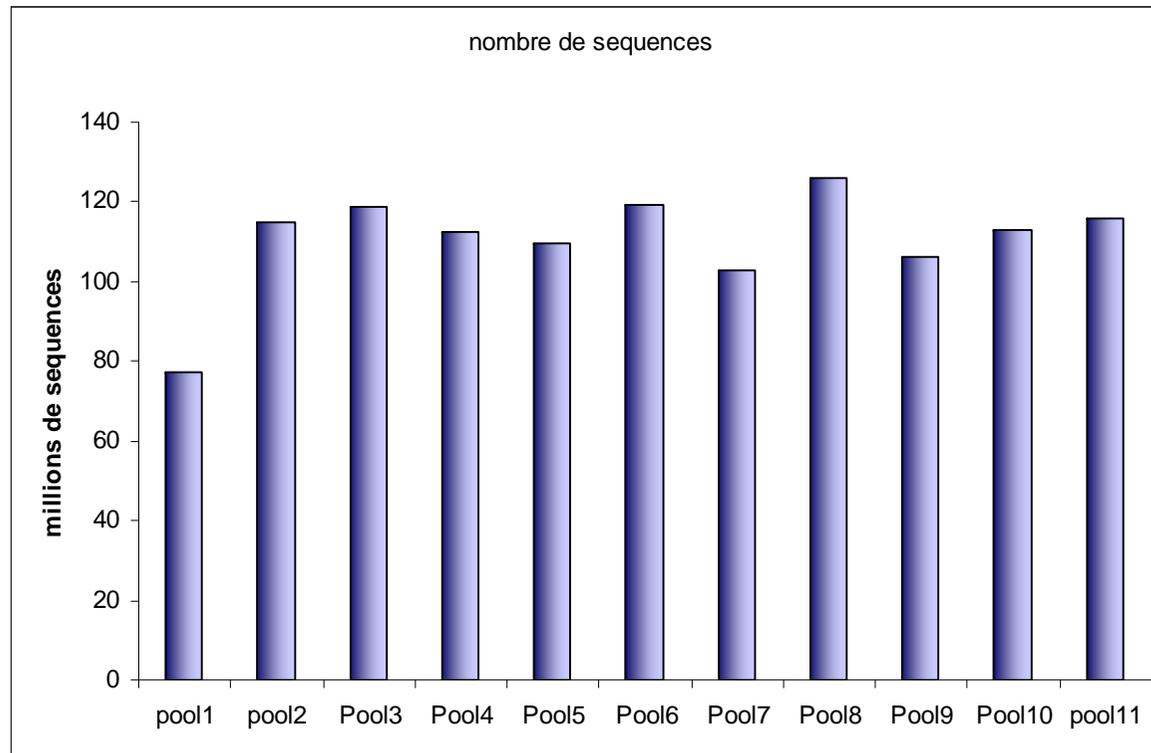
7 Octobre 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT



Séquençage

Bilan



Moyenne:

110M de séquences pairées/ligne

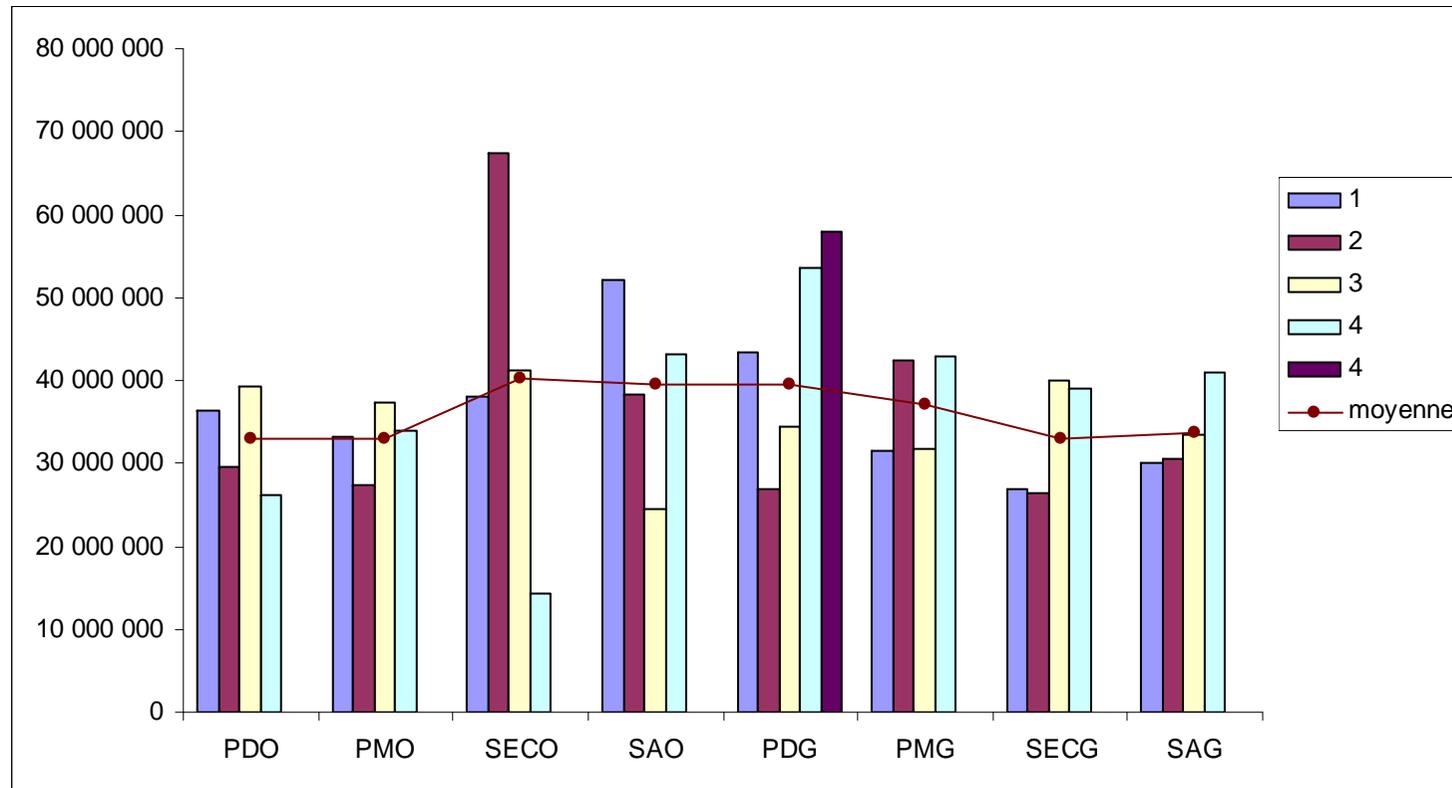
7 Octobre 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA

Séquençage

Nombre de paires de séquences par échantillon



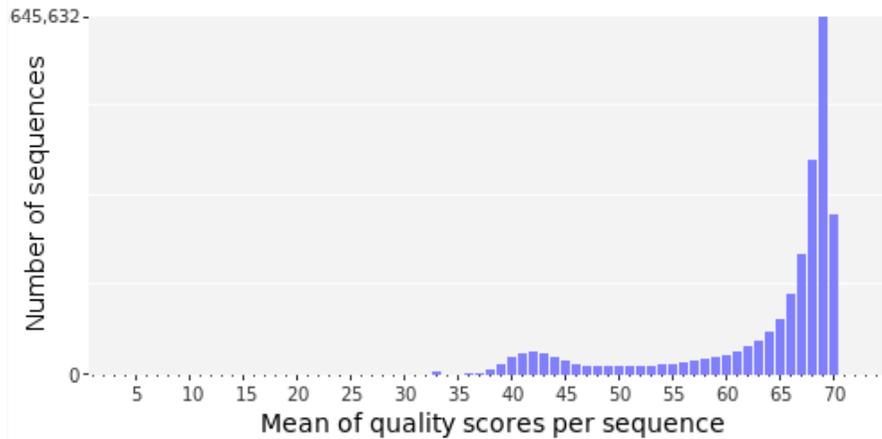
Moyenne: 36M/échantillon

7 Octobre 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT



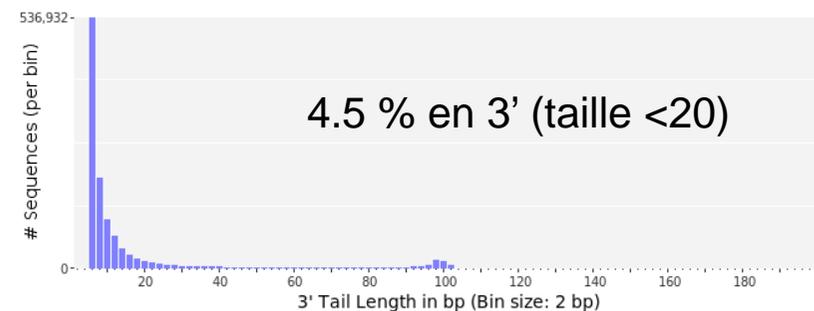
Qualité des séquences



Score >20

30 à 40 % de GC

0.22% de N toujours en début de séquence



Fréquence et taille du polyA/T

7 Octobre 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

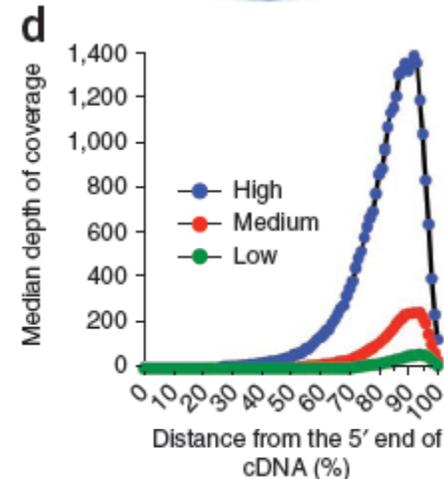
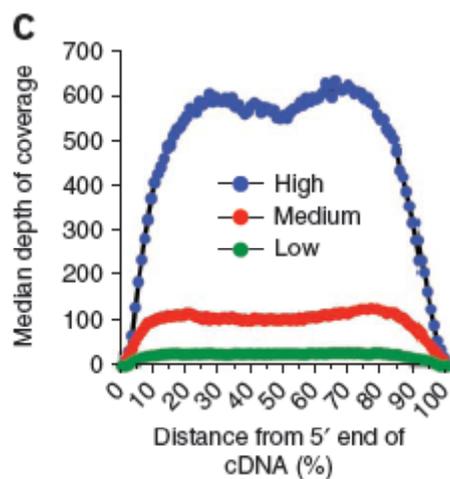
INRA

Traitement bioinformatique

(SIGENAE: Cédric Cabau)

Particularités du jeu de données :

- ARN amplifiés → distribution des lectures en 3' des transcrits
- Espèce ovine



Li *et al*, 2010

Couverture : 1-2 kb en 3'

7 Octobre 2011

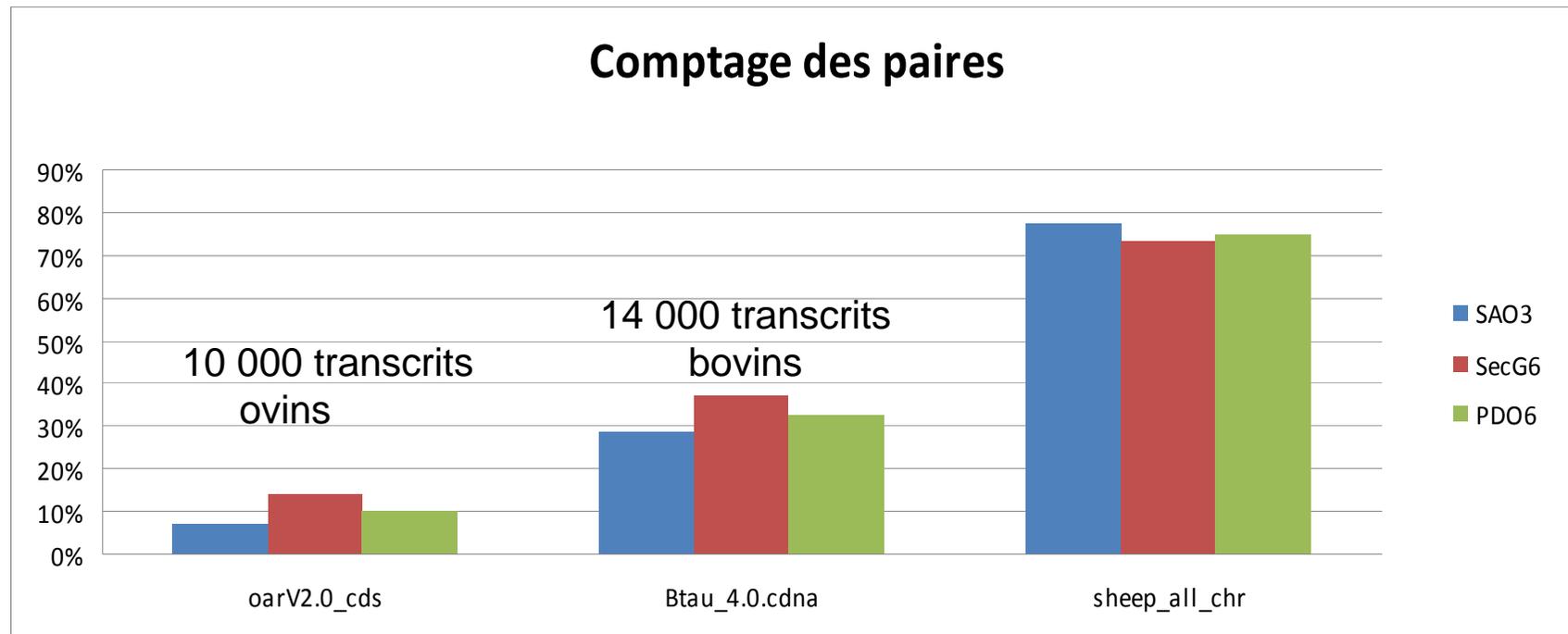
ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT



Résultats préliminaires:

1- Annotation

Choix de la référence - Banques de transcrits ovins et bovins
- Génome de référence ovin

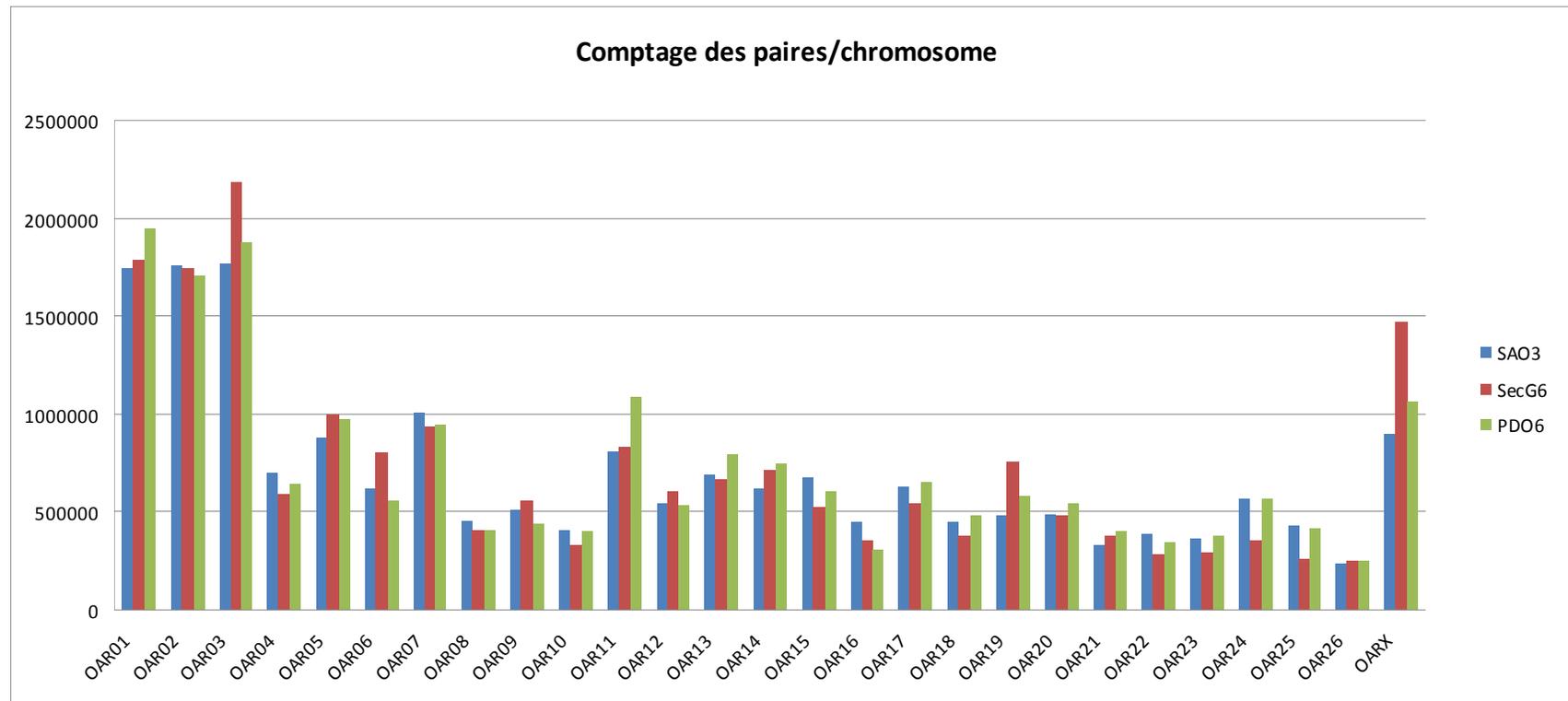


7 Octobre 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT



Distribution des lectures sur le génome



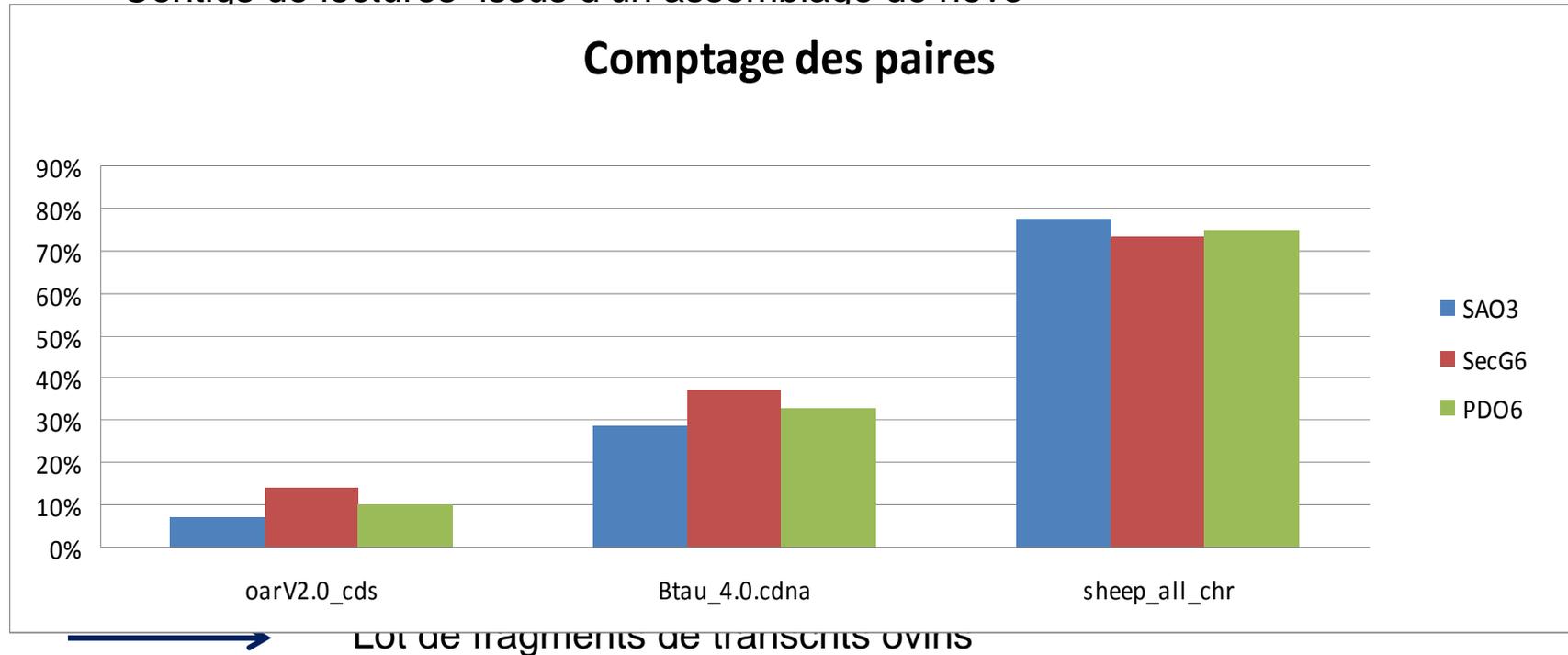
7 Octobre 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT



Annotation ...

- Contigs de lectures issus d'un assemblage de novo



Annotation

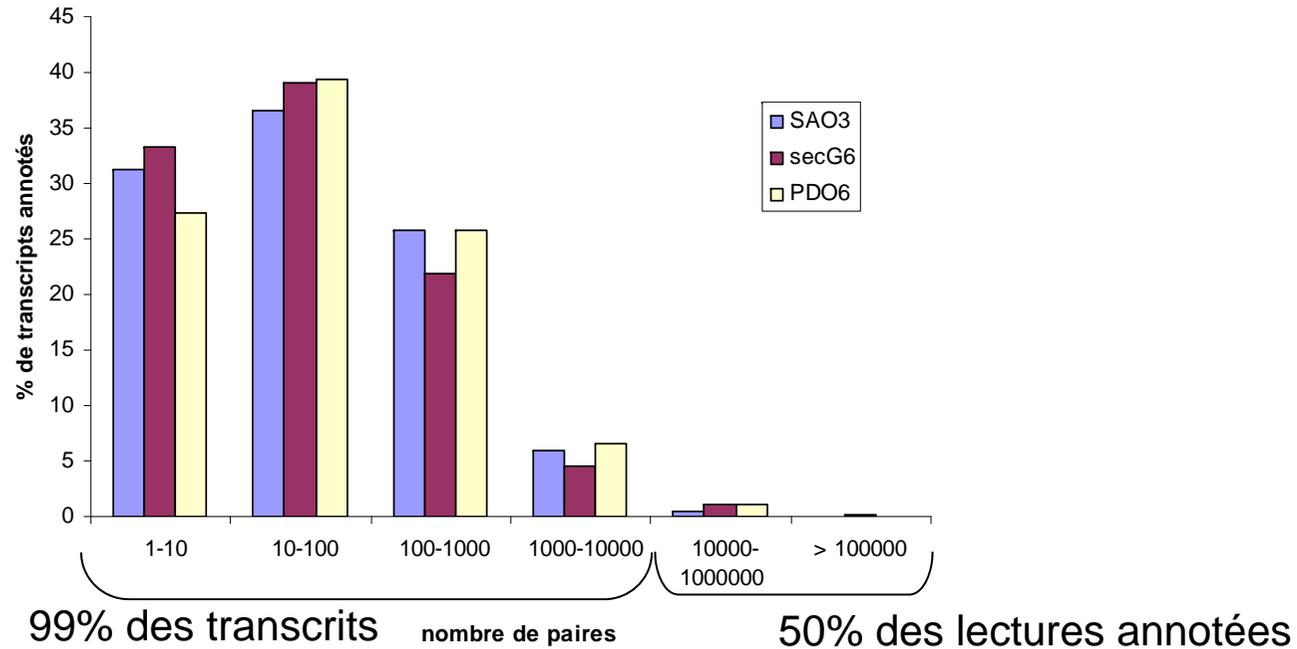
7 Octobre 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT



Résultats préliminaires :

2- Evaluation de l'abondance des transcrits



Transcrits les plus représentés:

Des gènes ribosomiques, facteurs d'élongation, d'initiation, des protéines de liaison...

Dans l'oocyte : famille des ZP

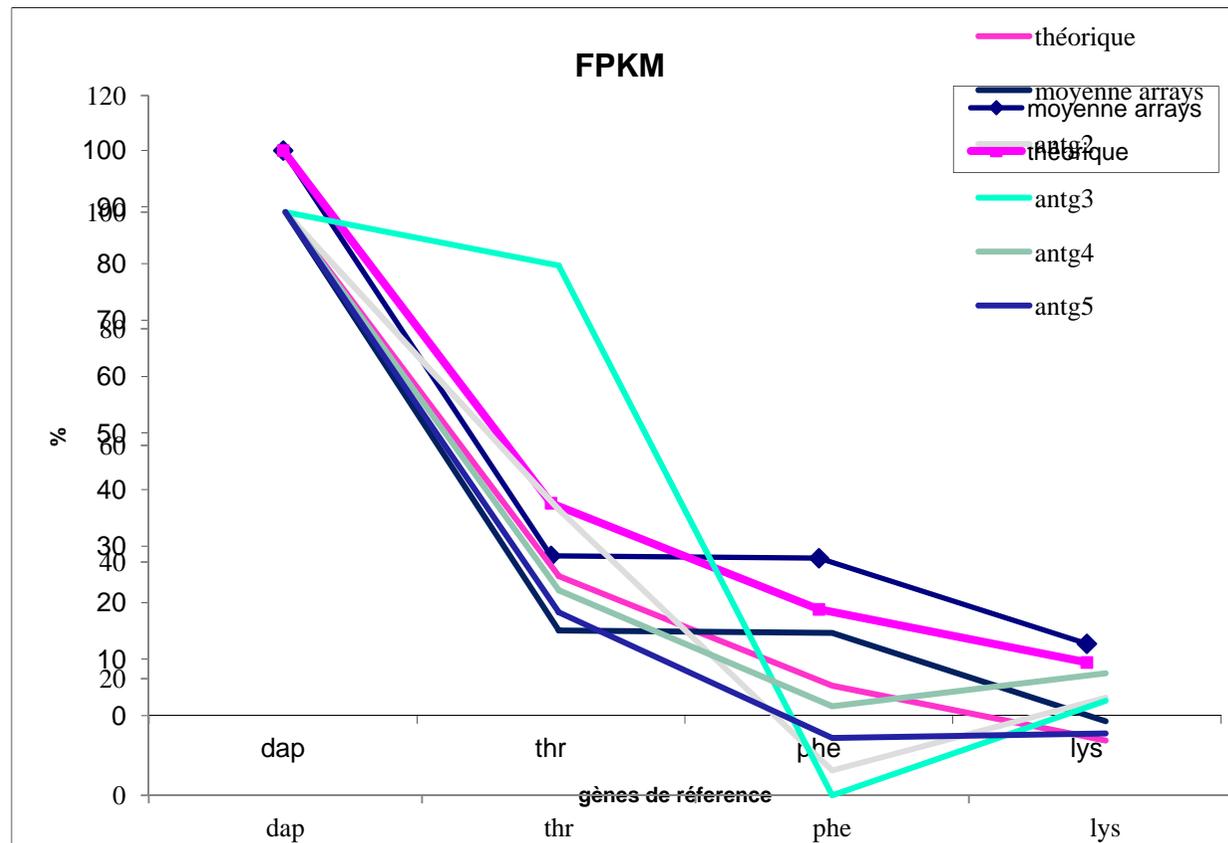
7 Octobre 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT



Résultats préliminaires :

comparaison des niveaux d'expression des transcrits contrôles



7 Octobre 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT



Conclusion

- Les lectures obtenues à partir des ARNa sont de bonnes qualités
- Des niveaux d'expression conservés
- Difficultés: Annotation (biais en 3'; génome de référence peu annoté)

Support technique

Plateforme GeT

Plateforme Imagerie

**Tache 1: Obtention des
échantillons LCM**

Projet REFOLLIS FINANCÉ PAR 

A. Bonnet; F. Benne;

J. Sarry; Florent Woloszyn;

G. Tosser-klopp;

L. Bodin; B. Mandon-Pepin

Remerciements

Financement

ANR/INRA

Tache 2 : Transcriptome

Projet BioFoll 

A. Bonnet; J. Sarry; N. Marsaud

**Tache 3 : Analyses des
données**

SIGENAE (C. Cabau); A. Bonnet; M. San-cristobal;
T. Faraud

7 Octobre 2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA