

Notre objectif:

Comprendre les problèmes de fertilités liés aux anomalies chromosomiques constitutives par une approche moléculaire et cellulaire

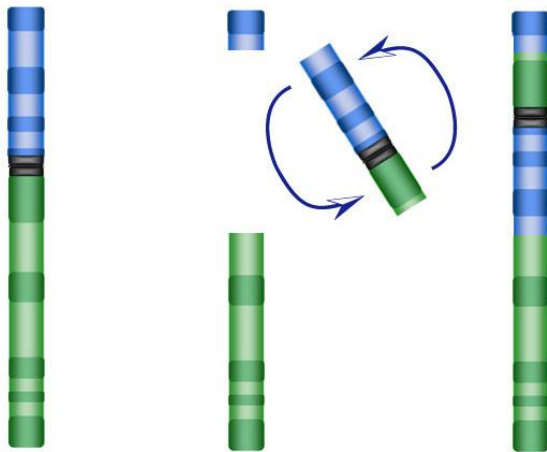


Les anomalies chromosomiques

- Des échanges de matériel génétique dans un même chromosome (inversions, délétions, duplications) ou entre chromosomes (translocations)

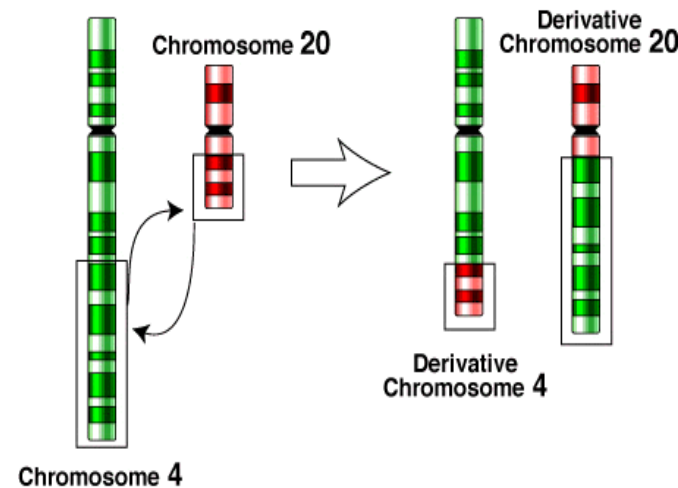
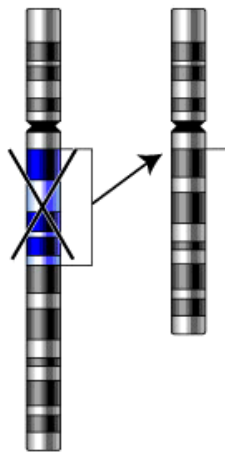
Inversion Péricentrique

1 chromosome impliqué
2 points de cassure



Délétion interstitielle :

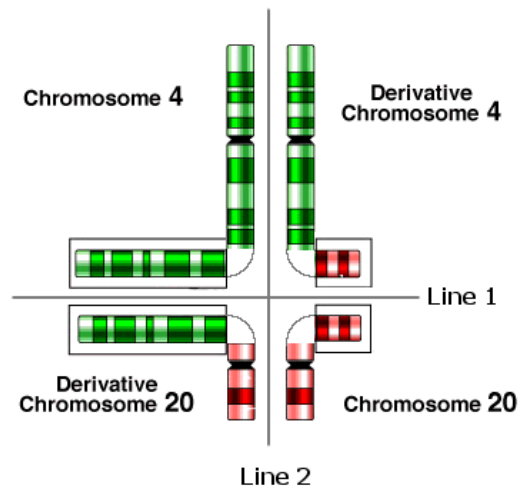
1 chromosome impliqué
2 points de cassure



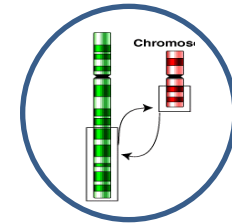
Les anomalies chromosomiques

Impact sur la fertilité

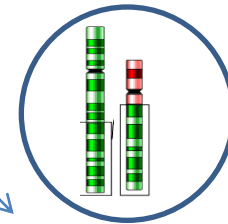
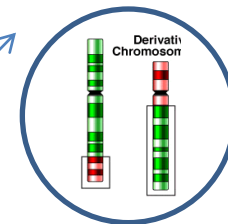
- Au cours de la méiose:
Problèmes d'appariements



Effets génétiques

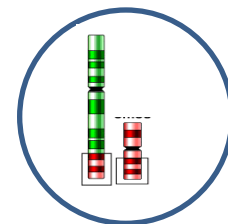


Pas de déséquilibre
génétique



Déséquilibre
génétique: certains
gènes manquent,
d'autres sont
dupliqués

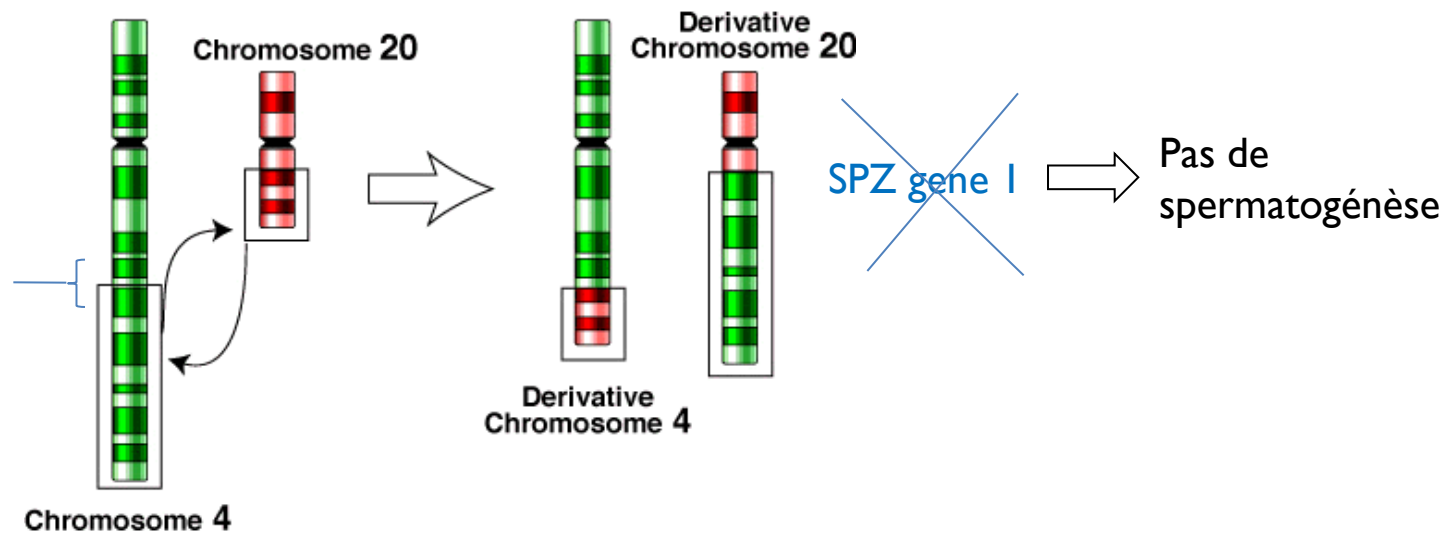
→ mortalité
embryonnaire et
foétale, baisse de
la fertilité



Les anomalies chromosomiques

Impact sur la fertilité

- Destruction des gènes localisés au point de cassure



Génétique directe: effet génétique

Les anomalies chromosomiques

Impact sur la fertilité

- Les effets épigénétiques



Changement de l'environnement chromatinien:

Structure répressive ou permissive:

- γ H2AX
- Méthylation de l'ADN
- Méthylation des histones
- Acétylation des histones...

→ Modifications des profils d'expressions géniques

→ Altération de la spermatogénèse

→ Qualité de semence dégradée

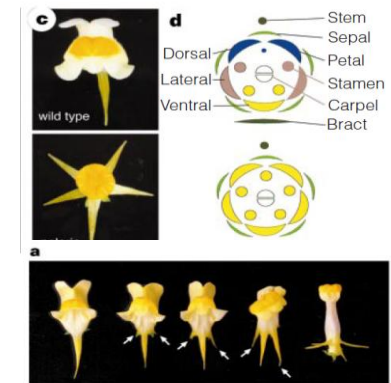
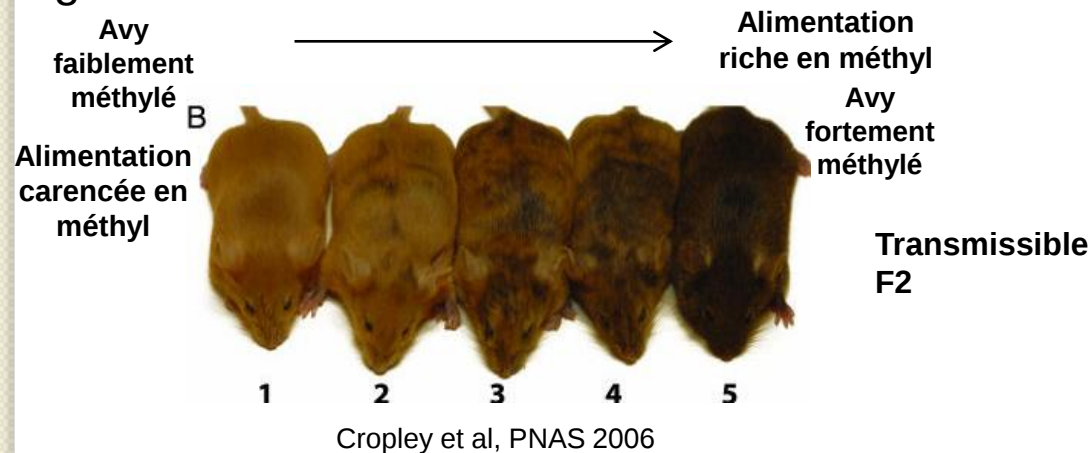
La méthylation de l'ADN

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-methylcytosine (Wyatt, Nature) et dès 1953 pour la 5-hydroxymethylcytosine (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). Il s'agit d'un niveau de régulation supplémentaire de l'expression des gènes, qui peut-être transmis au cours des divisions cellulaires mais aussi entre générations.



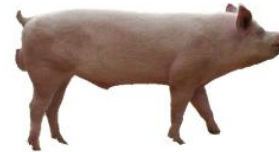
Cubas et al.
Nature 1999

Notre étude

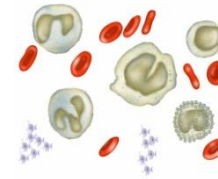
La méthylation de l'ADN spermatique chez des animaux infertiles à qualité de semence dégradée

Verrats infertiles

Caryotypes normaux ou porteurs
d'anomalies chromosomiques

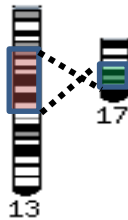


Spermatozoïde



Sang

Approche moléculaire



Identification des
points de cassure
(CGH+NGS)

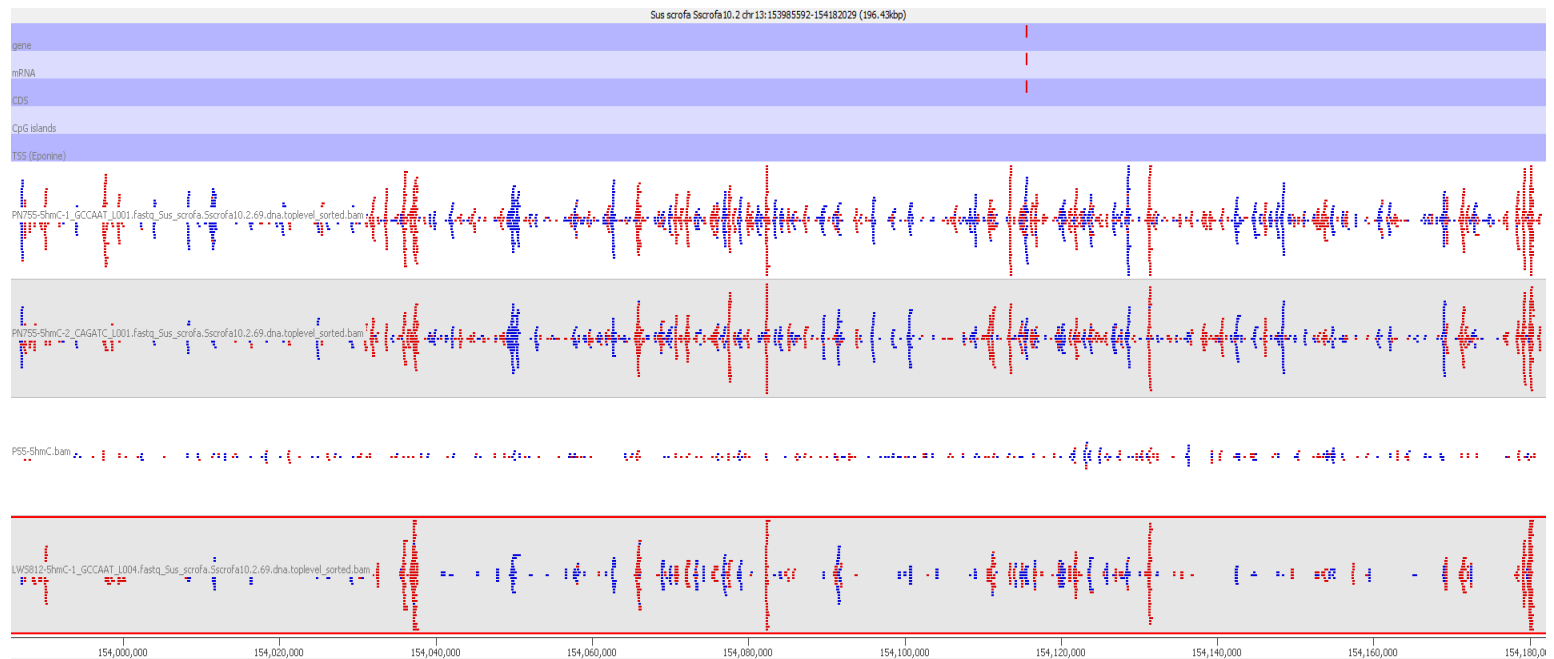


MeDIP+
Analyse local QPCR



Méthylome
(Me-DIP-Seq)

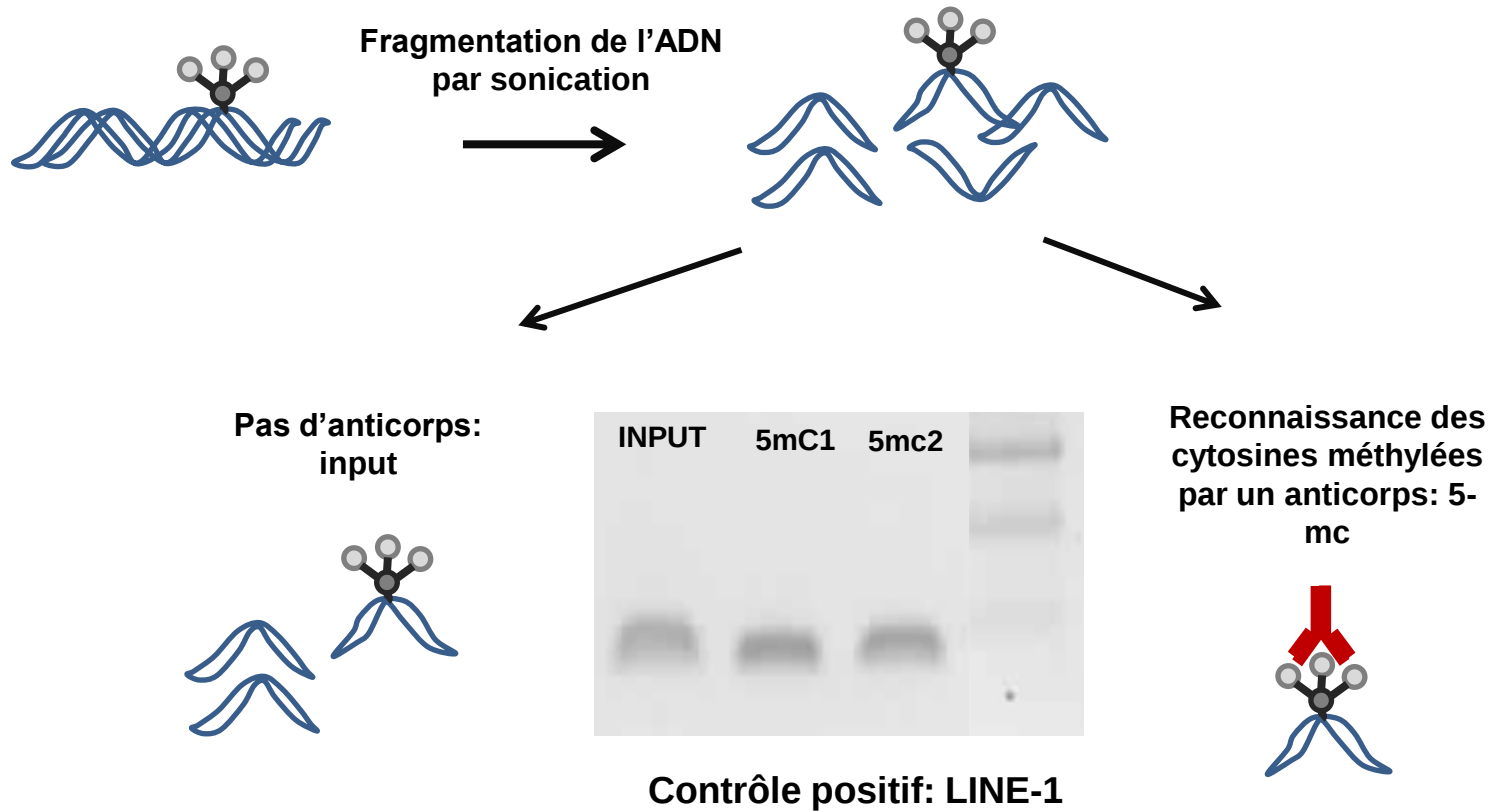
Carte tout-génomique des niveaux de méthylation de l'ADN spermatique chez des animaux normaux et fertiles



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

I^{ere} Approche:

Analyse par immunoprécipitation de l'ADN méthylé et QPCR

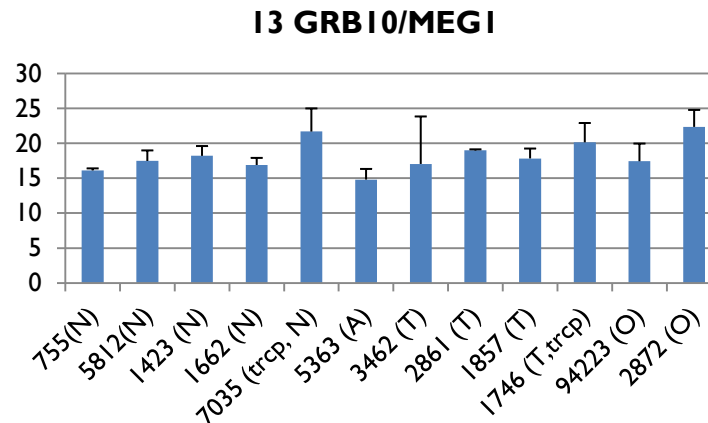


Avec cette approche, nous avons testé 153 couples d'amorces correspondant à 31 gènes soumis à empreintes, 6 gènes du développement embryonnaire précoce et 3 gènes contrôles (40 gènes au total).

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).

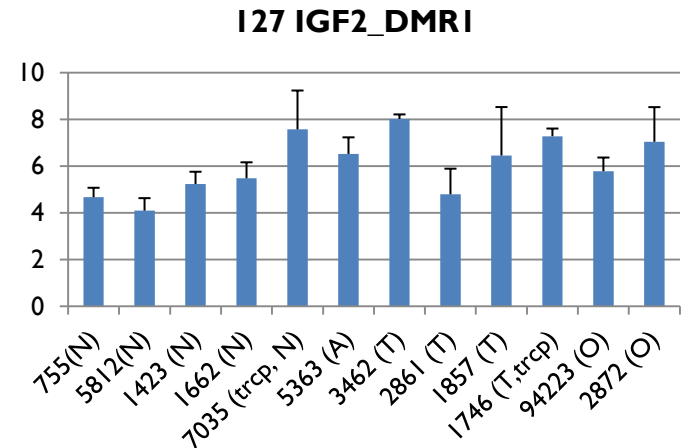
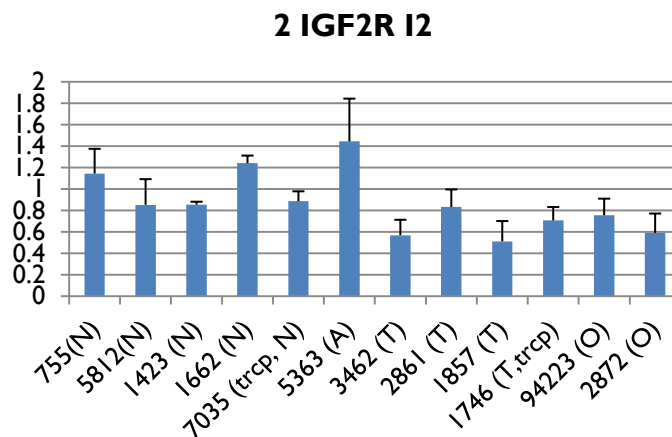
Le MeDIP est normalisé sur LINE1

12 animaux (dont 4 contrôles fertiles) ont ainsi été analysés



La majorité des loci ne présente pas de différence entre animaux

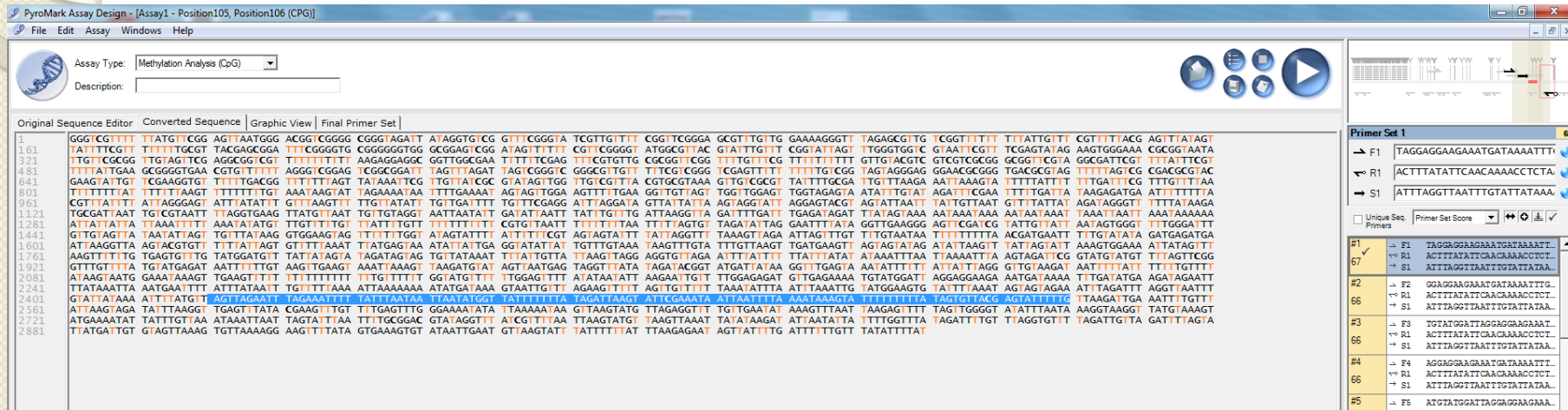
Analyse locale des niveaux de méthylation de l'ADN spermatique chez des animaux normaux et fertiles



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

Notre expérience du Pyromark

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



PyroMark Assay Design - [Assay1 - Position105, Position106 (CPG)]

File Edit Assay Windows Help

Assay Type: Methylation Analysis (CpG)

Description:

Original Sequence Editor | Converted Sequence | Graphic View | Final Primer Set

1 GGGCGTTT TATGTCGG AGTAAATGGG ACGGCGGG CCGGAGATT ATAGGTGCG GTTCGGGTA TCGTGTGTT CCGTTCGGGA GCGTTGTG GAAAAGGGT TAGAGCGTG TCGGTTTT TATTGTTT CGTTCACG AGTATATAGT
161 TATTTTCGTT TTTTTCGCT TACGAACGGA TTTTCGGGTG CCGGGGGTGG GCGGGAGTCG ATAGTTTTCG GTTCGGGTG ATGGCGTTAC GATTTGTTT CCGGATTAGT TTGGGTGGTC GATATTCGT TCGAGTATAG AAGTGGGAAA CCGGTAATA
321 TTGTTCGCGG TTGTAGTCG AGGCGGCG TTTTTCGTTT AAGAGGAGGC GGTTCGCGAA TTTTCGAG TTTTCGTTG CCGGTTCCG TTTTTCGTTT GTTGACGTC GTGTCGCGG CCGGTCGTA GGCATTCTG TTTATTTCTG
481 TTTTATTGAA CGGGGGTGAA CCGTCTTTT AGGGCGGAG TCGCGGAT TAGTTAGAT TAGTCGGG TTTTCGCGG TCGAGTTT TTTTTCGCG TAGTAGGAG GGAACGCGG TCGCGGTAG TTTTAGCG CGACGCGTAC
641 GAAGTATGT TCGAAGGTG TTTTTCACGG TTTTTCAGT TAATAATCG TTGTTATCG GATATGCG GTTCGTTA CCGTCCGTA GGTTCGCGT TTTTTCGCGA AATTAAGTA TTTTATTGTT TTTGATTG TTTGTTTAA
801 TTTTTCGTTT TTTTTCAGT TTTTTCGTTT AAATAAGTAT TAGAAAATAA TTTTGAAAAT AGTAGTTGGA AGTTTGTAA GGTTCGTTT TTTTTCGCGA AATTAAGTA TTTTTCGCGA TTTTTCGCGA TTTTTCGCGA
961 CGTTCATTTT ATTAGGGAGT ATTATATTT GTTTAAGTT TTGTTATATT TGTTGATTT TTTTTCGAGG ATTTAGGATA GTTATATTA AGTAGGTTT TTTTTCGCGA TTTTTCGCGA TTTTTCGCGA
1121 TCGGATTAAT TGTGTAATTT TTAGGTGAG TTTTTCGTTT AATTAATATT GATATTAATT TATTTGTTT ATTAAGGTTA GATTTGTTT TTAGGATAGT TTTATAGTAAA AATATAATAA TAAATTAATT AATATAAAAA
1281 ATTATATTA TAAATTTT AATATATG TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT
1441 GTTGATGTA TAAATTTT GTTTTAAAG GTGGAAGTAG TTTTTCGTTT ATAGTATTTT ATTTTTCGTTT AGTAGTATTT TATTAGGTTT TAAAGTAGA ATTAGTTGTT TTTGTAATAA ACGATGAATT TTTGATATA GATGAGATGA
1601 ATTAAAGTTA AGTAGGTTT TTTTTCGTTT GTTTTAAAT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT
1761 AAGTTTTCGTTT TTAGGTGAG TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT
1921 GTTTGTTT TGTATGAGAT AATTTCGTTT AAGTTGAAGT AATTAAGT TAAAGTATAGT AGTTAAGT TAAAGTATAGT TAAAGTATAGT TAAAGTATAGT TAAAGTATAGT TAAAGTATAGT TAAAGTATAGT TAAAGTATAGT
2081 ATAAGTAAGT GAAATTAAGT TGAAGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT
2241 TTTATAATTA AATGAATTTT ATTTATAAT TGTTCGTTT AATTAAGT TAAAGTATAGT TAAAGTATAGT TAAAGTATAGT TAAAGTATAGT TAAAGTATAGT TAAAGTATAGT TAAAGTATAGT TAAAGTATAGT TAAAGTATAGT
2401 GATATATAAA ATTTATGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT
2561 ATTAGTAGA TATTAAGTT TGAAGTTATA TGAAGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT
2721 ATGAAATAT TATTTGTTA AATAATTAAT TAGTATTTA TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT TTTTTCGTTT
2881 TATGATGTT GTAGTTAAAG TGTAAAGG AAGTTTATA GTGAAAGTTT ATAATTGAAT GTTAAGTAT TATTTTCGTTT TTAAGAGAAAT AGTTATTTG ATTTTTCGTTT TATATTTTAT

Primer Set 1

→ F1 TAGGAGGAAGAAATGATAAAATTT
→ R1 ACTTTATATTCACCAACCTCTA
→ S1 ATTTAGGTTAATTTGATTATAAA

Unique Seq Primer Primer Set Score

67 → F1 TAGGAGGAAGAAATGATAAAATTT
→ R1 ACTTTATATTCACCAACCTCTA
→ S1 ATTTAGGTTAATTTGATTATAAA

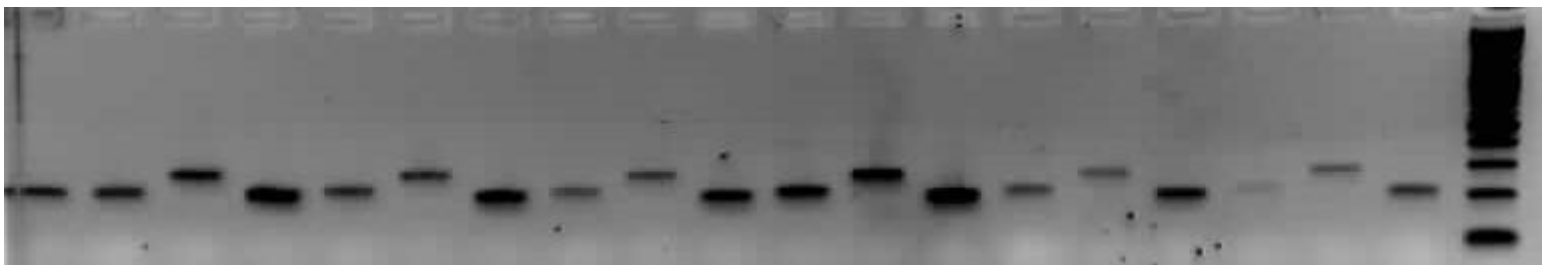
68 → F2 GAGGAGGAAGAAATGATAAAATTT
→ R1 ACTTTATATTCACCAACCTCTA
→ S1 ATTTAGGTTAATTTGATTATAAA

69 → F3 TGTATGATTCAGGAGGAAGAAAT
→ R1 ACTTTATATTCACCAACCTCTA
→ S1 ATTTAGGTTAATTTGATTATAAA

70 → F4 GAGGAGGAAGAAATGATAAAATTT
→ R1 ACTTTATATTCACCAACCTCTA
→ S1 ATTTAGGTTAATTTGATTATAAA

71 → F5 ATGTATGATTCAGGAGGAAGAAAT
→ R1 ACTTTATATTCACCAACCTCTA
→ S1 ATTTAGGTTAATTTGATTATAAA

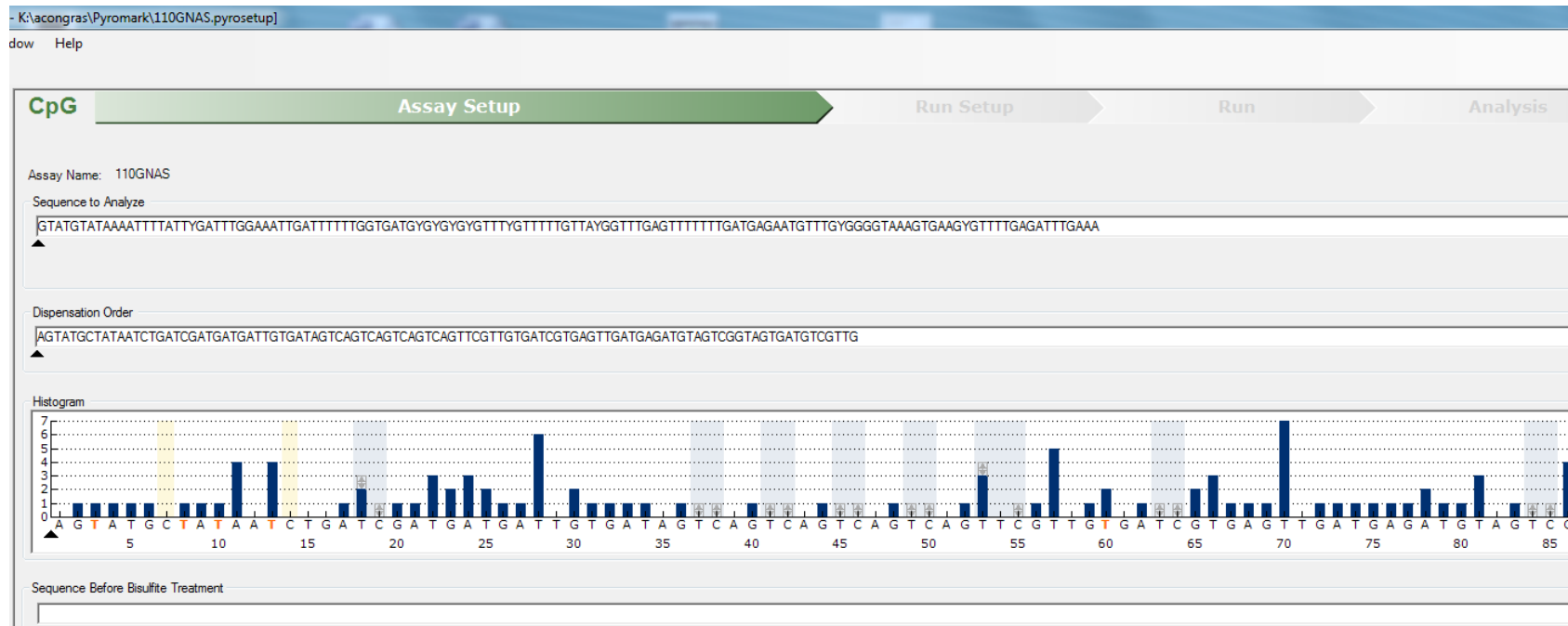
100 % des amorces dessinées avec ce software ont fonctionné



Notre expérience du Pyromark

Préparation du run de pyroséquençage avec le software PyroMark Q24

Préparer un « Assay »



Notre expérience du Pyromark

Préparation du run de pyroséquençage avec le software PyroMark Q24

Préparer un « Run »

Assay Setup **Run Setup** Run Analysis Report

Run Name: 130308 133
Instrument Method: PyroMark Q24 Method 005
Plate ID:
Barcode:
Reagent ID:
Estimated Run Time: 2 h 19 min
Run Note:

Well Information

Enter Assay, Sample ID and Notes for wells in plate setup

Plate Setup

1

Assay

A Sample ID (optional)

Note (optional)

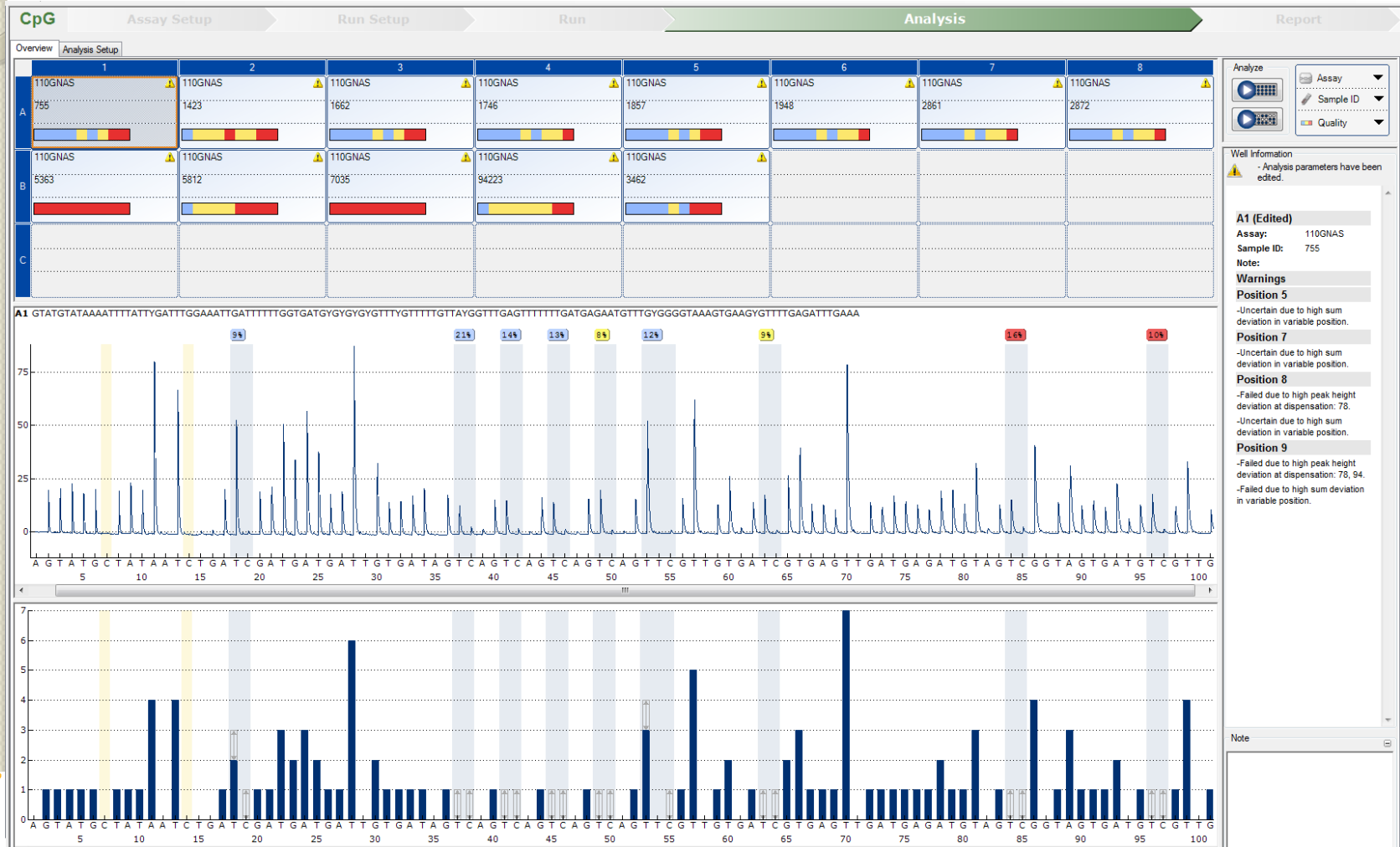
Sample ID and Note will follow through Analysis and Reports.

Plate Setup

	1	2	3	4	5	6	7	8
133 H19	133 H19	133 H19	133 H19	133 H19	133 H19	133 H19	133 H19	133 H19
755	1423	1662	1746	1857	1948	2861	2872	
133 H19	133 H19	133 H19	133 H19	133 H19 ICR	133 H19 ICR	133 H19 ICR	133 H19 ICR	133 H19 ICR
5363	5812	7035	84223	755	1423	1662	1746	
133 H19 ICR	133 H19 ICR	133 H19 ICR	133 H19 ICR	133 H19 ICR	133 H19 ICR	133 H19 ICR	133 H19 ICR	133 H19 ICR
1857	1948	2861	2872	5363	5812	7035	84223	

Préparation du run de pyroséquençage avec le software PyroMark Q24

Analyser un « Run »



Notre expérience du Pyromark

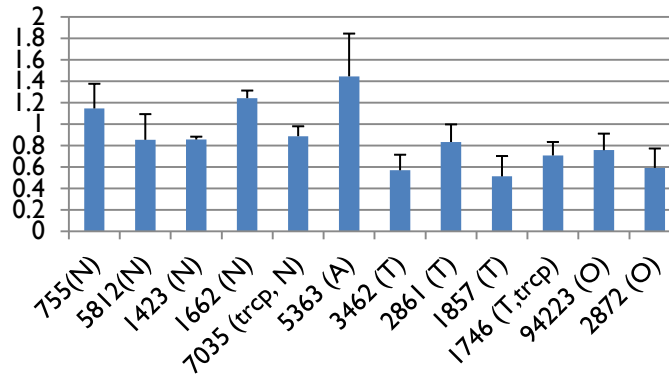
Les points critiques pour de beaux résultats:

- Avoir une bonne conversion de l'ADN (kit Epitect Fast Qiagen nous a donné de bons résultats vs Millipore)
- Avoir une bonne amplification PCR (meilleurs résultats avec le kit Pyromark PCR kit vs Platinum)
- Rester concentrer lors de la préparation du run!!!
- Ne pas analyser des séquences trop longues (>150pb)

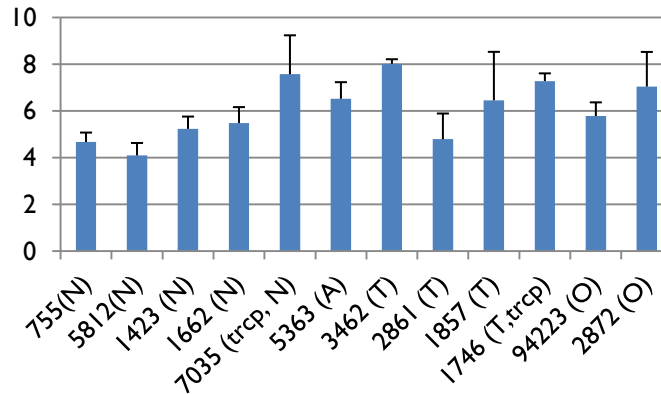
Avec des résultats intéressants

MEDIP+ QPCR

Region 2

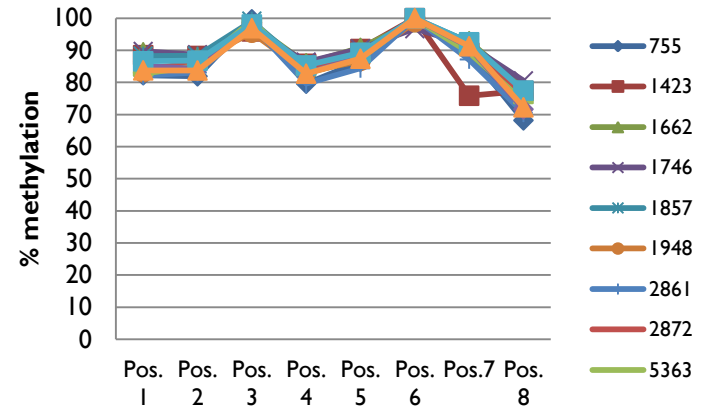


Region 127

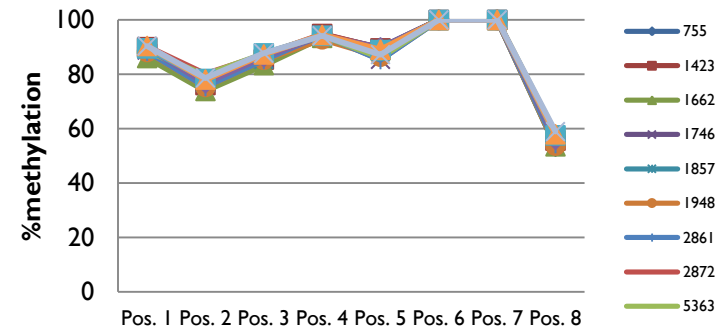


BS + Pyrosequençage

Region 2



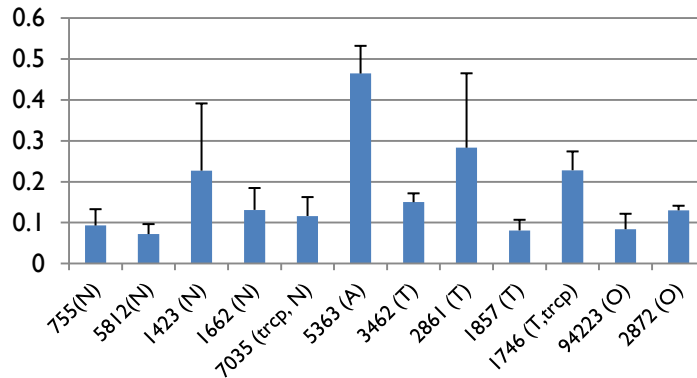
Region 127



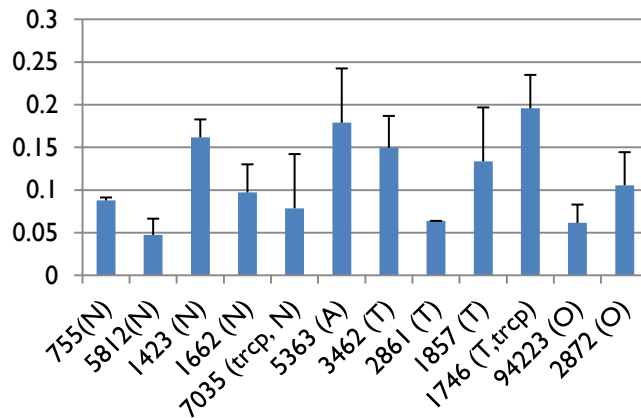
Avec des résultats intéressants

MEDIP+ QPCR

Region 51

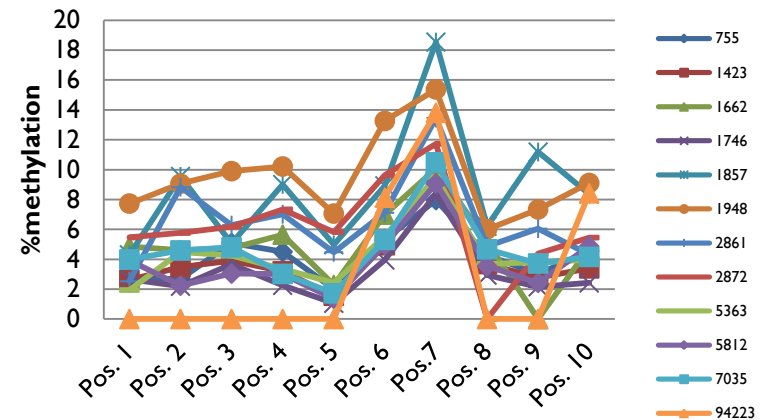


Region 56

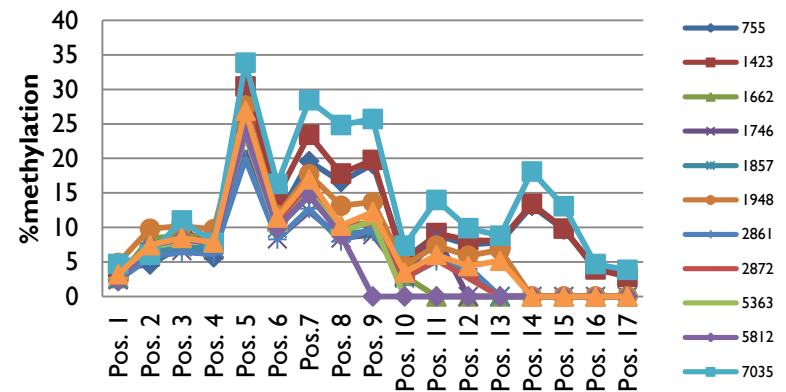


BS + Pyrosequençage

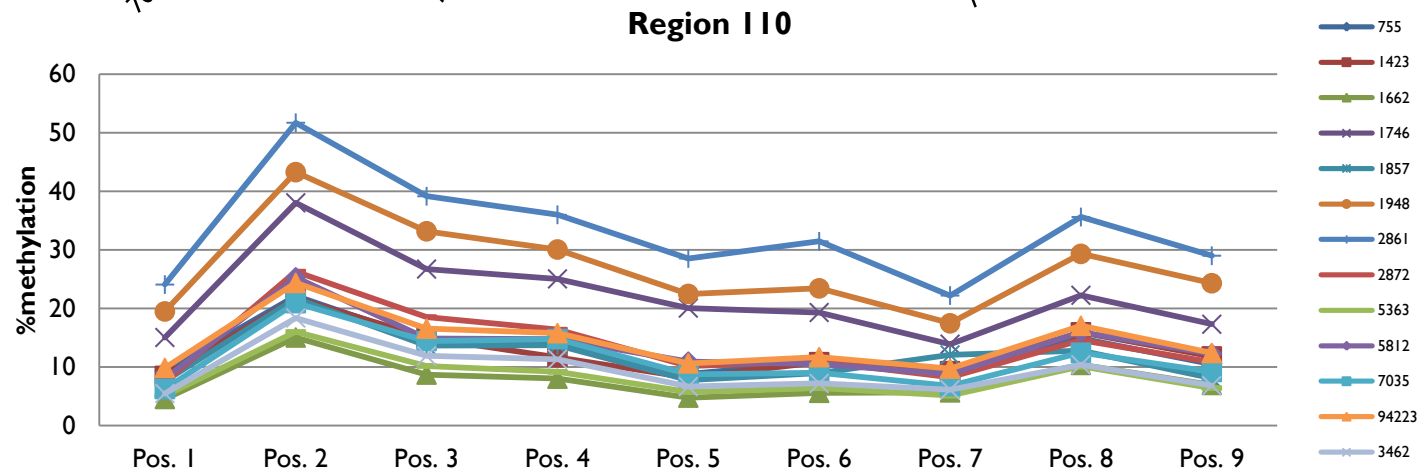
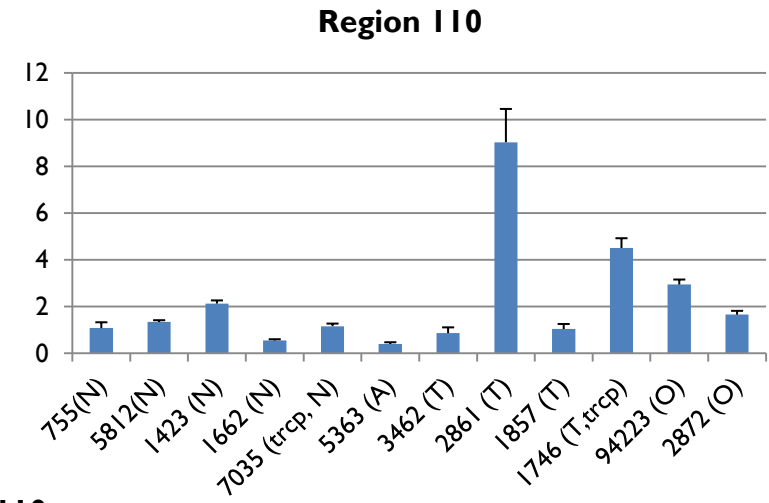
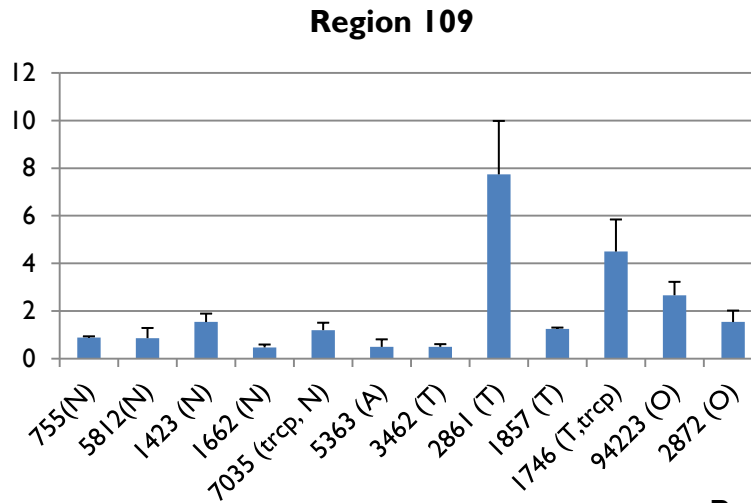
Region 51



Region 56



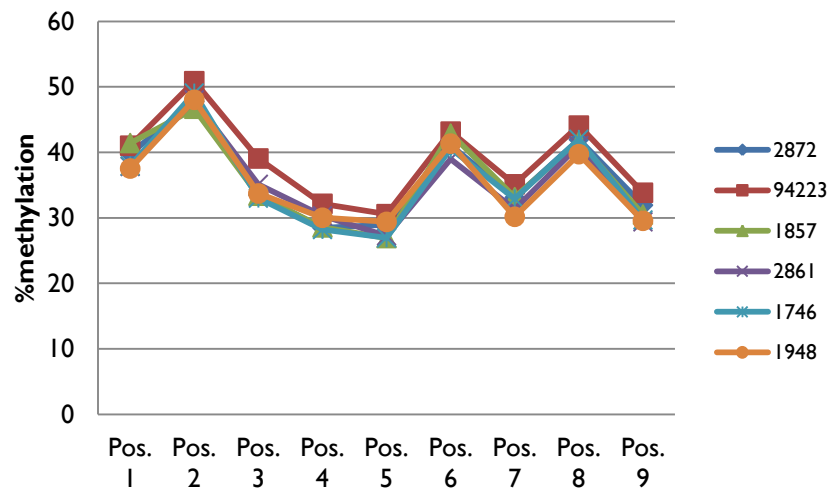
Avec des résultats intéressants



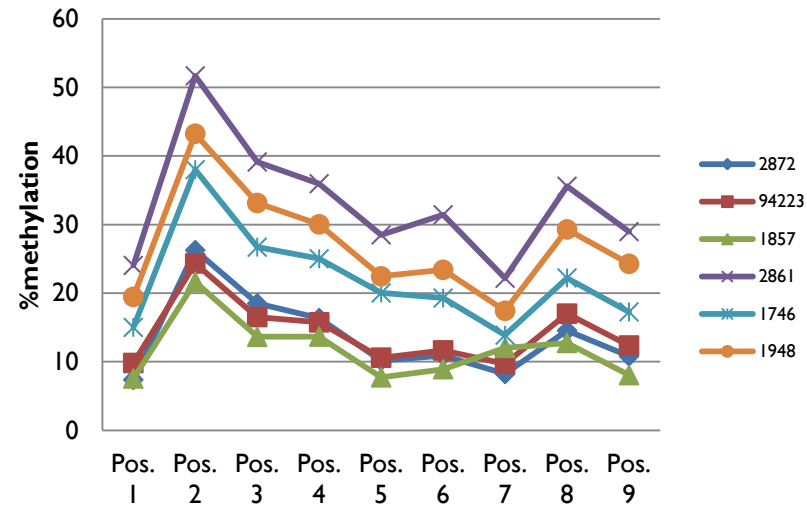
One imprinted locus is reproducibly hypermethylated in 3 OAT animals (from which two are carriers of chromosomal abnormalities)

Avec des résultats intéressants

Region I10 Blood DNA



Region I10 sperm



D'autres groupes intéressés

- Anne Collin et Vincent Coustham a Tours
Projet sur l'adaptation a la chaleur chez les
poulets

Vincent Castric (Lille): autoincompatibilité
pour la germination du pollen chez
arabidopsis thaliana

Conclusions

- Des analyses rapides, pour un cout modéré (environ 8-9€ le point), idéal pour du moyen-débit (analyse locale ou validation données haut-débit)
- Une technologie en progrès pour des produits de séquence plus long
- Des données très fiables, qualitatives et quantitatives



Merci de votre attention!!!

Remerciements:

Equipe Cytogénétique UMR444

Florence Vignoles, Frédérique Pitel

GEPA et UEICP Rouillé

CIAs et BIOPORC

QIAGEN