

4 - Recherche de gènes associés à des fonctions

G. TOSSER-KLOPP, C. CLOUSCARD-MARTINATO, F. BENNE, A. BONNET, C. CABAU, J. RALLIERES, F. HATEY

INRA, Laboratoire de Génétique Cellulaire, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan cedex

e-mail : Gwenola.Tosser@toulouse.inra.fr

Exemple d'approche fonctionnelle : la fonction ovarienne dans l'espèce porcine

Résumé. La recherche de gènes ovariens hormono-régulés a été entreprise par l'hybridation différentielle de 40 000 clones d'ADNc d'une génothèque de cellules de granulosa porcine en culture et par des expériences de Differential Display. Environ 150 clones exprimés différemment, selon qu'il s'agit de cellules traitées par la FSH ou de cellules témoins, ont été séquencés et 59 d'entre eux ont été identifiés. La régulation de ces gènes a été étudiée *in vitro* et *in vivo* par des techniques de Northern blot, RT-PCR comparative et hybridation sur coupes d'ovaires. Environ cinquante gènes ont été localisés sur le génome porcine. Ces données fonctionnelles et génétiques permettent de considérer certains de ces gènes comme des candidats intéressants pour la fonction de reproduction.

La prolificité de la truie a deux composantes essentielles : le taux d'ovulation, aboutissement du développement du follicule ovarien, lui-même contrebalancé par le processus d'atrésie qui concerne 99 % des follicules, et la mortalité embryonnaire. Le développement du follicule ovarien est une organogenèse programmée génétiquement, fortement influencée par l'environnement physiologique de l'ovaire : il est contrôlé par les hormones gonadotropes hypophysaires (FSH et LH) agissant selon un mode endocrine, mais aussi par des facteurs stéroïdiens et peptidiques agissant selon un mode paracrine ou autocrine .

Le but de cette étude est d'identifier des gènes impliqués dans la folliculogenèse ovarienne chez la truie et de préciser, d'une part, les lieux, moments et modalités de leur expression dans le follicule, d'autre part, leur localisation chromosomique et leur éventuel polymorphisme. Ces dernières informations permettent de définir des gènes candidats, c'est-à-dire potentiellement responsables de la variabilité de la prolificité, en liaison avec des QTL (Quantitative Trait Loci) identifiés par ailleurs.

Un modèle d'étude constitué par des cultures primaires de cellules de la granulosa (population de cellules les plus internes du follicule ovarien et jouant un rôle dans la fabrication et la réception de signaux) a été mis au point au laboratoire. Nous l'avons utilisé pour rechercher des gènes dont l'expression est stimulée ou réprimée par l'hormone folliculo-stimulante (FSH), en ayant recours soit au tri différentiel d'une banque d'ADN complémentaire construite à partir de cellules de granulosa porcine, soit à des expériences de Differential Display sur des follicules ovariens calibrés.

1 / Méthodologies

La méthode de tri différentiel d'une banque d'ADNc consiste à hybrider avec deux sondes complexes différentes marquées radioactivement (ici : ADNc issu de cellules traitées par la FSH et ADNc issu de cellules témoins) deux répliques identiques d'un filtre où sont déposés des clones de la génothèque d'ADNc. Une différence d'intensité observée entre les deux signaux d'hybridation pour un même clone d'ADNc reflète une expression différente de l'ARN messager correspondant selon la situation étudiée (ici, traitement par la FSH ou témoin).

La méthode de Differential Display est présentée dans l'article de Hatey (2000, cet ouvrage).

Les méthodes de Northern blot et RT-PCR comparative ont été utilisées afin de vérifier que les clones sélectionnés étaient effectivement régulés par la FSH.

Le Northern blot consiste à hybrider les ARNm (issus de cellules traitées par la FSH ou témoins), préalablement séparés selon leur taille par une électrophorèse, avec une sonde spécifique du clone sélectionné. La différence de signal entre les deux pistes permet de déterminer si le messager correspondant est régulé par la FSH. Le signal donne en outre la taille du ou des messagers correspondants. Toutefois, pour que cette technique permette de conclure, il faut que le messager soit suffisamment abondant.

La RT-PCR comparative consiste à amplifier à l'aide d'amorces spécifiques du gène étudié des dilutions des ADNc d'origines différentes. On observe et on

compare l'apparition d'un signal spécifique dans les deux séries de dilutions. Cette technique est beaucoup plus sensible que le Northern blot ; en revanche, elle ne permet pas de déterminer la taille du messenger étudié.

A l'aide des panels d'hybrides construits au laboratoire (Yerle *et al* 1996 et 1998), les clones ont été localisés sur le génome porcin. Le détail de cette méthode figure dans l'article de Yerle (2000, cet ouvrage).

Une sonde ARN d'un clone donné a été hybridée sur des coupes d'ovaire, afin de localiser l'expression de l'ARN messenger correspondant dans l'ovaire de truie. Cette technique permet de localiser l'ARN messenger *in vivo* à la fois dans les cellules de la granulosa (dont sont issus les clones sélectionnés) et dans d'autres types cellulaires. L'étude a été faite sur des ovaires à divers moments du cycle.

2 / Résultats

2.1 / Sélection des clones d'intérêt

A partir d'une génothèque d'ADNc issus de cellules de granulosa porcine en culture, le tri différentiel a permis de sélectionner des clones régulés par la FSH. Le tri de 40 000 clones a conduit à 238 clones, dont 174 ont donné des séquences valides, représentant 136 clones différents. Deux cent dix séquences de type EST (Expressed Sequenced Tags) ont été soumises à la banque de séquences EMBL. A l'issue du séquençage, 54 clones ont pu être identifiés (Tosser-Klopp *et al* 1997) et 82 clones étaient inconnus. Par exemple, la glutathion S-transférase porcine (GST) a ainsi été isolée (3 clones indépendants).

Les expériences de Differential Display ont permis de sélectionner 16 clones (dont 11 inconnus) s'exprimant différemment selon la taille et l'état de développement du follicule ovarien.

2.2 / Vérification de la régulation par la FSH

Soixante-quatorze clones ont été testés par la méthode de Northern blot. Vingt-neuf présentent une régulation par la FSH (sur 37 résultats interprétables). Devant les difficultés rencontrées avec cette méthode, nous avons mis au point la technique de RT-PCR comparative. Quarante gènes inconnus issus du tri différentiel ont été étudiés par cette dernière méthode. Quinze d'entre eux sont régulés par la FSH. Par exemple, l'étude par Northern blot montre que l'expression de la GST est fortement stimulée par la FSH dans les cellules de granulosa en culture.

2.3 / Etude de la variation du taux d'ARN messenger dans des follicules à divers stades de développement

La méthode de RT-PCR comparative étant très sensible (l'étude peut porter sur quelques follicules isolés), nous l'avons utilisée pour étudier l'expression de certains gènes isolés par tri différentiel dans des follicules isolés et caractérisés (taille, stade de

développement, état d'atrésie ...). Parmi onze clones issus du tri différentiel, six présentent des différences d'expression selon le stade étudié. C'est aussi le cas de sept des clones isolés par Differential Display.

2.4 / Localisation sur le génome porcin

Les localisations régionales de différents clones ont été réalisées.

Parmi les gènes connus isolés dans ce travail, certains présentaient un intérêt pour la carte cytogénétique (voir l'article de Yerle 2000, cet ouvrage) pour la carte comparée des génomes porcin et humain.

D'autre part, 44 gènes inconnus (Tosser-Klopp *et al* 2000) et 14 gènes issus du Differential Display ont pu être localisés sur le génome porcin. Ces marqueurs ADNc constituent des marqueurs de type I et sont donc d'un apport significatif pour la carte cytogénétique. Les nombreuses données disponibles concernant le génome humain permettent souvent de trouver une étiquette humaine correspondante et parfois localisée sur le génome humain. Ainsi, ces marqueurs, même s'ils ne correspondent pas à des gènes connus, permettent de préciser la carte comparée Homme/Porc.

2.5 / Profil spatio-temporel d'expression

L'étude par hybridation de quelques gènes sélectionnés par hybridation différentielle a permis de mettre en évidence des différences d'expression au cours du développement folliculaire.

L'exemple le plus démonstratif est peut-être celui de la glutathion S-transférase. L'analyse par hybridation *in situ* sur coupes d'ovaires montre que l'expression de la GST varie en fonction du développement du follicule ovarien. Présente dans la thèque interne des follicules sains de petite taille, cette expression se manifeste également dans la granulosa des plus gros follicules, mais elle disparaît dans les follicules en état d'atrésie avancée.

La question est posée du rôle de cette enzyme (connue pour son rôle de détoxification, dans le foie en particulier) dans le follicule ovarien. L'hypothèse d'une intervention dans la biosynthèse des hormones stéroïdes, qui repose sur l'activité isomérase que présente également cette protéine, se trouve confortée ici du fait de sa régulation par la FSH qui stimule cette biosynthèse, d'une expression relativement spécifique des tissus stéroïdogènes et, enfin, d'une colocalisation assez stricte avec une autre enzyme de la biosynthèse des hormones stéroïdes, la 3-béta hydroxystéroïde déshydrogénase, qui intervient dans la conversion des delta 5-stéroïdes en delta 4-stéroïdes.

Conclusion et perspectives

Les techniques d'hybridation différentielle et de Differential Display ont permis de sélectionner des gènes dont l'expression est régulée par la FSH dans les cellules de granulosa porcine ou au cours du développement folliculaire. Différentes méthodes ont été mises au point pour préciser l'expression différentielle de ces gènes : *in vitro* à l'aide du modèle de culture cellulaire disponible, mais aussi *in*

vivo, grâce à des études sur follicules isolés. Ces données doivent être exploitées en lien avec la localisation sur le génome porcine, afin de déterminer si ces gènes se situent dans des zones comportant un QTL affectant la capacité de reproduction de la truie.

A l'heure actuelle, des matériels performants (filtres à haute densité) permettent d'envisager ce travail à grande échelle, pour établir le répertoire aussi exhaustif que possible des transcrits et avoir des indications sur leur régulation dans divers états physiologiques.

Références

Hatey F., 2000. Recherche de gènes associés à des fonctions : l'approche fonctionnelle. INRA Productions Animales, numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 153-160.

Tosser-Klopp G., Benne F., Bonnet A., Mulsant P., Gasser F., Hatey F., 1997. A first catalog of genes involved in pig ovarian follicular differentiation. *Mammalian Genome*, 8, 250-254.

Tosser-Klopp G., Bonnet A., Yerle M., Hatey F., 2000. Functional study and Regional mapping of 44 hormono-regulated Expressed Sequence Tags isolated from a Porcine granulosa cell library. *Genet. Sel. Evol.*, soumis.

Yerle M., 2000. Etablissement des cartes cytogénétiques et physiques. INRA Productions Animales, numéro hors série

« Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 87-93.

Yerle M., Echard G., Robic A., Mairal A., Dubut-Fontana C., Riquet J., Pinton P., Milan D., Lahbib-Mansais Y., Gellin J., 1996. A somatic cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 73, 194-202.

Yerle M., Pinton P., Robic A., Alfonso A., Palvadeau Y., Delcros C., Hawken R., Alexander L., Beattie C., Schook L., Milan D., Gellin J., 1998. Construction of a whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 82, 182-188.

