

Utilisation de la Génomique pour l'étude de la phase d'élongation de l'embryon bovin

S. DEGRELLE (1), I. HUE (1), K. PIOT (2), F. PIUMI (3), C. RICHARD (4), X. VIGNON (1) et JP. RENARD (1)

(1) INRA, UMR Biologie du Développement et Reproduction (BDR), 78350 Jouy-en-Josas

(2) INRA, Unité Mathématique, Informatique et Génome (MIG), 78350 Jouy-en-Josas

(3) INRA, Centre Ressources Biologiques (CRB), 78350 Jouy-en-Josas

(4) INRA, Unité Commune d'Expérimentation Animale de Bressonvilliers, 91630 Leudeville

RESUME - Chez les bovins, plus de 30 % des pertes embryonnaires observées après insémination artificielle, semblent avoir une origine précoce, liée à la croissance exponentielle du trophoblaste. Durant cette phase d'élongation qui se produit entre le 13^{ème} et le 19^{ème} jour de gestation, se mettent en place entre l'embryon et l'utérus, des interactions physiologiques indispensables pour le maintien de la gestation. Nos travaux en cours portent sur l'identification de transcrits impliqués dans la croissance de l'embryon avant l'implantation. Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé un réseau sur filtre de nylon, comprenant 1920 inserts ordonnés provenant d'une banque d'ADNc établie à partir d'embryons bovins en début d'élongation (14^{ème} jour), pour comparer les profils d'expression de trophoblastes provenant d'embryons de taille croissante : ovoïde (10-18mm), tubulaire (50-60mm) et filamenteux (140-160mm). Une première analyse statistique fait apparaître des gènes jusqu'alors inconnus dont l'expression est différentielle entre ces stades.

Use of Genomic to study the elongation phase of the bovine embryo

S. DEGRELLE (1), I. HUE (1), K. PIOT (2), F. PIUMI (3), C. RICHARD (4), X. VIGNON (1) et JP. RENARD (1)

(1) INRA, UMR Biologie du Développement et Reproduction (BDR), 78350 Jouy-en-Josas

SUMMARY - In cattle, more than 30 % of embryonic losses observed after artificial insemination, seem to have an early origin, coincident with the exponential growth of the trophoblast. During this phase of elongation, which occurs between the 13th and 19th days of pregnancy, physiological interactions essential for pregnancy are established between the embryo and the uterus. Our current work focuses on identification of transcripts involved in the growth of the embryos before implantation. In this context we have used an array on a nylon membrane of 1920 gridded inserts originating from a bovine Day-14 embryo cDNA library to compare expression profiles of trophoblasts from embryos of increasing size : ovoid (10-18mm), tubular (50-60mm) and early filamentous (140-150mm). A statistical analysis indicates that some yet "unknown" genes are differentially expressed during rapid trophoblastic elongation.

INTRODUCTION

Chez les bovins laitiers, les cas de mortalité embryonnaire précoce représentent plus du tiers des inséminations artificielles (35 %) et à peu près les deux tiers des échecs de gestation (75 %, Fig. 1). Survenant largement avant l'implantation, ces échecs sont sans conséquence sur la durée du cycle sexuel. Leur impact économique reste donc relativement limité. A l'inverse, les cas de mortalité tardive, qui surviennent aux alentours de l'implantation, retardent le retour en cycle des femelles et contribuent à accroître l'intervalle entre deux vêlages (Pinto *et al.*, 2000). Des facteurs liés à l'environnement (substances toxiques, stress), des anomalies chromosomiques, mais le plus souvent des dérégulations physiologiques au cours de la période de l'implantation (Ayalon, 1978, Wilmut *et al.*, 1986, Cross, 2001) sont à l'origine de ces mortalités.

	fécondation	élongation	implantation
	M.E. précoces		M.E. tardives
Jours de gestation		J14-J16	J23-J24 J25-J35
Diagnostics			Dosage de Progestérone Dosage PAGs
Mortalités Embryonnaires		75 %	15%
Inséminations Artificielles		35 %	11 %
Pertes économiques		+	+++

Figure 1 : Mortalités embryonnaires (M.E.) et diagnostics de gestation applicables avant le 35^{ème} jour chez la vache (d'après Dunne *et al.*, 2000, Pinto *et al.*, 2000, Picard-Hagen *et al.*, 2001, Heyman *et al.*, 2002)

Sur le terrain, la mise en évidence des arrêts précoces de gestation est délicate. En effet, les facteurs sécrétés par l'embryon ne passent pas nécessairement dans la circulation périphérique maternelle (interféron tau) ou sont produits trop tardivement pour servir aux diagnostics précoces. Par exemple les protéines associées à la gestation (PAGs) ne sont détectables dans la circulation maternelle qu'à partir de 25-35 jours de gestation (Picard-Hagen *et al.*, 2001). L'intérêt pour un diagnostic plus précoce repose donc sur la recherche d'isoformes précoces dans les familles protéiques connues (Green *et al.*, 2000) ou sur l'identification de marqueurs nouveaux.

Notre objectif est donc d'identifier des transcrits impliqués dans la croissance de l'embryon avant implantation et de tester leur potentiel comme marqueur précoce de gestation. Pour cela nous avons comparé les profils d'hybridation obtenus avec des embryons en cours d'élongation (ovoïdes, tubulaires et filamenteux (Fig. 2)) sur un macro-réseau, issu d'une banque d'ADNc obtenue à partir d'embryons témoins en début d'élongation (14^{ème} jour de gestation, Hue *et al.*, manuscrit en préparation) et généré dans le cadre d'un programme d'analyse fonctionnelle des génomes animaux (programme AGENA).

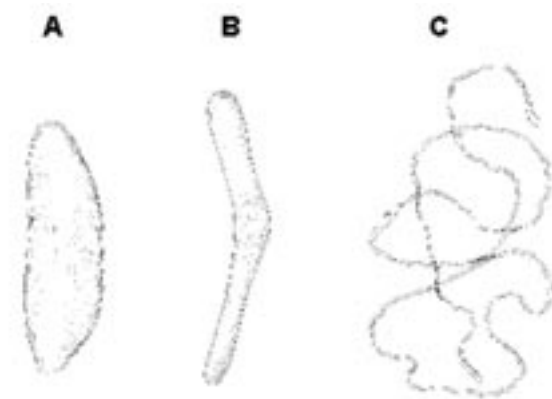


Figure 2 : Croissance exponentielle du trophoblaste au cours de la phase d'élongation de l'embryon bovin (d'après Barone, 1978). (A) stade ovoïde (Gr. x5), (B) stade tubulaire (Gr. x4), (C) stade filamenteux (Gr. x1)

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. COLLECTES D'EMBRYONS

Après insémination artificielle, des embryons bovins de stade ovoïde (n=4), tubulaire (n=4) et filamenteux (n=4) ont été collectés par perfusion *in vivo* de l'utérus (PBS1X, 37°C). Après élimination du bouton embryonnaire, le trophoblaste de chaque embryon a été congelé dans de l'azote liquide.

1.2. EXTRACTIONS DES ARNs TOTAUX

Les extractions d'ARNs ont été faites de manière individuelle pour chaque embryon (Trizol, Invitrogen) puis les ARNs totaux ont été regroupés par stade. La concentration des ARNs a été mesurée par densitométrie optique et leur pureté estimée par le quotient 260nm / 280nm.

1.3. PREPARATION DES SONDES COMPLEXES AMPLIFIEES (ARNs ANTISENS)

Les ARNs antisens ont été générés par transcription *in vitro* à partir d'1µg d'ARNs totaux en suivant les instructions du kit MessageAmp (Ambion). Pour chaque stade embryonnaire, 2 sondes indépendantes ont été réalisées. Ensuite 500ng de chaque sonde ont été marqués par rétrotranscription en présence de α -³³P dATP (Decreane *et al.*, 1999).

1.4. HYBRIDATIONS, LAVAGES ET EXPOSITION

Pour chaque sonde marquée, 4 membranes de nylon contenant les 1920 ADNc embryonnaires ont été hybridées sur la nuit à 68°C, puis lavées selon le protocole de Clontech (kit SMART PCR cDNA synthesis). Les membranes ont été exposées 7 jours dans des cassettes à écran au phosphore (Molecular Dynamics).

1.5. ACQUISITION ET TRAITEMENT D'IMAGE

L'utilisation du scanner (Storm 760, Molecular Dynamics) permet à partir des écrans au phosphore d'acquérir une image correspondant aux membranes exposées. La quantification de l'intensité des signaux se fait par la création et le positionnement manuel d'une grille d'adressage (Fig. 3A, 3B). Chaque signal est entouré d'un cercle. La quantification proprement dite est basée sur l'intensité moyenne des pixels à l'intérieur de chaque cercle. Le résultat final est l'obtention d'un fichier regroupant les informations telles que le positionnement des signaux et le signal moyen (Fig. 3C).

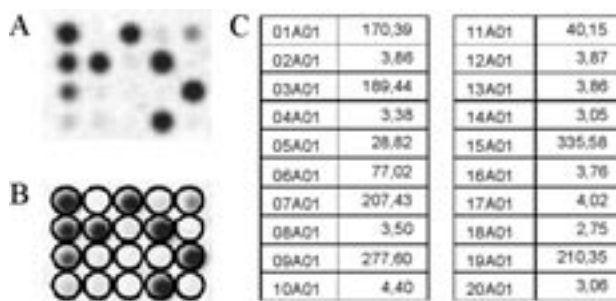


Figure 3 : Positionnement et quantification des signaux effectués par le logiciel Imagen 5.2 (Biodiscovery) (A, B) positionnement d'une grille décomposée en une matrice de 5x4 (visualisée par des cercles noirs) permettant l'adressage des signaux et définissant le périmètre de quantification pour chaque signal (C) la première colonne du tableau correspond à l'adresse des clones et la deuxième colonne aux quantifications obtenues

2. RESULTATS

2.1. PROFILS D'EXPRESSION

La figure 4 montre le profil d'hybridation d'une sonde réalisée à partir de trophoblastes de stade ovoïde.

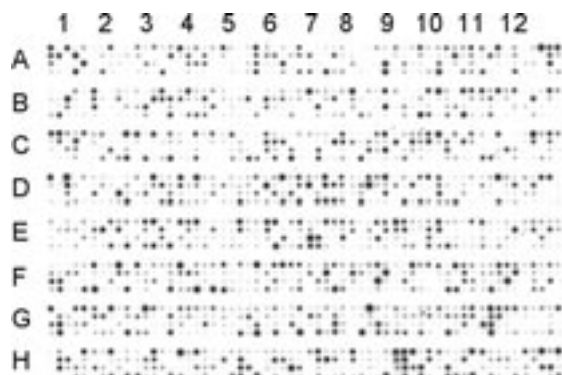


Figure 4 : Signaux d'hybridation obtenus avec une sonde trophoblastique "ovoïde" sur une membrane de nylon contenant 1920 clones d'ADNc embryonnaires

Afin d'étudier le profil d'expression des gènes sur l'ensemble du protocole expérimental qui comprend 3 stades embryonnaires (ovoïde, tubulaire et filamenteux), 2 sondes indépendantes par stade et 4 membranes par sonde, nous avons réalisé une analyse globale de la variance (ANOVA) sous SAS en collaboration avec l'unité Mathématique Informatique et Génome (MIG, INRA Jouy-en-Josas). Les analyses statistiques utilisées (AnovArray, Piot *et al.*, 2003) ont permis de mettre en évidence de manière significative ($P < 0,01$), des gènes trophoblastiques exprimés différemment entre les trois stades embryonnaires.

2.2. TRANSCRITS IDENTIFIES

Sur une sélection de quelques gènes, 2 profils d'expression se distinguent. Dans le premier (Fig. 5A), il est intéressant de constater que les 3 gènes qui ont une expression plus forte dans le trophoblaste au stade ovoïde, sont nouveaux. En effet, 2 d'entre eux sont de séquence et de fonction inconnues (unknown 1 et 2) et le troisième, de séquence connue (RP42-A) mais de fonction inconnue. Dans le deuxième profil (Fig. 5B), sur 5 gènes ayant une expression croissante en fonction du développement de l'embryon,

2 sont nouveaux : 1 de séquence et fonction inconnues (unknown 3) et 1 de séquence connue (RP42-B) mais de fonction inconnue. Les 3 autres gènes sont de séquence (TKDPI, PAG11, IFNtau) et de fonction connues (IFNtau).

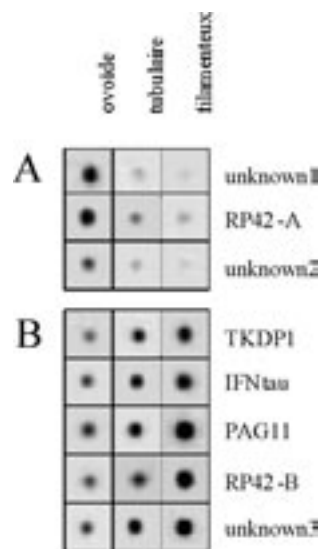


Figure 5 : Exemple de gènes dont l'expression relative varie pendant la phase d'élongation du trophoblaste bovin

(A) Expression forte dans le trophoblaste d'embryon au stade ovoïde,
(B) Expression croissante entre les trois stades embryonnaires

3. DISCUSSION

Le travail réalisé a permis d'identifier des gènes dont l'expression relative varie lors de la croissance de l'embryon avant l'implantation, parmi lesquels certains sont déjà décrits dans la littérature. En effet, chez les ruminants, l'interféron τ (IFNtau) est une protéine embryonnaire responsable du maintien du corps jaune qui permet la reconnaissance maternelle de la gestation. Cette protéine a pour caractéristique d'être produite et sécrétée par le trophoblaste de manière croissante et transitoire entre le 15^{ème} et le 24^{ème} jour de gestation (Bartol *et al.*, 1985). De la même manière, l'ARN messager localisé dans le trophoblaste est produit de manière croissante et transitoire pendant la phase d'élongation (Farin *et al.*, 1990).

Les protéines TKDP (Trophoblast Kunitz Domain Protein) font partie d'une grande famille d'inhibiteurs de protéases sécrétés par le trophoblaste. Chez les bovins, la protéine TKDPI est aussi décrite comme ayant un profil d'expression proche de celui de l'interféron τ , à savoir une expression croissante et transitoire entre les jours 17 et 19 de gestation (Kramer *et al.*, 1994, MacLean *et al.*, 2003). Une étude de l'ARN messager entre les jours 14 et 31 (Ledgard *et al.*, 2002) a montré que l'expression du transcrite était croissante entre le 14^{ème} et le 17^{ème} jour et transitoire puisque son expression devient quasi nulle au 31^{ème} jour de gestation.

Les travaux menés par Green *et al.* (2000) à partir du 25^{ème} jour de gestation ont montré que la famille des PAG était composée de 21 protéines. Toutes n'ont pas la même fenêtre d'expression et la même localisation cellulaire durant la gestation. En effet, la PAG-1 ou PSPB qui est utilisée pour le diagnostic de gestation n'est exprimée qu'après l'implantation alors qu'il semble que la PAG-11 (Fig. 5B) soit exprimée dès le début de l'élongation (14^{ème} jour de gestation). D'un autre côté, Perényi *et al.* (2002), ont montré l'existence de PAG dans le plasma de vaches gestantes dès le 21^{ème} jour de gestation. La PAG-11 correspondrait-elle à une de ces protéines plasmatiques ?

CONCLUSION

Dans la mesure où des gènes connus pour leur expression différentielle au cours de la phase d'élongation de l'embryon bovin ont été retrouvés, nous pouvons dire que l'approche par génomique utilisée pour rechercher de nouveaux marqueurs précoces de gestation a permis de mettre en évidence des gènes jusqu'alors inconnus dont l'expression dans l'embryon varie au cours de l'élongation. Une recherche plus approfondie sur l'identification et la chronologie d'expression de ces gènes pourrait aboutir à la conception d'un diagnostic moléculaire plus précis et plus précoce.

Ayalon, N. 1978. *J. Reprod. Fert.*, 54, 483-493.

Barone, R. 1978. In *Anatomie comparée des Mammifères domestiques*, tome 3, fascicule 2. Vigot- Paris.

Bartol, F., Roberts, R., Bazer, F. Lewis, G., Godkin J., Thatcher, W. 1985. *Biol. Reprod.*, 32, 681-693.

Cross, J. 2001. *Theriogenology*, 55, 193-207.

Decraene, C., Reguigne-Arnould, I., Auffray, C., Pietu, G. 1999. *Biotechniques*, 27, 962-6.

Dunne, L., Diskin, M., Sreenan, J. 2000. *Anim Reprod Sci.*, 58, 39-44.

Farin, C., Imakawa, K., Hansen, T., McDonnell, J., Murphy, C., Farin, P., Roberts, R. 1990. *Biol. Reprod.*, 43, 210-218.

Green, J., Xie, S., Quan, X., Bao, B., Gan, X., Mathialagan, N., Beckers, J., Roberts, R. 2000. *Biol. Reprod.*, 62, 1624-31.

Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P., LeBourhis, D., Camous, S., Vignon, X., Renard, JP. 2002. *Biol. Reprod.*, 66, 6-13.

Kramer, K., Duffy, J., Klemann, S., Bixby, J., Low, B., Pope, W., Roberts, R. 1994. *J. Biol. Chem.*, 269, 7255-7261.

Ledgard, A., Lee, R., Peterson, A. 2002. Sixth International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants, Crieff Hydro Hotel, Scotland UK, 14-17th august.

MacLean, J., Chakrabarty, A., Xie, S., Bixby, J., Roberts, R., Green, J. 2003. *Mol. Reprod. Dev.*, 65, 30-40.

Perényi, Z., Szenci, O., Sulon, J., Drion, P., Beckers J. 2002. *Reprod. Dom. Anim.*, 37, 100-104.

Picard-Hagen, N., Gayrard, V., Berthelot, X., Humblot, P. 2001. Association pour l'Etude de la Reproduction Animale, Paris, France, 4 décembre.

Pinto, A., Bouca, P., Chevallier, A., Freret, S., Grimard, B., Humblot, P. 2000. 7èmes Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, France, 6-7 décembre, 213-216.

Piot, K., Hennequet-Antier, C., Chiapello, H., Rodolphe, F., Degrelle, S., Hue, I., Renard, JP., Robin, S. 2003. European Conference on Computational Biology, Paris, France, 27-30 septembre.

Wilmot, I., Sales, D., Ashworth, C. 1986. *J. Reprod. Fert.*, 54, 483-493.