

ROGER : Un Répertoire Ordonné de Gènes pour l'analyse de l'Expression génique chez les Ruminants. Application à l'identification de marqueurs de la différenciation dans le muscle, le tissu adipeux, l'embryon et la glande mammaire

GINGER : A Gene INDEX for Gene Expression profiling in Ruminants: identification of muscle, fat, embryo and mammary gland markers of differentiation

P. MARTIN (1), J.F. HOCQUETTE (3), I. HUE (2), C. LEROUX (3), S. POLLET (1), F. LE PROVOST (4), K. SUDRE (3), S. DEGRELLE (2), G. ROLLAND (1), E. ZALACHAS (1), I. CASSAR-MALEK (3), C. VELTRI (1), F. LEPAGE (1), A. LISTRAT (3), M. BONNET (3), E. PETIT (4), J. LAUBIER (4), M. GRAZIANO (1), F. PIUMI (5), Y. CHILLIARD (3), J.P. RENARD (2), P. CHARDON (5)

(1) INRA, Unité Génomique et Physiologie de la Lactation (GPL), 78352 Jouy-en-Josas Cedex

(2) INRA/ENVA, UMR Biologie du Développement et Reproduction (BDR), 78352 Jouy-en-Josas Cedex

(3) INRA, Unité de Recherche sur les Herbivores (URH), Theix, 63122 St Genès-Champanelle

(4) INRA, laboratoire de Génétique Biochimique et de Cytogénétique (LGBC), 78352 Jouy-en-Josas Cedex

(5) INRA, Centre de Ressources Biologiques (CRB), 78352 Jouy-en-Josas Cedex

INTRODUCTION

L'identification des processus biologiques qui gouvernent la différenciation cellulaire des tissus (parmi lesquels figurent le muscle, l'embryon précoce, le tissu adipeux et la glande mammaire) constitue un des enjeux majeurs pour les productions animales, notamment en matière de reproduction et de qualité des produits (lait, viande). Le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire montre une universalité de certains mécanismes mis en jeu (Neidhardt *et al.*, 2000). Même si des avancées significatives ont été enregistrées dans la connaissance du processus myogénique, de la différenciation terminale de la cellule épithéliale mammaire (Salomon *et al.*, 1999) ou de l'adipocyte, bon nombre d'effecteurs et de mécanismes restent à découvrir. Ils concernent notamment l'instauration d'un nécessaire dialogue entre cellules en voie de différenciation et leur environnement. L'identification des gènes impliqués dans ces processus et l'analyse de leurs profils d'expression (programme AGENAE¹), permettra de mieux comprendre les mécanismes de la différenciation.

1. MATERIEL ET METHODES

Trois banques d'ADNc bovins ont été construites afin de mettre en place un répertoire de gènes ordonnés. Une banque d'ADNc d'embryon de 14 jours a été construite après amplification ménagée des produits de la transcription inverse des ARNs totaux. Cette banque contient 5 millions de clones dont les inserts ont une taille comprise entre 0,5 et 3,5 kb. Une banque ADNc à partir d'un pool d'échantillons variés de muscles (cœur - *Longissimus thoracis* - *Masseter* - *Semitendinosus* - *Cutaneus Trunci*) prélevés à différents âges au cours de la vie fœtale (110, 180, 260 jours) ou post partum (15 jours, 1 et 15 mois), de différentes races (Charolais x Salers, Holstein, INRA95, Montbéliard, Charolais) et respectant les proportions, fœtal / postnatal, glycolytique / oxydatif, a été construite (18 865 clones, dont les inserts ont une taille moyenne de 550 pb). S'agissant de la glande mammaire, deux stratégies ont été utilisées pour produire des clones représentant des transcrits mammaires mais également des transcrits dont la spécificité est plus large. Cent quatre vingt clones proviennent d'une banque d'ADNc de glande mammaire de chèvre en lactation. L'approche "gènes candidats" a permis d'amplifier de façon spécifique des fragments d'ADN correspondant à 72 gènes. Ces amplifiats ont été clonés pour pouvoir être ensuite amplifiés à grande échelle. De plus, 132 gènes candidats, fonctionnellement importants (signalisation moléculaire, cytokines, etc.) absents de ces collections ont ensuite été recherchés dans les banques d'ADNc (MARC1-4 Bov) produites par l'USDA (United States Department of

Agriculture), disponibles au Centre de Ressources Biologiques de Jouy-en-Josas (CRB).

2. RESULTATS

Après caractérisation (séquençage partiel) de près de 3700 clones issus des 3 banques d'ADNc construites (embryon précoce, muscles et glande mammaire), une analyse bioinformatique par clustering et contigage a permis de définir, après élimination de la redondance, un répertoire de 1809 "gène" indépendants "Muscle-Embryon-Mamelle" provenant de 876 clones "embryon", 549 clones "muscle" et 384 clones "glande mammaire". Le traitement de l'ensemble des données de séquences a été réalisé à l'aide du système SIGENAE (Système d'Information d'AGENAE). Le réarrangement des clones, l'amplification, la purification et le dépôt des inserts sur membrane de Nylon et lame de verre ont été réalisés au CRB avec l'appui des équipes utilisatrices. Ce répertoire a permis la production d'un premier réseau générique bovin qui sera mis à la disposition de la communauté scientifique pour des études fonctionnelles à caractère générique et finalisé (reproduction, qualité des produits, etc.).

3. PERSPECTIVES

Pour identifier des acteurs de la différenciation communs aux tissus sélectionnés (Chen et Capecchi, 1999), des ARN cibles complexes ont été préparés à partir de tissus bovins à différents stades de développement ou de différenciation : 4 stades fœtaux (110, 180, 210 et 260j) pour le muscle et le tissu adipeux, 5 stades physiologiques (début, milieu et fin de gestation, lactation et involution) pour la glande mammaire et 3 stades embryonnaires (G14, G18 et G25). Après validation de la qualité des ARNs, ceux-ci seront hybridés sur le réseau générique. Le caractère différentiel des gènes révélés dans le cadre de cette étude sera validé en Northern blot ou en RT-PCR quantitative en temps réel.

Cette action a bénéficié d'un soutien institutionnel dans le cadre de l'AIP Génomes et fonctions et du programme AGENAE

Neidhardt L, Gasca S, Wertz K, Obermayr F, Worpenberg S, Lehrach H, Herrmann BG. (2000) *Mech Dev*. 98 : 77-94.

Salomon DS, Bianco C, De Santis M (1999) *Bioessays*. 21: 61-70

Chen F & Capecchi MR (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 541-546

¹Programme structurant mis en place par l'INRA, le CIRAD et les partenaires professionnels de l'élevage, dans le cadre d'un G.I.S. qui a pour objectif de favoriser le développement des outils nécessaires à l'Analyse du GENome des Animaux d'Élevage et de promouvoir des actions à vocation finalisée sur l'expression des gènes et la structure des génomes.