Gènes différentiellement exprimés dans le tissu adipeux de vaches laitières portant des haplotypes contrastés pour un QTL de fertilité femelle du chromosome 3

Genes differently expressed in adipose tissue of dairy cows carrying the «fertil+» or «fertil-» haplotype for one QTL of female fertility located on chromosome 3

COYRAL-CASTEL S. (1,2), RAME C. (2), ELIS S. (2), COGNIE J. (2), FRITZ S. (3), LECARDONNEL J. (4), HENNEQUET-ANTIER C. (5), MARTHEY S. (4), ESQUERRE D. (4), DUPONT J. (2)
(1) Institut de l'Elevage, Département Génétique, 149 rue de Bercy, 75595 Paris Cedex 12
(2) INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Centre de Tours, 37380 Nouzilly
(3) UNCEIA, 149 rue de Berçy, 75595 Paris Cedex 12
(4) INRA, CRB GADIE, UMR1313 GABI, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas
(5) INRA, UR83 Unité de Recherche Avicole, Centre de Tours, 37380 Nouzilly

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, la fertilité des vaches laitières hautes productrices a fortement diminuée, particulièrement en race Prim'Holstein. Après le vêlage, les vaches mobilisent prioritairement leurs réserves corporelles pour répondre aux besoins de la lactation. Les réserves mobilisées sont ainsi utilisées au détriment de la fertilité. Ce dernier caractère est peu héritable mais présente une forte variabilité génétique. Il existe plusieurs QTL de fertilité femelle (QTL-Fert-F), notamment un situé sur le chromosome 3 (BTA3), qui est impliqué dans les échecs précoces de la gestation (Guillaume *et al.*, 2007). Notre étude a pour but d'identifier des transcrits codant et non codant exprimés au niveau de la région du QTL-Fert-F-BTA3 et d'étudier leur variation d'expression entre les femelles portant l'haplotype favorable « fertil+ » ou l'haplotype défavorable « fertil- » pour ce QTL-Fert-F-BTA3. Pour ce faire, nous avons utilisé des puces à ADN de type Tiling Array. Cette méthode permet entre autre, l'étude exhaustive de l'activité transcriptionnelle d'une région chromosomique donnée.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. TILING ARRAY

1.1.1. Biopsie et extraction des ARN totaux

Des biopsies de tissu adipeux ont été réalisées au fanon sur 9 femelles « fertil+ » et 9 femelles « fertil- » à une ou deux semaines après le vêlage, période où les niveaux plasmatiques d'acides gras non estérifiés étaient les plus élevés. Les tissus ont été broyés et les ARN totaux ont été extraits et purifiés. La qualité des échantillons a été vérifiée avec une puce RNA Nano (Bioanalyzer 2100, Agilent).

1.1.2. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons a été réalisée avec les kits fournis par Nimblegen. Cette préparation consiste en la synthèse du premier puis du second brin d'ADN complémentaire (ADNc) suivi d'une purification à la RNase A. Les ADNc obtenus sont ensuite marqués à la Cy3.

1.1.3. Hybridation et quantification des échantillons

Les échantillons sont hybridés pendant 18h30 à 42°C sur les lames de Tiling Array contenant 385K oligonucléotides chevauchants qui couvrent l'intégralité du QTL-Fert-F-BTA3 (Nimblegen), soit environ 3,6 mégabases. Les lames sont ensuite lavées puis scannées à 532 nm. Les images obtenues sont alignées avec la grille de design.

1.2. ANALYSES STATISTIQUES

Pour chaque échantillon (1 lame par vache), la mesure d'expression de chaque sonde a été normalisée (transformation en $\log_2$ puis soustraction de la moyenne globale de la lame). Le fichier utilisé pour l'analyse contient tous les gènes présents dans le QTL, dans le sens « forward » et « reverse », et codant pour des protéines connues ou non. L'expression de chaque gène est analysée par un modèle mixte avec deux effets fixes (exon et haplotype) et un effet aléatoire (sonde) (Jaffrézic *et al.*, 2010). Un gène sera déclaré différemment exprimé entre les deux haplotypes si l'effet haplotype est significatif avec une correction de tests multiples de Benjamini-Hochberg.

2. RESULTATS

L'analyse statistique a permis de mettre en évidence 93 gènes différemment exprimés (49 « forward » et « 44 reverse ») sur 124 gènes (62 « forward » et 62 « reverse ») entre les femelles « fertil+ » et « fertil- » (padjusted<0,05). Parmi ces gènes, 43 codent pour des protéines connues et 50 pour des protéines putatives. Les ratios d'expression de ces gènes varient de 1,03 à 2,08 entre les deux haplotypes, 78 gènes étant surexprimés chez les femelles « fertil+ ». Parmi les gènes connus, on trouve des gènes qui codent pour des protéines du cytosquelette, des canaux ioniques, des enzymes du métabolisme protéique ou encore des récepteurs olfactifs.

3. DISCUSSION

Les animaux étudiés présentent une différence de fertilité, avec un taux de réussite après la première insémination artificielle (IA1) plus élevé chez les primipares « fertil+ » comparé aux primipares « fertil- » (70 % vs 39 %, p=0,05 à 35 jours après l'IA1). L'utilisation d'une technique innovante, le Tiling Array, a permis de mettre en évidence une différence d'expression de gènes du QTL-Fert-F-BTA3 dans le tissu adipeux d'animaux sélectionnés pour ce même QTL. Les fonctions dans lesquelles certains gènes connus sont impliqués sont surprenantes au regard de la fonction pour laquelle ils sont décrits dans la littérature. Cela justifie à la fois de confirmer ces résultats par PCR en temps réel mais également de s'intéresser à de potentielles nouvelles fonctions dans lesquelles ces gènes pourraient être impliqués.

CONCLUSION

Notre étude montre une différence d'expression d'environ 90 gènes du QTL-Fert-F-BTA3, avec pour certains des variations très faibles, dans le tissu adipeux de femelles sélectionnées pour leur haplotype à ce même QTL et présentant des différences de fertilité.

Les auteurs remercient l'ANR Genanimal et Apis-Gene pour le financement du projet ainsi que Florence Jaffrézic pour la mise à disposition des scripts d'analyse statistique.

Guillaume, F., Gautier, M., Ben Jemaa, S., Fritz, S., Eggen, A., Boichard, D., Druet, T., 2007. Anim. Genet., 38, 72-74
Jaffrézic, F., Rogel-Gaillard, C., Gao, Y., Marthey, S., Robin, S., 2010. soumis