

# Recherche et identification de gènes différentiellement exprimés dans l'épididyme de verrat par une approche transcriptomique

Benoît GUYONNET (1,2), Jean-Louis DACHEUX (1), Florence JAFFRÉZIC (3), Anne LACOSTE (2), Guillemette MAROT (3), Marie-José MERCAT (2), Jean-Luc GATTI (1)

(1) UMR 6175 Inra-Cnrs-Université de Tours-Haras Nationaux, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly

(2) IFIP - Institut du porc, La Motte au Vicomte 35650 Le Rheu

(3) Unité de génétique quantitative et appliquée, INRA, 78352 Jouy-en-Josas

*gatti@tours.inra.fr*

## INTRODUCTION

Chez les Mammifères, la production de spermatozoïdes fécondants fait intervenir deux organes : le testicule et l'épididyme. Le testicule est le lieu de production et a donc un rôle sur la quantité de gamètes produits. À la sortie du testicule, les spermatozoïdes bien que morphologiquement formés sont immobiles et incapables de féconder un ovocyte. C'est au cours de leur transit dans l'épididyme, tube pelotonné d'environ 70 m de long chez le verrat, que les spermatozoïdes vont acquérir leur mobilité et leur pouvoir fécondant. Au sein de l'épididyme, les gamètes sont baignés dans le fluide épидидymaire dont la composition est la résultante des activités de sécrétion et de réabsorption de l'épithélium qui, par la présence de la barrière hémato-épидидymaire, permet de maintenir une composition spécifique du fluide.

Cette maturation fait intervenir divers remaniements protéiques, fruits d'interactions entre le fluide et les spermatozoïdes (Dacheux et al., 2005 ; Gatti et al., 2004). L'épididyme intervient dans la qualité du gamète.

Le travail présenté est la recherche de gènes dont l'expression pourrait être associée à la fonction de maturation des spermatozoïdes au sein de l'épididyme à l'aide d'une puce générique porcine.

## 1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1.1. Animaux

L'étude présentée porte sur 4 verrats Large White âgés de plus de 18 mois, sélectionnés sur leur qualité de reproducteur et provenant de centres d'insémination. Après abattage, les testicules et les épидидymes sont prélevés et des morceaux de tissu testiculaire, des canaux efférents, de 9 différentes zones épидидymaires (0,1,2,3,4,5,6,7,8/9) et des canaux déférents sont congelés à -80°C.

## 1.2. Hybridation des puces

Les membranes génériques porc sont fournies par le Centre de Ressources Biologiques GADIE de l'INRA Jouy en Josas. Ces membranes de nylon (Amersham) comportent 9216 dépôts provenant d'amplification des clones obtenus lors du programme AGENAE. Ces clones sont issus des banques ADNc USDA, AGENAE et LGC. Le testicule et l'épididyme sont parmi les tissus ayant servi à produire la banque AGENAE.

Les ARN messagers (ARNm) des tissus sont extraits après broyage (ultra-turax) par une double extraction phénol-chloroforme (TRI reagent, sigma). La qualité des ARNm obtenus est estimée par le rapport 260/280 nm (nanodrop) et par séparation sur gel d'électrophorèse (Bioanalyseur, Agilent technologies). Les messagers sont rétrotranscrits en ADNc et ceux-ci marqués au P<sup>33</sup>. Après 16 h d'hybridation, les membranes sont rincées et exposées sur écran 24 h avant d'être digitalisées (Fuji-BAS 5000). Le niveau d'intensité de chaque dépôt est quantifié par le programme AGScan, normalisé (après transformation en log<sub>2</sub>), la valeur est ensuite corrigée pour équilibrer les variations de quantité déposée.

Une première analyse comparative des données a été effectuée en utilisant un programme d'analyse de gènes différentiellement exprimés développé par G. Marot (Unité de génétique quantitative et appliquée, INRA, Jouy en Josas), et basé sur un modèle de variance (Jaffrezic et al, 2006) avec une procédure d'ajustement pour les tests multiples de Benjamini-Hochberg à 5 %.

## 2. RESULTATS

Sur les 48 puces hybridées, 5 ont été écartées due à la faible intensité de marquage certainement liée à un problème lors de la rétrotranscription. Les résultats montrent qu'entre le testicule et les canaux efférents, plus de 3000 dépôts sem-

blent différemment exprimés. Cette première analyse suggère aussi que l'épididyme peut être classé en quatre grandes régions transcriptomiques : les zones 0 et 1 (tête antérieure); les zones 2 et 3 (tête postérieure); les zones 4, 5, 6 et 7 ; les zones 8/9 avec le canal déférent. Les profils d'expression de certains gènes épididymaires déjà connus (ERABP, GPX...) sont parfaitement en accord avec ceux décrits dans la littérature.

## CONCLUSION

Ces premiers résultats très satisfaisants vont permettre une analyse des gènes différemment exprimés le long de l'épididyme et d'en obtenir les profils d'expression. Ils permettront de rechercher des gènes particuliers entre l'épididyme et le testicule et certainement de mettre en évidence des gènes nouveaux exprimés dans l'épididyme. Cette étude

permet déjà de confirmer l'existence d'une régionalisation particulière de l'épididyme décrite au niveau des sécrétions protéiques. Ce travail ouvre la possibilité de comparer les transcriptomes épididymaires chez des animaux de haute et basse fertilité afin de rechercher des gènes pouvant servir de marqueurs et d'en étudier la fonction biologique.

## REMERCIEMENTS

Ce travail bénéficie d'un soutien GENANIMAL et d'une bourse CIFRE dans le cadre du projet BIOPORC-IFIP. Le CRB GADIE (Jouy-en-Josas) est remercié pour la fourniture des puces à ADN ainsi qu'A. Le Cam et J. Monfort du plateau technique « puce à ADN » de Rennes. Nous remercions aussi fortement les Centres d'Insémination Artificielle qui ont sélectionné et fourni les verrats pour cette étude.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dacheux J.L., Castella S., Gatti J.L., Dacheux F., 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenolog* 63, 319-341.
- Gatti J.L., Castella S., Dacheux F., Ecroyd H., Metayer S., Thimon V., Dacheux J.L., 2004. *Post-testicular sperm* environment and fertility. *Anim Reprod Sci* , 82-83, 321-339.
- Jaffrézic F., Marot G., Degrelle S., Hue I., Foulley J.L., 2006. A structural model for variances in differential gene expression studies. Soumis à *Bioinformatics*.