

# Le Phénotypage de la fertilité, son utilisation dans les programmes de génomique

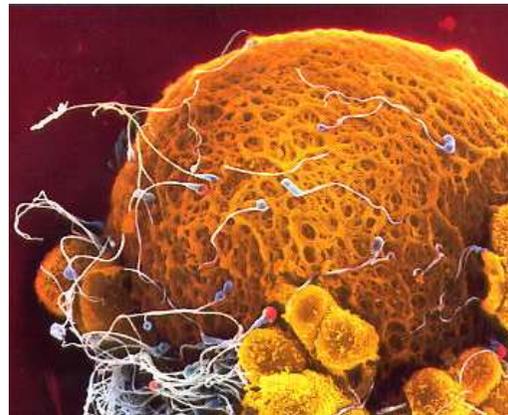
P Humblot / UNCEIA R&D

Journée de formation CSAGAD / Institut de l'Élevage  
Paris, 15 janvier 2008

# OBJECTIFS R&D



- Amélioration de la fertilité -  
Maîtrise de la Reproduction -  
Génomique (AGENAE)



# Programmes AGENAE

BTA

QTL Fert

QTL Fert 2

OVOAGENAE  
GEN SOM  
EMBRYOGEN  
VLHP (INRA)

GENIFER

GENIFER

MAMMIFERT

A	A
C	C
T	T
<b>G</b>	A
T	T
T	T
A	A
T	T
G	G

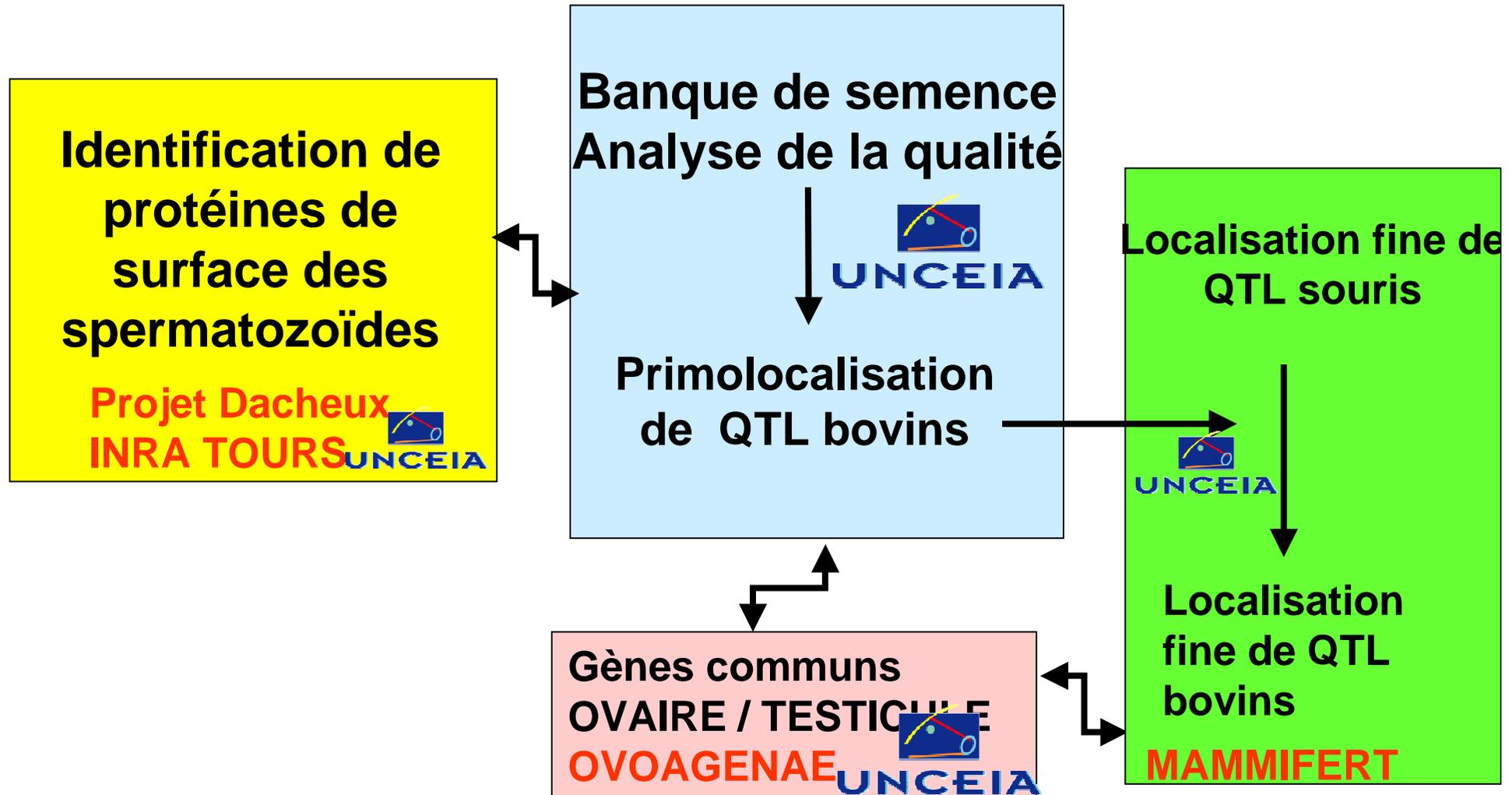
QTL

Cartographie  
Fine (SNP)

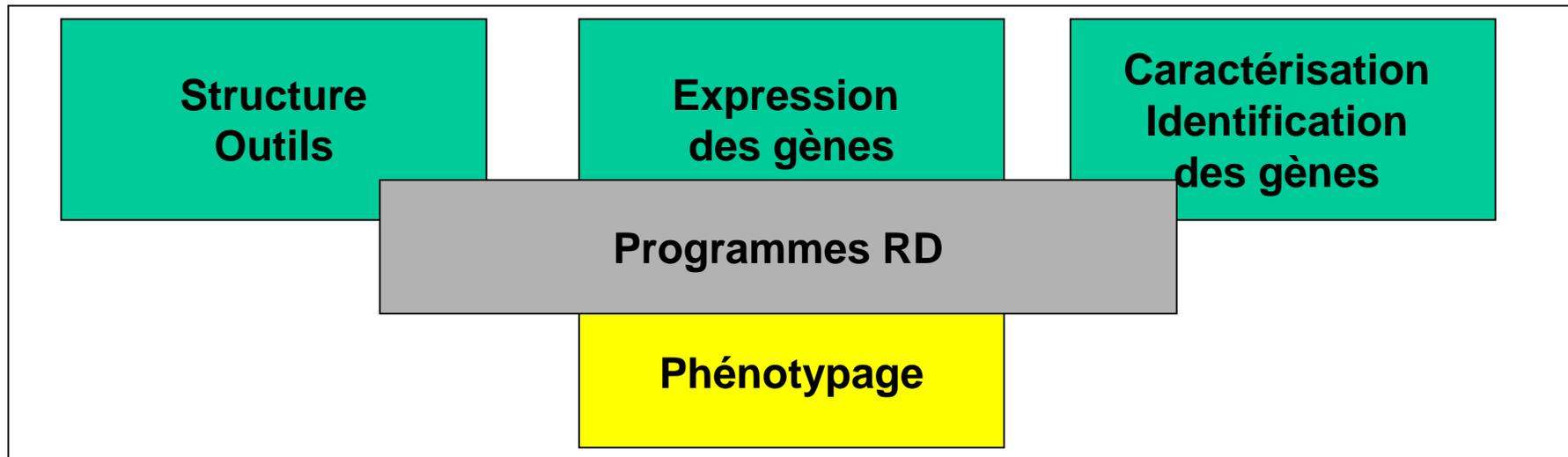
Expression  
Gene

Mutations  
Candidates

# QTL production semence et fertilité mâle



# Place du département R&D UNCEIAdans les programmes de génomique



- Animaux de choix (groupes d'animaux, individus de phénotype extrême)
- Fourniture de matériel biologique approprié/ spécifique (spermatozoides, ovocytes, embryons)
- Méthodes de phénotypage (fertilité mâle / femelle) pour animaux ou cellules

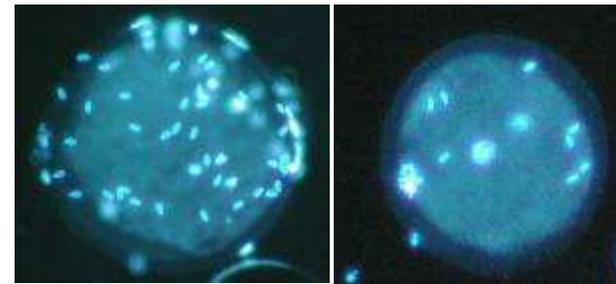
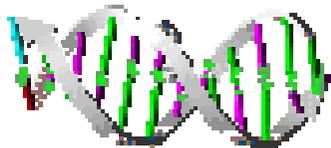
# Quelles méthodes ?

3. FERTILITE MALE : TNR (INRA SGQA)



1. TYPAGES  
150 marqueurs  
(Labogena)

2. TESTS de  
LABORATOIRE  
(UNCEIA RD)



Fertilité



Production



- Qualité / fécondance
- FIV / TNR
- Résistance Congélation
- Nombre de doses



# Méthodes de laboratoire « classiques » pour l'évaluation de la qualité de la semence



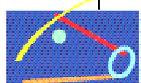
**Mouvement / oeil**



**Mouvement / HTM**



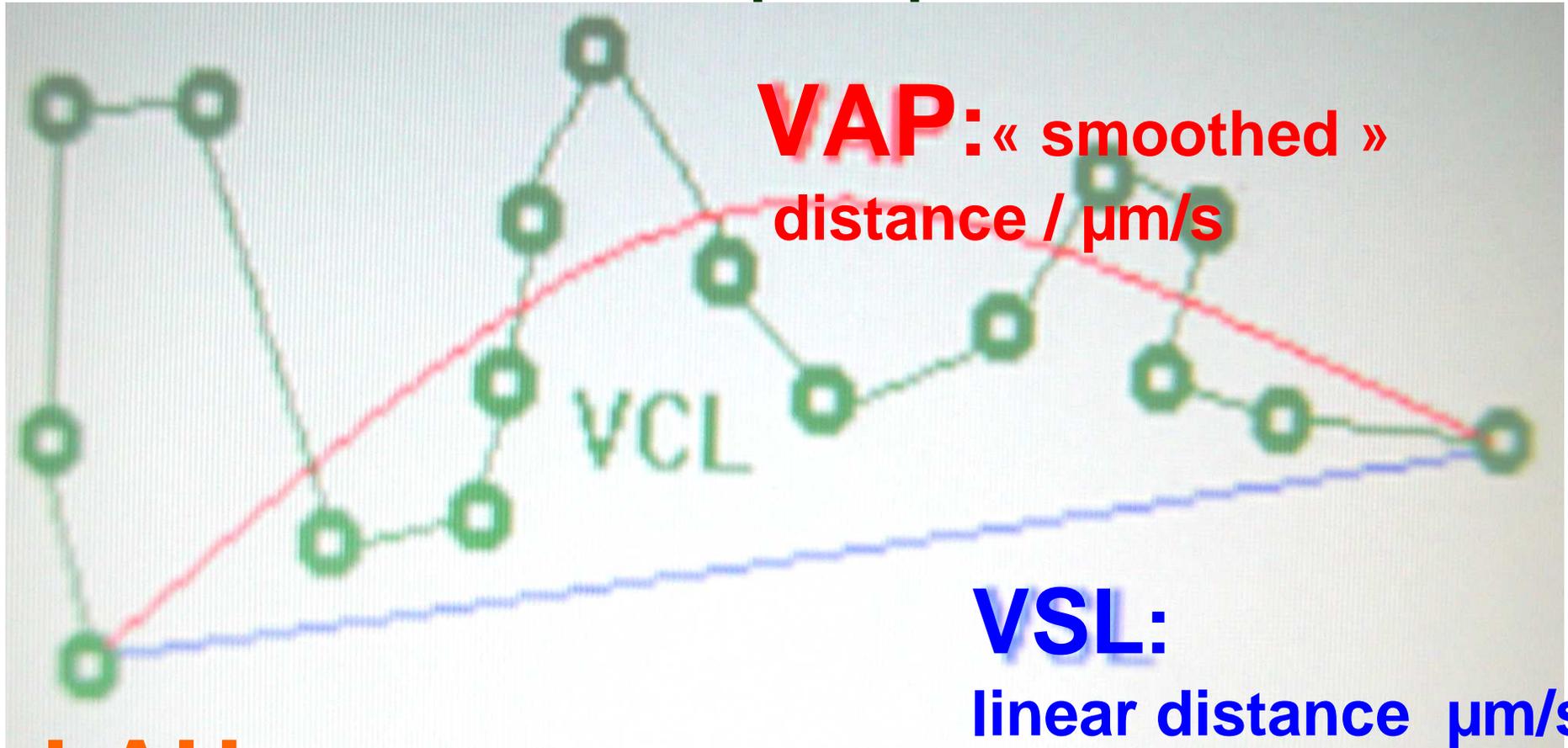
**% vivants / cytomètre  
de flux**



# HTM Parameters



**VCL** : real distance spz /  $\mu\text{m/s}$



**VAP**: « smoothed »  
distance /  $\mu\text{m/s}$

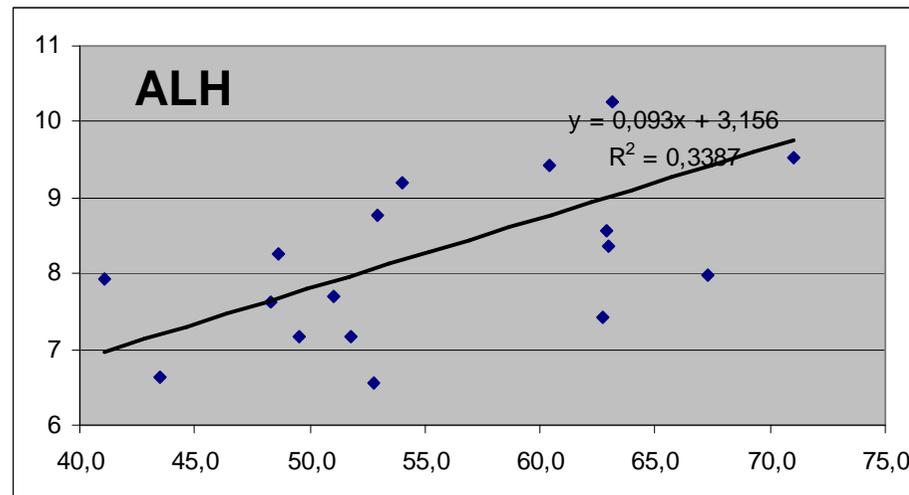
**VSL**:  
linear distance  $\mu\text{m/s}$

**LAH**: Lateral Amplitude Head spz / axis  $\mu\text{m}$

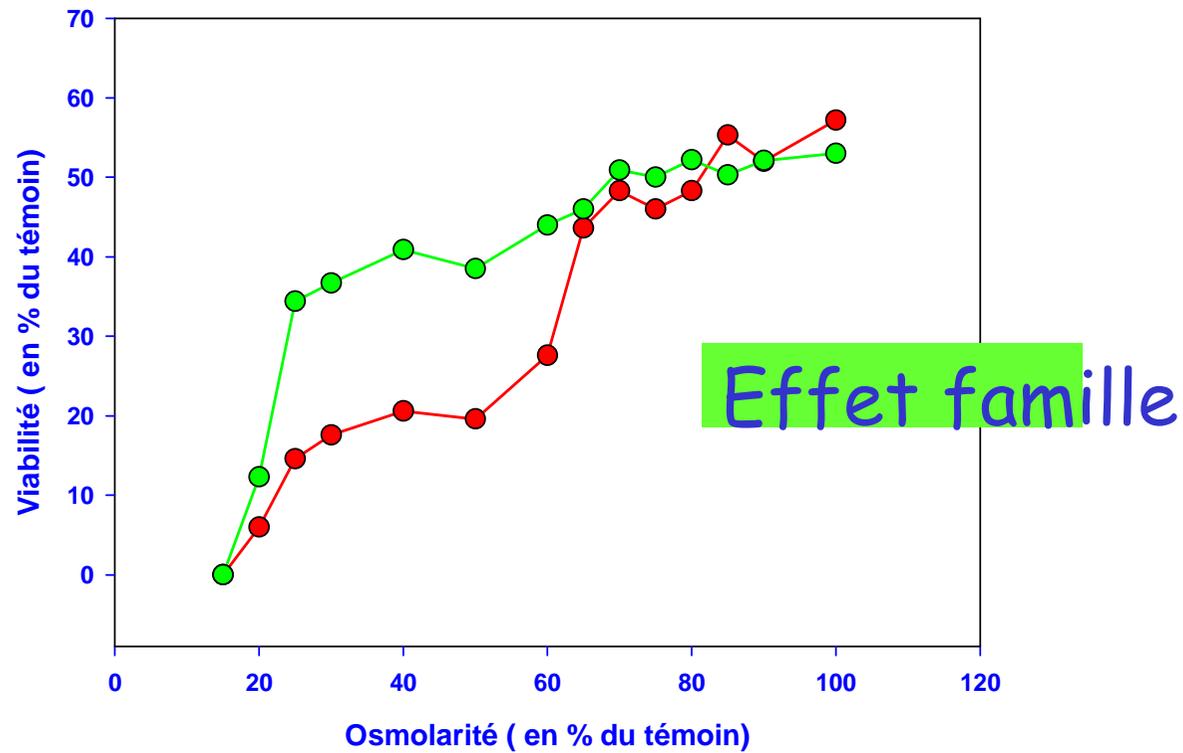
**➔ Objective Parameters of spz displacement**

# Voie Mâle : Tests utilisables en CPS

- **Nouvelles méthodes d'évaluation**
  - **Evaluation automatique de la motilité (meilleure liaison avec la fertilité)**
  - **Tests utilisant la Cytométrie en flux**
- \* **Résistance osmotique**
- \* **Condensation de la chromatine**



# Résistance osmotique



# Détection de QTL

Chromosome (BTA)	Caractère
Production de semence	
11	Concentration
13	Concentration
13	Nb spz
15	Volume
21	Nb spz
21	Concentration
22	Volume

Chromosome (BTA)	Caractère
Qualité de la semence	
2	Motilité spz
3	Vitesse spz
4	Vitesse spz
8	%spz viables
23	%spz viables

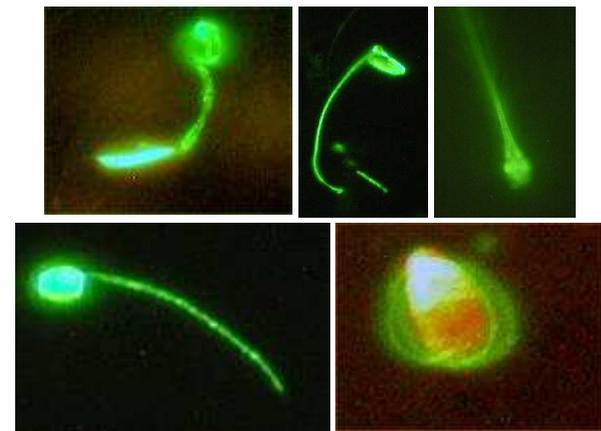
Chromosome (BTA)	Caractère
Fertilité mâle	
8	TNR28
8	TNR282
11	TNR28
11	TNR56
14	TNR90
14	TNR282
18	TNR28

Publication 3R , 2005

Paris 15/01/08

# Quels résultats ?

- Des zones QTL identifiées en relation avec :
  - production de semence
  - qualité de semence (Anomalies, mobilité)
- Relations avec la fertilité (TNR) à confirmer
- Trouver des marqueurs de 2eme génération (SNP)
- Améliorer le phénotypage



# Evaluation phénotypique de la fertilité Mâle :

- **Avec les méthodes “classiques” connues d’évaluation**
  - **Concentration**
  - **Anomalies**
  - **Caractéristiques de motilité**
    - **Bonne caractérisation des individus / taureaux “extrêmes” mais mauvaise discrimination pour les individus “intermédiaires”**
    - **Corrélation avec la fertilité souvent peu élevées**
- **Avec les tests FIV**
  - **Caractérisation lourde / chère (études grd nb d’individus)**
  - **Sensibilité du système / conditions de culture**
  - **Difficulté de distinguer les effets mâles liés à la fécondation et ceux liés à l’aptitude au développement (vitesse de clivage)**

# Evaluation phénotypique de la fertilité Mâle :

## Que manque t 'il ??

- **Nouvelles méthodes**
  - **Estimer le pouvoir fécondant avant FIV (meilleure liaison avec la fertilité)**
  - **Mieux caractériser l'aptitude individuelle au Dév.**
  - **Caractériser les différentes populations de spermatozoides (les spermatozoides fécondants sont t'ils identiques aux autres ??)**
  - **Leurs proportions sont t'elles identiques d'un individu à l'autre**
  - **Techniques d'analyse en "milieu utérin"**
  - **Trouver des marqueurs "protéiques" (membranes) ?  
Des Phospholipides ? Des sucres ??**
  - \* **Un nouveau programme de phénotypage .??**

# fertilité femelle

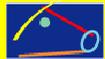


Cartographie  
Précision des Phénotypes

Génomique Expressionnelle

QTL de fertilité Chr3

Cartographie fine SNP  
Chr3 (TNR 90j)

GENIFER Chr3  
  
UNCEIA

Cartographie fine  
Validation SNP Chr3

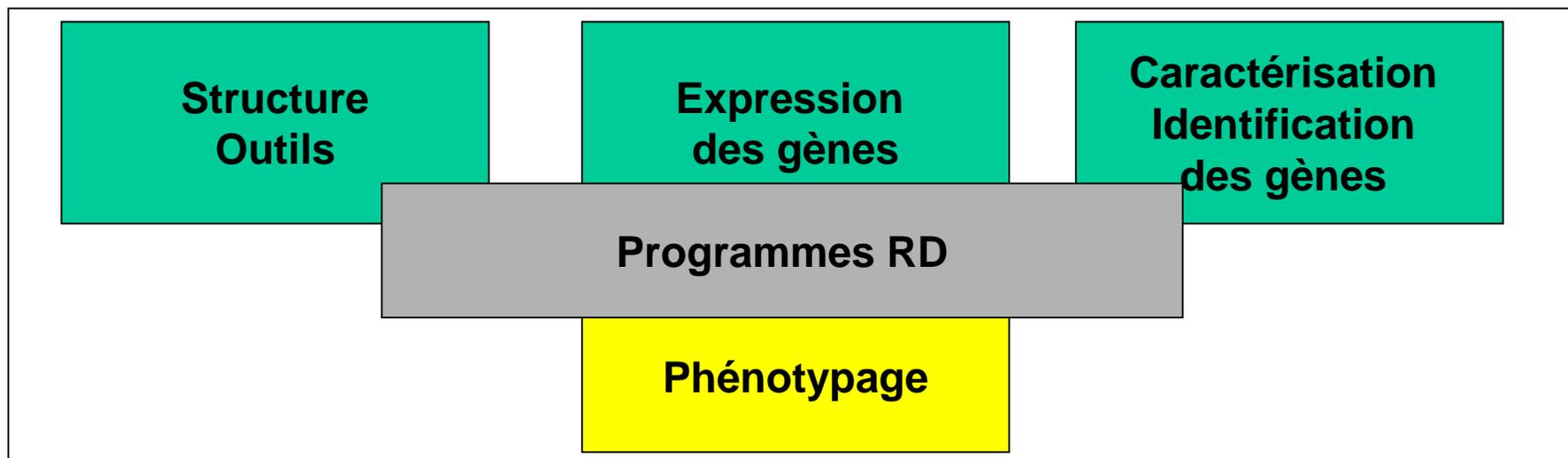
MAMMIFERT (3)  
  
UNCEIA

OVOAGENAE  
Gènes de l'Ovocyte  
  
UNCEIA  
Phénotypes  
Génotypes (++/--)  
suite

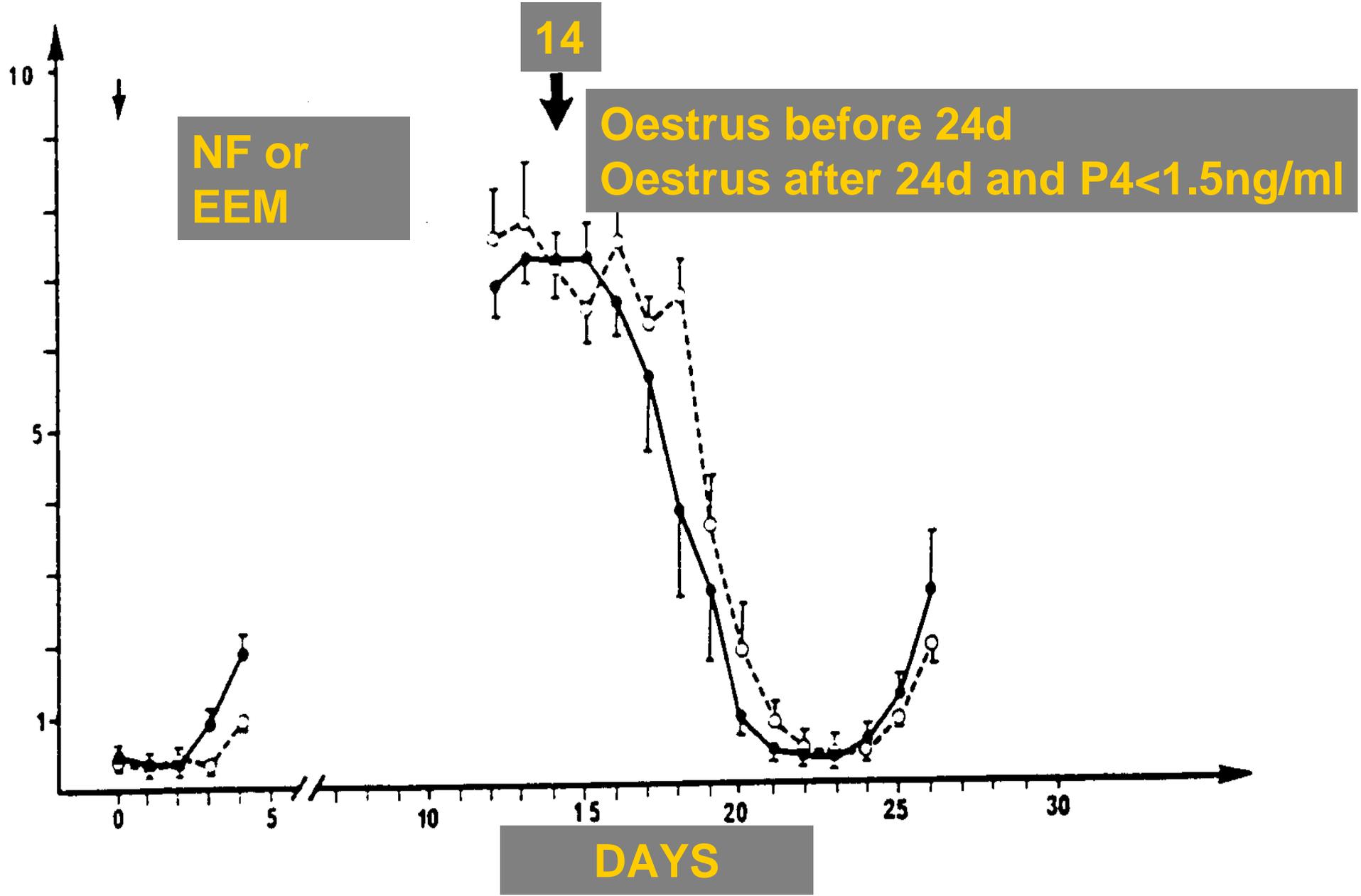
Gènes Somatiques  
  
UNCEIA  
Gènes Follicule  
Gènes tractus génital  
Modèles (modification  
w3/w6)

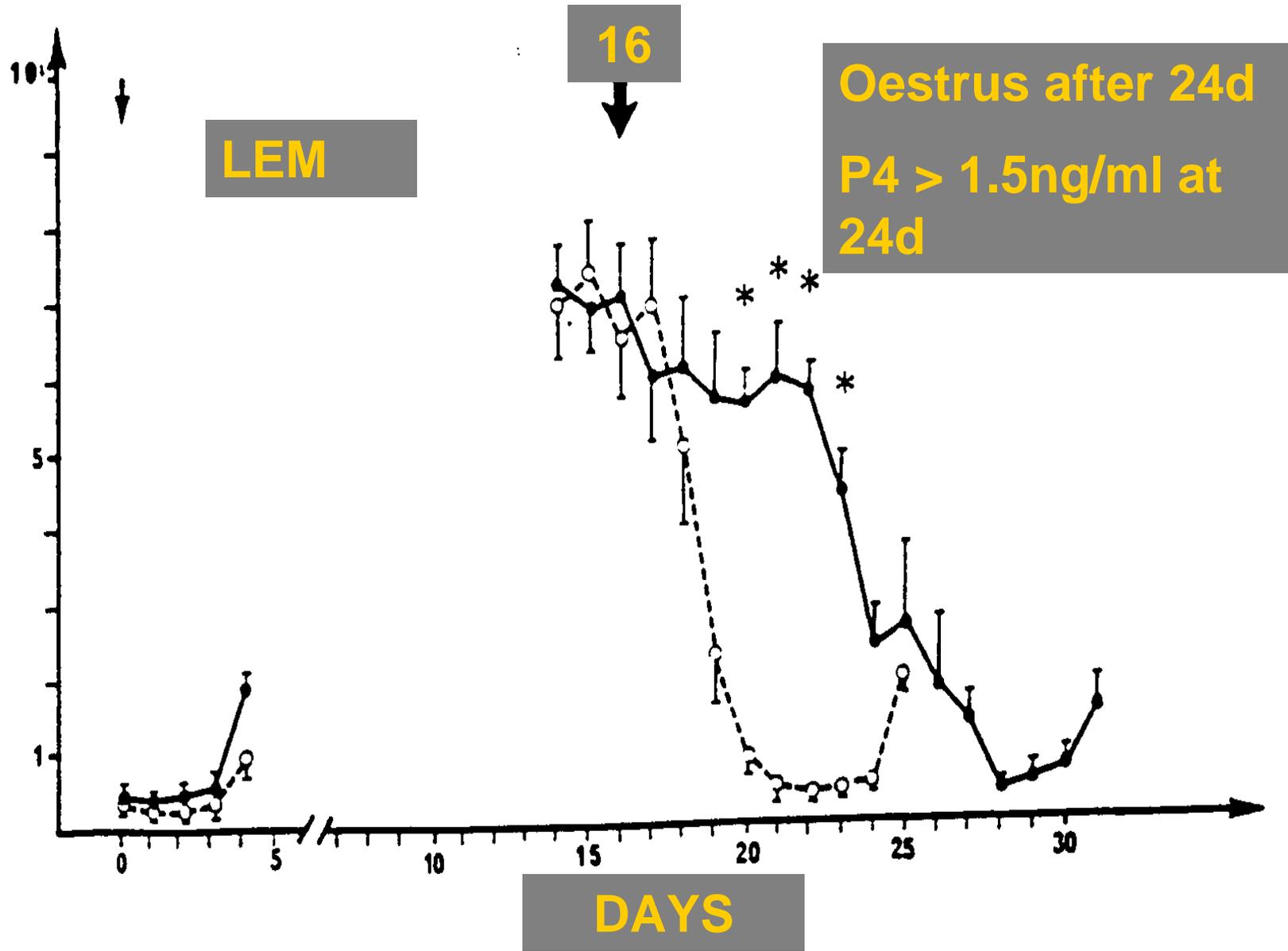
Fertilité des VHP (INRA PRC) Animaux  
de génotype connu (++/--)  
Choix des tissus (stade gestation)  
Utilisation outils (1) et (2) + (3)

# Place du département R&D UNCEIAdans les programmes de génomique



- Animaux de choix (groupes d'animaux, individus de phénotype extrême)
- Fourniture de matériel biologique approprié/ spécifique (spermatozoides, ovocytes, embryons)
- Méthodes de phénotypage (fertilité femelle) pour animaux utilisables sur populations (Dosages Hormonaux)

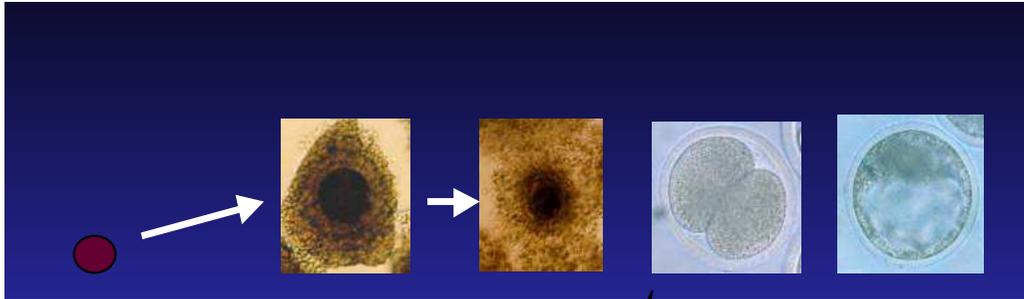




# Les Phenotypes d 'infertilité

(NR / oestrus/ P4 / Prot. Gest PSPB / RP)

**J0** - **J8** **J12** **J18** - **J45**



## I) Non Fécond. / Mortalité Précoce

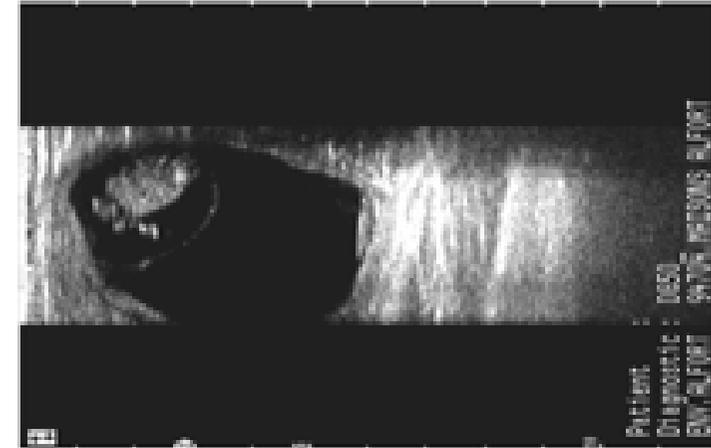
70-75% échecs

Ovulation / oestrus ? 21-24 Jours post AI

## II) Implantation

Mortalité Embryonnaire Tardive

20% échecs / ovulation >24 Jours



## III) Avortements

< 10% échecs

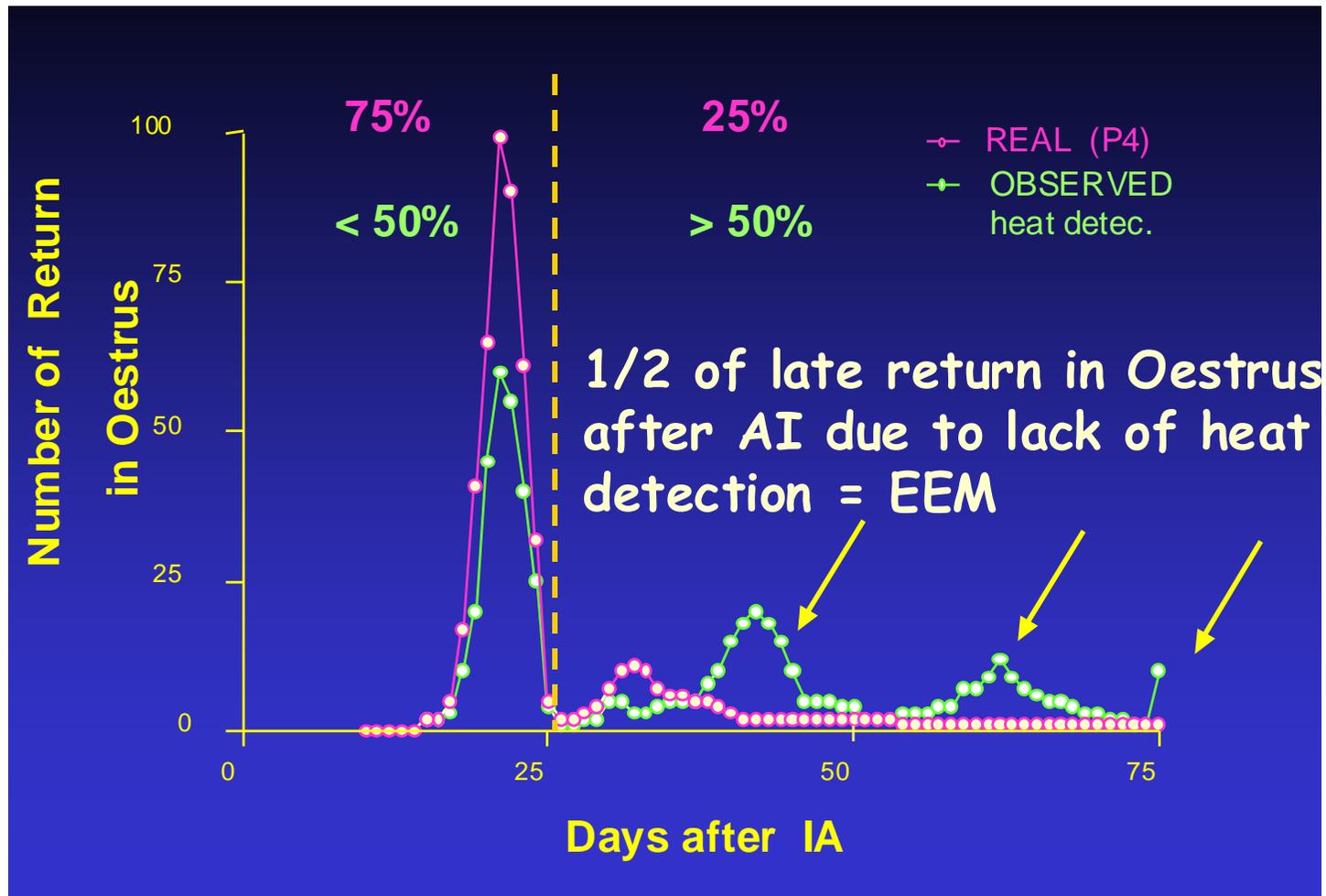
Oestrus >90 jours

Paris 15/01/08

Humblot, 2001

## Frequences des phénotypes d 'infertilité

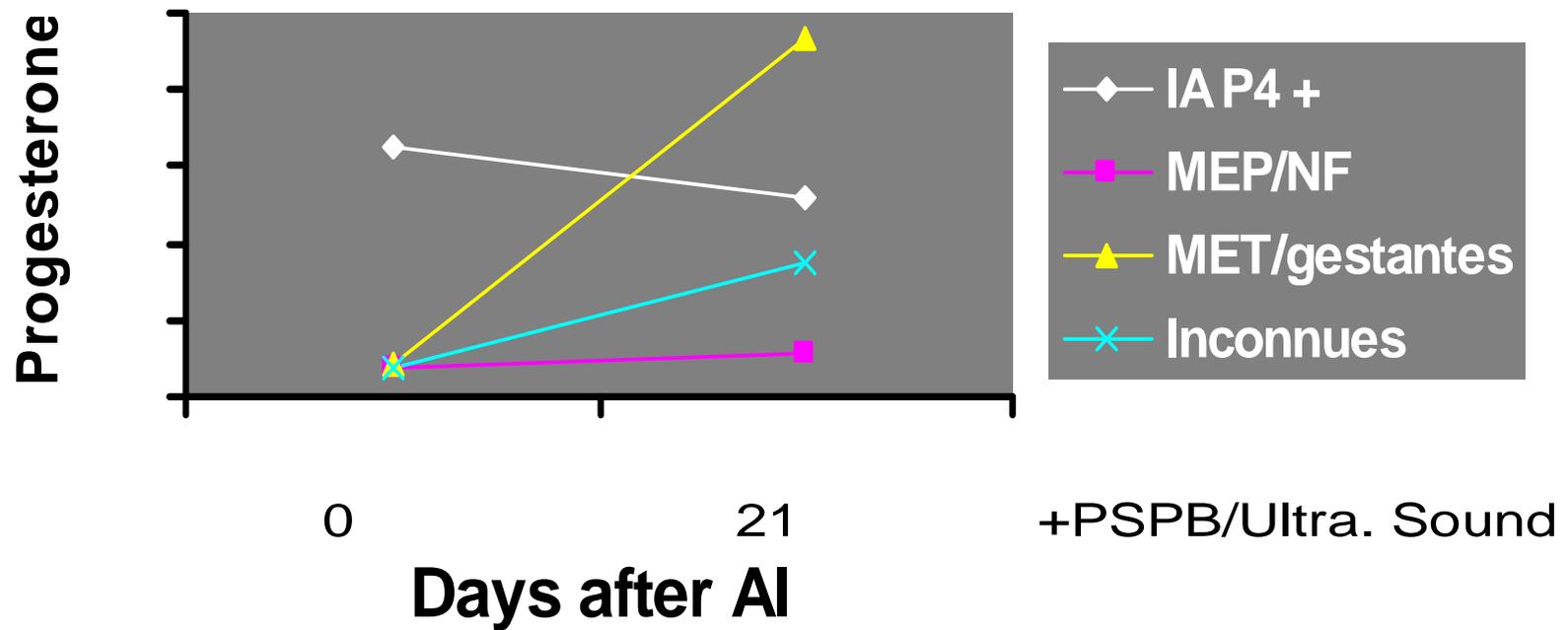
- IA mauvais moment (5 % des AI's)
- Défauts de détection ( effets troupeaux 30 à 40% of AI's) et retours tardifs



Sources de biais dans l'analyse des données d'IA

Paris 15/01/08

## Methodes simples pour affiner le phenotype



- X 1000 vaches (études terrain)
- Impossible systematiquement

# Differentes situations après IA (n=1200 2258 926)

Progesterone (ng/ml)

10  
8  
6  
4  
2  
0

J0

J21

Trop.

Temp

Jours après IA

**PREG**  
29.8%

**LEM**  
14.7%

**AI P4+**  
9.2%

**NP ??**  
14%

**EEM**  
32.3%

**PREG**  
44%

**LEM**  
14%

**AI P4+**  
5%

**NP ??**  
10%

**EEM**  
27%

**PREG**  
40.2%

**LEM**  
16.7%

**AI P4+**  
4%

**NP ??**  
4.6%

**EEM**  
34.5%

# GENIFER: Utilisation des phenotypes d 'infertilité en génomique

Exemple: QTL en relation avec TNR 90 jours,  
Phénotypage pour MEP et MET et typage de 5000 vaches de 12 familles  
Typages associés avec MEP ou MET ???



- **Genomique structurale**  
« Refine Mapping »  
Identification de marqueurs utiles

↓

**Localisation du gène**

**MEP,** **MET**

- **Genomique expressionnelle**
- **Quelles étapes sont reliées aux typages**

↓

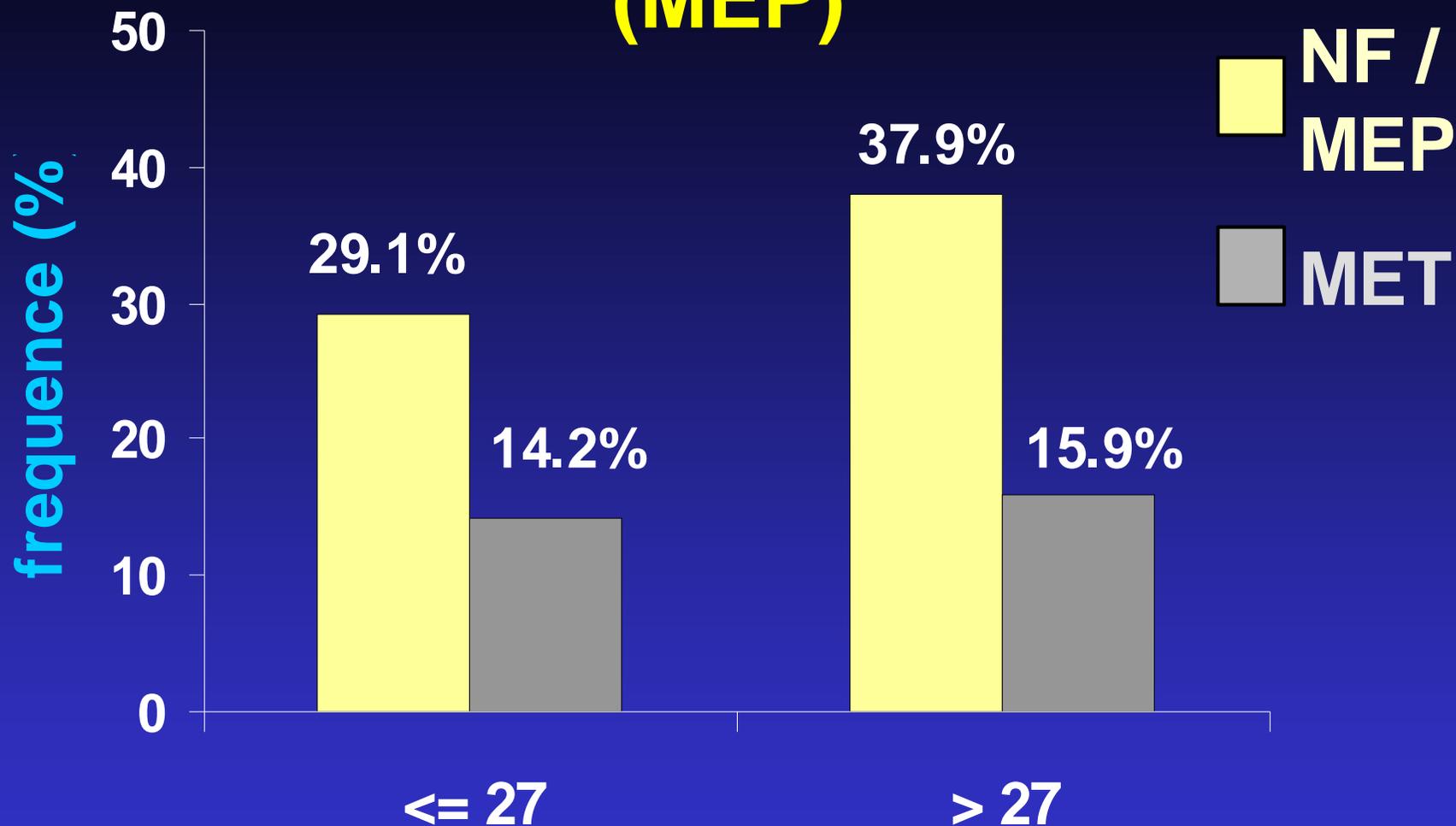
**Choisir tissus**      **Choisir Animaux**

↓      ↙

**MEP**      **MET**

**Ovocyte, Follicles,**      **Uterus**

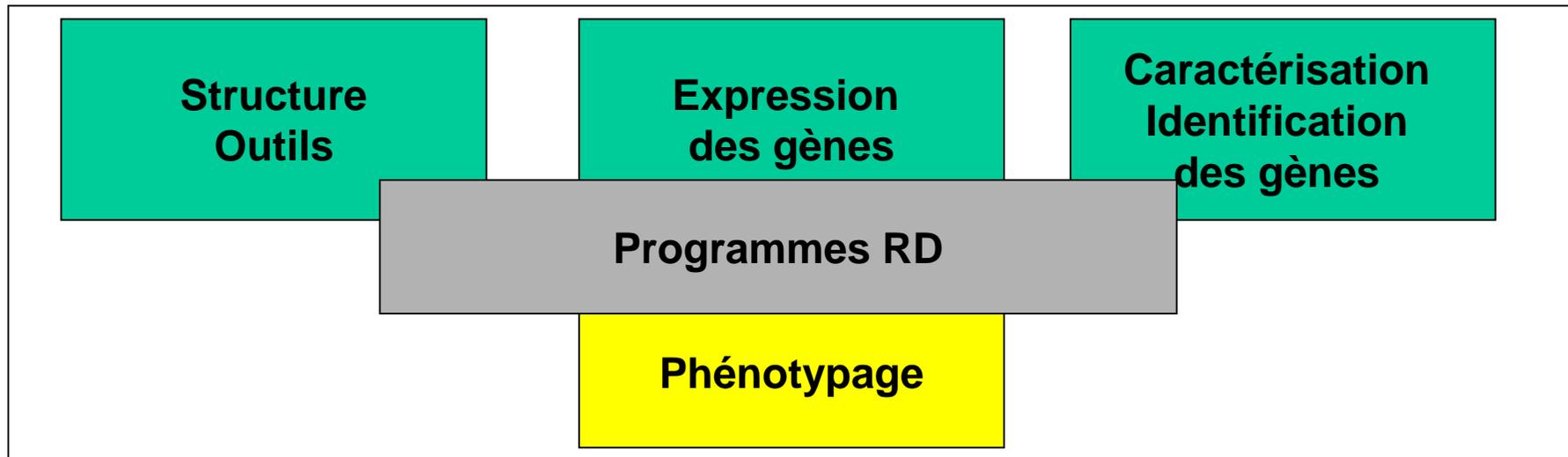
# Effets Génétiques sur la fertilité (MEP)



Index de production lait

Humblot 2001, Grimard et al., 2005

# Place du département R&D UNCEIAdans les programmes de génomique



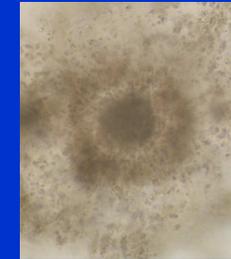
- Animaux de choix (groupes d'animaux, individus de phénotype extrême)
- Méthodes de phénotypage (fertilité femelle) pour animaux en station (répétitions des prélèvements)
- Fourniture de matériel biologique approprié/ spécifique , (ovocytes, embryons)

# Evaluation de l'aptitude au développement de l'embryon in vitro

**Superovulation  
OPU**



**IVM**



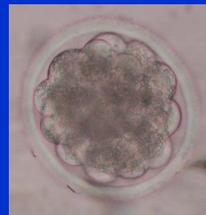
Oocytes Matures

Oocytes Immatures

**13.6 / session  
(5 - 6 / session)**

**IVF**

Transferts frais



SOF

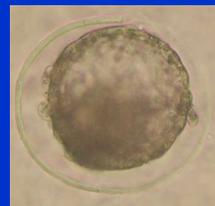
**Culture**



Oocytes Fécondés

**3.75 / session ( 1/session)**

Embryons Congelés



Co-culture Véro cells

**9.3 / session  
(2-3/session)**

In Vitro

J 4



J 6



J 7



In Vivo et In Vitro

J 8-9



# OVOAGENAE : quelles méthodes ?

2/ COLLECTES D'OVOCYTES

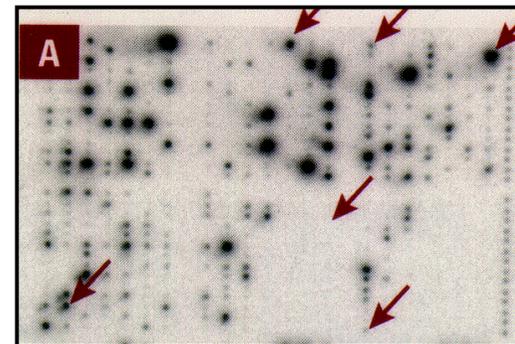
UNCEIA Chateauvillain



TESTS EN LABORATOIRE

1/ Mise au point de membranes

INRA NOUZILLY



TESTS EN LABORATOIRE

3/ Utilisation des membranes

INRA NOUZILLY



Paris 15/01/08

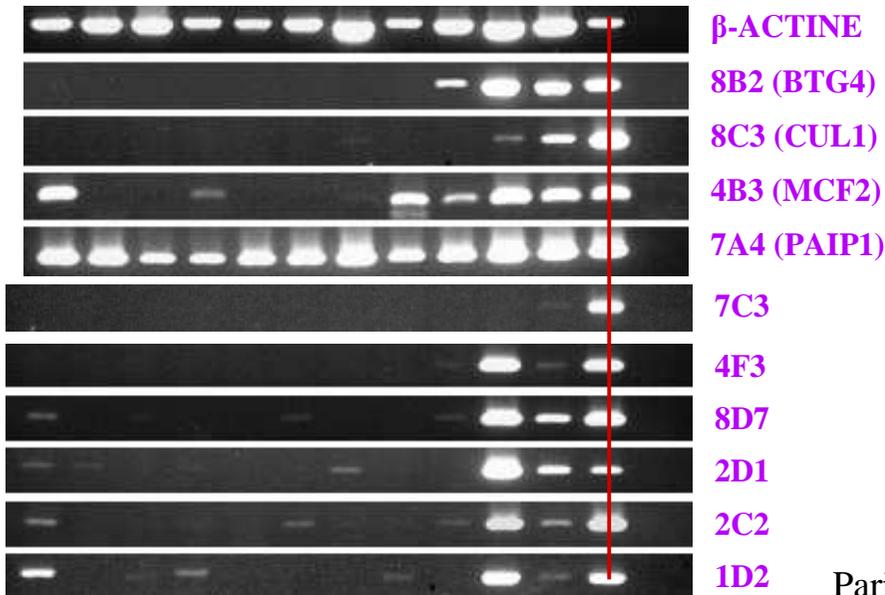
**Genes Candidats**

# OVOAGENAE

**Banque SSH  
ovocyte spécifique**

**Identification of genes  
préférentiellement exprimés dans  
l'ovocyte bovin**

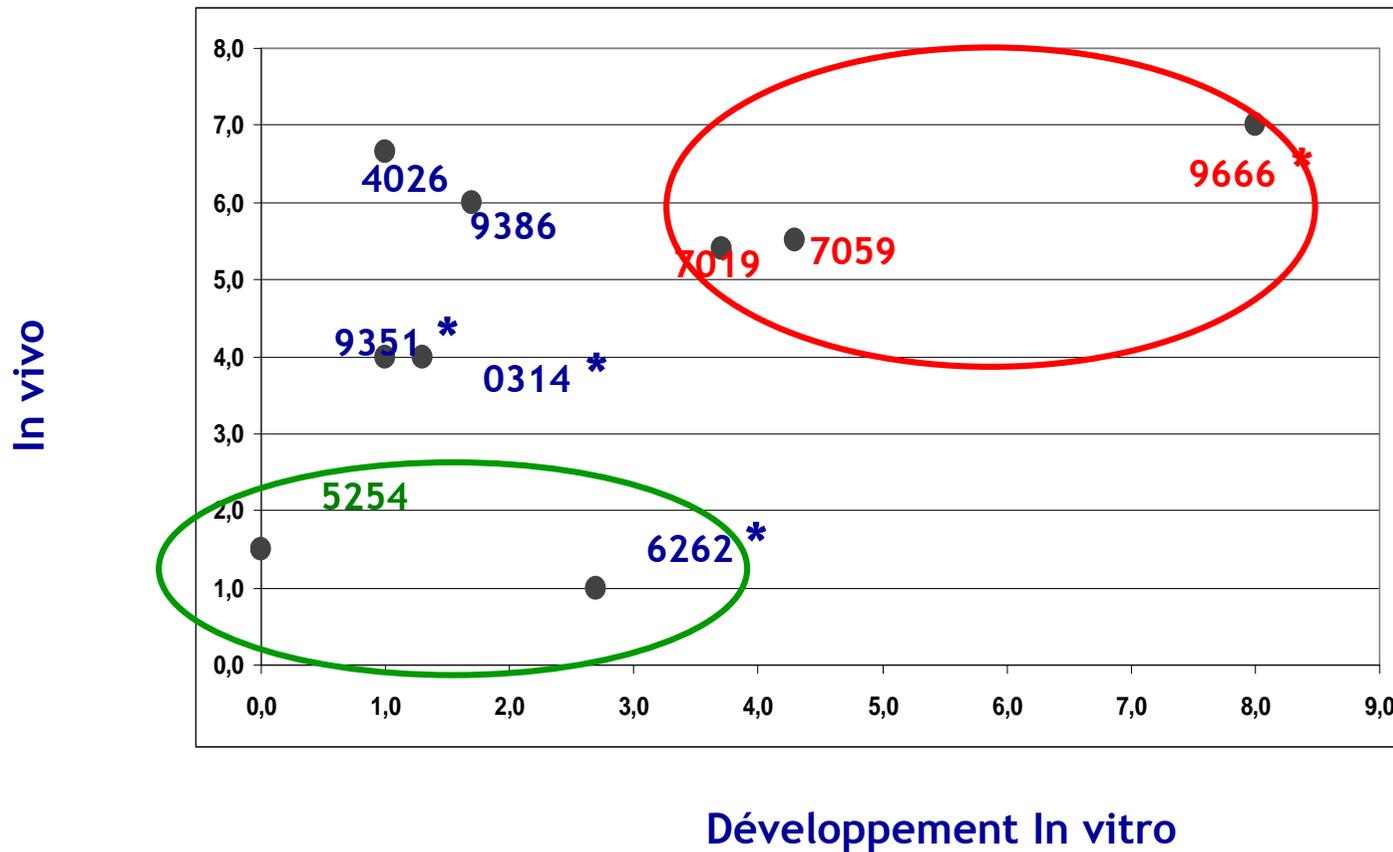
Cerveau  
Coeur  
Hypophyse  
Foie  
Intestin  
Poumon  
Muscle  
Rate  
Utérus  
Testicule  
Ovaire  
Ovocyte  
H<sub>2</sub>O



10 genes Identifies: ovocyte  
ovocyte /testicule ; ovocyte /foie

Genes connus / « Nouveaux»  
Genes

# OVOAGENAE : Identification de femelles « extrêmes » / nombre et qualité des embryons



# Ovoagenae : Perspectives

**Profils d'expression profiles à différents stades ( maturation ovocytaire et développement précoce )**

**Differences d'expression dans des modèles discriminants (« Fertile vs Infertile »)**

**Genes Critiques pour la fertilité (utilisables en sélection )**

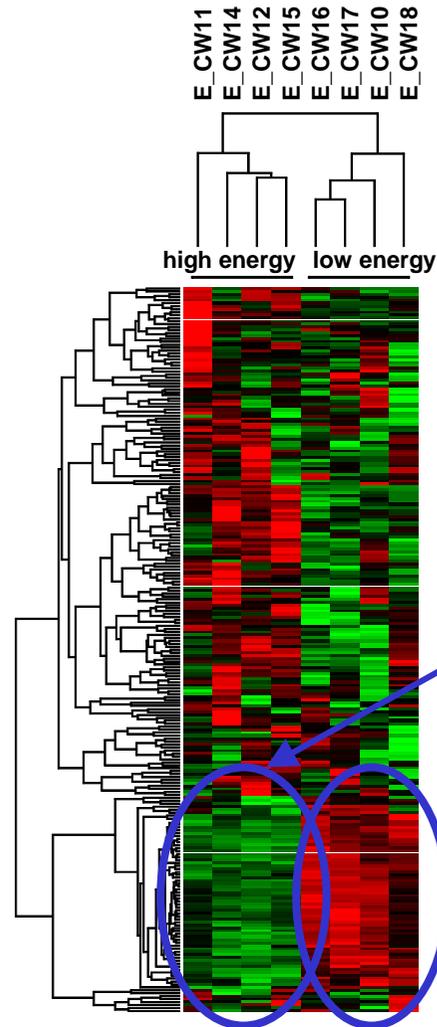
# Génomique : gènes somatiques et fertilité

- Animaux

- Lots

- Gènes différentiellement exprimés

- Vert = sous exprimé
- Rouge = sur exprimé



- 8 animaux

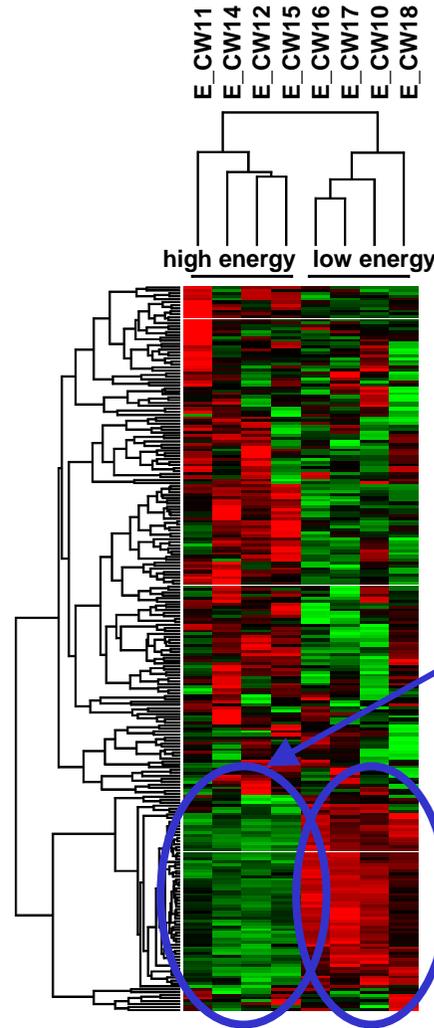
- 2 groupes

- Gènes sous exprimés dans groupe 1

- Gènes sur exprimés dans groupe 2

# Génomique : gènes somatiques et fertilité

- Animaux  
Relation avec le potentiel de développement embryonnaire
- Gènes différentiellement exprimés
  - Mise en relation avec différentes voies métaboliques pour ces gènes



- Gènes sous exprimés dans groupe 1

- Gènes sur exprimés dans groupe 2

# Evaluation phénotypique de la fertilité Femelle :

## Que manque t 'il ??

- **Nouvelles méthodes**
    - Distinguer les cas de Non fécondation et de Mortalité Embryonnaire précoce
    - Caractériser la “qualité ovocytaire”
    - Caractériser les différentes populations d'ovocytes (les ovocytes fécondés sont t'ils identiques aux autres ??) / mieux que chez le mâle
    - Leurs proportions sont t'elles identiques d'un individu à l'autre ?
    - Techniques d'analyse non invasives ? avant la fécondation / dans le follicule / AMH (Follicules)
- \* Un nouveau programme de phénotypage .?????