



HAL
open science

La folliculogenèse ovarienne : études fonctionnelles et comparatives chez des mammifères d'intérêt agronomique

Gwenola Tosser-Klopp

► **To cite this version:**

Gwenola Tosser-Klopp. La folliculogenèse ovarienne : études fonctionnelles et comparatives chez des mammifères d'intérêt agronomique. Biologie du développement. Institut National Polytechnique de Toulouse, 2010. <tel-02949369>

HAL Id: tel-02949369

<https://hal.science/tel-02949369v1>

Submitted on 25 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Institut National Polytechnique de Toulouse

Mémoire présenté par

Gwenola Tosser-Klopp

**en vue de l'obtention du diplôme
d'Habilitation à Diriger des Recherches**

**La folliculogenèse ovarienne : études fonctionnelles et
comparatives chez des mammifères d'intérêt agronomique**

Soutenu le 8 février 2010 devant le jury composé de :

Mme Rozenn Dalbiès-Tran
Mme Madeleine Douaire
M. Hubert Levéziel
M. Hervé Rémignon
Mme Nathalie Viguerie

Chargée de recherches
Directrice de recherches
Directeur de recherches
Professeur
Chargée de recherches

INRA (PRC, Nouzilly)
INRA (DSAPA, Rennes)
INRA (GMA, Limoges)
INP (Toulouse)
INSERM (I2MR, Toulouse)

PROLOGUE

Si je suis aujourd'hui en mesure d'écrire ce mémoire, c'est grâce au soutien et à la collaboration de plusieurs personnes à qui je voudrais exprimer ma reconnaissance. Les premières d'entre elles, d'un point de vue « historique » sont Jacques Mallard, qui a répondu avec enthousiasme, il y a plus de 20 ans, au désir de quelques étudiants de s'orienter vers un DEA de « biologie et agronomie », qu'il a monté en quelques mois et Jean-Marc Frasin, enseignant insolite, qui a attiré mon attention vers la génétique et l'éthique. Je remercie Sandrine Lagarrigue et Frédérique Pitel, étudiantes de ma promotion, qui sont aussi à l'origine de la création de ce DEA et dont les chemins professionnels et humains sont restés proches du mien, je crois. Je dois beaucoup ensuite à Jean Cohen, mon Directeur de thèse, à l'imagination fertile, et à l'équipe « rotavirus » du laboratoire de Virologie et Immunologie Moléculaires, dont l'ambiance de travail mais aussi la capacité à tout abandonner le vendredi soir pour aller boire du « Pampero aniversario », en s'imaginant au pied du « Salto Angel » étaient remarquables. J'ai gardé de cette époque l'amitié de Marie Labbé, mon aînée d'un an. J'avais, au Laboratoire de Génétique Cellulaire, un indicateur, Pitou, qui m'avait brossé un laconique – mais jamais démenti – portrait des habitants de l'époque. En arrivant, c'est finalement le nombre d'appareils PCR qui m'a étonnée : je me demandais comment ils arrivaient à les utiliser tous à la fois, et puis, j'ai commencé à y prendre goût...La vie des laboratoires n'est pas un « long fleuve tranquille » et je mentirais en disant qu'il n'y a pas eu parfois des désaccords. Toutefois, j'ai trouvé au LGC, une ambiance de travail et un climat de confiance très agréables. Je remercie l'ensemble des personnels du Laboratoire, et plus particulièrement François Gasser et François Hatey, animateurs successifs de l'équipe « GDO ». Je remercie également mes autres collègues de l'équipe GDO pour leur aide, leur disponibilité, leurs encouragements et leur soutien : Francis Benne, Agnès Bonnet, Laurence Liaubet, Philippe Mulsant, Janine Rallières, Julien Sarry, Kamila Canale Tabet, sans oublier les participants plus transitoires, Laurence Drouilhet, Stéphane Fabre et Florence Vignoles. Leurs personnalités sont très diverses et très attachantes. J'ai pensé un instant affubler chacun d'entre eux d'un adjectif pour faire comprendre au lecteur de ces lignes quelle diversité a toujours existé au sein de l'équipe. Mais, ceux qui la connaissent bien, savent qu'il y a eu et qu'il y a encore sûrement des « susceptibles », dont je ne veux pas m'attirer les foudres. L'essentiel, finalement, c'est que ça marche ! Merci aussi à Magali San Cristobal, à la « générosité sereine » - qui m'a sauvée l'été de la canicule, alors que j'étais empêtrée dans des données « transcriptome » - et ne m'a pas abandonnée depuis.

En dehors du LGC, je dois beaucoup à plusieurs collègues de la SAGA, de la PRC et de l'ENVT : merci, en particulier à Loys Bodin, Hervé Lefebvre, Philippe Monget et Christèle Robert-Granié.

Je remercie Rozenn Dalbiès-Tran, Hubert Levéziel et Nathalie Viguerie pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce mémoire, Hervé Rémignon pour assurer la Présidence de mon jury d'HDR et Madeleine Douaire pour sa participation à ce jury, en tant que collègue de longue date, dont la bienveillance a toujours été pour moi un soutien et un exemple.

Il n'y a pas que le laboratoire dans la vie : merci aussi à Christophe de m'avoir (entre autres...) si souvent rappelé qu'il fallait écrire ce mémoire et à mes enfants, Antonin, Nolwenn, Enora et Nadège, qui soulignent régulièrement que le temps passe, puisque mes cheveux blanchissent !

SOMMAIRE

Introduction	2
A Les années « virologie »	2
B Bilan de 15 ans au Laboratoire de Génétique Cellulaire.....	3
B.1 1994-2001 : Recherche et caractérisation de gènes impliqués dans la folliculogenèse porcine.....	5
B.1.1 Contexte	5
B.1.2 Résultats: Etablissement d'un répertoire de gènes de la folliculogenèse	6
B.2 1999-2004 Outils génériques pour l'analyse du transcriptome chez le porc	10
B.2.1 Banque multi-tissus	10
B.2.2 Séquençage.....	11
B.2.3 Réseaux génériques d'ADNc	11
B.3 Identification et caractérisation de gènes impliqués dans le développement et l'atrésie folliculaires ovariens	13
B.3.1 Développement folliculaire terminal, modèle porcin.....	14
B.3.2 Développement folliculaire précoce, modèle ovin.....	14
B.3.3 Déterminisme génétique du taux d'ovulation, modèles bovin, porcin et ovin.	15
B.3.4 Expériences en cours (échéance fin 2010)	19
C Activités Complémentaires	20
C.1 Groupes de travail et collaborations.....	20
C.2 Formation et enseignement	20
C.3 Encadrement et animation scientifique	21
D Projet de recherches	21
D.1.1 Génomique ovine	21
D.1.2 Génomique caprine	22
E Conclusion.....	23
F References	24
G Annexe 1 : Curriculum Vitae	26
H Annexe 2 : liste des publications.....	29
H.1 Publications dans des revues à comité de lecture.....	29
H.2 Publications dans des revues sans comité de lecture.....	31
H.3 Communications dans des congrès et colloques	31
H.4 Encadrement et co-encadrement de la recherche	35

INTRODUCTION

Après une formation initiale d'ingénieur agronome, j'ai orienté mes études vers la biochimie et la génétique moléculaires, en effectuant un DEA, que j'ai obtenu en 1990. Dans la continuité de mon stage de DEA, j'ai obtenu une thèse de doctorat en virologie moléculaire en 1993. Depuis 1994, je suis chargée de recherches au Laboratoire de Génétique Cellulaire (LGC) de l'INRA de Toulouse-Auzeville, dans l'équipe « Génétique et Différenciation Ovarienne ». La synthèse de mes travaux, qui est l'objet de ce mémoire, distinguera trois périodes, dont une à venir, dans ma carrière de chercheur : 1990-1993, 1994-2010, 2011- .

La première période a été décisive, dans le sens où elle a révélé mon goût pour la recherche. En effet, j'avais choisi, en dernière année d'études d'école d'ingénieur de faire, en même temps que mon diplôme d'ingénieur agronome, un DEA de biochimie et génétique appliquées. Les deux stages en laboratoire de recherches que j'ai effectués cette année-là m'ont poussée à continuer mes études en thèse de doctorat et à rechercher du travail dans le domaine de la recherche.

La deuxième période est celle de ma carrière de chargée de recherches au LGC. On peut néanmoins la découper en plusieurs étapes : les analyses fonctionnelles qui sont passées d'une petite à une grande échelle entre 1994 et 2000, une implication dans la création d'outils génériques, un élargissement des thématiques de recherche à plusieurs espèces, l'intégration des aspects génétiques.

La troisième période s'annonce avec une réorientation relative de mes recherches vers la génomique des petits ruminants.

Dans ce document, je développerai successivement ces trois périodes de mes activités de recherches puis, je présenterai mes activités d'animation, de formation, d'expertise et ma participation à différents groupes de travail et réseaux scientifiques.

A LES ANNEES « VIROLOGIE »

Durant presque 4 ans, j'ai travaillé dans le Laboratoire de Virologie et Immunologie Moléculaires de l'INRA de Jouy-en-Josas, dans l'équipe de « biologie moléculaire des rotavirus » dirigée à l'époque par Jean Cohen. Les rotavirus, virus à ARN double brin, sont des pathogènes importants à la fois en médecine humaine et vétérinaire. Je me suis plus particulièrement intéressée à une souche pathogène de l'espèce bovine. A l'époque, les questions auxquelles l'équipe de recherches dont je faisais partie tentait de répondre concernaient d'une part l'élucidation d'un certain nombre d'étapes du cycle viral et d'autre part les mécanismes immunitaires de protection contre les rotavirus. L'un des outils, très précieux, pour élucider le rôle de chacune des protéines, structurales ou non structurales d'un virus, consiste à fabriquer des protéines recombinantes, lorsqu'on possède la séquence de l'ARN correspondant et à étudier les propriétés de ces protéines recombinantes (entières, tronquées, chimères entre différents sérotypes ...). Ces protéines recombinantes sont alors étudiées, par exemple, pour leurs interactions avec d'autres protéines virales ou des séquences d'ARN virales, leur capacité à restaurer les activités transcriptase de particules virales incomplètes, les réactions immunologiques qu'elles induisent par injection à des animaux modèles.

Brièvement, mon travail a consisté en l'expression de la protéine recombinante structurale VP6 et en l'étude de ses propriétés structurales, fonctionnelles et topologiques. J'ai pu montrer, en exprimant les protéines VP6 de 2 sérotypes différents que certaines zones de la protéine étaient plus particulièrement impliquées dans l'assemblage de VP6 avec les

« précoces » viraux, tandis que d'autres zones, moins conservées entre sérotypes, sont responsables de la restauration de l'activité transcriptase des particules virales. En outre, certaines zones permettant la formation de trimères de VP6 ont été identifiées. J'ai ensuite étudié, de manière plus approfondie les propriétés topologiques de la protéine VP6, isolée et assemblée dans plusieurs types de particules virales (complètes ou non). Cela a permis de montrer l'existence d'épitopes accessibles aux anticorps monoclonaux étudiés ou cachés dans la particule virale. En combinant ces informations avec la séquence (entièrement ou partiellement) connue des épitopes en question, on a envisagé à l'époque d'utiliser des protéines VP6 recombinantes dont la séquence de l'épitope aurait été remplacée par un peptide donné, afin d'obtenir une réponse immunitaire contre ce peptide.

Je ne souhaite pas développer ici davantage ces travaux, qui ont conduit à 5 publications [2, 3, 5-7], parce qu'ils sont maintenant anciens. Néanmoins, j'aimerais exposer les enseignements que j'ai pu tirer de ces quatre années d'expérience :

- la confirmation de mon goût pour l'étude des séquences et de leur rôle au sens large, pour l'élucidation des mécanismes cellulaires et moléculaires
- l'impression que j'avais une certaine capacité à résister à l'échec et que j'avais la patience et la persévérance nécessaires au métier de chercheur
- le goût de la réflexion et du travail en équipe
- la pratique de nombreuses techniques de biologie moléculaire.

Par ailleurs, j'ai aussi perçu dès cette époque l'importance de l'encadrement des étudiants en recherche, ayant bénéficié d'un Directeur de thèse à la fois disponible, compétent, motivant, sachant trouver les idées et les moyens de les explorer. En revanche, je n'ai eu, à ce moment-là, aucune expérience à proprement parler du travail par projet, la recherche n'étant pas à l'époque, ou en tous cas pas dans ce laboratoire, organisée de cette manière.

B BILAN DE 15 ANS AU LABORATOIRE DE GENETIQUE CELLULAIRE

En septembre 1994, j'ai intégré le laboratoire de Génétique Cellulaire, dont l'organigramme est présenté dans la figure 1, dans l'équipe «Génétique et Différenciation Ovarienne». Ce laboratoire fait partie du département de Génétique Animale et consacre son activité à l'analyse du génome des animaux domestiques (voir organigramme) : cartographies génétique et physique du génome du porc et des volailles, cartographie comparée, cartographie fonctionnelle du noyau (équipes de Génétique Porcine, de Génomique Aviaire, de Cytogénétique), analyse génétique et fonctionnelle de la fonction ovarienne (équipe « Génétique et Différenciation Ovarienne »), structure génétique des populations et structure des génomes (équipe « Biomathématiques et Informatique »). L'objectif global est de fournir des informations et de nouveaux outils utilisables en sélection animale.

L'activité du groupe « Génétique et Différenciation Ovarienne » (GDO) se place dans le contexte général de l'étude du déterminisme génétique d'une fonction importante - la reproduction - pour participer, conjointement aux approches cartographiques, à l'identification de gènes ayant un rôle dans la variabilité des phénotypes aussi bien intra- que inter- espèces. Cet objectif implique des approches génétique, physiologique et moléculaire avec 1) l'isolement systématique et la caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans le développement du follicule ovarien, 2) une approche de clonage positionnel des gènes.

Depuis 2001, l'équipe GDO a développé des recherches sur la qualité de la viande de porc. Mon activité de recherches peut être découpée en trois périodes. De 1994 à 2001, je me suis essentiellement consacrée à l'étude du développement folliculaire antral chez la truie, en identifiant des gènes impliqués dans ce processus. J'ai par ailleurs eu une activité de cartographie des gènes identifiés afin de faire un lien entre le caractère fonctionnel et le caractère positionnel des candidats identifiés. De manière transitoire, de 1999 à 2004, je me

suis fortement impliquée dans la construction d' « outils génériques », pour les équipes travaillant sur le génome porcin. Notre équipe a en effet construit une banque d'ADNc multi-tissus, organisé son séquençage et sélectionné les clones constituant deux générations successives de réseaux de nylon, disponibles pour la communauté scientifique. Depuis 2005, mon activité s'est élargie dans deux directions. D'une part, j'ai étendu mon champ d'études au phénomène d'atrésie folliculaire, qui est un élément du déterminisme du taux d'ovulation. D'autre part, j'ai mené des études comparatives d'espèces dont la stratégie d'ovulation est très différente (espèce mono versus polyovulante, étude de modèles génétiques ovins, présentant des mutations d'hyperprolificité).

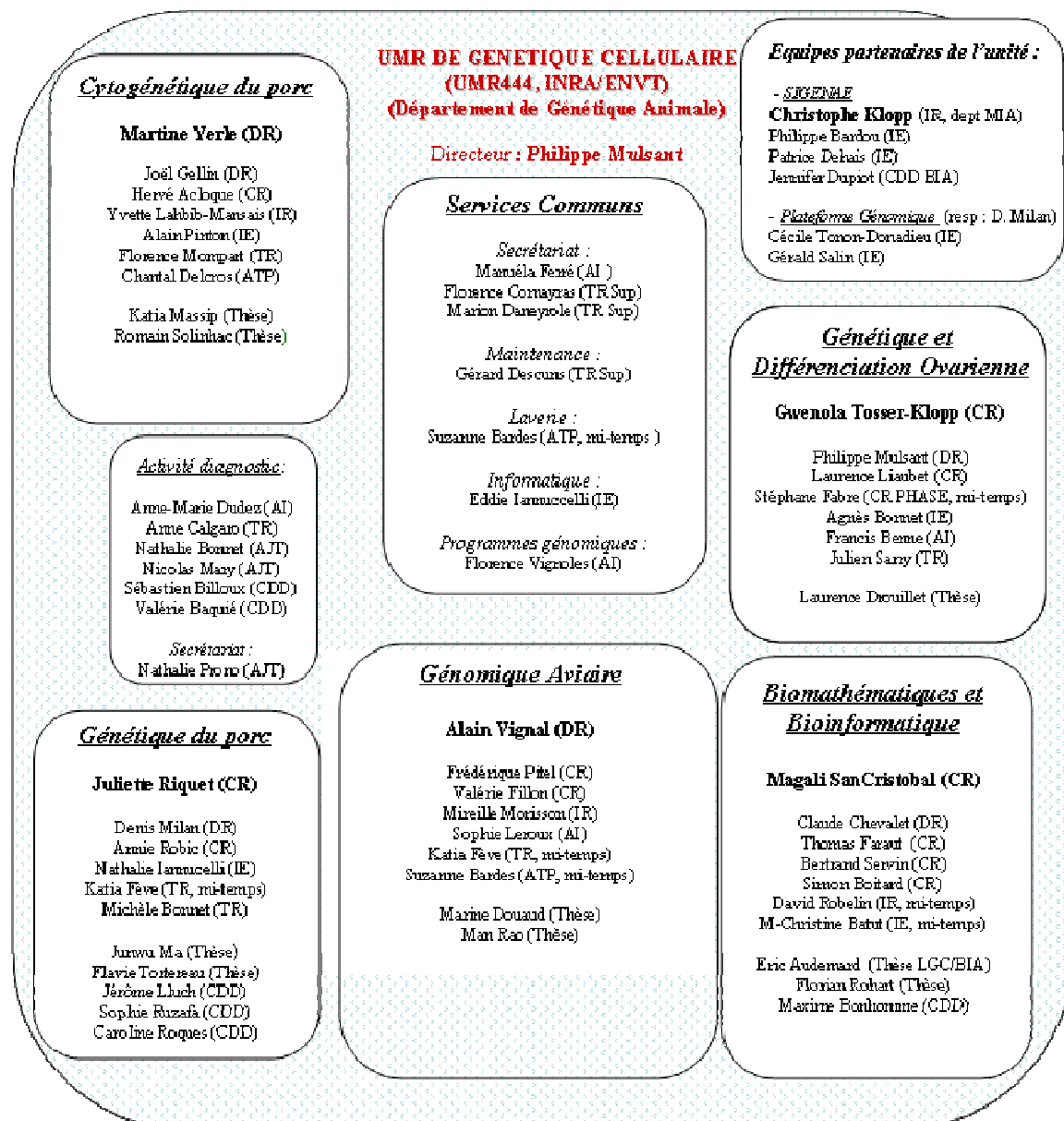


Figure 1 : Organigramme du Laboratoire de Génétique Cellulaire

B.1 1994-2001 : Recherche et caractérisation de gènes impliqués dans la folliculogenèse porcine

B.1.1 Contexte

Mon activité a eu pour objectif l'étude fonctionnelle et génétique de la folliculogenèse ovarienne chez la truie. Il s'agit d'identifier les gènes et réseaux de gènes impliqués dans ce processus et de préciser, d'une part, les lieux, moments et modalités de leur expression dans le follicule, et d'autre part, leur localisation chromosomique. Ces informations permettent ensuite de les considérer ou non en tant que gènes candidats pour des QTL (Quantitative Trait Loci) de prolificité identifiés par ailleurs.

La prolificité a deux composantes essentielles : le taux d'ovulation, aboutissement du développement du follicule ovarien (contrebalancé par le processus d'atréisie qui concerne 95 à 99% des follicules) et la mortalité embryonnaire. Le développement du follicule ovarien est une organogenèse programmée génétiquement, et fortement influencée par l'environnement physiologique de l'ovaire : il est contrôlé par les hormones gonadotropes hypophysaires (FSH et LH) agissant selon un mode endocrine mais aussi par des facteurs stéroïdiens et peptidiques agissant selon un mode para ou autocrine.

Notre modèle d'étude est constitué par les cellules de la granulosa porcine, utilisées selon deux modalités. La première (*in vitro*) est constituée par des cultures primaires. La deuxième («*in vivo*») utilise des cellules fraîches isolées à partir de follicules ovariens dont on a déterminé la taille et l'état (follicules évoluant vers la croissance ou vers l'atréisie). Ces follicules sont eux-mêmes isolés à partir d'ovaires prélevés sur des animaux dont l'état physiologique est connu.

Un gène est important dans le développement du follicule ovarien si une variation qualitative ou quantitative de son expression entraîne, par des relais successifs plus ou moins nombreux, des modifications du taux d'ovulation. Nous avons donc cherché à isoler et à caractériser des gènes régulés par la FSH, hormone jouant un rôle central dans la folliculogenèse. Cette approche, moléculaire, conduit donc à établir un répertoire de gènes hormono-dépendants et intervenant dans la fonction étudiée. La caractérisation de ces gènes permet d'identifier ceux qui, présentant une grande spécificité d'expression, sont susceptibles de jouer un rôle important. Cette spécificité sera par exemple une expression limitée à un type cellulaire donné ou à un stade précis du développement folliculaire. L'objectif est d'apporter ainsi des éléments de réponse aux trois questions suivantes:

- 1) quels sont les gènes impliqués dans la folliculogenèse ?
- 2) où et quand s'expriment-ils dans le follicule ?
- 3) par quoi et selon quels mécanismes sont-ils régulés ?

La seule démarche qui permette aujourd'hui, chez les animaux domestiques, de relier la variabilité du taux d'ovulation et celle des gènes qui en sont responsables est d'associer une approche génétique à l'approche moléculaire présentée ci-dessus. Elle est rendue possible chez le porc par le développement de la carte génique. L'approche génétique permet l'identification des régions du génome où se trouvent les gènes (gènes majeurs et QTL) impliqués dans la variation du caractère dans les familles étudiées ; les informations fournies par l'approche moléculaire sont complétées par la localisation des différents gènes du répertoire sur les chromosomes. La co-localisation d'un QTL et de l'un de ces gènes le désigne comme candidat pour le caractère étudié. C'est une démarche de "candidat positionnel". Elle se poursuit par la recherche d'un polymorphisme de ce gène puis celle d'une association entre ses allèles et la variation de l'expression. Cette démarche, très puissante, est cependant lourde

puisque'elle nécessite la constitution de familles, la mesure du caractère et l'analyse d'un certain nombre de marqueurs.

B.1.2 Résultats: Etablissement d'un répertoire de gènes de la folliculogénèse

B.1.2.1 Sélection des clones par tri différentiel d'une génothèque d'ADNc

Pour isoler des gènes impliqués dans la folliculogénèse, nous avons utilisé des techniques de comparaison entre des cellules traitées ou non par la FSH.

Deux stratégies complémentaires ont été mises en œuvre sur la base d'une régulation par la FSH, le tri différentiel, que j'ai effectué et le " mRNA differential display ", conduit par Catherine Clouscard-Martinato, en thèse au laboratoire, de 1995 à 1998. En effet, le mRNA Differential Display permet d'accéder à des séquences de gènes peu exprimés, ce qui n'était pas possible avec les techniques d'hybridation différentielle. Ensuite, les extrémités 5' et 3' des différents ADN complémentaires obtenus sont séquencées sur environ 300 bases, produisant des " étiquettes " ou " ESTs " (Expressed Sequence Tags ; [1]). La comparaison de ces séquences avec celles contenues dans les bases de données existantes permet éventuellement d'identifier les gènes correspondants.

Le tri différentiel d'une génothèque d'ADN complémentaires permet de sélectionner des ARN messagers régulés plutôt abondants, par comparaison des signaux d'hybridation de deux sondes correspondant à des situations physiologiques différentes. Nous avons utilisé une génothèque construite à partir des ARN messagers de granulosa de truie, cultivées *in vitro*. Les ADN complémentaires ont été synthétisés en utilisant une amorce d'oligo(dT) puis insérés dans un vecteur par l'équipe de D. Caput (SANOFI, Toulouse-Labège). Pour rechercher des ARN messagers hormono-régulés, nous avons hybridé des répliques d'une génothèque d'ADNc avec 2 sondes correspondant l'une à des cellules témoin et l'autre à des cellules traitées par la FSH puis nous avons comparé l'intensité des signaux d'hybridation. Deux tris successifs ont été réalisés, le premier sur colonies bactériennes, le deuxième sur les inserts des clones sélectionnés par le premier tri, que nous avons amplifiés par PCR et déposés sur membranes de nylon. Ainsi, sur environ 40 000 clones triés, 349 ont été retenus après 2 tours de tri. Parmi les 238 clones qui ont été séquencés, 174 ont donné des séquences valides qui correspondent à 136 gènes différents dont 54 ont pu être identifiés, à l'époque, par comparaison avec les banques de séquences [9].

B.1.2.2 Caractérisation des gènes

La caractérisation des gènes correspondant aux clones ainsi obtenus comporte deux volets, l'un fonctionnel, l'autre génétique, c'est-à-dire l'étude des modalités d'expression des gènes d'une part, leur localisation chromosomique et la recherche de polymorphisme d'autre part. L'ensemble des résultats sera d'abord présenté puis l'étude d'un clone particulier, la GST, illustrera la démarche d'isolement et de caractérisation proposée.

Caractérisation fonctionnelle

J'ai étudié, avec l'aide de plusieurs membres de l'équipe, l'expression des gènes dans différents tissus (Northern blot), le profil spatio-temporel de l'expression ovarienne (hybridation *in situ*) et la régulation de leur expression par la FSH dans les cellules en culture.

Contrôle de régulation par la FSH : avant toute caractérisation, nous avons vérifié dans les cellules en culture que le critère de sélection, la régulation par la FSH *in vitro*, était

bien respecté. Parmi les 72 clones ainsi analysés, 30 ont donné des résultats corrects, mettant en évidence une régulation positive ou négative des gènes correspondants par la FSH, 11 autres ne présentaient pas de régulation évidente. Les signaux obtenus pour les clones restants étaient faibles, inexistantes ou impossibles à analyser (par exemple en raison d'un bruit de fond important).

Spécificité d'expression tissulaire : nous avons recherché dans quels tissus s'exprimaient les gènes isolés. Les ARN totaux extraits de différents tissus (cœur, cortex cérébral, estomac, foie, intestin grêle, muscle strié, pancréas, rate, rein, surrénale, testicule, ovaire, corps jaune) ont été hybridés avec différents clones. Cinq gènes ont ainsi été analysés par Northern, avec des résultats très différents, tels qu'une expression ubiquitaire (clone E74) ou au contraire limitée (clone VIH8: GST, voir ci-après).

Profil spatio-temporel de l'expression : l'identification des différents types cellulaires et des stades du développement folliculaire où s'expriment ces différents gènes est réalisée par hybridation *in situ*. L'expression de la GST a ainsi été analysée en détail (voir ci-après), et 6 autres clones ont fait l'objet d'une première investigation; quatre d'entre eux présentent un profil d'expression restreint à certains compartiments cellulaires, contrairement aux deux autres qui sont exprimés dans tout l'ovaire.

Caractérisation génétique

Il s'agissait d'identifier les régions chromosomiques porteuses des gènes correspondant aux clones étudiés.

La localisation des gènes sur les chromosomes a reposé sur l'utilisation d'un panel d'hybrides somatiques. Les données de séquence sont en général suffisantes pour pouvoir définir un couple d'amorces spécifiques permettant d'amplifier la séquence porcine, si elle est présente dans l'hybride, sans amplifier la séquence équivalente du rongeur. En utilisant le panel développé au laboratoire [8], nous avons pu localiser 41 gènes sur 63 analysés. Ces gènes se répartissent sur tous les chromosomes, à l'exception des chromosomes 8, 11 et 15. Pour cinq d'entre eux, nous avons différencié les fragments provenant des deux espèces par une analyse du polymorphisme de conformation, aucune différence de taille n'ayant pu être mise en évidence par une électrophorèse en gel d'agarose. Pour les autres clones, les amorces choisies n'amplifiaient pas l'ADN du porc, ou au contraire amplifiaient un fragment identique sur l'ADN des rongeurs.

Outre les gènes non identifiés, qui présentaient un intérêt pour l'amélioration de la carte transcriptionnelle porcine, nous nous sommes intéressés à un certain nombre de gènes identifiés, présentant un intérêt pour la carte comparée (homme/porc), pour compléter les études développées au laboratoire par l'équipe de cytogénétique (collaboration avec Martine Yerle, Yvette Lahbib-Mansais et André Goureau). A ce titre, nous avons pu mettre clairement en évidence une correspondance entre les chromosomes 10 humain et 10 porc, par une localisation régionale du gène codant pour la vimentine (VIM) et préciser les limites des zones de correspondance entre le chromosome 1 humain et les chromosomes 4, 6 et 14 porcins, en localisant les gènes codant pour la phosphoglucomutase 1 (PGM1), la 3 bêta-hydroxy-stéroïde déshydrogénase (HSD3B) et l'actine 1 (ACTA1) [11].

Il faut noter qu'aucun lien entre les étiquettes identifiées par les approches de tri différentiel et des QTL de reproduction identifiés par ailleurs n'a pu être clairement établi.

En 2001, la caractérisation génétique et fonctionnelle de 44 clones isolés par tri différentiel a été publiée [12]. Par ailleurs, j'ai participé au programme européen GenetPig, conduit par Joël Gellin au laboratoire, et dont le but était d'améliorer la carte transcriptionnelle du porc par la localisation à l'aide d'un panel d'hybrides irradiés [10] de 700 EST porcines. Au commencement de ce projet, 160 étiquettes porcines seulement étaient cartographiées sur le

génomique porcine. Quatre laboratoires européens ont participé à ces travaux (Danemark, Italie, Allemagne et France) et j'ai collaboré, au laboratoire, avec Yvette Lahbib-Mansais pour ce travail. Nous avons eu par ailleurs l'aide de techniciens, recrutés sur le contrat européen : Sophie Leroux et Cédric Cabau.

Glutathion S-transférase (GST)

La glutathion S-transférase (GST) est un gène dont l'expression dans le follicule ovarien nous a été révélée par le tri différentiel puisque 3 clones codant pour cette protéine ont été isolés au cours de ce travail.

- l'analyse de la spécificité d'expression tissulaire révèle que, mis à part l'intestin et le foie, la GST ne s'exprime que dans les tissus stéroïdogènes.

- l'expression dans les cellules de la granulosa en culture est faible dans les cellules témoin, mais elle est fortement stimulée par la FSH ; cette stimulation est inhibée par l'activation simultanée de la voie des protéines kinases C ; ces deux phénomènes sont dépendants de la dose. La démonstration des régulations de l'ARN messager a été réalisée à la fois par Northern et par RT-PCR.

- enfin, l'analyse par hybridation *in situ* sur coupes d'ovaires montre que l'expression de la GST varie en fonction du développement du follicule ovarien : présente dans la thèque interne des follicules sains de petite taille, cette expression se manifeste également dans la granulosa des follicules de de Graaf mais elle disparaît dans les follicules en état d'atréxie avancée (Figure 2). Par ailleurs, pour une même taille de follicule, nous n'avons pas pu mettre en évidence de variabilité de l'expression liée à la phase, folliculaire ou lutéale, du cycle.

La question est posée du rôle de cette enzyme de détoxification dans le follicule ovarien. L'hypothèse d'une intervention dans la biosynthèse des hormones stéroïdes, qui repose sur l'activité isomérase que présente également cette protéine, se trouve confortée ici 1) du fait de sa régulation par la FSH qui stimule cette biosynthèse, 2) par une expression relativement spécifique des tissus stéroïdogènes, et 3) par une colocalisation avec une autre enzyme de la biosynthèse des hormones stéroïdes, la 3 beta hydroxystéroïde déshydrogénase, qui intervient dans la conversion des delta 5-stéroïdes en delta 4-stéroïdes. Des contacts ont été pris avec des chercheurs qui étudient la détoxification (Laboratoire des Xénobiotiques INRA Toulouse), mais les expériences de purification de la protéine à partir des cultures cellulaires n'ont pas abouti. En revanche, des expériences de colocalisation avec d'autres enzymes de la stéroïdogénèse ont été réalisées avec Hélène Quesnel (UMRVP, INRA Rennes Saint Gilles). Les autres résultats obtenus portaient sur la détermination de la totalité de la séquence de l'ADN complémentaire et la localisation chromosomique du gène correspondant. La connaissance de la séquence permet de ranger cette GST dans la classe des GST de type alpha. De plus, cette localisation sur le chromosome porcine *Sscr7* confirme son orthologie avec le gène humain de type alpha : ce gène est localisé chez l'homme dans la région correspondante du génome, le chromosome *Hsap* 6; les autres types de GST sont localisés chez l'homme sur d'autres chromosomes, qui correspondent chez le porc à des chromosomes différents de *Sscr7*.

A l'époque, nous avons songé à valoriser ces résultats sous la forme d'une publication. Mais, c'est finalement seulement en 2008 qu'Agnès Bonnet a publié une partie de ces résultats en décrivant une expérience qui avait également isolé la GST [19]. Par ailleurs, l'équipe de Mohamed Benahmed (INSERM, U407, Lyon) a utilisé la séquence de cette GST comme sonde et a démontré que l'expression de la GST était sous le contrôle de la FSH et de la testostérone dans les cellules de Sertoli [13].

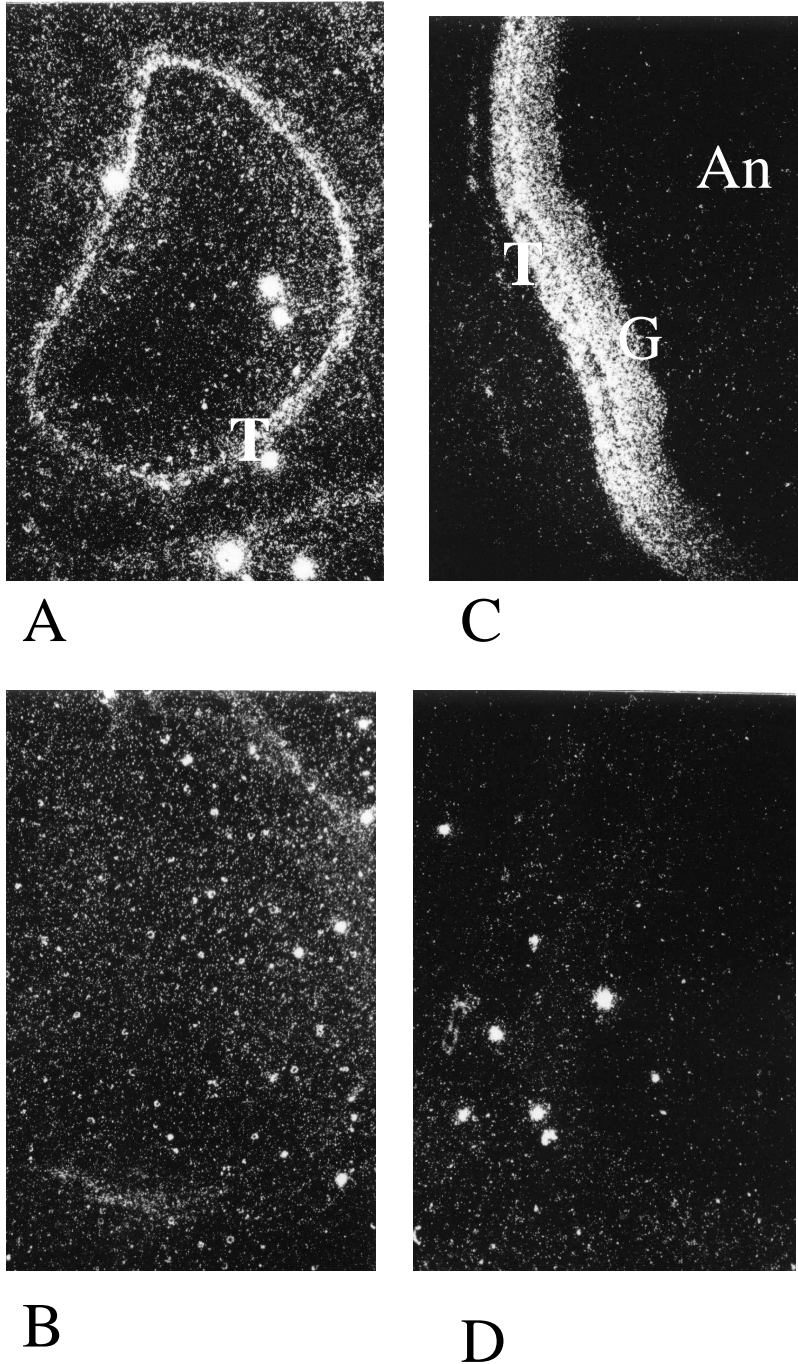


Figure 2 : Hybridation *in situ* d'une sonde de GSTA sur coupes d'ovaires de truie.

Les coupes ovariennes ont été hybridées avec une sonde ARN de GSTA sens, témoin négatif, (B et D) ou antisens (A et C) sur coupes d'ovaires de truie. Les cellules de la thèque (T), de la granulosa (G) et l'antrum (An) sont indiqués. Le marquage est spécifique de la thèque des follicules de taille inférieure à 1 mm (A et B) et s'étend à la granulosa des follicules de grande taille, 5mm ici (C et D).

Durant cette première période d'activités au Laboratoire de Génétique Cellulaire, j'ai tout d'abord participé à des projets existant à mon arrivée (tri différentiel), puis, en fonction des résultats obtenus, j'ai orienté mes recherches vers des thématiques adjacentes (caractérisation des gènes identifiés, cartographie d'étiquettes), le rôle de coordinateur revenant au(x) chef(s) d'équipe (François Gasser puis François Hatey). Pour ce faire, j'ai bénéficié de l'appui d'un certain nombre de stagiaires et personnels en CDD, dont certains de longue durée (un an ou plus), que j'ai encadrés : Sophie Cayré m'a aidée dans les expériences de tri différentiel, Sophie Somnard, Emmanuel de Billy et Fabienne Bodin dans les analyses fonctionnelles, Elsa Bonnafé, Virginie Gindraud, Sylvie Perret, Cédric Cabau, Benoît Tournan, dans les expériences de localisation. J'ai aussi bénéficié des forces techniques de l'équipe (Francis Benne, Agnès Bonnet et Janine Rallières). C'est auprès de ces personnes que j'ai acquis une expérience de l'encadrement.

Mon rôle a été de mener les expériences concernant le projet de tri différentiel et la caractérisation des gènes identifiés, de mobiliser les ressources technologiques et humaines et de valoriser les résultats obtenus. Pour mener le projet de tri différentiel, j'ai rapidement eu à résoudre deux difficultés : la première était le dispositif de séquençage des clones et la seconde la gestion des données. En effet, le projet initial prévoyait du séquençage manuel et j'ai décidé de profiter de l'arrivée récente d'un séquenceur automatique au laboratoire pour changer de technologie. Par ailleurs, la gestion de l'abondance des matériels et des données récoltées (clones bactériens, préparations d'ADN, séquences...) n'avait pas été anticipée. Au sein du laboratoire, Denis Milan et Eddie Iannuccelli avaient des compétences pour la création de bases de données et ils ont construit, avec le logiciel 4D, une base de données qui m'a beaucoup aidée dans la gestion quotidienne des résultats de mes expériences.

B.2 1999-2004 Outils génériques pour l'analyse du transcriptome chez le porc

B.2.1 Banque multi-tissus

Lorsque ce projet a été initié, les banques d'étiquettes porcines étaient relativement pauvres. Fin 1998, par exemple, on disposait de 4000 EST porcines dans les banques de données internationales et, fin 2000, il n'y en avait encore que 50 000. En outre, même si le séquençage du génome humain était en cours, le séquençage du génome du porc était un horizon très lointain. Les banques d'ADNc constituaient donc une ressource majeure pour la connaissance des séquences exprimées et en posséder une, de bonne qualité dans son propre laboratoire ou Institut de recherches était un atout indéniable. C'est pourquoi, à l'INRA, un groupe de scientifiques a eu l'idée de lancer, simultanément dans quatre espèces, la construction et le séquençage d'une banque d'ADNc. Ces banques se voulaient « universelles », puisque les ARNm les constituant venaient de plusieurs tissus et néanmoins non redondantes, puisqu'on avait prévu, dès le départ de les normaliser. François Hatey étant l'un des initiateurs du projet, notre équipe a été impliquée dans la construction de la banque porcine.

Dans le cadre du projet Asteroger/Agenae, Agnès Bonnet et moi-même avons pris en charge la construction de la banque normalisée multi-tissus porcine. La stratégie de construction, de normalisation et de soustraction de la banque retenue est celle de Soares *et al.* [4], et, à mi-parcours, Agnès Bonnet est allée dans le laboratoire de Bento Soares (University of Iowa, Iowa, US) en février 2001 pour acquérir une expérience dans la construction de ce type de banques.

La première étape a été la collecte des ARN totaux auprès des équipes INRA, puis la validation des échantillons (dosage, analyse par électrophorèse, aptitude à la réverse transcription). Nous avons ainsi validé 41 échantillons d'ARN que nous avons regroupés en 6 pools. Les ARN messagers (poly A+) correspondants ont été utilisés pour construire les 6

banques correspondantes. La banque multi-tissus obtenue par mélange des 6 banques a été normalisée, résultant en une banque de $6,4 \cdot 10^6$ clones initiaux, avec des inserts de 1 kb en moyenne et environ 2% de clones vides. Dans une deuxième étape, près de 9 000 clones séquencés ont été soustraits de la banque initiale, afin d'éviter l'augmentation de la redondance, lors de la poursuite du séquençage. La banque soustraite contient 60 000 clones.

B.2.2 Séquençage

- une première série de 8 736 clones de la banque normalisée a été organisée et séquencée en 5' et en 3'. Un total de 11 843 séquences valides a été déposé dans la base de données de séquences EMBL (2002-2003).

- après soustraction, 14 976 clones ont été organisés et séquencés en 5'. Un total de 12 838 séquences valides a été déposé dans la base EMBL en 2003 et 2004.

L'organisation et l'envoi des clones ont été réalisés par le Centre de Ressources Biologiques de l'INRA de Jouy en Josas (CRB-GADIE). Le séquençage a été effectué par une compagnie privée. Le financement a été assuré par l'INRA dans le cadre du projet AGENAE puis par le ministère de la recherche dans le cadre de l'appel à projet Genanimal de 2003.

Divers outils bioinformatiques ont été développés, en collaboration, par Eddie Iannuccelli et l'équipe SIGENAE de l'INRA (Figure 1). Il s'agit, d'une part, d'outils permettant l'étude et la validation des séquences effectuées par le prestataire de services (détermination du nombre de bases de bonne qualité hors vecteur et adaptateur, mise en place d'un séquençage de contrôle afin de vérifier qu'il n'y a pas eu de confusion de plaque ou d'inversion du sens d'une plaque) et, d'autre part d'outils permettant d'évaluer la qualité des banques : nombre de clones vides, détermination de la taille des inserts, redondance.

L'équipe SIGENAE a réalisé l'assemblage de toutes les séquences disponibles, publiques ou privées. Le dernier assemblage a défini 77 300 « contigs » et 4% d'entre eux sont spécifiques de la banque réalisée au laboratoire (Figure 3). Par ailleurs, 60% d'entre eux sont représentés par au moins un clone dans les collections du CRB-GADIE. Nous disposons donc d'une ressource de bonne qualité pour des études d'expression.

B.2.3 Réseaux génériques d'ADNc

- En 2003, nous avons établi une première liste comprenant 1 056 clones AGENAE (redondance d'environ 10%) ainsi que des témoins exogènes. Cette liste a permis au Centre de Ressources Biologiques de préparer et de mettre à la disposition de la communauté scientifique une première membrane générique de type « macro-array » nylon (8 x 12 cm).

- Sur la base des 77 300 contigs résultant de l'assemblage des 300 486 séquences publiques réalisé en avril 2004, nous avons choisi les contigs et les clones qui sont présents sur le réseau générique, en concertation avec les membres de la communauté « porcine » de l'INRA et en fonction de la disponibilité des clones correspondants. Nous avons aujourd'hui établi une collection de 8 960 clones représentatifs d'autant de contigs différents. Cette collection est majoritairement basée (90%) sur la banque Asteroger, complétée par des clones USDA, danois (C. Bendixen) et quelques clones isolés par des équipes de l'INRA. Ce travail, piloté par notre équipe, est réalisé en étroite collaboration avec l'équipe SIGENAE. Les produits PCR de ces clones et de témoins ont été déposés sur une membrane de nylon (2,5 x 7,5 cm) par l'équipe du CRB-GADIE, qui assure la distribution de ce support, référencé GPL3729 dans la base de données GEO (Figure 4). Cette puce a été produite en 600 exemplaires, permettant de réaliser 665 hybridations dans quatre laboratoires différents.

Notre engagement dans ce projet a nécessité de notre part un fort investissement méthodologique qui nous a permis de construire une banque multi-tissus de très bonne qualité. Son séquençage a permis de déposer près de 25 000 séquences d'EST, contribuant de

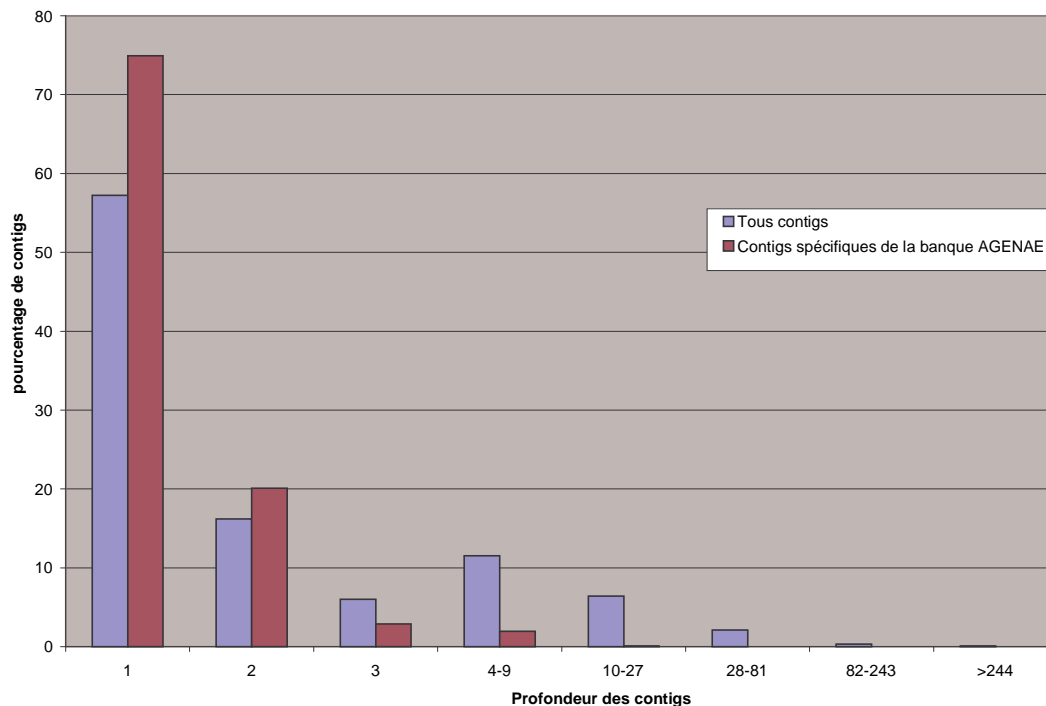


Figure 3 : profondeur des contigs spécifiques de la banque AGENAE porcine, en comparaison avec l'ensemble des contigs disponibles dans l'assemblage du 30/01/2006

La figure indique la répartition (%) des contigs en fonction de leur profondeur, pour l'assemblage complet d'une part (en bleu) et pour les contigs spécifiques de la banque AGENAE (en rouge).

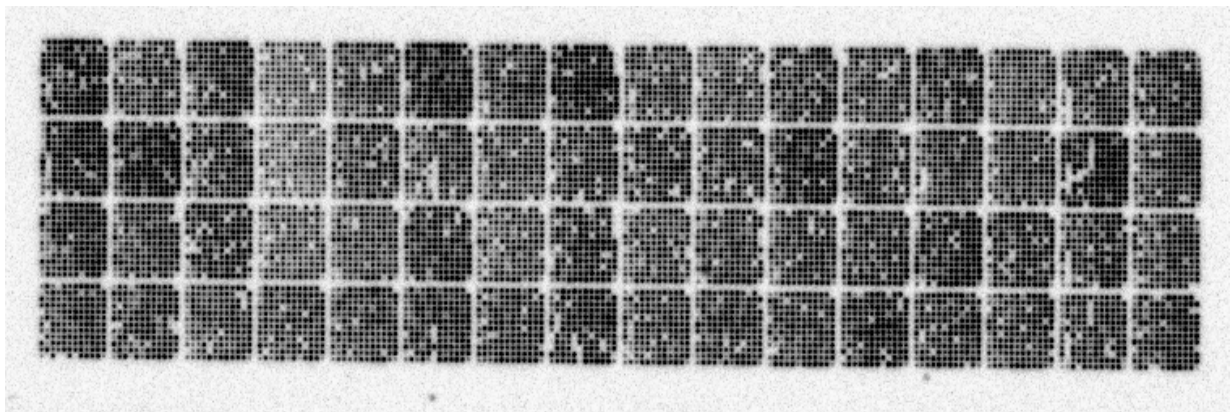


Figure 4 : Micromembrane de 9216 ADNc porcins, déposée sous le nom GPL3729 dans la base GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>).

La membrane (64 blocs de 144 spots) a été hybridée avec une sonde oligonucléotide, permettant la détection de tous les ADNc spottés sur la membrane et la vérification de l'absence de contamination entre les spots grâce à des témoins négatifs (en haut à droite de chaque bloc).

manière non négligeable à alimenter les bases de données internationales. Fin 2004, les données de séquence d'EST pour le porc avoisinaient les 400 000 et il est aujourd'hui de 1 500 000 ; il nous a donc semblé que notre rôle n'était plus de produire de nouvelles données de séquence, en tout cas pas de manière systématique et globale comme nous l'avons fait dans le cadre du projet ASTEROGGER/AGENAE. On peut d'ailleurs noter que ce projet, qui a été initié dans 4 espèces en parallèle (truite, poule, vache et porc) a dû s'adapter à l'actualité. L'équipe qui a construit la banque multi-tissus chez la poule (UMR de Génétique Animale, Rennes) a interrompu son séquençage après 20000 séquences environ, devant l'augmentation des séquences disponibles dans les banques de données internationales. En revanche, pour la truite, le SCRIBE avait produit à l'issue du programme plus de 40% la moitié des séquences disponibles au niveau mondial [14]. Pour l'espèce porcine, la situation a été intermédiaire : nous avons contribué de manière modeste aux bases de données internationales. La construction, la caractérisation de la banque, ainsi que la description de la membrane générique ont été publiées début 2008 [20].

Au cours de ces travaux, je n'ai pas encadré de stagiaire. En effet, il me semblait délicat de confier ce type de travaux, pour lesquels nous débutions, à des étudiants. J'ai eu l'aide de Sandrine Villéger, en CDD, puis, comme je partais en congé de maternité, la suite des expériences a été confiée à Agnès Bonnet, à qui j'ai transféré mon savoir-faire. C'est elle qui, après un séjour dans le laboratoire de Bento Soares, a construit la banque multi-tissus. A mon retour, je me suis plus particulièrement chargée de la gestion du projet de séquençage, puis de la conception de la puce à ADN générique. J'ai pu à cette occasion mesurer l'importance des procédures permettant de transférer les savoirs. Plus généralement, ce projet a été riche d'enseignements concernant la coordination d'un projet réalisé en parallèle dans plusieurs laboratoires et nous a permis de collaborer avec un laboratoire américain ayant une grande expérience de la construction de banques d'ADNc. Cela a également été l'occasion de créer des liens avec les utilisateurs de la puce à ADN porcine.

B.3 Identification et caractérisation de gènes impliqués dans le développement et l'atrésie folliculaires ovariens

Au cours de ces quatre dernières années, tout en valorisant les études démarrées sur le développement folliculaire terminal, chez la truie, nous avons étendu nos champs d'études au développement folliculaire précoce (modèle brebis), à la comparaison du développement folliculaire terminal et de l'atrésie folliculaire entre deux espèces mono (vache) et polyovulante (truie) et à l'analyse de transcriptome de tissus cible, en relation avec des mutations responsables de phénotype d'hyperprolificité dans la race ovine. Ces différentes approches ont toutes pour finalité d'identifier des gènes impliqués dans le développement folliculaire ou l'atrésie folliculaire.

Avant d'exposer les résultats des études que nous avons menées, je voudrais souligner quel changement d'échelle a eu lieu de manière relativement brutale dans nos études. Alors qu'en 1994, on pensait qu'une première révolution technologique s'était opérée puisqu'elle nous permettait d'analyser les gènes par dizaines ou centaine, dans les années 2000, on est passé à l'étude de milliers de gènes simultanément. Cela a eu deux conséquences au moins : d'abord, il est devenu difficile pour les laboratoires de fabriquer eux-mêmes leurs outils de criblage (puces à ADN, pour ce qui nous concerne) et on a assisté au développement de plate-formes technologiques (génopoles, centres de ressources...) et ensuite, les biologistes effectuant ce type d'expériences ont dû compléter leur formation en statistiques. En effet, il s'est vite avéré que, pour beaucoup de statisticiens, les données du transcriptome présentaient pas ou peu d'intérêt et que pour quasiment tous les biologistes, le traitement de ces données était difficile voire impossible. J'estime avoir eu, dans cette évolution une grande chance parce que notre laboratoire comporte une équipe de biomathématiciens et que, parmi eux, Magali San

Cristobal a montré d'abord de l'intérêt pour ce type de données - et les a traitées pendant les premières années- puis de la patience et de la pédagogie pour nous faire acquérir une certaine autonomie dans ces analyses. Cela a, de plus, été l'occasion de former deux groupes de travail concernant l'analyse statistique des puces à ADN, comportant des biologistes et des statisticiens et d'établir des liens et des collaborations avec plusieurs d'entre eux. Par ailleurs, nous avons pu bénéficier, à Toulouse, des infrastructures de la génopole toulousaine, qui nous a permis de fabriquer un certain nombre de puces « maison » avant de recourir aux puces génériques fabriquées par le CRB-GADIE, les puces commerciales devenant aujourd'hui incontournables.

B.3.1 Développement folliculaire terminal, modèle porcin

Pour ce volet de recherches, Agnès Bonnet a mené toutes les expériences d'hybridation Soustractive Suppressive et en a fait l'analyse. J'ai donc eu plutôt un rôle d'encadrement, avec François Hatey, qui était l'animateur de l'équipe à cette époque. J'ai mené de mon côté l'étude de faisabilité concernant un transcriptome à petite échelle (1000 gènes) des granulosa porcines, issues de follicules à divers stades de développement.

Deux modèles successifs ont été étudiés : d'abord des cultures de cellules primaires, puis des cellules de granulosa issues de follicules ovariens calibrés, qui n'ont pas été cultivées.

L'étude *in vitro* de cultures cellulaires de granulosa stimulées ou non par la FSH a identifié par Hybridation Soustractive Suppressive puis caractérisé par RT-PCR ou Northern 25 gènes régulés par la FSH. L'analyse de ces résultats suggère un rôle de la FSH dans la modulation de l'activité peroxydase et le remodelage de la chromatine et a fait l'objet d'une publication [15].

Nous avons complété nos recherches sur le développement folliculaire terminal par une étude *in vivo* sur cellules de granulosa fraîches, prélevées sur des follicules d'état physiologique sains et à différents stades de développement (PF, MF, GF) afin d'entourer la phase d'acquisition du récepteur de la LH. Après une étude de faisabilité sur une puce générique de petite taille [22], nous avons réalisé une analyse du transcriptome, sur puce dédiée, dans laquelle 79 gènes ont été identifiés comme différentiellement exprimés entre les 3 stades. L'intégration des données met en évidence 5 réseaux de gènes et suggère en particulier un changement de forme des cellules de la granulosa au cours du processus terminal de la folliculogénèse [19].

B.3.2 Développement folliculaire précoce, modèle ovin

Ce projet ANR, Refollis, est mené par Agnès Bonnet. J'interviens comme appui scientifique. Dans différentes espèces comme par exemple chez les ovins et les rongeurs, plusieurs mutations de gènes intervenant précocement et provoquant la stérilité ou l'hyperprolificité en fonction du génotype ont été identifiées. Ces travaux démontrent que le bon déroulement de la folliculogénèse précoce est une étape cruciale pour la fonction ovarienne qui conditionne la durée de reproduction et la fertilité. Cependant les études des mécanismes contrôlant ces premières étapes sont limitées à cause de la taille et la quantité du matériel d'intérêt présent dans l'ovaire.

Nous avons donc cherché à étudier de manière la plus complète possible l'expression génique au cours des stades précoces du développement folliculaire. Nous nous sommes appuyés sur la spécificité des brebis de race Lacaune chez lesquelles il existe une mutation naturelle *FecX^L* dans le gène *BMP15* qui provoque à l'état homozygote un blocage de la folliculogénèse au stade du follicule primaire. En complément de l'étude globale de l'expression génique, les brebis mutées homozygotes permettront d'étudier le rôle du gène *BMP15* au stade primaire.

Nous avons tiré parti du développement de la microdissection à capture laser pour isoler les 2 compartiments d'intérêt (oocyte et granulosa) pour les 3 premiers stades folliculaires (primordial, primaire et secondaire). Ce projet combine ensuite 2 méthodologies : l'amplification des ARN et le transcriptome sur puce Affymetrix bovine (hybridation hétérologue). Le rôle fonctionnel des gènes sera étudié sur culture organotypique, par le laboratoire BDR (INRA Jouy-en-Josas). Le développement méthodologique a été financé par l'ANR GENANIMAL 2007. Les résultats suggèrent une faible contamination des échantillons. Les résultats préliminaires du transcriptome (1 échantillon par groupe) montrent environ 8000 gènes exprimés. Des gènes spécifiques de l'oocyte ou des cellules de la granulosa ont été identifiés et sont en cours de validation en RT-PCR en temps réel.

B.3.3 Déterminisme génétique du taux d'ovulation, modèles bovin, porcine et ovin

Depuis 2005, nous participons aux programmes ANR « Genovol » et européen « SABRE », pour des volets centrés sur l'étude du déterminisme génétique du taux d'ovulation, en tirant parti des comparaisons inter et intra-espèce. Dans ce cadre, je collabore avec deux unités de l'INRA : la SAGA (Loys Bodin, Christèle Robert-Granié) et la PRC (Stéphane Fabre et plusieurs autres chercheurs).

B.3.3.1 Comparaison vache-truie

Différents arguments indiquent que le polymorphisme inter-espèces se trouve plus fréquemment dans les régions promotrices et régulatrices des gènes. Une partie au moins de l'analyse comparative de la fonction ovarienne (comme des autres fonctions) peut profitablement être réalisée au niveau de l'expression des gènes. Ainsi, la comparaison de l'expression des gènes au cours de la folliculogénèse et de l'atrésie dans deux espèces différentes permet d'identifier les gènes dont les profils d'expression sont semblables ou au contraire différents ; les premiers correspondent probablement à des fonctions fortement conservées, et les seconds sont sans doute impliqués dans des mécanismes responsables, au moins en partie, des différences de folliculogénèse entre ces deux espèces.

Dans ce cadre, nous avons réalisé une analyse du transcriptome qui cible à la fois le développement folliculaire antral et le phénomène d'atrésie chez la truie et la vache. Les follicules ovariens ont été prélevés, dans des conditions physiologiques analogues, chez les animaux et les cellules de granulosa et les liquides folliculaires ont été récoltés individuellement. Après détermination du statut de chaque follicule (sain ou atrétique) et de sa taille (Petit ou Gros) trois classes d'échantillons ont été faites : petits follicules sains (PFS), gros follicules sains (GFS) et petits follicules atrétiques (PFA). Nous avons réalisé une analyse du transcriptome sur la même puce à ADN porcine (9216 spots) pour les 2 espèces. Les résultats mettent en évidence (Figure 5) que 254 gènes différentiels (correction de Bonferroni 1%) classent les follicules d'abord selon leur état (sain ou atrétique) puis selon l'espèce d'origine. Parmi les follicules sains, les petits et les gros follicules sont également bien séparés. Par ailleurs, cette étude a permis de mettre en évidence 917 gènes exprimés chez la vache et pas chez la truie. Il faut préciser que notre dispositif expérimental ne permet pas de mettre en évidence des gènes spécifiquement exprimés chez la truie, puisque cette dernière espèce est hybridée sur une membrane homologue, tandis que la vache est hybridée sur une membrane hétérologue. La technique de PCR quantitative en temps réel a validé les résultats du transcriptome sur la quasi-totalité des gènes étudiés. Des approches statistiques complémentaires sont en cours, afin d'identifier des gènes discriminants pour l'espèce, la taille et le statut du follicule. Ainsi, nous espérons obtenir une petite liste de marqueurs, nous

permettant de différencier les classes de follicules. Par ailleurs, une analyse du protéome a été réalisée par Nadine Gérard (Laboratoire PRC, INRA de Tours-Nouzilly), sur les liquides folliculaires récoltés dans cette expérience. Nous espérons, à l'issue d'une analyse approfondie de ces résultats, établir des liens entre les données transcriptome et protéome et mettre en relation les similitudes et différences d'expression dans ces deux espèces avec leur caractère mono ou polyovulant.

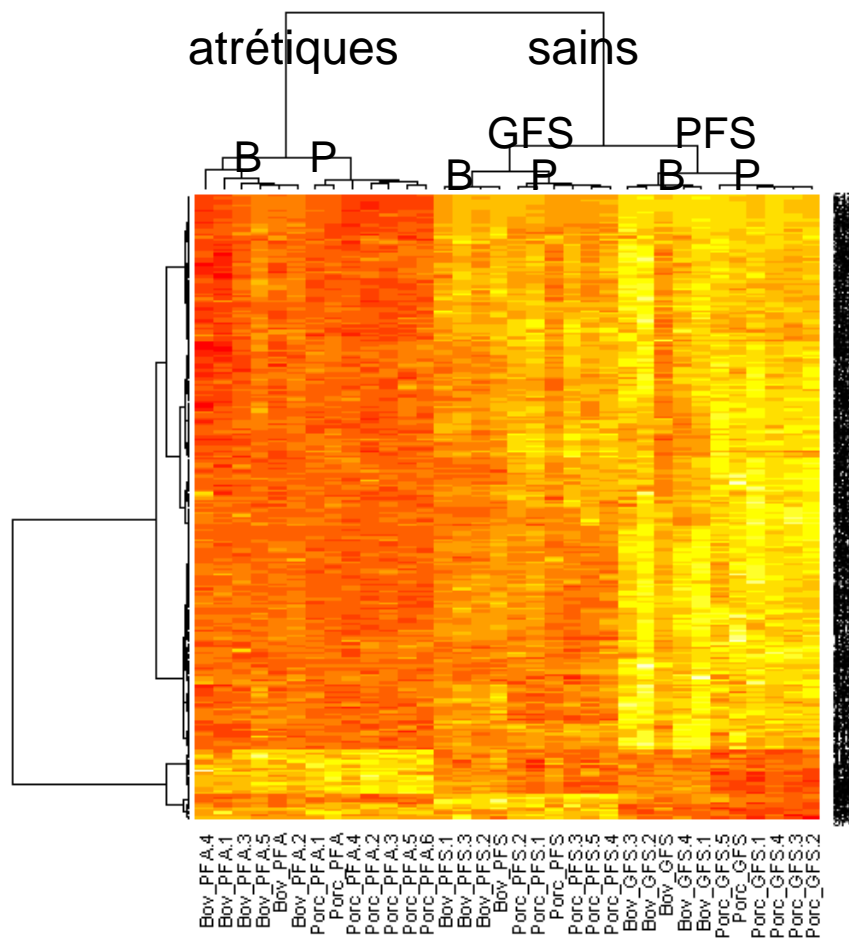


Figure 5 : Analyse du transcriptome inter-espèces (données bovines et porcines).

La figure représente la double classification ascendante hiérarchique avec distance des corrélations et saut de Ward. Les colonnes représentent les 35 membranes et les lignes les 254 ADNc. Le jaune indique une surexpression et le rouge une sous-expression. Les positions des membranes représentant des follicules sains ou atrétiques, gros follicules sains (GFS) ou petits follicules sains (PFS), et l'espèce bovine (B) ou porcine (P) sont précisées.

B.3.3.2 Modèles génétiques ovins

Dans la plupart des espèces de mammifères, il y a des différences de taux d'ovulation entre les races. Cependant, les modèles les mieux caractérisés sur le plan génétique sont rencontrés chez la brebis. Dans cette espèce, plusieurs mutations responsables d'une augmentation du taux d'ovulation et/ou de stérilité ont été identifiées entre 2000 et 2004. Toutes les mutations identifiées à ce jour affectent les gènes *BMPR-1B*, *BMP15* et *GDF9* codant pour des protéines du système de signalisation cellulaire des Bone Morphogenetic Protein (BMP) qui comprend des peptides (BMP, GDF, TGF β ...), des protéines de liaison (follistatin, chordin, noggin...) et des récepteurs hétérodimériques de type I et II (*BMPR*). Ces observations indiquent le rôle majeur du système BMP dans le contrôle du nombre d'ovulation et la fonction ovarienne, sans pour autant que le mécanisme en soit compris.

L'augmentation du taux d'ovulation chez les brebis « Booroola » est expliquée par une mutation dans le récepteur BMP de type IB (*BMPR-1B* Q249R) entraînant une perte de fonction partielle de celui-ci. Toutefois, les mécanismes conduisant au phénotype « Booroola » ne sont pas encore complètement élucidés.

Nous avons conduit une étude de transcriptome sur les cellules de granulosa ovines de brebis porteuses ou non, à l'état homozygote, de la mutation d'hyperprolificité « Booroola », Q249R dans le gène *BMPR-IB*. Les cellules avaient été traitées ou non avec un ligand de *BMPR-IB*, *BMP4*. Le dispositif expérimental nous a permis de répondre à trois questions :

- quels sont les gènes dont l'expression varie dans les cellules de granulosa ovine en fonction du génotype considéré (animaux sauvages vs animaux homozygotes porteurs de la mutation « Booroola » affectant *BMPR-1B*) ?
- quels sont les gènes dont l'expression est modifiée par un traitement par *BMP4*, qui sont donc des cibles potentielles de la signalisation par *BMP4* et *BMPR-1B* ?
- les cellules issues d'animaux sauvages et celles issues d'animaux mutés se comportent-elles de la même manière en réponse à un traitement par *BMP4* ? Autrement dit : existe-t-il une interaction génotype*traitement, dans le modèle expérimental considéré ?

De manière plus provocatrice, nous voulions aussi savoir si l'analyse du transcriptome aurait permis d'identifier la mutation « Booroola ».

Les ARN des cultures cellulaires ont été extraits et hybridés sur une puce à ADN bovine, que nous avons fabriquée et publiée dans la base GEO, sous la référence GPL8510 [21]. L'analyse statistique des résultats d'hybridation des puces bovines à l'aide d'un modèle linéaire mixte, a permis d'identifier 122 gènes différentiels (FDR 5%), 68 gènes présentant un effet génotype, 94 gènes présentant un effet traitement et montré qu'il n'y avait pas d'interaction génotype*traitement, dans le modèle expérimental considéré. Ces 122 gènes (Figure 6) séparent bien les cultures cellulaires selon le traitement reçu et le génotype des animaux dont elles sont issues.

Les gènes présentant un effet génotype sont à étudier de manière plus approfondie. Toutefois, parmi les 68 gènes, seulement 8 présentent une variation d'expression d'un facteur supérieur à 2 entre les génotypes. Pour ce qui concerne l'effet du traitement par *BMP4*, il sera de la même manière nécessaire de procéder à une étude approfondie. Vingt-trois gènes présentent une variation d'expression d'un facteur supérieur à 2 entre les cellules témoin et les cellules traitées (Figure 7) et sont donc potentiellement des cibles de *BMP4*. Le gène *FOXO4*, en particulier, présente une variation d'expression spectaculaire (d'un facteur 10 à 12) et va donner lieu à des études de physiologie moléculaire, afin de mieux comprendre son rôle dans cette voie de signalisation. En effet, de nombreux gènes de la famille *FOX* sont connus pour avoir un rôle important dans la fonction ovarienne.

L'absence d'interaction génotype*traitement, dans le modèle expérimental considéré, est surprenante, dans la mesure où la différence de phénotype est due à une mutation du récepteur

BMPR-1B connu pour affecter l'action biologique de BMP4 *in vitro*. On peut expliquer ces résultats de plusieurs façons :

- BMP4 pourrait ne pas être le ligand de BMPR-1B qui agit naturellement
- pour cette étude, les cellules de granulosa ont été cultivées *in vitro*, ce qui les modifie peut-être au point de ne plus exacerber les différences entre génotypes,
- la puce ne présente que 9000 gènes et n'est pas exhaustive.

Une remarque importante pourrait également être faite après l'analyse de ces résultats. Si nous n'avions pas eu connaissance de la voie de signalisation affectée par la mutation Booroola, l'approche transcriptome comparant les deux génotypes n'aurait pas pu nous orienter de façon évidente sur le système BMP.

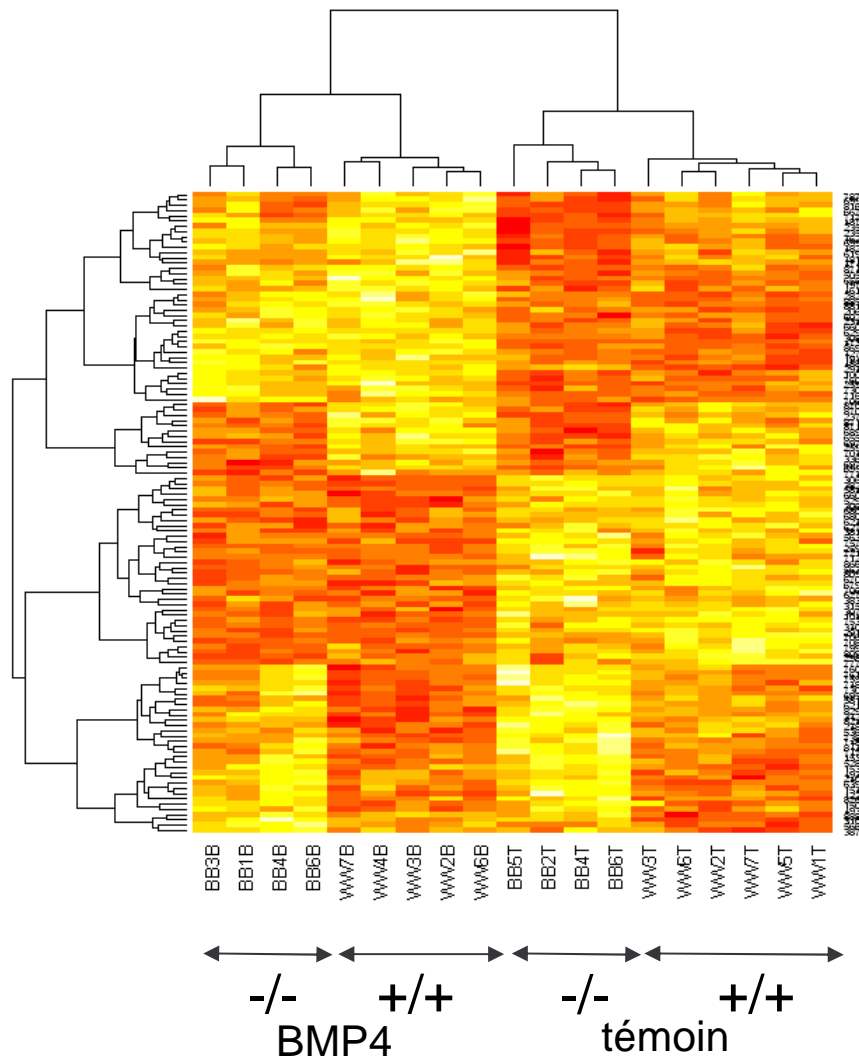


Figure 6 : Analyse de transcriptome des cellules de granulosa issues de brebis porteuses ou non de la mutation BMPR-1B, traitées ou non par BMP4.

La figure représente la double classification ascendante hiérarchique avec distance des corrélations et saut de Ward. Les colonnes représentent les 19 membranes et les lignes les 122 ADNc, présentant un effet additif « génotype+traitement » avec un FDR de 5%. Le jaune indique une surexpression et le rouge une sous-expression. Les cellules sont issues d'animaux sauvages (+/+) ou homozygotes pour la mutation BMPR-1B (-/-) et ont été traitées (BMP4) ou non (témoin) par BMP4.

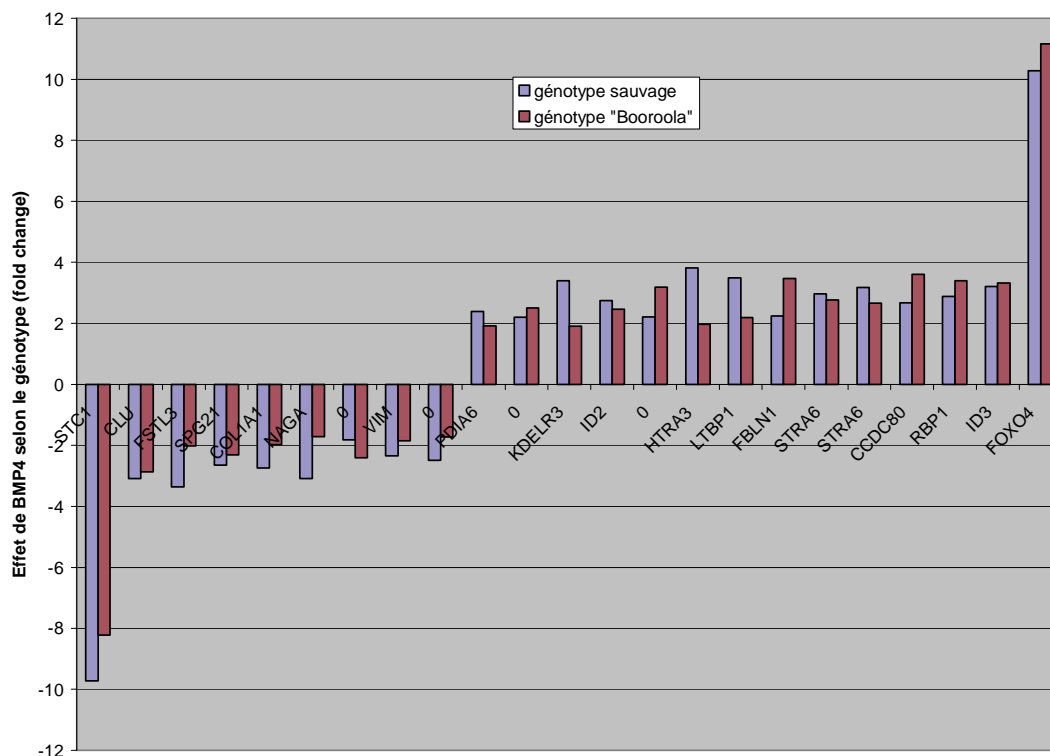


Figure 7 : Effet de BMP4 sur les gènes à effet génotype pour lesquels la différence d'expression est supérieure à 2.

Pour chacun des gènes (le symbole est indiqué sur l'axe horizontal, « 0 » indique que le gène est inconnu), la variation d'expression lors du traitement par BMP4 est indiquée pour les cellules de génotype sauvage, en bleu et pour les cellules mutées en rouge.

B.3.4 Expériences en cours (échéance fin 2010)

D'ici fin 2010, nous pensons être en mesure de publier les nombreux résultats obtenus au cours des travaux présentés ci-dessus. Le développement des méthodologies pour l'étude des stades précoces de la folliculogénèse sera valorisé sous forme de publication. Ces premiers résultats d'expression seront comparés avec les données déjà existantes chez les rongeurs et permettront d'effectuer une première présélection de biomarqueurs spécifiques de compartiments. Les résultats obtenus dans le cadre des programmes SABRE et Genovol vont donner lieu à au moins deux publications : l'une sur les données inter-espèces (vache et truie), l'autre sur l'analyse des données « Booroola ».

Par ailleurs, une analyse du transcriptome sera réalisée sur plusieurs tissus impliqués dans la fonction de reproduction avec des animaux porteurs d'une autre mutation d'hyperprolificité dans la race ovine « Lacaune ». Même si cette approche, telle que nous l'avons conduite dans le modèle « Booroola », n'aurait probablement pas facilité l'identification de la mutation causale, nous avons choisi de mener cette analyse dans le modèle « Lacaune », les mécanismes de régulation impliqués étant très probablement différents. Nous espérons que, cette fois, l'analyse du transcriptome sera une aide à l'identification de la mutation causale.

Au cours de cette montée en puissance des analyses du transcriptome, j'ai assuré l'encadrement ou le coencadrement de plusieurs personnes. Les plâtres ont été essuyés par Nadine Gobert, stagiaire de M2R et Pierre Ferré en thèse. Dans une deuxième phase, où plusieurs milliers de gènes ont été étudiés simultanément, j'ai coencadré (avec Agnès Bonnet,

Cédric Cabau ou Christèle Robert-Granié) des stagiaires, sur des approches biologiques, statistiques ou bioinformatiques (Renaud Mestagh, Stéphanie Madieu, Kim-Anh Lê Cao, Aurélie Izart et Aude Chayriguet). Ce n'est pas un hasard si au cours de cette période, j'ai eu peu souvent la responsabilité en tant qu'unique encadrant des stagiaires : nous avons mis en place des approches tellement diverses et complémentaires que, clairement, les complémentarités des compétences sont également nécessaires au niveau de l'encadrement.

C ACTIVITES COMPLEMENTAIRES

C.1 Groupes de travail et collaborations

Dès mon arrivée au laboratoire en 1994, j'ai pu participer à différents groupes de travail.

Le « club de la granulosa » groupait différents chercheurs français travaillant sur la croissance folliculaire et comptait une quarantaine de participants (80% INRA, 15% INSERM, 5% universitaires) se réunissant une fois par an.

En 1994, François Hatey a été à l'initiative d'un groupe méthodologique réunissant les utilisateurs du « Differential Display » qui s'est réuni pour la dernière fois en 1998.

Les analyses de transcriptome ont été aussi l'occasion de participer à différents groupes de travail toulousains mais aussi internationaux. En effet, principalement à l'initiative de Magali San Cristobal, deux groupes de travail ont été créés : l'un est plutôt constitué de personnes de l'INRA, l'autre groupe des personnes de différents laboratoires toulousains et a évolué vers la constitution de la plate-forme « biostatistiques ».

Dans le cadre de ces différents groupes de travail, j'ai pu présenter mes travaux, à divers stades de leurs développements et je pense que ces réunions informelles sont une source très intéressante d'échanges scientifiques et méthodologiques.

Dans le cadre du projet EADGENE, deux « workshops » ont été organisés en 2006 (<http://www.eadgene.info/Events/DataAnalysisWorkshop2006/tabid/166/Default.aspx>) et 2008 (<http://www.eadgene.info/Events/PostanalysesofMicroarrayDataWorkshop2008/tabid/320/Default.aspx>). L'idée était de travailler sur des jeux de données communs, distribués aux participants au projet. Ensuite, les différentes approches et analyses étaient confrontées pendant un séminaire de quelques jours. A l'issue des séminaires, des articles de synthèse ont été écrits [16-18, 23-25].

J'ai des collaborations « historiques » avec plusieurs laboratoires : la Station d'Amélioration Génétique des Animaux (INRA, UR 631), la Physiologie de la Reproduction et des Comportements (INRA, UMR85) et ai pu, de manière transitoire, nouer des collaborations avec d'autres chercheurs : M. Benahmed (INSERM, U407, Lyon), F. Raffali-Mathieu (Department of Biochemistry and Organic Chemistry Uppsala, Suède), A. Paris et P. Rouimi (UMR INRA/ENVT 1089 Xénobiotiques, St Martin du Touch).

C.2 Formation et enseignement

J'ai réalisé la plupart de mes projets de recherches avec la participation d'étudiants stagiaires ou de personnels en contrat à durée déterminée.

J'ai également eu une activité d'enseignement à la fois en intervenant dans des cours magistraux ou travaux dirigés de M1 ou M2 mais aussi en organisant des Unités de Valeur pour l'école doctorale.

Par ailleurs, j'ai fait partie de différents comités de thèse.

C.3 Encadrement et animation scientifique

Au sein de l'équipe de recherches dont je fais partie, j'ai pu exercer des activités d'encadrement à plusieurs niveaux. En effet, mes travaux ont toujours été réalisés avec la participation du personnel technique de l'équipe. Selon les missions de ces personnels, j'ai pu leur fournir un encadrement adapté.

Depuis 2007, j'ai pris en charge l'animation de l'équipe « GDO ». Mon activité a plusieurs volets : organisation de la recherche, gestion des ressources humaines, conduite de réunions, organisation de la réflexion sur notre évolution, qui sera détaillée dans le paragraphe suivant.

D PROJET DE RECHERCHES

Depuis de longues années, notre équipe a une situation un peu atypique dans le laboratoire, dans la mesure où l'unité thématique est difficile à y percevoir. Cette situation est principalement due à l'histoire. Un certain nombre de questions se posent :

- quel est notre rôle par rapport à celui des physiologistes ?
- comment plus et/ou mieux intégrer les modèles génétiques ?
- la thématique concernant le transcriptome musculaire porcine ne devrait-elle pas être rattachée à l'équipe de génétique porcine ?

Plusieurs scénarii ont été envisagés et la solution qui se dessine, depuis peu, est la spécialisation de cette équipe dans des approches de génétique moléculaire concernant les ovins et des caprins. Cela implique plusieurs changements :

- le départ d'une des scientifiques, menant un projet concernant spécifiquement le porc vers une autre équipe
- une formation complémentaire à la génétique, pour ce qui me concerne

Dans les deux paragraphes qui suivent, le projet global de notre équipe, qui comportera, au départ deux scientifiques, 2 ingénieurs d'études, 1 assistant ingénieur et un technicien de recherches, sera exposé. Aujourd'hui, les rôles n'ont pas été précisément distribués. On peut néanmoins imaginer, étant donnée l'expérience passée, que plusieurs projets d'identification de mutations causales ou de réduction d'intervalle de localisation de QTL vont être menés à la fois. Ces sujets de recherche devraient attirer des étudiants en thèse de doctorat ou en post-doc.

D.1.1 Génomique ovine

Le génome du mouton est en cours de séquençage, dans le cadre d'un consortium de séquençage. D'ores et déjà, ce consortium a développé une puce de 60000 SNP (Single Nucleotide Polymorphism), qui est opérationnelle. Par ailleurs, deux vastes projets de détection et de cartographie fine de QTL sont en cours : un programme national SheepSNPQTL, coordonné par la SAGA (Station d'Amélioration Génétique des Animaux, Toulouse), et financé par l'ANR, a démarré début 2009 et un projet européen (3SR), coordonné par Genesis Faraday, est accepté et en phase de négociation finale.

SheepSNPQTL porte sur la primo-détection et une première localisation de QTL pour de nombreux caractères d'intérêt agronomique (mais pas les caractères de reproduction) et inclut le comportement. Ce projet est basé sur des analyses familiales sur puce 60K. Le projet 3SR

inclut la reproduction, comme caractère supplémentaire mais n'intègre pas le comportement. Il prévoit principalement de la cartographie fine de QTL détectés précédemment (en particulier, dans le cadre de SheepSNPQTL), en combinant analyses génétiques au moyen de puces SNP ciblées aux régions d'intérêt, reséquençage et études d'expression. L'objectif est naturellement d'aboutir à l'identification de mutations causales déterminant certains de ces caractères. Ces projets seront menés en étroite collaboration avec la SAGA et, ce que nous imaginons actuellement est que la SAGA interviendra davantage dans les aspects de « biologie sèche », tandis que notre équipe se consacrera davantage aux aspects de « biologie humide », l'équipe de « biomathématique » du LGC étant également impliquée.

Pour ce qui concerne la reproduction, l'étude de quatre populations différentes, dans lesquelles l'existence de gènes majeurs est déjà démontrée, est prévue dans le projet 3SR (Lacaune, Davisdale, Olkaska, Cambridge). Dans ce cas particulier, nous pensons combiner primo-localisation et cartographie fine, *via* le génotypage sur puce SNP générique 60K d'une centaine d'animaux extrêmes pour chaque gène étudié. Notre expérience sur la mutation autosomale au locus *FecL* en race Lacaune indique que la puissance de ce type d'étude devrait être équivalente à celle d'une analyse familiale sur un pedigree de 200 animaux informatifs, c'est-à-dire que les mutations correspondantes devraient pouvoir être localisées dans un intervalle de 1 ou 2 centiMorgans. Il restera ensuite à identifier le gène et la mutation causale. Notre expertise dans ce domaine, avec l'identification de plusieurs mutations ayant un effet sur le taux d'ovulation, et le réseau de collaborations existantes devraient nous permettre de mener à bien ces études.

Par ailleurs, nous suspectons l'existence d'un ou plusieurs gènes majeurs de prolificité dans plusieurs races françaises. Nous nous proposons, en collaboration avec la SAGA, de vérifier si les phénotypes extrêmes trouvés dans ces races sont dus à des mutations dans des gènes déjà identifiés ou très finement cartographiés (système BMP, gène Lacaune). Si ce n'était pas le cas, nous proposons de rechercher les mutations causales de ce phénotype. Il faudra alors trouver les financements correspondants.

Enfin, des réflexions sont engagées avec les laboratoires « Biologie du Développement et de la Reproduction », à Jouy-en-Josas et « Physiologie de la Reproduction et des Comportements » à Tours-Nouzilly, pour élaborer un nouveau projet portant sur le développement folliculaire précoce et tirant parti des mutations identifiées ou en cours d'identification, ayant un effet sur le développement folliculaire.

En ce qui concerne les autres caractères, l'étude génétique de la sensibilité aux mammites et de la résistance au parasitisme est prévue dans le projet européen 3SR. Le choix des QTL à étudier dépendra évidemment des résultats du programme SheepSNPQTL.

D.1.2 Génomique caprine

Les outils d'analyse génétique sont encore peu développés chez la chèvre. Une carte génétique à base de microsatellites a été publiée il y a déjà quelques années. Par contre, la séquence du génome de la chèvre n'est pas connue, et il n'y a pas eu de programme de détection systématique de SNP.

Nous avons entrepris un programme de détection de SNP, CapriSniP, qui est financé par la profession. Ce programme porte sur le séquençage (454) d'une représentation réduite du génome de 13 animaux de 3 races différentes. Ce travail sera réalisé en collaboration avec l'équipe Sigenae, pour l'analyse informatique des données de séquence. *A priori*, nous espérons obtenir de 20.000 à 50.000 SNP. Ce travail devrait permettre ensuite de définir des

puces SNP à moyenne densité pour l'étude de gènes majeurs présumés ou de QTL forts. Le financement de cette deuxième étape est également prévu dans le projet 3SR.

Là aussi, il est difficile de définir actuellement les caractères dont l'étude sera privilégiée. Deux gènes majeurs sont suspectés, l'un influençant la vitesse de traite et l'autre la sensibilité aux parasites. Un programme de détection de QTL caprins inclut également l'analyse des caractères de composition fine des laits et la saisonnalité de la reproduction.

E CONCLUSION

Après quinze ans de recherche au laboratoire de génétique cellulaire, j'arrive en quelque sorte à un tournant de ma carrière. Je suis consciente que cela peut être perçu et interprété de manières diverses. Certains penseront, je crois, que je « rentre dans le rang », en acceptant de faire enfin de la génétique dans un laboratoire de génétique. Selon leur sensibilité, ce sera une appréciation positive ou négative. D'autres diront sans doute que l'heure n'est plus aux équipes méthodologiques ou encore qu'il faut recentrer les thématiques de recherche sur des sujets en lien avec les demandes des professionnels et de la société.

L'avenir me dira si j'ai fait un choix judicieux. Dans l'immédiat, il me semble important d'acquérir ou de renforcer mes compétences en génétique moléculaire pour assurer la transition vers cette nouvelle thématique. Je suis plutôt enthousiaste quant à cette perspective d'élargissement de mes connaissances et à l'idée d'avoir une approche globale des caractères agronomiques.

F REFERENCES

1. Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merrill CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, et al.: **Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project.** *Science* 1991, **252**:1651-1656.
2. Tosser G, Labbe M, Bremont M, Cohen J: **Expression of the major capsid protein VP6 of group C rotavirus and synthesis of chimeric single-shelled particles by using recombinant baculoviruses.** *J Virol* 1992, **66**:5825-5831.
3. Kohli E, Pothier P, Tosser G, Cohen J, Sandino AM, Spencer E: **In vitro reconstitution of rotavirus transcriptional activity using viral cores and recombinant baculovirus expressed VP6.** *Arch Virol* 1993, **133**:451-458.
4. Soares MB, Bonaldo MF, Jelene P, Su L, Lawton L, Efstratiadis A: **Construction and characterization of a normalized cDNA library.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:9228-9232.
5. Tosser G, Delaunay T, Kohli E, Grosclaude J, Pothier P, Cohen J: **Topology of bovine rotavirus (RF strain) VP6 epitopes by real-time biospecific interaction analysis.** *Virology* 1994, **204**:8-16.
6. Kohli E, Pothier P, Tosser G, Cohen J, Sandino AM, Spencer E: **Inhibition of in vitro reconstitution of rotavirus transcriptionally active particles by anti-VP6 monoclonal antibodies.** *Arch Virol* 1994, **135**:193-200.
7. Franco MA, Lefevre P, Willems P, Tosser G, Lintermanns P, Cohen J: **Identification of cytotoxic T cell epitopes on the VP3 and VP6 rotavirus proteins.** *J Gen Virol* 1994, **75 (Pt 3)**:589-596.
8. Yerle M, Echard G, Robic A, Mairal A, Dubut-Fontana C, Riquet J, Pinton P, Milan D, Lahbib-Mansais Y, Gellin J: **A somatic cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics.** *Cytogenet Cell Genet* 1996, **73**:194-202.
9. Tosser-Klopp G, Benne F, Bonnet A, Mulsant P, Gasser F, Hatey F: **A first catalog of genes involved in pig ovarian follicular differentiation.** *Mamm Genome* 1997, **8**:250-254.
10. Yerle M, Pinton P, Robic A, Alfonso A, Palvadeau Y, Delcros C, Hawken R, Alexander L, Beattie C, Schook L, Milan D, Gellin J: **Construction of a whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs.** *Cytogenet Cell Genet* 1998, **82**:182-188.
11. Tosser-Klopp G, Mulsant P, Yerle M: **Regional localisations of VIM, HSD3b, ACTA1 and PGM1 in pigs.** *Anim Genet* 1998, **29**:23-26.
12. Tosser-Klopp G, Bonnet A, Yerle M, Hatey F: **Functional study and regional mapping of 44 hormono-regulated genes isolated from a porcine granulosa cell library.** *Genet Sel Evol* 2001, **33**:69-87.
13. Benbrahim-Tallaa L, Tabone E, Tosser-Klopp G, Hatey F, Benahmed M: **Glutathione S-transferase alpha expressed in porcine Sertoli cells is under the control of follicle-stimulating hormone and testosterone.** *Biol Reprod* 2002, **66**:1734-1742.
14. Govoroun M, Le Gac F, Guiguen Y: **Generation of a large scale repertoire of Expressed Sequence Tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries.** *BMC Genomics* 2006, **7**:196.

15. Bonnet A, Frappart PO, Dehais P, Tosser-Klopp G, Hatey F: **Identification of differential gene expression in in vitro FSH treated pig granulosa cells using suppression subtractive hybridization.** *Reprod Biol Endocrinol* 2006, **4**:35.
16. Watson M, Perez-Alegre M, Baron MD, Delmas C, Dovic P, Duval M, Foulley JL, Garrido-Pavon JJ, Hulsegge I, Jaffrezic F, Jimenez-Marin A, Lavric M, Le Cao KA, Marot G, Mouzaki D, Pool MH, Robert-Granie C, San Cristobal M, Tosser-Klopp G, Waddington D, de Koning DJ: **Analysis of a simulated microarray dataset: Comparison of methods for data normalisation and detection of differential expression (Open Access publication).** *Genet Sel Evol* 2007, **39**:669-683.
17. Sorensen P, Bonnet A, Buitenhuis B, Closset R, Dejean S, Delmas C, Duval M, Glass L, Hedegaard J, Hornshoj H, Hulsegge I, Jaffrezic F, Jensen K, Jiang L, de Koning DJ, Le Cao KA, Nie H, Petzl W, Pool MH, Robert-Granie C, San Cristobal M, Lund MS, van Schothorst EM, Schuberth HJ, Seyfert HM, Tosser-Klopp G, Waddington D, Watson M, Yang W, Zerbe H: **Analysis of the real EADGENE data set: Multivariate approaches and post analysis (Open Access publication).** *Genet Sel Evol* 2007, **39**:651-668.
18. Jaffrezic F, de Koning DJ, Boettcher PJ, Bonnet A, Buitenhuis B, Closset R, Dejean S, Delmas C, Detilleux JC, Dovic P, Duval M, Foulley JL, Hedegaard J, Hornshoj H, Hulsegge I, Janss L, Jensen K, Jiang L, Lavric M, Le Cao KA, Lund MS, Malinverni R, Marot G, Nie H, Petzl W, Pool MH, Robert-Granie C, San Cristobal M, van Schothorst EM, Schuberth HJ, Sorensen P, Stella A, Tosser-Klopp G, Waddington D, Watson M, Yang W, Zerbe H, Seyfert HM: **Analysis of the real EADGENE data set: Comparison of methods and guidelines for data normalisation and selection of differentially expressed genes (Open Access publication).** *Genet Sel Evol* 2007, **39**:633-650.
19. Bonnet A, Le Cao KA, Sancristobal M, Benne F, Robert-Granie C, Law-So G, Fabre S, Besse P, De Billy E, Quesnel H, Hatey F, Tosser-Klopp G: **In vivo gene expression in granulosa cells during pig terminal follicular development.** *Reproduction* 2008, **136**:211-224.
20. Bonnet A, Iannuccelli E, Hugot K, Benne F, Bonaldo MF, Soares MB, Hatey F, Tosser-Klopp G: **A pig multi-tissue normalised cDNA library : large-scale sequencing, cluster analysis and 9K micro-array resource generation.** *BMC Genomics* 2008, **9**:17.
21. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/query/acc.cgi?acc=GPL8510>]
22. Tosser-Klopp G, Lê Cao KA, Bonnet A, Gobert N, Hatey F, Robert-Granie C, Déjean S, Antic J, Baschet L, San Cristobal M: **A pilot study on transcriptome data analysis of folliculogenesis in pigs.** *Animal* 2009, **3**:393-401.
23. Jaffrezic F, Tosser-Klopp G: **Gene network reconstruction from microarray data.** *BMC Proc* 2009, **3 Suppl 4**:S12.
24. Hedegaard J, Arce C, Bicciato S, Bonnet A, Buitenhuis B, Collado-Romero M, Conley LN, Sancristobal M, Ferrari F, Garrido JJ, Groenen MA, Hornshoj H, Hulsegge I, Jiang L, Jimenez-Marin A, Kommadath A, Lagarrigue S, Leunissen JA, Liaubet L, Neerinx PB, Nie H, Poel J, Prickett D, Ramirez-Boo M, Rebel JM, Robert-Granie C, Skarman A, Smits MA, Sorensen P, Tosser-Klopp G, Watson M: **Methods for interpreting lists of affected genes obtained in a DNA microarray experiment.** *BMC Proc* 2009, **3 Suppl 4**:S5.
25. Bonnet A, Lagarrigue S, Liaubet L, Robert-Granie C, Sancristobal M, Tosser-Klopp G: **Pathway results from the chicken data set using GOTM, Pathway Studio and Ingenuity softwares.** *BMC Proc* 2009, **3 Suppl 4**:S11.

G ANNEXE 1 : CURRICULUM VITAE

Gwenola TOSSER-KLOPP

Etat civil : née le 22 décembre 1967 à Brest (Finistère), mariée, quatre enfants.

Diplômes :

1985 : Baccalauréat, série C, mention AB.

1990 : Diplôme d'Ingénieur Agronome (1990), spécialisation Biochimie et Génétique.
Diplôme d'Etudes Approfondies : D.E.A. "Biologie et Agronomie", option "Biochimie et Génétique Appliquées", délivré par l'Université de Rennes I (1990), mention T.B.

1993 : Thèse de doctorat délivrée par l'Université de Paris XI, avec la mention : "très honorable avec félicitations du jury".

Expérience professionnelle :

1990 : Stage à l'**I.N.R.A.** de Rennes, au laboratoire de **Génétique animale** sous la direction de J.M. Fraslín et J. Mallard "Recherche de conditions favorisant la multiplication et le maintien de l'état différencié d'hépatocytes de poulet en culture."
Stage de fin d'études à l'**I.N.R.A.** de Jouy-en-Josas, au laboratoire de **Virologie et Immunologie Moléculaires**, sous la direction de J. Cohen, de mars à septembre 1990 : "Expression dans le système "Baculovirus-Cellules de lépidoptère" de la protéine VP3 du Rotavirus bovin."

1990-1993 :Thèse de doctorat à l'**I.N.R.A.** de Jouy-en-Josas, au laboratoire de **Virologie et Immunologie Moléculaires**, sous la direction de J. Cohen, de novembre 1990 à décembre 1993 : "La protéine VP6 du rotavirus bovin : propriétés structurales, fonctionnelles et topologiques"

1994-1998 : chargée de recherches 2^{ème} classe au laboratoire de Génétique Cellulaire du Centre I.N.R.A. de Toulouse.

Depuis septembre 1998 : chargée de recherches 1ère classe

Depuis juin 2007 : animatrice du groupe « Génétique et Différenciation ovarienne »

Expertise , évaluation:

Depuis 2001 : membre du comité infrastructures puis du Comité Scientifique des Utilisateurs du CRB-GADIE (Jouy-en-Josas)

Depuis 2004 : membre du CSU de la plate-forme Biopuces de Toulouse

Membre de jurys de concours interne à l'INRA (TR, 2000) ou externe (IE, 2004 ; TR, 2008)

Examineur pour les revues GSE, BMC Genomics : 2 articles par an environ.

Relecture d'articles soumis aux journées de la recherche avicole en 2009.
Expertise de projets pour le Bureau des Ressources Génétiques.

Enseignement, encadrement, co-encadrement:

Membre de comités de thèse

D. Pillon (Directeurs de thèse : Yves Tillet et Gilles Bruneau, INRA, PRC, Tours-Nouzilly), soutenance le 17/10/2003

A. Thélie (Directrice de thèse : Rozenn Dalbiès-Tran, INRA, PRC, Tours-Nouzilly), soutenue le 9/12/2008

O. Picone (Directrices de thèse : Pascale Chavatte-Palmer et Véronique Duranthon, INRA, BDR, Jouy-en-Josas), en cours

Ecole doctorale Biologie, Santé, Biotechnologies de Toulouse III

module BM4 (Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR) en 1997, 1999, 2000, 2002, 2004 et 2006

module « hybridation in situ sur coupes de tissu » en 1997, 2000

Ecole doctorale Sciences Ecologiques Vétérinaires, Agronomiques, Bioingénierie

Master AgroFoodChain : 2H cours de M1 par an depuis 2006, 4,5 H de cours de M2 en 2008.

Stagiaires et personnels en Contrat à durée déterminée :

Licence : S. Somnard (1995), S. Perret (1997) et B. Tournan (1999)

Master : E. de Billy (1996), F. Bodin (1996), E. Bonnafé (1997), V. Gindraud (1997), C. Cabau (1998), N. Gobert (2003), R.Mestdagh (2006), S.Madiou (2007), A.Izart (2008), A.Chayriguet (2009)

Doctorat : Pierre Ferré (2004), Kim-Anh Lê Cao (2008)

CDD : S.Cayré (1994-1995), C.Cabau (1998-2000), S.Villeger (1999-2000)

Collège : G. de Pablos (1995)

Formations suivies:

- recherche :

Atelier de formation INSERM 138 : De l'exploitation bioinformatique des données génomiques fonctionnelles à l'analyse dynamique des réseaux moléculaires (3 jours, 2002)

Atelier de formation INSERM 145 : Analyse statistique des micro-arrays (3 jours, 2003)

Formation FPStat : Introduction à l'analyse statistique (4 jours, 2003)

AGENAE : Analyse des données d'expression (4 jours, 2004)

Atelier de formation INSERM 169 : miRNA et régulation des génomes eucaryotes (2 jours, 2006)

Ecole chercheurs : Phylogénomique (4 jours, 2007)

ARENA : structure et fonction des ARN (2 jours, 2009)

- animation de la recherche

Formation des jurés de concours (2 jours, 2000)

Gestion du temps (2 jours, 2007)

Personne compétente en radioprotection (7 jours, 2007)

Management de proximité (7 jours, 2008)

Contrats de recherche :

- participation

Contrats nationaux :

GREG : 1994-1995

“Identification and mapping of genes involved in ovulation rate in the pig”

ACI (Appel d'offres ACC-SV1) 1996-1997

« Caractérisation fonctionnelle et génétique de séquences non identifiées impliquées dans la folliculogénèse ovarienne chez la truie ».

Genanimal 2003 : séquençage de la banque AGENAE porcine. Coordinateur : François Hatey.

AGENAE 2006 : Refollis (01/01/2008-30/04/2009). Coordinatrice : Agnès Bonnet.

AGENAE 2009 : Porcinet (01/01/2010-31/12/2013). Coordinatrice : Laurence Liaubet.

Contrats européens :

GenetPig : 01/11/1998-28/02/2001

“Identification of genes controlling economic traits in pig”. Coordinateur : Joël Gellin.

Eadgene : 01/09/2004-28/02/2010

European Animal Disease Genomics Network of Excellence for Animal Health and Food Safety. Coordinatrice : Marie-Hélène Pinard-van der Laan

SABRE : 01/04/2006-31/03/2010

“Cutting Edge Genomics for Sustainable Animal Breeding”. Coordination : Genesis Faraday (GB).

- coordination

AGENAE 2003 : étude de faisabilité puces à ADN porcines

AGENAE 2005: Genovul (01/01/2006-30/06/2009)

H ANNEXE 2 : LISTE DES PUBLICATIONS

H.1 Publications dans des revues à comité de lecture

1. Tosser G, Labbe M, Bremont M, Cohen J: **Expression of the major capsid protein VP6 of group C rotavirus and synthesis of chimeric single-shelled particles by using recombinant baculoviruses.** *J Virol* 1992, **66**:5825-5831.
2. Kohli E, Pothier P, Tosser G, Cohen J, Sandino AM, Spencer E: **In vitro reconstitution of rotavirus transcriptional activity using viral cores and recombinant baculovirus expressed VP6.** *Arch Virol* 1993, **133**:451-458.
3. Tosser G, Delaunay T, Kohli E, Grosclaude J, Pothier P, Cohen J: **Topology of bovine rotavirus (RF strain) VP6 epitopes by real-time biospecific interaction analysis.** *Virology* 1994, **204**:8-16.
4. Franco MA, Lefevre P, Willems P, Tosser G, Lintermanns P, Cohen J: **Identification of cytotoxic T cell epitopes on the VP3 and VP6 rotavirus proteins.** *J Gen Virol* 1994, **75 (Pt 3)**:589-596.
5. Kohli E, Pothier P, Tosser G, Cohen J, Sandino AM, Spencer E: **Inhibition of in vitro reconstitution of rotavirus transcriptionally active particles by anti-VP6 monoclonal antibodies.** *Arch Virol* 1994, **135**:193-200.
6. Tosser-Klopp G, Benne F, Bonnet A, Mulsant P, Gasser F, Hatey F: **A first catalog of genes involved in pig ovarian follicular differentiation.** *Mamm Genome* 1997, **8**:250-254.
7. Tosser-Klopp G, Mulsant P, Yerle M: **Regional localisations of VIM, HSD3b, ACTA1 and PGM1 in pigs.** *Anim Genet* 1998, **29**:23-26.
8. Hatey F, Tosser-Klopp G, Clouscard-Martinato C, Mulsant P, Gasser F: **Expressed sequence tags for genes : a review.** *Genet Sel Evol* 1998, **30**:521-541.
9. Yerle M, Lahbib-Mansais Y, Goureau A, Tosser-Klopp G, Pinton P, Sun HS, Tuggle CK, Gellin J: **Contribution to the comparative map between humans and pigs.** *Anim Biotechnol* 1999, **10**:93-97.
10. Milan D, Hawken R, Cabau C, Leroux S, Genet C, Lahbib Y, Tosser G, Robic A, Hatey F, Alexander L, Beattie C, Schook L, Yerle M, Gellin J: **IMpRH server: an RH mapping server available on the Web.** *Bioinformatics* 2000, **16**:558-559.
11. Mazerbourg S, Overgaard MT, Oxvig C, Christiansen M, Conover CA, Laurendeau I, Vidaud M, Tosser-Klopp G, Zapf J, Monget P: **Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine, and equine ovarian follicles: involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development.** *Endocrinology* 2001, **142**:5243-5253.
12. Goureau A, Garrigues A, Tosser-Klopp G, Lahbib-Mansais Y, Chardon P, Yerle M: **Conserved synteny and gene order difference between human chromosome 12 and pig chromosome 5.** *Cytogenet Cell Genet* 2001, **94**:49-54.
13. Tosser-Klopp G, Bonnet A, Yerle M, Hatey F: **Functional study and regional mapping of 44 hormono-regulated genes isolated from a porcine granulosa cell library.** *Genet Sel Evol* 2001, **33**:69-87.
14. Benbrahim-Tallaa L, Tabone E, Tosser-Klopp G, Hatey F, Benahmed M: **Glutathione S-transferase alpha expressed in porcine Sertoli cells is under the control of follicle-stimulating hormone and testosterone.** *Biol Reprod* 2002, **66**:1734-1742.

15. Lahbib-Mansais Y, Tosser-Klopp G, Leroux S, Cabau C, Karsenty E, Milan D, Barillot E, Yerle M, Hatey F, Gellin J: **Contribution to high-resolution mapping in pigs with 101 type I markers and progress in comparative map between humans and pigs.** *Mamm Genome* 2003, **14**:275-288.
16. Karsenty E, Barillot E, Tosser-Klopp G, Lahbib-Mansais Y, Milan D, Hatey F, Cirera S, Sawera M, Jorgensen CB, Chowdhary B, Fredholm M, Wimmers K, Ponsuksili S, Davoli R, Fontanesi L, Braglia S, Zambonelli P, Bigi D, Neuenschwander S, Gellin J: **The GENETPIG database: a tool for comparative mapping in pig (*Sus scrofa*).** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:138-141.
17. Bonnet A, Frappart PO, Dehais P, Tosser-Klopp G, Hatey F: **Identification of differential gene expression in in vitro FSH treated pig granulosa cells using suppression subtractive hybridization.** *Reprod Biol Endocrinol* 2006, **4**:35.
18. Ferre PJ, Liaubet L, Concordet D, Sancristobal M, Uro-Coste E, Tosser-Klopp G, Bonnet A, Toutain PL, Hatey F, Lefebvre HP: **Longitudinal Analysis of Gene Expression in Porcine Skeletal Muscle After Post-Injection Local Injury.** *Pharm Res* 2007.
19. Jaffrezic F, de Koning DJ, Boettcher PJ, Bonnet A, Buitenhuis B, Closset R, Dejean S, Delmas C, Detilleux JC, Dovic P, Duval M, Foulley JL, Hedegaard J, Hornshoj H, Hulsegge I, Janss L, Jensen K, Jiang L, Lavric M, Le Cao KA, Lund MS, Malinverni R, Marot G, Nie H, Petzl W, Pool MH, Robert-Granie C, San Cristobal M, van Schothorst EM, Schuberth HJ, Sorensen P, Stella A, Tosser-Klopp G, Waddington D, Watson M, Yang W, Zerbe H, Seyfert HM: **Analysis of the real EADGENE data set: Comparison of methods and guidelines for data normalisation and selection of differentially expressed genes (Open Access publication).** *Genet Sel Evol* 2007, **39**:633-650.
20. Sorensen P, Bonnet A, Buitenhuis B, Closset R, Dejean S, Delmas C, Duval M, Glass L, Hedegaard J, Hornshoj H, Hulsegge I, Jaffrezic F, Jensen K, Jiang L, de Koning DJ, Le Cao KA, Nie H, Petzl W, Pool MH, Robert-Granie C, San Cristobal M, Lund MS, van Schothorst EM, Schuberth HJ, Seyfert HM, Tosser-Klopp G, Waddington D, Watson M, Yang W, Zerbe H: **Analysis of the real EADGENE data set: Multivariate approaches and post analysis (Open Access publication).** *Genet Sel Evol* 2007, **39**:651-668.
21. Watson M, Perez-Alegre M, Baron MD, Delmas C, Dovic P, Duval M, Foulley JL, Garrido-Pavon JJ, Hulsegge I, Jaffrezic F, Jimenez-Marin A, Lavric M, Le Cao KA, Marot G, Mouzaki D, Pool MH, Robert-Granie C, San Cristobal M, Tosser-Klopp G, Waddington D, de Koning DJ: **Analysis of a simulated microarray dataset: Comparison of methods for data normalisation and detection of differential expression (Open Access publication).** *Genet Sel Evol* 2007, **39**:669-683.
22. Bonnet A, Iannuccelli E, Hugot K, Benne F, Bonaldo MF, Soares MB, Hatey F, Tosser-Klopp G: **A pig multi-tissue normalised cDNA library : large-scale sequencing, cluster analysis and 9K micro-array resource generation.** *BMC Genomics* 2008, **9**:17.
23. Bonnet A, Le Cao KA, Sancristobal M, Benne F, Robert-Granie C, Law-So G, Fabre S, Besse P, De Billy E, Quesnel H, Hatey F, Tosser-Klopp G: **In vivo gene expression in granulosa cells during pig terminal follicular development.** *Reproduction* 2008, **136**:211-224.
24. Tosser-Klopp G, Lê Cao KA, Bonnet A, Gobert N, Hatey F, Robert-Granie C, Déjean S, Antic J, Baschet L, San Cristobal M: **A pilot study on transcriptome data analysis of folliculogenesis in pigs.** *Animal* 2009, **3**:393-401.

25. Hedegaard J, Arce C, Bicciato S, Bonnet A, Buitenhuis B, Collado-Romero M, Conley LN, Sancristobal M, Ferrari F, Garrido JJ, Groenen MA, Hornshoj H, Hulsege I, Jiang L, Jimenez-Marin A, Kommadath A, Lagarrigue S, Leunissen JA, Liaubet L, Neerincx PB, Nie H, Poel J, Prickett D, Ramirez-Boo M, Rebel JM, Robert-Granie C, Skarman A, Smits MA, Sorensen P, Tosser-Klopp G, Watson M: **Methods for interpreting lists of affected genes obtained in a DNA microarray experiment.** *BMC Proc* 2009, **3 Suppl 4**:S5.
26. Jaffrezic F, Tosser-Klopp G: **Gene network reconstruction from microarray data.** *BMC Proc* 2009, **3 Suppl 4**:S12.
27. Bonnet A, Lagarrigue S, Liaubet L, Robert-Granie C, Sancristobal M, Tosser-Klopp G: **Pathway results from the chicken data set using GOTM, Pathway Studio and Ingenuity softwares.** *BMC Proc* 2009, **3 Suppl 4**:S11.

H.2 Publications dans des revues sans comité de lecture

1. Tosser-Klopp G, Cloucard-Martinato C, Benne F, Bonnet A, Cabau C, Rallières J, Hatey F: **Exemple d'approche fonctionnelle : la fonction ovarienne dans l'espèce porcine.** *Productions Animales* 2000, **HS**:165-167.
2. Leroux C, Tosser-Klopp G: **La fonction du gène : les grandes étapes de l'utilisation de l'information génétique.** *Productions Animales* 2000, **HS**:21-28.

H.3 Communications dans des congrès et colloques

1. Tosser G, Labbe M, Bremont M, Cohen J: **Expression de la protéine majeure de la capsid interne du pararotavirus (VP6C) et formation de particules virales à simple capsid, dans le système "baculovirus-cellules de lépidoptère".** In *XIXème forum des jeunes chercheurs de la société de biochimie et biologie moléculaire ; 7-10 juillet 1992 ; Caen, France.* 1992
2. Tosser G, Delaunay T, Grosclaude J, Kohli E, Pothier P, Cohen J: **Topology of bovine rotavirus (RF strain) VP6 epitopes.** In *Fourth International Symposium on double-stranded RNA viruses ; 12 au 16 décembre 1992 ; Scottsdale, Arizona, USA.* 1992
3. Lagarrigue S, Tosser G, Chauveau I, Le Gall A, Mallard J, Frasin J: **Active proliferation of adult chicken hepatocytes ex vivo.** In *40th meeting of the European Tissue Culture Society ; 4 au 8 juillet 1993 ; Rennes, France.* 1993
4. Tosser G, Delaunay T, Grosclaude J, Kohli E, Pothier P, Cohen J: **Topology of bovine rotavirus (RF strain) VP6 epitopes.** In *Third european BIASymposium ; 23 et 24 septembre 1993 ; Londres, Grande-Bretagne.* 1993
5. Tosser G, Delaunay T, Grosclaude J, Kohli E, Pothier P, Cohen J: **Topology of bovine rotavirus (RF strain) VP6 epitopes.** In *Journées du département de pathologie animale ; 30 novembre et 1er décembre 1993 ; Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, France.* 1993
6. Hatey F, Tosser G, Mulsant P, Gasser F: **Isolation, sequencing and characterization of genes involved in prolificacy in pig.** In *PigMap II Project meeting ; 04-06 septembre 1995 ; Cambridge, Grande Bretagne.* 1995
7. Tosser G, Galoin S, Mulsant P, Gasser F, Hatey F: **Toward a catalogue of genes involved in FSH-induced development of pig ovarian follicles.** In *Congress of the*

- European Developmental Biology Organisation ; 9-13 juillet 1995 ; Toulouse, France. 1995*
8. Cloucard-Martinato C, Tosser-Klopp G, Bodin L, Bonnet A, Benne F, Rallières J, Gasser F, Mulsant P, Hatey F: **Recherche de gènes hormono-régulés dans les cellules de granulosa de truie par tri différentiel et PCR différentielle.** In *XIV^o Congrès de la Société Française d'Endocrinologie ; 5-7 septembre 1996 ; Angers, France. Ann. Endocrinol. 57 (4) P203, 368-369 (1996) ; 1996*
 9. Hatey F, De Billy E, Tosser-Klopp G, Benne F, Bonnet A, Quesnel H, Gasser F: **Expression ovarienne de la glutathion-S-transferase chez la truie.** In *XIV^o Congrès de la Société Française d'Endocrinologie ; 5-7 septembre 1996 ; Angers, France. Ann. Endocrinol. 57 (4) P202, 368 (1996) ; 1996*
 10. Hatey F, Tosser-Klopp G, Cloucard C, Mulsant P, Gasser F: **La valse des "étiquettes".** In *Séminaire INRA Cartographie du génome et fonction des gènes ; 28-29 février, 01 mars 1996 ; Tours, France. 1996*
 11. Tosser-Klopp G, De Billy E, Benne F, Yerle M, Mulsant P, Gasser F, Hatey F: **Identification, localization and functional analysis of FSH-regulated genes expressed in pig ovarian follicles.** In *XXVth International Conference on Animal Genetics ; 21-25 juillet 1996 ; Tours, France. 1996*
 12. Tosser-Klopp G, Benne F, Bonnet A, Mulsant P, Gasser F, Hatey F: **Caractérisation fonctionnelle et génétique de séquences non identifiées impliquées dans la folliculogénèse ovarienne chez la truie.** In *Colloque de clôture des Actions Coordonnées Concertées des Sciences du Vivant ; 22-23 décembre 1997 ; Paris, France. 1997*
 13. Tosser-Klopp G, Cloucard-Martinato C, Mulsant P, Gasser F, Hatey F: **Recherche de gènes exprimés lors du développement du follicule ovarien par tri différentiel et PCR différentielle.** In *XIX^{ème} forum des jeunes chercheurs de la société de biochimie et biologie moléculaire ; 8-11 juillet 1997 ; Corte, France. 1997*
 14. Yerle M, Lahbib-Mansais Y, Goureau A, Tosser-Klopp G, Pinton P, Sun HS, Tuggle C, Gellin J: **Contribution to the comparative map between humans and pigs.** In *11th North American Colloquium on Domestic Animal Cytogenetics and Gene Mapping - Minneapolis (USA) 14-18 Juin 1999* *Animal Biotechnology. 1999*
 15. Cabau C, Leroux C, Lahbib-Mansais Y, Tosser-Klopp G, Milan D, Karsenty E, Yerle M, Barillot E, Hatey F, Gellin J: **High Resolution Mapping of 148 Type I Markers in Pigs.** In *XXVIIth International Conference on Animal Genetics (ISAG) ; 22-26 juillet 2000 ; Minneapolis, USA. 2000*
 16. Leroux C, Tosser-Klopp G: **La fonction du gène : les grandes étapes de l'utilisation de l'information génétique.** *Productions Animales 2000, HS:21-28.*
 17. Tosser-Klopp G, Cloucard-Martinato C, Benne F, Bonnet A, Cabau C, Rallières J, Hatey F: **Exemple d'approche fonctionnelle : la fonction ovarienne dans l'espèce porcine.** *Productions Animales 2000, HS:165-167.*
 18. Yerle M, Lahbib-Mansais Y, Tosser-Klopp G, Goureau A, Pinton P, Gellin J: **Mammalian comparative mapping.** In *27th International Congress on Animal Genetics (ISAG) – Minneapolis (USA) 22-26 Juillet 2000. 2000*
 19. Goureau A, Garrigue A, Tosser-Klopp G, Lahbib-Mansais Y, Chardon P, Yerle M: **Conserved synteny and gene order difference between human chromosome 12 and pig chromosome 5.** In *Third European Cytogenetics Conference –Paris 6-9 Juillet 2001. 2001*
 20. Bonnet A, Tosser-Klopp G, Benne F, Cabau C, Villeger S, Soares MB, Bonaldo F, Hatey F: **A pig normalised multi-tissue cDNA library.** In *7th WCGALP ; Montpellier. 2002: 03-31.*

21. Bonnet A, Hérault F, Tosser-Klopp G, Le Meuth-Metzinger V, Benne F, Désert C, Cabau C, Villeger S, Soares BF, Bonaldo F, Douaire M, Hatey F: **Chicken and Pig Normalised Multi-Tissue cDNA Libraries**. In *XXVIIIth International Conference on Animal Genetics ; 11-15 août 2002 ; Göttingen, Allemagne*. 2002
22. Bonnet A, Tosser-Klopp G, Benne F, Cabau C, Villeger S, Soares BF, Hatey F: **A pig normalised multi-tissue cDNA library**. In *Colloque AGENAE « Génomique des animaux d'élevage », 20-21 mai 2003, Seignosse*. 2003
23. Lefebvre H, Tosser-Klopp G, Toutain P-L, Hatey F: **Evaluating variability in drug response : pharmacogenetics. "The Cutting Edge"**. In *Thirteenth Biennial AAVPT Symposium, June 3-5, 2003, Charlotte, North Carolina, USA*. 2003
24. Tosser-Klopp G, Lefebvre H, Benne F, Gobert N, Bonnet A, Liaubet L, Hatey F: **Le transcriptome ovarien du porc : étude de faisabilité d'un projet à grande échelle**. In *Colloque " Génomique des animaux d'élevage " ; 20-21 mai 2003 ; Seignosse, France*. 2003
25. Bonnet A, Benne F, Dantec C, Gobert N, Frappart P-O, San Cristobal M, Hatey F, Tosser-Klopp G: **Identification of genes and gene networks involved in Pig Ovarian Follicular Development, by using cDNA Micro-arrays**. In *XIII International Workshop on the Development and Function of Reproductive Organs ; 12-15 June 2004 ; Copenhagen, Denmark*. 2004
26. Bonnet A, Degrelle S, Diot C, Douaire M, Govorum M, Goupil A-S, Guiguen Y, Hatey F, Hérault F, Hocquette J-F, Hue I, Lagarrigue S, Le Gac F, Leroux C, Martin P, Pollet S, Renard J-P, Sandra O, Tosser-Klopp G: **Réseaux d'ADNc pour l'analyse du transcriptome des animaux d'élevage**. In *Séminaire " Programmes INRA de génomique animale, végétale et des microorganismes " ; 2-3 décembre 2004 ; Paris, France*. 2004
27. Bonnet A, Degrelle S, Désert C, Douaire M, Govorum M, Goupil A-S, Guiguen Y, Hatey F, Hérault F, Hocquette J-F, Hue I, Le Gac F, Le Provost F, LeMeuth-Metzinger V, Martin P, Pollet S, Renard J-P, Sandra O, Sudre K, Tosser-Klopp G: **Bilan du séquençage de collections d'ADNc chez 4 espèces d'élevage (bovin, porc, poule, truite) (programmes ASTEROGER et AGENAE)**. In *Séminaire " Programmes INRA de génomique animale, végétale et des microorganismes " ; 2-3 décembre 2004 ; Paris, France*. 2004
28. Bonnet A, Lê Cao KA, San Cristobal M, Low-So G, Tosser-Klopp G, Hatey F: **Transcriptome of pig ovarian cells: discriminant genes involved in pig ovarian development**. In *1st European Farm Animal Functional Genomics Conference ; 18-20th september 2005 ; Edinburgh, Heriot Watt University, United Kingdom*. 2005
29. Bonnet A, Lê Cao KA, San Cristobal M, Low-So G, Tosser-Klopp G, Hatey F: **Transcriptome of pig ovarian cells: discriminant genes involved in pig ovarian development**. In *XIIth European Congress on Biotechnology ; 21-24th August 2005 ; Copenhagen, Denmark*. 2005
30. Liaubet L, Ferré P, Concordet D, San Cristobal M, Tosser-Klopp G, Bonnet A, Toutain P-L, Hatey F, Lefebvre HP: **Remaniements du muscle strié après injection intramusculaire chez le porc : analyse du transcriptome et étude cinétique**. In *Journées Recherche Porcine ; Paris, France*. 2005: 141-146.
31. Bonnet A, Tosser-Klopp G, San Cristobal M, Lê Cao KA, Hatey F: **Discriminant genes involved in follicular development: transcriptome analysis of pig ovarian cells**. In *Pig Genome I ; 20-21th February 2006 ; Lodi, Italy*. 2006
32. Bonnet A, Lê Cao KA, San Cristobal M, Low-So G, Tosser-Klopp G, Hatey F: **Transcriptome of pig ovarian cells: discriminant genes involved in pig ovarian development**. In *Pig Genome I ; 20-21th February 2006 ; Lodi, Italy*. 2006

33. Delmas C, Duval M, Robert-Granié C, Le Cao K, Tosser-Klopp G, San Cristobal M: **Two new procedures to detect differentially expressed genes.** In *EADGENE Data Analysis Workshop*, ; 1-3 November 2006 ; Tine, Denmark,. 2006
34. Le Cao K, San Cristobal M, Tosser-Klopp G, Delmas C, Duval M, Robert-Granié C: **Gene profile clustering, selection of predictive genes using random forests and a stochastic algorithm, regulatory networks in a transcriptomic kinetics on bovine mastitis.** In *EADGENE Data Analysis Workshop*, ; 1-3 November 2006 ; Tine, Denmark,. 2006
35. Terenina-Rigaldie E, A H, C, SanCristobal M, Tosser-Klopp G, Hatey F: **Identification of discriminates genes and gene networks involved in pig ovarian follicular atresia by using cDNA microarrays.** In *Sixth ARK-Genomics Farm Animal Functional Genomics Workshop* ; Wednesday 27th to Thursday 28th September 2006 ; Robinson College Cambridge, UK. 2006
36. Terenina-Rigaldie E, Bonnet A, A H, C, SanCristobal M, Tosser-Klopp G, Hatey F: **Identification of discriminates genes and gene networks involved in pig ovarian follicular atresia by using cDNA microarrays.** In *GénoToul2006* ; Thursday 23rd November 2006 ; Toulouse, France. 2006
37. Tosser-Klopp G, Benne F, Bonnet A, Bodin L, Bontoux M, Delpuech T, Fabre S, Hatey F, Monget P, Monniaux D, Mulsant P, Robert-Granié C, San Cristobal M: **Exploitation de la variabilité génétique intra et inter-espèces pour l'étude du déterminisme génétique du taux d'ovulation.** In *Séminaire AGENAE* ; 28-29 mars 2006 ; Futuroscope, Poitiers, France. 2006
38. Bonnet A, Lê Cao KA, SanCristobal M, Tosser-Klopp G, Hatey F: **Analyse du transcriptome ovarien : identification de réseaux de gènes impliqués dans la folliculogénèse.** In *Journées de la Recherche Porcine* ; Paris, France. 2007
39. Bonnet A, Le Cao K, Terenina E, San Cristobal M, Robert-Granié C, Benne F, Rallières J, Tosser-Klopp G, Hatey F: **What makes the ovarian follicle grow? a transcriptome point of view.** In *Embryogenomics* ; 17-20 10 2007 ; Paris, France. 2007
40. Tosser-Klopp G, Benne F, Bodin L, Bonnet A, Bontoux M, Delpuech T, Drouilhet L, Fabre S, Hatey F, Monget P, Monniaux D, Mulsant P, Robert-Granié C, San Cristobal M: **Exploitation de la variabilité génétique intra et inter-espèces pour l'étude du déterminisme génétique du taux d'ovulation.** In *Séminaire AGENAE* ; 15-16 octobre ; Dourdan, France. 2007
41. Bonnet A, Le Cao K, San Cristobal M, Benne F, Robert-Granié C, Law-So G, Fabre S, Besse P, De Billy E, Quesnel H, Hatey F, Tosser-Klopp G: **In vivo gene expression in granulosa cells during pig terminal follicular development.** In *Pig Genome II* ; June 2008, 4-5th ; Ljubljana, Slovenia. 2008
42. Bonnet A, Le Cao K, San Cristobal M, Benne F, Robert-Granié C, Law-So G, Fabre S, Besse P, De Billy E, Quesnel H, Hatey F, Tosser-Klopp G: **Etude de l'expression des gènes dans les cellules de la granulosa porcine "in vivo" au cours du développement folliculaire terminal.** In *Journées scientifiques du département de Génétique Animale* ; 21-24 avril ; Lacanau, France. 2008
43. Bonnet A, Lagarrigue S, Liaubet L, Robert-Granié C, San Cristobal M, Tosser-Klopp G: **Pathway results from the chicken data set using several softwares.** In *EADGENE and SABRE Post-Analyses* , ; Workshop12-14th November 2008 ; Animal Sciences Group, Wageningen UR, Lelystad. 2008
44. Jaffrézic F, Tosser-Klopp G: **Gene network reconstruction from microarray data.** In *EADGENE and SABRE Post-Analyses* , ; Workshop12-14th November 2008 ; Animal Sciences Group, Wageningen UR, Lelystad. 2008

45. Klopp C, Moreews F, Casel P, Tosser-Klopp G, auteurs... immd: **Annotation results.** In *EADGENE and SABRE Post-Analyses* , ; *Workshop12-14th November 2008* ; *Animal Sciences Group, Wageningen UR, Lelystad.* 2008
46. Terenina E, Hourcade C, San Cristobal M, Hatey F, Tosser-Klopp G, Bonnet A: **Identification with cDNA microarrays of discriminant genes and gene networks involved in pig ovarian follicular atresia.** In *EAAP – 59th Annual Meeting* ; *Vilnius, Lituania.* 2008
47. Tosser-Klopp G, Benne F, Bodin L, Bonnet A, Bontoux M, Delpuech T, Drouilhet L, Fabre S, Izart A, Monget P, Monniaux D, Mulsant P, Robert-Granié C, San Cristobal M, Vignoles F: **Exploitation de la variabilité génétique intra et inter-espèces pour l'étude du déterminisme génétique du taux d'ovulation.** In *Séminaire AGENAE* ; *20-22 octobre* ; *La Rochelle, France.* 2008
48. Bonnet A, Benne F, Bevilacqua C, Bodin L, Cotinot C, Mandon-Pépin B, Martin P, Liaubet L, San Cristobal M, Tosser-Klopp G: **Regulation of early folliculogenesis.** In *Conference Jacques-Monod* ; *4 au 8 avril 2009* ; *Roscoff.* 2009
49. Gamot A, Villa N, Liaubet L, Rossi F, Tosser-Klopp G, Cherel P, San Cristobal M: **Are gene networks always meaningful?** In *EADGENE* ; *15-17 octobre 2009* ; *Paris.* 2009
50. Gerard N, Tosser-Klopp G, Benne F, Bonnet A, Delpuech T, Douet C, Drouilhet L, Fabre S, Izart A, Monget P, Monniaux D, Mulsant P, Robert-Granié C, San Cristobal M, Vignoles F, Bodin L: **Unravelling the mechanisms of mammalian ovarian follicular development and atresia: a cattle vs pig transcriptome and proteome study.** In *EAAP* ; *24-27, August 2009* ; *Barcelona, Spain.* 2009

H.4 Encadrement et co-encadrement de la recherche

Personnels en Contrat à durée déterminée :

1. Cayré S: **Criblage différentiel d'une banque d'ADNc.** Contrat Emploi Solidarité; 1994-1995
2. Cabau C: **Contrat Genetpig.** In. CDD; 1998-2000
3. Villeger S: **Construction d'une banque d'ADNc.** CDD; 1999-2000

Etudiants accueillis dans le cadre de formation diplômantes :

Licence :

4. Somnard S: **Etude par Northern blot de la régulation de certains gènes sélectionnés par tri différentiel dans la granulosa de follicules porcins.** BTS; 1995
5. Perret S: **Localisation chromosomique, étude de l'expression tissulaire et de la régulation de gènes hormono-régulés exprimés dans les cellules de granulosa porcine à l'aide d'un panel d'hybrides somatiques.** BTS, Lycée Agricole de Toulouse Auzeville; 1997
6. Tournan B: **Etude cytogénétique de gènes exprimés dans les cellules de granulosa porcine.** BTS, Lycée Agricole de Toulouse Auzeville; 1999

Master :

7. Billy Ed: **Etude de la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la folliculogénèse ovarienne chez la truie.** DESU, Université Paul Sabatier, Toulouse III; 1995-1996
8. Bodin F: **Recherche de gènes impliqués dans la folliculogénèse ovarienne chez la truie.** DESU, Université Paul sabatier, Toulouse III; 1995-1996
9. Bonnafé E: **Localisation chromosomique, étude de l'expression tissulaire et de la régulation de gènes hormono-régulés exprimés dans les cellules de granulosa porcine à l'aide d'un panel d'hybrides somatiques.** Magistère, Ecole Normale Supérieure de Lyon; 1997
10. Gindraud V: **Caractérisation génétique et fonctionnelle de gènes exprimés dans les cellules de granulosa de truie et régulés par la FSH.** DESS, IUP bioingénierie, Université Paul Sabatier, Toulouse III.; 1997
11. Cabau C: **Analyse de la structure et du polymorphisme du gène de la glutathion S-transferase alpha porcine.** DESU, Université Paul sabatier, Toulouse III; 1997-1998
12. Gobert N: **Décryptage d'une fonction complexe par analyse du transcriptome : identification et analyse des gènes de la folliculogénèse ovarienne.** M2R, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, Université de Rennes I; 2003
13. Mestdagh R: **Annotation d'une puce générique porcine.** M1, Université Paul Sabatier, Toulouse III; 2006
14. Madiou S: **Allongement par RACE-PCR de clones de cDNA isolés pour leur rôle dans la folliculogénèse porcine.** M1, Université paul Sabatier, Toulouse III; 2007
15. Izart A: **Identification de gènes impliqués dans la folliculogénèse ovarienne chez les bovins et les porcins.** M1, Université de Toulouse Le Mirail; 2008
16. Chayriguet A: **Analyse de données d'expression génique : cas de la folliculogénèse ovarienne.** M1, Université Toulouse III; 2009

Doctorants :

17. Ferré P: **Étude des lésions musculaires iatrogènes.** Thèse de doctorat, Institut national polytechnique (Toulouse), 2004.
18. Kim-Anh LC: **Outils statistiques pour la sélection de variables et l'intégration de données "omiques".**Thèse de doctorat, Institut national des sciences appliquées (Toulouse), 2008.

Autres stagiaires :

19. Pablos Gd: **Stage d'immersion.** Collège des châlets; 1995