

## **Analyse de modifications post-transcriptionnelles dans les ovocytes immatures et matures chez le bovin**

GOHIN M. (1), LAFLAMME I. (1), DUFORT I. (1), ROBERT C. (1), SIRARD M.A. (1)

(1) Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Département des Sciences animales, Pavillon des services/INAF, Université Laval, Québec, QC, Canada G1V 0A6

### **RESUME**

La compréhension de l'ensemble des régulations qui s'exercent sur l'ARNm, de sa transcription à sa dégradation, ainsi que sa traduction et la caractérisation des différentes modifications post-transcriptionnelles impliquées (épissage, polyadénylation et dé-adénylation) est primordiale en biologie de la reproduction. En effet, la régulation précise de ces différents mécanismes est essentielle à la formation d'un ovocyte de bonne qualité, c'est-à-dire permettant un développement embryonnaire normal. La transcription étant arrêtée de la maturation ovocytaire jusqu'aux premiers clivages embryonnaires, l'ovocyte met en réserve différents ARNs qui seront nécessaires lors du développement embryonnaire précoce. Ces ARNs seront traduits successivement à travers un processus finement régulé dont les mécanismes sont encore peu connus. La régulation de la longueur de la queue poly(A) à l'extrémité 3' de l'ARNm semble être impliquée dans le stockage, dans l'initiation de la traduction et dans la dégradation de ceux-ci. A ce jour, les méthodes utilisées pour identifier les ARNs maternels déadénylés sont indirectes. Dès lors, nous mettons au point une méthode de purification des ARNs polyadénylés mais aussi déadénylés. Les mises au point ont été réalisées sur de l'ARN purifié de cellules de granulosa et les premiers essais sur les ovocytes immatures ont été réalisés. Nous obtenons deux fractions enrichies en ARN polyadénylés ou en ARN déadénylés. La contamination respective entre les deux fractions (en moyenne 19% pour les ovocytes) ainsi que le rendement total (0,8% de l'ARN initial) reste à être améliorée. A la suite de ce travail, les deux fractions seront amplifiées et hybridées sur puces Agilent EmbryoGENE (44K). Nous comparerons alors l'évolution des deux fractions entre ovocytes immatures et matures chez le bovin. L'état de polyadénylation des candidats identifiés sera vérifié par race-pat (rapid amplification of cDNA ends-poly(A) test) et PCR en temps réel.

## **Analysis of the post-transcriptional modifications in immature and mature bovine ovocytes**

GOHIN M. (1), LAFLAMME I. (1), DUFORT I. (1), ROBERT C. (1), SIRARD M.A. (1)

(1) Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Département des Sciences animales, Pavillon des services/INAF, Université Laval, Québec, QC, Canada G1V 0A6

### **SUMMARY**

Understanding mRNA regulation from transcription to degradation, including translation and characterization of the different post-transcriptional modifications involved (splicing, polyadenylation and deadenylation) is a major issue in reproductive biology. The precise regulation of these different mechanisms is necessary to the development of an ovocyte of good quality, allowing normal embryo development once matured and fertilized. Transcription is silenced during ovocyte maturation until the first embryonic divisions, so the ovocyte stores different RNA that will be necessary during early embryonic development. Stored RNA will be translated during a finely regulated process by some mechanisms that are still poorly understood. However, regulation of the length of the poly(A) tail to the 3' extremity of the mRNA appears to be involved in the storage, translation initiation and degradation of mRNA. To date, methods used to identify the maternal deadenylated RNA are indirect. Therefore, we are establishing methodology to recover polyadenylated and deadenylated RNA. First, we tested the method on RNA isolated from granulosa cells. The first attempt on immature ovocytes was also performed. Two populations enriched in either polyadenylated or deadenylated RNA were obtained, although respective contamination of both populations (19% for ovocytes), and the total yield (0,8% of initial RNA) need to be improved. In the future, both populations will be amplified and hybridized on an EmbryoGENE Agilent chip (44K). We then will be able to compare the evolution of both populations between immature and mature oocytes. Validation of polyadenylation of mRNA will be performed by race-pat (rapid amplification of cDNA ends-poly(A) test) and real time PCR.

## INTRODUCTION

Au cours de l'ovogenèse, différents ARNs sont synthétisés par l'ovocyte et stockés au sein de complexe ribonucléoprotéique (RNP) en prévision de la maturation ovocytaire et du développement embryonnaire. En effet, à partir de la maturation ovocytaire et jusqu'à l'activation du génome embryonnaire, la transcription est arrêtée. Néanmoins, la traduction de nouvelles protéines reste nécessaire à la progression de la maturation ovocytaire ainsi que lors du développement embryonnaire précoce (Lonergan, *et al.* 1998; Sirard, *et al.* 1989).

Il en résulte que certains ARNs maternels sont déadénylés et stockés lors de l'ovogenèse et sont essentiels au renouvellement de certaines protéines en absence de transcription. A ce jour, différentes études ont été réalisées pour identifier des candidats dont l'état d'adénylation varie entre les ovocytes immatures et matures chez de nombreuses espèces dont le bovin (Paynton et Bachvarova, 1994; Thelie *et al.*, 2010).

Néanmoins les ARNs déadénylés sont identifiés indirectement par comparaison avec les ARNs détectés avec des amorces aléatoires ou oligo-dT. Dans le but d'identifier des candidats dont l'état d'adénylation varie au cours de la maturation ovocytaire, nous mettons au point une méthode permettant d'obtenir une fraction enrichie en ARN polyadénylés (A+), mais aussi une fraction enrichie en ARN déadénylés (A-).

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. OBTENTION DU MATERIEL BIOLOGIQUE

Les ovaires de vaches laitière sont collectés d'un abattoir et transportés soit à 30-35°C pour les cellules de granuloosa soit à froid sur glace pour la récolte des ovocytes dans une solution saline 0.9% NaCl contenant des agents antibiotiques et antimycotiques.

Les cellules de granuloosa sont obtenues en grattant les follicules et placées dans du PBS-EDTA (10 mM). Après centrifugation de 2 minutes à 2000g, les cellules sont lavées dans 200 µl de PBS et recentrifugées avant congélation à -80°C à sec. Les complexes cumulus-ovocyte (COCs) des follicules de 3-6 mm de diamètre ont été ponctionnés et sélectionnés comme décrits précédemment (Labrecque et Sirard 2011). 200 ovocytes immatures ont été congelés à -80°C après dénudation.

### 1.2. ISOLATION DES DEUX FRACTIONS D'ARN

L'ARN est extrait à l'aide du kit Pico-Pure RNA Isolation (Molecular devices, Sunnydale, CA, USA). 100 pg d'ARN polyadénylés de GFP et d'ARN déadénylés de la large sous-unité de l'enzyme RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphate

carboxylase/oxygenase, RubL) de tomate sont ajoutés lors de l'extraction et utilisés comme contrôles externes. L'ARN total est ensuite purifié par le kit Ribominus transcriptome isolation (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) avec des volumes divisés par deux pour adapter les conditions à de faibles quantités d'ARN initial.

Afin d'obtenir les deux populations d'ARN, le microkit dynabeads mRNA direct (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norvège) a été utilisé. L'ARN correspondant à la fraction enrichie en ARN A- est concentré en utilisant les colonnes de concentration Ribominus concentration Module (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A chaque étape, 2 µl d'ARN sont congelés pour réaliser une reverse transcription et la qualité de l'ARN total initial ainsi qu'après l'utilisation du kit ribominus est analysée par 2100-bioanalyseur (Agilent Technologies, Palo Alto, Ca, USA).

### 1.3. TRANSCRIPTION INVERSE ET PCR EN TEMPS REEL

2 µl des différentes fractions d'ARN sont utilisés pour la transcription inverse avec 10 µM d'amorces aléatoires et avec le kit qScript™ cDNA SuperMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD, USA) suivant les recommandations du fournisseur. L'ADNc obtenu est analysé par PCR en temps réel sur un appareil LightCycler à l'aide du kit LightCycler FastStart DNA polymerase (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada) comme précédemment décrit (Labrecque et Sirard 2011).

## 2. RESULTATS

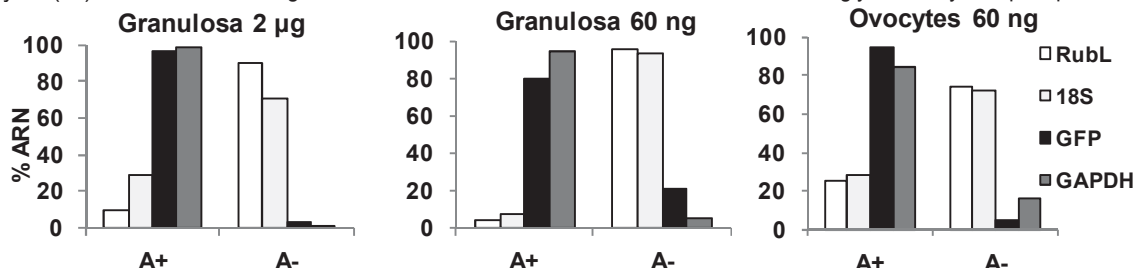
### 2.1. MISE AU POINT A PARTIR D'ARN DE CELLULES DE GRANULOSA

Dans un premier temps, nous avons testé notre méthodologie avec 2 µg d'ARN isolé de cellules de granuloosa selon les recommandations des fournisseurs, puis nous avons adapté le protocole à 60 ng d'ARN de départ correspondant à environ 200 ovocytes immatures. Il en résulte que la majorité des ARNs contrôles externes (RubL et GFP) et internes (18S et GAPDH) sont retrouvés dans leur population respective (figure). De plus, une contamination d'en moyenne 9,3% d'une fraction par l'autre est identifiée avec un maximum de 20 % pour l'ARN de GFP. Néanmoins, à travers ces différentes étapes de purification, nous observons une très forte perte d'ARN car nous retrouvons en moyenne 0,1% de l'ARN initial pour les candidats testés.

### 2.2. APPLICATION AUX OVOCYTES IMMATURES

Nous avons dès lors testé le protocole avec de l'ARN isolé à partir de 200 ovocytes immatures. Les ARNs contrôles externes et internes sont retrouvés dans leur population respective avec une contamination moyenne de 19% et un rendement moyen de 0,8%.

**Figure** Pourcentage d'ARN mesuré par PCR en temps réel dans les fractions enrichies en ARNs polyadénylés (A+) et déadénylés (A-). RubL = Rubisco large subunit ; GFP = Green Fluorescent Protein ; GAPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase



### 3. DISCUSSION

Ce travail a permis de mettre au point une méthode d'isolation de deux fractions d'ARN selon l'état d'adénylation de leur queue poly(A). A l'aide d'ARNs contrôles externes mais aussi de contrôles internes, nous avons démontré que cette méthode permet bien d'obtenir une forte proportion de ces contrôles dans leur population respective. Néanmoins, une contamination d'environ 19% est détectée dans les ovocytes immatures. Il est envisageable de modifier la température d'hybridation afin d'être plus ou moins permissif sur la longueur de la queue poly(A) des ARNs triés. De plus, il sera nécessaire de valider la longueur de la queue poly(A) de ces candidats, par race-pat et PCR en temps réel. Enfin, les différentes fractions d'ARN obtenues par cette méthode seront amplifiées et hybridées sur les puces EmbryoGENE afin d'identifier des candidats dont l'état d'adénylation varie entre des ovocytes immatures et matures.

### CONCLUSION

A partir de cette méthode, il est envisageable de caractériser des candidats dont l'état de polyadénylation varie fortement au cours de la maturation ovocytaire. Ces candidats peuvent être nécessaire pour la formation d'un ovocyte mature voire d'un embryon viable. Il serait dès lors intéressant de caractériser leur fonction et régulation au cours de ces différents stades ainsi que de déterminer s'ils ne sont pas dérégulés lors de la maturation et de la fécondation *in vitro*.

*Ce travail est soutenu par le CRNSG.*

**Labrecque, R., Sirard, MA. 2011.** *Reprod, Fert and Dev*, 23, 591-602

**Lonergan, P., Fair, T., Khatir, H., Cesaroni, G., Mermillod, P. 1998.** *Theriogenology*, 50, 417-431.

**Paynton, B.V., Bachvarova, R. 1994.** *Mol Reprod Dev* 37 172-180.

**Sirard, MA., Florman, H.M., Leibfried-Rutledge, M.L., Barnes, F.L., Sims, M.L., First, N.L. 1989.** *Biol Reprod*, 40, 1257-1263.

**Thelie, A., Papillier, P., Penetier, S., Perreau, C., Traverso, J.M., Uzbekova, S., Mermillod, P., Joly, C., Humblot, P., Dalbès-Tran, R. 2007.** *BMC Dev Biol* 7 125.

