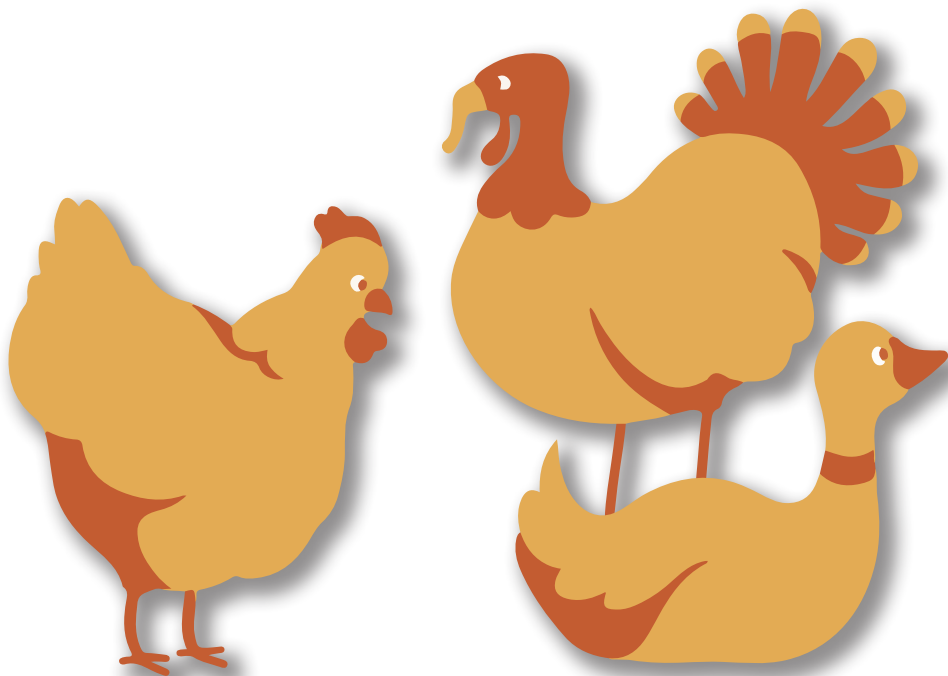


12^e Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras



5 & 6 avril 2017

TOURS - Centre des congrès Vinci



RAISING LIFE



NOTHING IS MORE PRECIOUS THAN LIFE. THAT IS THE PHILOSOPHY DRIVING PHILEO.

With global population increasing, the world faces a growing demand for sustainable food.

Phileo Lesaffre Animal Care works at the crossroads of nutrition and health. We are committed to delivering poultry health and performance solutions that contribute to food safety and the responsible use of antibiotics.

In every country, our progress is led by the most advanced science as well as practical on-farm experience.

phileo-lesaffre.com



ORVIA GOURMAUD SÉLECTION

5, La Seigneurtière – Saint-André-Treize-Voies

85260 MONTREVERD – FRANCE

Tél : +33 (0)2 40 02 02 00 // Fax : +33 (0)2 40 02 02 07

E-mail : contact@orvia.fr

WWW.ORVIA.FR

MASTERING A WHOLE PROCESS

La maîtrise de tout un process

GENETIC SELECTION / Sélection Génétique

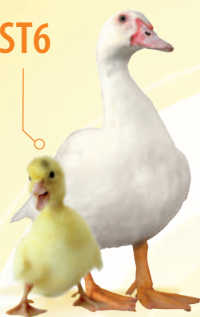
INTEGRAL INDUSTRIAL PROCESS / Processus Industriel Complet

ENVIRONMENT & ANIMAL WELFARE / Environnement & BEA

RISK MANAGEMENT / Management des Risques

CONSULTANCY & SERVICES / Conseils & Services

ST6



MUSCOVY DUCK

Canard de Barbarie

ST5



PEKIN DUCK

Canard Pékin

STIMUL



MULE DUCK

Canard Mulard

SI



WHITE & GREY GEES

Oie blanche & grise



Les 12^{èmes} Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras ont été organisées avec le soutien financier des sociétés et organismes suivants :



Ensemble, pour nourrir l'excellence

SESSION

GENETIQUE - REPRODUCTION

Synthèse

MODIFICATIONS CIBLEES DES GENOMES : APPORTS ET IMPACTS POTENTIELS DES NOUVELLES TECHNOLOGIES POUR LES ESPECES AVIAIRES

Ducos Alain¹, Bed'Hom Bertrand², Acloque Hervé¹, Pain Bertrand³

¹ *GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, ENVT, Castanet Tolosan, France*

² *GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, France*

³ *Univ Lyon, Université Lyon 1, INSERM, INRA, Stem Cell and Brain Research Institute, U1208, CSC USC1361, Bron, France.*

a.ducos@envt.fr

RÉSUMÉ

L'avènement des nucléases programmables, et de CRISPR-Cas9 en particulier, constitue une réelle rupture technologique dans le domaine de l'ingénierie génétique. Le principe de ces méthodes est relativement simple. Il consiste en premier lieu à générer des cassures double-brin au niveau d'une (de) séquence(s) d'ADN cible dans des cellules d'intérêt (cellules somatiques, germinales, embryonnaires, iPS ...). Ces cassures sont ensuite réparées, soit par un mécanisme de ligation non-homologue des extrémités, pouvant conduire à l'inactivation d'un gène de la région modifiée (*knock-out*, ou KO), ou par recombinaison homologue, permettant l'insertion d'un fragment de séquence modèle apporté aux cellules (*knock-in*, ou KI). Les domaines d'application de ces techniques sont très nombreux : recherche fondamentale, thérapie génique, ingénierie écologique, biotechnologies industrielles, agriculture ... Elles ont d'ores et déjà été utilisées à de multiples reprises dans les espèces animales d'élevage. Des exemples d'applications visant à améliorer la santé des animaux (induction de résistances pour des maladies infectieuses à fort impact économique, et/ou à fort potentiel zoonotique), à éviter des pratiques d'élevage compromettant le bien-être animal (élimination systématique de poussins mâles ...), ou à modifier les produits (œufs, viande ...) dans le but d'améliorer leur valeur santé (réduction des allergies), ou nutritionnelle, sont présentés. Le déploiement de ces méthodes soulève de multiples questions (techniques, réglementaires, économiques, éthiques ...) qui sont discutées.

ABSTRACT

Genome Editing: what impacts for farm animal species?

The advent of designer nucleases, especially CRISPR-Cas9, is providing a real breakthrough in genome editing technology. The principle is relatively simple. Double-strand breaks (DSB) are accurately produced on selected target DNA sequences from somatic, germinal, embryonic or iPS cells. These DSB are then repaired by non-homologous end-joining, resulting in inactivation (*knock-out*) of the targeted gene(s), or by inserting a specific DNA fragment (template) through homologous recombination (*knock-in*). These technologies can be used in multiple domains, including fundamental research, gene therapy, ecological engineering, biotechnologies or agriculture. Many applications involving farm-animal species have already been published. Examples are presented of research projects aiming at improving animal health (acquisition of resistance to major infections and/or zoonotic diseases), avoiding controversial breeding practices (elimination of male chicks ...), and improving the health impact (reduction of allergies) and/or nutritional values of animal products (eggs, meat ...). Numerous questions raised by the use of CRISPR technology (techniques, regulation, economics, ethics...) are discussed.

INTRODUCTION

Les premières souris transgéniques ont été produites dès le début des années 1980 par micro-injection de matériel génétique exogène dans l'un des pronoyaux d'œufs fécondés (Gordon et Ruddle, 1981). La même technique a été utilisée, quelques années plus tard, pour produire les premiers mammifères et poissons d'élevage génétiquement modifiés. Les spécificités de l'embryon des espèces aviaires ont nécessité le recours à d'autres techniques, comme l'infection rétro- et lentivirale d'embryons à des stades précoces du développement, pour obtenir les premiers poulets transgéniques à la fin des années 1980 (Bosselman et al., 1989). Entre autres limites, ces méthodes « historiques » de transgénèse présentent l'inconvénient majeur de ne maîtriser ni les sites d'insertion des transgènes, ni le nombre de copies effectivement intégrées dans le génome des cellules ciblées, rendant les profils d'expression des transgènes généralement peu prédictibles. Chez la souris, la possibilité de modifier le génome de façon précise par recombinaison homologue (RH) dans des cellules embryonnaires souches (ES) a été démontrée dès 1989 (Capecchi, 1989) et a constitué une avancée scientifique majeure pour la recherche en biologie. La manipulation des cellules ES reste cependant impossible dans la plupart des espèces de mammifères d'élevage, et non pertinente chez le poulet car elle ne permet pas la transmission des modifications génétiques à la lignée germinale (Nishijima et Iijima, 2013).

Des approches alternatives ont donc été recherchées et proposées. Chez les mammifères, des modifications ciblées de cellules somatiques en culture par RH, suivies de clonage par transfert de noyaux (*somatic cell nuclear transfer*, ou SCNT) ont été réalisées. Cependant, cette approche demeure longue, fastidieuse, et d'une efficacité limitée. Chez le poulet, l'utilisation de la RH dans des cellules germinales primordiales en culture (PGC) a permis de produire les premiers animaux recombinants pour un locus défini d'immunoglobuline, mais avec une efficacité là encore limitée (1 clone cellulaire modifié pour 10⁷ cellules transfectées ; Schusser et al., 2013).

Une possibilité d'améliorer cette efficacité de façon importante est apparue avec le concept de « nucléases programmables », permettant de générer des cassures double-brin au niveau de régions précises de la séquence d'ADN. Les premières techniques basées sur ce concept (*Zinc Finger Nucleases*, ou ZFN ; *Transcription Activator-Like Effector Nuclease*, ou TALEN), ont été respectivement développées à la fin des années 1990 et 2000. Malgré leur efficacité avérée, elles sont toutefois d'utilisation délicate, du fait notamment de la complexité de leur élaboration et de leur coût élevé. Une avancée décisive a eu lieu

avec le développement de la technique CRISPR-Cas9 (Jinek et al., 2012), beaucoup plus simple en termes de conception et d'utilisation, moins coûteuse, et, de ce fait, bien plus accessible. A ce jour, son efficacité a été démontrée dans plus de 40 espèces (Haeussler et Concordet 2016), et ses perspectives d'utilisation sont considérables (Hsu et al., 2014).

Dans la suite de cet article, nous présenterons les principes généraux de cette méthode d'ingénierie ciblée des génomes, considérée par d'aucuns comme une révolution dans le monde de la biologie (Lander, 2016). Ses applications en recherche fondamentale et médicale, en ingénierie écologique ou dans certains domaines industriels particuliers (pharmacie, biotechnologies blanches ...) seront évoquées brièvement, avant de présenter plus longuement son utilisation à des fins agronomiques (filères de productions animales, avicoles en particulier). Les limites de cette technique, les questions qu'elle soulève (aspects éthiques, réglementaires, économiques ...) seront également présentées et discutées.

1. PRÉSENTATION DE LA TECHNIQUE CRISPR-CAS9

1.1. CRISPR-Cas9 : un système immunitaire bactérien

CRISPR est l'acronyme de *Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats* : séquences répétées palindromiques courtes (30 bases) regroupées et régulièrement intercalées avec d'autres séquences qualifiées de *spacers*, vestiges de séquences de bactériophages ou de plasmides, d'environ 36 bases. Ce type particulier de motif a été observé dès la fin des années 1980 dans le génome d'*Escherichia coli*, puis, rapidement, dans de nombreuses autres espèces de bactéries et d'archées. L'évolution des connaissances dans ce domaine est bien résumée par Lander 2016. Des gènes codant des protéines aux fonctions variées (hélicases, nucléases ...) ont été identifiés à proximité de ces séquences CRISPR. Ces gènes « Cas », pour *CRISPR-associated genes*, dont le gène codant l'endonuclease Cas9, sont directement liés à la fonction de ces systèmes CRISPR (immunité adaptative chez les procaryotes, voir la synthèse de Marraffini, 2015).

1.2. CRISPR-Cas9 : un outil révolutionnaire d'ingénierie ciblée des génomes

Les travaux de microbiologie moléculaire ont permis des progrès importants dans notre compréhension du fonctionnement de ces systèmes. Cependant, si CRISPR-Cas9 induit une telle effervescence depuis quelques années dans la communauté scientifique, et bien au-delà, c'est en raison de son utilisation possible

pour générer des cassures au niveau de régions très précises de l'ADN, dans potentiellement tout type de cellules : animales, végétales, fongiques, microbiennes. L'idée initiale de « détourner » ce système bactérien pour en faire un outil d'ingénierie ciblée des génomes, ainsi que les premières preuves de concepts, sont à porter au crédit de plusieurs scientifiques très médiatisés ces derniers temps, comme le tandem Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna (Doudna et Charpentier, 2014), d'une part, et Feng Zhang (Zhang, 2015), d'autre part.

Le principe général de l'outil CRISPR-Cas9 est relativement simple, et schématisé sur la Figure 1. Comme c'était déjà le cas pour ZFN ou TALEN, CRISPR-Cas9 est constitué de deux composants principaux : un dispositif (ou domaine) de « guidage », permettant la reconnaissance par hybridation d'une séquence cible sur le génome de la cellule à modifier, et un domaine de « clivage » enzymatique, générant des cassures double-brin de la molécule d'ADN au niveau de la (ou des) région(s) ciblée(s) (on parle de « ciseaux moléculaires »). L'élément principal qui différencie CRISPR-Cas9 des systèmes antérieurs ZFN et TALEN est la nature du dispositif de guidage. Dans le cas de CRISPR-Cas9, ce dispositif est constitué d'une simple molécule d'ARN guide, ou sgRNA, dont une partie permet l'association à l'enzyme Cas9, et une vingtaine de bases sont complémentaires de la séquence cible. Dans le cas de ZFN ou TALEN, le dispositif de guidage est un complexe protéique, plus difficile, long et coûteux à produire. Les systèmes CRISPR-Cas9 sont donc globalement plus simples et plus rapides à développer et à tester que ZFN ou TALEN. Comme l'illustrent certains exemples détaillés plus loin, ils sont aussi sensiblement plus efficaces et offrent la possibilité de « multiplexage » (modification simultanée de plusieurs cibles du génome), ce qui était beaucoup plus difficile à envisager avec ZFN ou TALEN (Bao et al., 2015).

Dans le processus de modification ciblée par les nucléases programmables, une fois la cassure double-brin générée au niveau de la (des) séquence(s) cible(s), deux voies de réparation par la cellule sont possibles (Figures 2 et 3). La première (NHEJ, pour *Non Homologous End Joining*, ou ligation non-homologue des extrémités, Figure 2) consiste en un simple ajout ou excision de bases sur chacun des brins à l'endroit de la coupure. Si cette dernière est induite au niveau d'une région codante (exon d'un gène), les courtes insertions/délétions générées par la réparation (un à quelques nucléotides) induisent classiquement un décalage du cadre de lecture (mutation *frameshift*) conduisant à l'inactivation, ou *knock-out* (KO), de ce gène. L'autre voie de réparation (HDR, pour *Homology Directed Repair*, ou réparation par recombinaison homologue, Figure 3) est possible si un modèle d'ADN est apporté à la cellule en même temps que le système CRISPR-Cas9. Il peut s'agir

d'un gène de la même espèce, avec, par exemple, une variation de séquence intéressante, ou un gène d'une autre espèce. Ce modèle peut être inséré à l'endroit de la cassure par des mécanismes de recombinaison homologue, et induire une (des) fonction(s) particulière(s) chez la cellule modifiée (modification *knock-in*, ou KI). L'efficacité de CRISPR-Cas9 est supérieure, voire très supérieure, à celle des systèmes antérieurs (Wang et al., 2016). Elle est le plus souvent élevée pour générer des KO de gènes (voie de réparation NHEJ). Il demeure toutefois plus difficile de réaliser des KI, les événements de recombinaison homologue restant assez rares, et pouvant par ailleurs s'accompagner d'insertions/délétions indésirables. Des efforts de recherche importants sont actuellement réalisés pour tenter d'améliorer l'efficacité (le rendement) des modifications KI (par la voie HDR). L'utilisation d'inhibiteurs de la voie de réparation concurrente (NHEJ) est une piste explorée avec un certain succès par différents groupes de recherche (voir par exemple Chu et al., 2015).

Les composants du système CRISPR-Cas9 peuvent être délivrés dans les cellules à modifier (cellules somatiques en culture, cellules souches pluripotentes induites, ou iPS, cellules embryonnaires ...) de différentes façons : (i) à l'aide de vecteurs viraux ; (ii) par électroporation ou micro-injection de plasmides d'expression, de transposons ou d'ARN messager ; (iii) à l'aide de systèmes physiques (nanoparticules) ; pour plus de détails, voir par exemple la revue de Jo et al., 2015.

Les mammifères génétiquement modifiés ont été principalement produits, jusqu'à présent, à l'aide des stratégies suivantes : (i) micro-injection pronucléaire dans des embryons produits par fécondation *in vitro*, suivie du transfert des embryons modifiés dans des femelles receveuses ; (ii) modification de cellules somatiques en culture, sélection (criblage) des clones cellulaires ayant les modifications souhaitées, et production d'animaux modifiés à partir de ces cellules par SCNT (voir pour plus de détails la revue de Menchaca et al., 2016).

Chez le poulet, les PGC (*primordial germ cells*) constituent un matériau de choix pour la procréation d'individus génétiquement modifiés (Schusser et al., 2013). Ces cellules, précurseurs des gamètes, présentent la particularité de migrer, via la circulation sanguine, du croissant germinale jusqu'aux crêtes génitales, et colonisent les gonades en formation (Doran et al., 2016). Elles peuvent être collectées, soit à partir du sang circulant d'un embryon de 2 jours, soit à partir des gonades embryonnaires (6-8 jours de développement), et utilisées pour initier des cultures cellulaires à long terme. Ces PGC en culture peuvent être génétiquement modifiées, puis réinjectées au 3ème jour d'incubation dans la circulation sanguine d'autres embryons. Ceci permet de générer des individus chimériques (G0), utilisés pour produire des

descendants (G1, G2 ...) ayant intégré la (ou les) modification(s) dans l'ensemble de leurs cellules, à l'état hétérozygote (G1) ou homozygote (G2) (van de Lavoie et al., 2006, Nishijima et Iijima, 2013). Une approche encore plus simple, consistant à transfecter directement les PGC *in vivo*, a été récemment proposée et validée par Tyack et al., 2013. Elle permet de s'affranchir des délicates étapes de culture cellulaire et ouvre des perspectives intéressantes, notamment pour les espèces aviaires autres que le poulet (Doran et al., 2016). Cependant, avec ce type d'approche, le contrôle des événements de modification ne peut se faire qu'au niveau de l'animal, comme dans le cas de la micro-injection pronucléaire chez les mammifères. Le criblage des modifications souhaitées est donc plus difficile qu'à partir d'une culture cellulaire.

2. UTILISATION DE LA TECHNIQUE CRISPR-CAS9

2.1. Panorama général

Le caractère révolutionnaire de la technologie CRISPR-Cas9 tient notamment au spectre extrêmement large de ses applications, déjà testées ou potentielles. Celles-ci sont bien décrites dans Doudna et Charpentier, 2014, ou Hsu et al., 2014.

CRISPR-Cas9 est, avant tout, un outil de plus en plus incontournable en recherche fondamentale, permettant d'aborder de nouvelles questions scientifiques, ou de s'intéresser à d'autres, plus anciennes, de façon plus efficace et/ou approfondie. CRISPR-Cas9 permet, par exemple, d'étudier efficacement les relations génotype-phénotype via la réalisation de cribles fonctionnels (perte ou gain de fonction) à haut débit (voir la revue de Shalem et al., 2015). L'utilisation de formes désactivées de Cas9 (dCas9), ayant perdu la faculté de couper l'ADN, mais pouvant toujours s'associer à des régions précises par l'intermédiaire du sgRNA (cet ARN guide est synthétisé de façon à être complémentaire des séquences que l'on veut cibler), est par ailleurs devenue une méthode de choix pour visualiser des régions génomiques particulières au sein de cellules vivantes (dCas9 fusionnée avec des protéines fluorescentes ; Ma et al., 2015). Ces formes désactivées dCas9 constituent aussi des outils extrêmement précis et souples pour étudier les mécanismes de régulation de l'expression génique, notamment épigénétiques (dCas9 couplée à des modulateurs épigénétiques, par exemple des enzymes méthyltransférases ; *epigenome editing*, voir la synthèse de Kungulovski et Jeltsch, 2016).

CRISPR-Cas9 ouvre également des perspectives extrêmement importantes dans le domaine de la thérapie génique et cellulaire humaine, en facilitant les modifications de cellules somatiques, iPS, voire

embryonnaires : élimination ou correction de variations délétères ou pathologiques, addition de gènes thérapeutiques (voir la revue de Maeder et Gerbach, 2016). Des travaux permettant d'améliorer la précision et l'innocuité de ces approches sont néanmoins nécessaires pour ce type d'application. Ceci fait actuellement l'objet de très gros efforts de recherche.

La technique CRISPR-Cas9 peut aussi être employée pour modifier le génome de microorganismes (bactéries, levures) utilisés pour la production industrielle de produits chimiques, pharmaceutiques, de polymères ou de carburants à partir de biomasse, source très importante de carbone renouvelable (biotechnologies blanches ; voir par exemple Estrela et al., 2016). Elle permet aussi l'élaboration de systèmes dits de *gene drive* (ou d'hérédité « supermendélienne »). Ces derniers permettent de modifier très rapidement, en quelques générations seulement, un ou des gène(s) cible(s) dans des populations entières. Si, par exemple, les gènes inactivés sont indispensables à la reproduction de l'espèce, cela peut conduire à son éradication. Ceci a été testé avec succès pour différentes espèces d'insectes vecteurs de maladies majeures chez l'Homme, dont le paludisme, responsable de plus de 500 000 morts par an (Hammond et al., 2016). Les mêmes approches pourraient constituer des moyens de lutte efficaces contre certaines espèces invasives, devenues résistantes à des biocides (insecticides, herbicides, anthelminthiques, par exemple, voir la revue de Champer et al., 2016).

CRISPR-Cas9 peut enfin être utilisée pour modifier le génome de plantes, modèles ou cultivées (Khatodia et al., 2016), ou celui d'animaux d'élevage, avec des visées biomédicales ou agronomiques. Dans le domaine biomédical, on pense à la création de nouveaux modèles animaux de pathologies humaines potentiellement plus pertinents que la souris (Whitelaw et al., 2015) ou à la production de greffons, en particulier porcins, pour la xénotransplantation (Niemann et Petersen, 2016). Les applications agronomiques envisagées, et en particulier celles concernant les filières avicoles, sont présentées plus en détail dans le chapitre suivant.

2.2. Applications agronomiques (espèces aviaires)

Produire des organismes génétiquement modifiés, y compris animaux, pour « nourrir l'humanité », n'est pas une idée récente (Houdebine, 1998, 2005). Mais si la commercialisation de variétés de plantes génétiquement modifiées est chose commune dans certaines régions du monde depuis le milieu des années 1990, la situation est très différente pour les espèces animales. Le saumon *Aquadvantage*® est actuellement la seule lignée transgénique à bénéficier d'une autorisation de commercialisation, délivrée fin 2015 par l'administration américaine, après 20 ans de

procédures (Ledford, 2015). Les raisons expliquant ce fort contraste entre plantes et animaux sont nombreuses. Certaines sont liées à des questions d'acceptabilité de ce type de produits par les consommateurs. D'autres sont d'ordres scientifique (technique) et/ou économiques. Cependant, les avancées spectaculaires en termes de connaissance des génomes, et la rupture technologique que représente CRISPR-Cas9, ont induit une explosion des travaux d'ingénierie des génomes animaux au cours des dernières années (Tan et al., 2016). Ceci, accompagné d'une forte mobilisation de certains leaders d'opinion, est probablement de nature à faire évoluer la situation au cours des années à venir.

Il serait impossible de citer ici l'ensemble des travaux entrepris à ce jour. Une liste des modifications réalisées dans les espèces bovine, ovine, caprine et porcine à l'aide des nucléases programmables ZFN, TALEN et CRISPR-Cas9, et publiées avant fin 2015, a été établie par Tan et al., 2016. Une synthèse des réalisations et des perspectives concernant les espèces aviaires a été récemment proposée par Doran et al., 2016. L'ensemble des applications envisagées pour les espèces animales est également bien résumé et mis en perspective dans le texte de Reardon, 2016 : *The CRISPR zoo*. Nous n'évoquerons de façon détaillée dans la suite de ce texte que quelques travaux illustrant bien certains types d'applications régulièrement mis en avant par les promoteurs de ces technologies, parce que plus faciles à justifier auprès de la société que d'autres, ou répondant à certaines critiques classiquement adressées par une partie de la société au secteur de l'élevage : (i) les modifications ciblées du génome visant à améliorer la santé des animaux d'élevage, (ii) celles permettant de ne plus recourir à des pratiques d'élevage très mal perçues car altérant le bien être des animaux ou soulevant d'évidentes questions éthiques, et (iii) celles visant à modifier les caractéristiques des produits animaux (lait, œufs, viande) dans une perspective d'amélioration de la nutrition et de la santé de l'Homme.

(i) Modifications ciblées du génome visant à améliorer la santé des animaux

La gestion des problèmes de santé en élevage est un sujet complexe. Un consensus assez large existe néanmoins pour considérer que les approches les plus efficaces et durables sont celles mobilisant de façon complémentaire différents leviers d'action : amélioration des conditions d'élevage (logement, alimentation, protections sanitaires ...), utilisation raisonnée des vaccins et des médicaments pour éviter l'apparition trop rapide de résistances, et sélection d'animaux présentant une robustesse naturelle face aux maladies (concept de gestion intégrée de la santé). Les méthodes de sélection fondées sur l'exploitation de la variabilité génétique existant au sein des populations, incluant donc la sélection assistée par

marqueurs ou la sélection génomique, ont d'ores et déjà permis d'obtenir des résultats très probants en matière de résistance génétique à certaines pathologies infectieuses d'importance économique majeure en élevage. Les méthodes d'ingénierie ciblée des génomes, complémentaires, ouvrent cependant d'autres perspectives, qui doivent être considérées.

Des résultats marquants ont été publiés, par exemple chez les bovins et les porcs : production de vaches transgéniques produisant dans leur glande mammaire deux protéines humaines disposant de propriétés antimicrobiennes, les rendant résistantes à plusieurs souches bactériennes responsables de mammites (Liu et al., 2014) ; production de porcs dont les deux copies du gène codant la protéine CD163 ont été inactivées, les rendant résistants à une souche virale responsable de SDRP (syndrome dysgénésique et respiratoire porcin), maladie virale ayant les répercussions économiques les plus importantes en élevage porcin à l'échelle mondiale (Whitworth et al., 2016).

Chez les volailles, d'autres maladies d'origine virale ont un fort potentiel zoonotique. C'est le cas en particulier de l'influenza aviaire, maladie pour laquelle le contrôle par la vaccination (interdit en France), ou par des méthodes de biosécurité, est également difficile. Rendre les animaux résistants à ce type de virus, en recourant éventuellement à des méthodes d'ingénierie génétique, est donc potentiellement intéressant pour l'économie des filières avicoles, mais également en termes de santé publique. C'est avec cet objectif que Lyall et al., 2011, de l'Université de Cambridge, en association avec le Roslin Institute, Université d'Edinburgh, ont imaginé un système de résistance au virus fondé sur l'interférence à ARN. L'idée générale de leurs travaux consistait à intégrer dans le génome de poulets, à l'aide de vecteurs lentiviraux, des transgènes exprimant une courte séquence d'ARN en épingle à cheveux (shRNA, *short-hairpin RNA*). Cet ARN, transcrit par les cellules des animaux transgéniques, était conçu pour fonctionner comme un leurre, attirant et bloquant la polymérase du virus, perturbant donc la réplication de ce dernier. Dans ces travaux fondateurs, publiés en 2011, tous les animaux transgéniques infectés expérimentalement par une souche virale hautement pathogène ont succombé à l'infection. Cependant, la transmission du virus à d'autres animaux, transgéniques ou non, élevés en contact étroit avec les animaux infectés, a pu être évitée (baisse de la contagiosité). Ce résultat montre la pertinence de ce type d'approche pour limiter et/ou ralentir la propagation de la maladie au sein d'un élevage et/ou d'un territoire. Les animaux transgéniques de Lyall et al., 2011, ont été produits à l'aide de méthodes de transgénèse antérieures à CRISPR-Cas9 (transduction du shRNA à l'aide d'un vecteur lentiviral dans des embryons d'œufs

fraîchement pondus). Un jeune coq produisant le transgène dans sa semence a été utilisé pour procréer des descendants ayant intégré la même copie unique du transgène sur leur chromosome 2. D'autres travaux du même type pourraient être réalisés avec une précision et une efficacité accrue en mobilisant les techniques les plus récentes de modifications ciblées (CRISPR-Cas9).

(ii) Modifications ciblées du génome permettant de ne plus recourir à certaines pratiques d'élevage

Certaines pratiques d'élevage (castration, gavage, écornage, élimination de poussins ...) font l'objet de campagnes de dénonciations virulentes organisées par certaines associations défendant la cause animale (L214 notamment). Une conséquence de ces campagnes est que le souhait d'abandonner ces pratiques est de plus en plus partagé au sein de la société. Leur abandon peut passer par une évolution des systèmes et des pratiques d'élevage, et/ou par une réorganisation des filières. Cependant, dans ce domaine également, l'ingénierie ciblée des génomes peut être une option *a priori* séduisante.

Chez les bovins par exemple, la production par clonage SCNT de taureaux homozygotes pour le gène « sans corne », à partir de cellules d'individus homozygotes « cornus » modifiées par les nucléases programmables, est désormais possible. L'utilisation de ces individus génétiquement modifiés permet d'envisager une augmentation rapide de la fréquence des veaux nés sans corne, sans nécessairement pénaliser de façon importante le niveau génétique des populations (races) concernées (Carlson et al., 2016).

Une autre pratique, ayant fait l'objet d'une campagne de dénonciation importante au cours des derniers mois, est l'élimination systématique, lors de l'éclosion, et à l'aide de méthodes parfois non appropriées, de poussins d'un sexe donné, par exemple des mâles dans le cas de la production de poussins femelles destinés à la ponte. Ces poussins mâles, issus de souches sélectionnées pour les aptitudes de ponte, sont en effet non adaptés à la production de poulets de chair, en raison d'une croissance, d'une composition corporelle et de comportements inadaptés aux exigences des filières. Pour éviter cette destruction massive de poussins, l'équipe de Tim Doran et Mark Tizard en Australie (CSIRO) a imaginé un système de production original valorisant la transgénèse (Figure 4). Ce système consiste à produire une lignée d'individus transgéniques dont le chromosome Z, noté Z^{GFP} , a intégré un transgène codant une protéine fluorescente (GFP). Chez les oiseaux, c'est le sexe femelle qui est hétérogamétique (ZW), les mâles disposant dans chacune de leurs cellules de deux chromosomes Z. Les femelles de la lignée transgénique (individus $Z^{GFP}W$) sont inséminées par de la semence de coqs issus d'autres lignées sélectionnées non transgéniques (individus ZZ). Les produits de ces accouplements

sont des femelles ZW (qui ont hérité d'un chromosome W non génétiquement modifié de leur mère transgénique, et d'un chromosome Z de leur père non transgénique), et des mâles $Z^{GFP}Z$, dont l'un des chromosomes Z, celui hérité de leur mère, porte le gène codant la GFP. Seules les femelles ayant un intérêt pour la filière ponte, les mâles doivent être écartés. Ceux-ci peuvent l'être par un mirage des œufs réalisé précocement au cours de la phase d'incubation (détection de la fluorescence). Les œufs présentant un signal de fluorescence sont alors orientés vers un autre circuit de valorisation (industrie pharmaceutique, chimie ...) bien avant l'éclosion, tandis que les autres sont gardés en incubation pour la production de poussins femelles (ZW) destinés à devenir des poules pondeuses. Ces femelles sont issues d'un parent transgénique, mais ne portent pas elles-mêmes de transgène, ce qui pose la question de leur statut : les promoteurs de ce dispositif considèrent que ces animaux ne sont pas génétiquement modifiés et qu'ils devraient par conséquent échapper à toute réglementation « OGM ». Ce dispositif, séduisant à certains égards, reste pour l'instant, à notre connaissance, à l'état de projet (pas de publication parue). Quelques inconnues restent par ailleurs à lever. Par exemple, quel promoteur utiliser pour obtenir une intensité optimale de fluorescence détectable dans les œufs ? On peut toutefois penser qu'avec les techniques actuelles de modification génétique, il pourrait devenir réalité à assez court terme. Se posera alors la question de l'acceptabilité par le consommateur de ce type d'approche.

(iii) Modifications ciblées du génome visant à améliorer la nutrition et la santé de l'Homme

Parmi les nombreuses questions que l'Homme se pose actuellement concernant son alimentation, celle des allergies alimentaires fait partie des plus importantes. Les allergies au lait de vache ou à l'œuf comptent parmi les plus fréquentes chez le jeune enfant, et sont difficiles à gérer pour les individus concernés dans la mesure où ces produits sont utilisés pour l'élaboration de très nombreuses préparations alimentaires ou non-alimentaires (protéines d'œuf présentes dans certains vaccins par exemple). L'élimination de ces aliments, sans substitution appropriée, peut par ailleurs être à l'origine de carences ou de malnutrition très préjudiciables durant la croissance de l'enfant. Les principales molécules allergisantes sont des protéines : caséines, lactalbumine, lactoglobuline pour le lait, ovalbumine, ovomucoïde pour le blanc d'œuf. Ces protéines, comme toutes les autres, sont le produit de gènes particuliers. L'inactivation de ces gènes, ou la modification de leurs séquences codantes pour diminuer l'allergénicité des protéines correspondantes, pourraient donc être envisagées, dans des filières d'élevage spécialisées, pour la production d'aliments adaptés aux régimes de personnes allergiques, ou, plus globalement, pour atténuer la fréquence de ces allergies chez l'enfant.

C'est avec cet objectif qu'ont été réalisés les travaux de l'équipe coréenne de TS Park (*Seoul National University*), la première à utiliser les nucléases programmables chez le poulet (Park et al., 2014). À l'aide de la technologie TALEN, des cassures ont été générées dans l'exon 2 du gène codant l'ovalbumine au sein de PGC en culture. Des délétions de 6 à 29 nucléotides, inactivant le gène, ont été constatées dans 33% des cellules analysées. Ces cellules ont été réinjectées dans des embryons de poulets pour donner naissance à des individus chimériques. Ces derniers ont été accouplés à des individus non modifiés pour procréer plusieurs descendants G1 portant une copie du gène muté dans chacune de leurs cellules. Aucune anomalie n'a été détectée chez ces animaux. Le séquençage de leur génome n'a révélé aucune modification hors cible. Le même type de travaux a été entrepris plus récemment par une équipe japonaise, mais, cette fois, et pour la première fois chez le poulet, à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9 (Oishi et al., 2016). Deux gènes étaient ciblés dans ces travaux (ovalbumine et ovomucoïde), qui sont allés jusqu'à l'obtention d'individus G2 mutés sur les deux copies du gène de l'ovomucoïde. Les résultats obtenus démontrent une nouvelle fois la grande efficacité et la précision de cette technique : taux de transformation cellulaire >90%, pas de modification hors-cible détectée dans les trois régions candidates analysées. L'impact à long terme (sur toute la durée de vie productive des animaux) de l'absence d'une protéine aussi importante que l'ovalbumine pour le développement et la croissance embryonnaire devrait toutefois être évalué avant d'envisager une application commerciale de ce genre de travaux.

D'autres programmes de recherche du même type ont été conduits avec succès pour modifier la composition protéique du lait de différentes espèces de ruminants (Yu et al., 2011 ; Song et al., 2015).

DISCUSSION

Les quelques exemples développés dans la partie précédente illustrent l'efficacité et le potentiel des nucléases programmables, et de CRISPR-Cas9 en particulier, pour la production de nouvelles lignées d'animaux génétiquement modifiés. Ces méthodes représentent, dans le domaine de l'ingénierie génétique, une réelle rupture technologique. Des raffinements méthodologiques visant à améliorer la précision (éviter les modifications hors-cible), le potentiel de multiplexage (modification simultanée de plusieurs régions du génome), ou l'innocuité des méthodes, par exemple, doivent encore être apportés. Toutefois, des efforts de recherche très importants sont actuellement en cours, accompagnés de moyens financiers considérables. Cela permet de penser que les améliorations techniques nécessaires seront opérationnelles rapidement.

Le déploiement de ces méthodes pour l'obtention d'animaux génétiquement modifiés dépendra étroitement de l'évolution des connaissances en matière de déterminisme et de variabilité génétique des caractères d'intérêt. Dans ce domaine, deux points de vue assez symétriques peuvent être défendus. Le premier consiste à considérer que de nombreux gènes majeurs (polymorphismes expliquant une part importante de la variabilité génétique d'un ou de plusieurs caractères importants en sélection) ont été identifiés dans le passé dans les espèces d'élevage. Une partie de ces gènes pourraient d'ores et déjà être candidats à des modifications ciblées, pour introduire certains allèles dans des populations particulières, en supprimer ou en corriger d'autres ... Ce pourrait aussi être le cas de nombreuses autres régions du génome où des variants responsables d'affections héréditaires sont identifiés. Les progrès très importants des connaissances permis par l'évolution spectaculaire des techniques d'analyse des génomes peuvent par ailleurs laisser penser que de nouvelles régions candidates à modification(s) par CRISPR-Cas9 pourraient être identifiées très régulièrement. Une autre façon de voir les choses serait de considérer que les caractères quantitatifs sélectionnés sont essentiellement polygéniques. Les analyses d'associations à l'échelle du génome entier réalisées jusqu'à présent montrent que, sauf exception, les polymorphismes contribuant le plus à la variation des caractères (QTL) n'expliquent qu'une faible part de cette variation. Par conséquent, si quelques régions du génome peuvent effectivement faire l'objet de modifications ciblées, l'essentiel des progrès génétiques à venir devrait être le résultat des programmes actuels de sélection, avec ou sans information génomique.

L'utilisation de CRISPR-Cas9 dans les populations d'élevage pose par ailleurs différentes questions dont les sélectionneurs devront s'emparer. La durabilité des améliorations produites en est une, tout particulièrement dans le cas des modifications visant à induire une résistance de l'hôte à des agents pathogènes. La dynamique évolutive de ces derniers peut être à l'origine de contournements de résistance rapides, rendant potentiellement peu pertinent et relativement vain, voire risqué, tout effort de lutte basé sur la modification d'un ou de quelques gènes de l'hôte seulement.

La politique à adopter par les organisations raciales et de producteurs vis-à-vis des nouvelles technologies est un autre aspect qu'il sera important de considérer. On peut imaginer, dans ce domaine, différents positionnements. Dans certaines populations, celles sur lesquelles s'adosent certains signes officiels de qualité par exemple, on pourrait envisager l'interdiction de toute intervention : un « variant CRISPR » particulier pourrait être formellement exclu de certains cahiers des charges. À l'inverse, on peut aussi envisager que certains sélectionneurs s'engagent

dans la différenciation de nouvelles populations (races) sur la base de « variants CRISPR » originaux. La question de la brevetabilité de tels animaux pourrait par ailleurs se poser : la modification d'une seule (ou de quelques) régions du génome serait-elle suffisante pour qu'une entreprise s'approprie une génétique façonnée au cours du temps par des générations d'éleveurs ?

Les modifications ciblées des génomes sont aussi susceptibles de poser des questions spécifiques en matière de gestion de la diversité génétique des populations : certains reproducteurs disposant de caractéristiques intéressantes induites par ingénierie ciblée pourraient en effet être utilisés massivement, créant de nouveaux goulets d'étranglement au sein des populations. De même, la gestion des programmes de sélection génomique pourrait être affectée par la nécessité d'estimer et de prendre en compte l'effet des nouveaux « variants CRISPR » dans les équations de prédiction génomique.

L'utilisation de ces nouvelles techniques fait également émerger d'autres types de questionnements, plus généraux, auxquels il sera parfois difficile de répondre.

Un premier type de questionnement concerne la nature juridique de ces innovations. La définition légale d'un OGM figure dans la directive 2001/18/CE : « un OGM est un organisme, à l'exception des êtres humains, dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle ». Jusqu'à présent, et sur la base de cette définition, c'était la méthode d'obtention qui déterminait la nécessité ou non d'une évaluation préalable à une éventuelle autorisation. Quelques techniques seulement, comme la mutagenèse, étaient exclues du champ d'application de la directive. Désormais, avec le déploiement des nucléases programmables, qui facilitent la réalisation de modifications ciblées qui, pour certaines, miment des processus cellulaires s'effectuant naturellement, les cartes sont susceptibles d'être rebattues. Un lobbying important est organisé actuellement, visant à faire évoluer la réglementation dans le sens d'une évaluation des produits eux-mêmes, sur la base de leurs caractéristiques propres, et non plus sur la seule base des méthodes ayant permis leur obtention (voir par exemple Murray et Maga, 2016).

Par ailleurs, les techniques de modification ciblées sont susceptibles de ne laisser aucune trace détectable sur les génomes : la mutation « naturelle » d'un gène, et la reproduction à la base près de cette modification par CRISPR, pourraient ne pas être distinguables. Se pose alors la question de la diffusion « cachée », délibérée (parce que cela pourrait procurer un avantage commercial temporaire) ou involontaire d'individus issus de ces techniques sur des territoires (ou dans des populations) qui continueraient pourtant

à les réglementer ou les interdire. La gestion de ce type de situation pourrait être particulièrement difficile.

D'autres questionnements sont d'ordre éthique. A-t-on le droit de se substituer à la nature pour introduire des modifications au sein de génomes d'espèces domestiques, même si, d'un point de vue moléculaire, certaines de ces modifications peuvent être de même nature que celles apparaissant naturellement par mutation ? Nombre de travaux, plus ou moins récents, illustrent bien la très grande complexité des mécanismes de régulation des phénomènes biologiques. Peut-on raisonnablement penser évaluer et maîtriser l'ensemble des conséquences que peut induire, chez un animal, la modification d'une (ou plusieurs) région(s) de son génome ? La réponse à ces questions implique nécessairement la prise en compte de considérations qui dépassent largement le seul cadre scientifique.

L'acceptabilité (la recevabilité par le citoyen-consommateur) des animaux issus de ce type de techniques est aussi une question très difficile à appréhender. Les débats concernant les OGM végétaux sont d'une grande complexité eux aussi, et parfois d'une grande violence. Il y a fort à parier que les débats que susciteront les perspectives de commercialisation d'animaux génétiquement modifiés seront au moins aussi difficiles. Une des difficultés tient au fait que le nombre de dimensions à considérer pour évaluer l'intérêt ou non de ces innovations est très important. Les questions relatives aux risques liés (i) à la consommation de produits OGM pour la santé humaine, ou (ii) à la dissémination de variétés ou d'individus OGM pour la biodiversité, par exemple, font partie des controverses. Mais d'autres dimensions sont tout aussi importantes à considérer dans une perspective de gestion des risques, et font aussi l'objet d'appréciations parfois contradictoires. C'est le cas de l'évaluation des conséquences économiques, sociales, ou environnementales de l'utilisation de variétés OGM, qui, toutes, sont fonction de nombreux paramètres : la région considérée, le terme envisagé, la nature des modifications proposées ... etc. Une argumentation classiquement développée par certains chercheurs (voir par exemple McColl et al., 2013 ou Tizard et al., 2016) est la suivante : une croissance très importante de la population humaine est attendue d'ici 2050 ; le chiffre de 9 milliards d'humains en 2050 est généralement avancé. Cette croissance démographique, accompagnée d'une augmentation de la consommation individuelle de produits animaux dans certaines régions (Chine notamment), induira une forte hausse de la demande alimentaire mondiale au cours des 30 prochaines années. La production alimentaire mondiale devra donc augmenter fortement elle aussi (de +70% à +100% selon les auteurs), et la seule façon de faire face à ce très important défi est de recourir aux biotechnologies (sous-entendu : les pratiques agricoles « conventionnelles » ne le

permettront pas). D'autres avis, contradictoires, sont exprimés. Jacobsen et al., 2013, par exemple, considèrent que, dans la mesure où c'est dans les pays du Sud que le besoin d'accroître la production agricole sera particulièrement crucial dans les années à venir, et tout particulièrement en Afrique, des solutions *low-tech* doivent être privilégiées, parce qu'elles sont souvent plus efficaces et moins sujettes à l'échec.

Ces controverses rejoignent celles relatives au(x) modèle(s) d'agriculture(s) à promouvoir. C'est un euphémisme de dire que cette question fait toujours débat en France, ou en Europe. Encore plus à l'échelle mondiale, entre l'Union Européenne (UE) et les USA ou la Chine, notamment.

CONCLUSION

Les méthodes permettant la procréation d'animaux génétiquement modifiés (AGM) ont considérablement évolué ces dernières années. Le développement de lignées commerciales d'AGM dans certaines espèces d'élevage, pour la production de lait, d'œuf ou de viande destinés à la consommation humaine, pourrait être une réalité à assez court terme. Cela pose de multiples questions dont la communauté scientifique, et, plus largement, la société, devraient rapidement s'emparer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bao Z., Cobb R. E., Zhao H., 2016. Wiley Interdiscip. Rev.-Syst. Biol., (8), 5–21.
- Bosselman R., Hsu R., Boggs T., Hu S., Bruszewski J., Ou S., Kozar L., Martin F., Green C., Jacobsen F., Nicolson M., Schultz J., Semon K., Rishell W., Stewart R., 1989. Science, (243), 533–535.
- Capecchi M., 1989. Science, (244), 1288–1292.
- Carlson D. F., Lancto C. A., Zang B., Kim E.-S., Walton M., Oldeschulte D., Seabury C., Sonstegard T. S., Fahrenkrug S. C., 2016. Nat. Biotechnol., (34), 479–481.
- Champer J., Buchman A., Akbari O. S., 2016. Nat. Rev. Genet., (17), 146–159.
- Chu V. T., Weber T., Wefers B., Wurst W., Sander S., Rajewsky K., Kuehn R., 2015. Nat. Biotechnol., (33), 543–U160.
- Doran T. J., Cooper C. A., Jenkins K. A., Tizard M. L. V., 2016. Transgenic Res., (25), 307–319.
- Doudna J. A., Charpentier E., 2014. Science, (346), 1077–+.
- Estrela R., Cate J. H. D., 2016. Curr. Opin. Biotechnol., (38), 79–84.
- Gordon J., Ruddle F., 1981. Science, (214), 1244–1246.
- Haeussler M., Concordet J.-P., 2016. J. Genet. Genomics, (43), 239–250.
- Hammond A., Galizi R., Kyrou K., Simoni A., Siniscalchi C., Katsanos D., Gribble M., Baker D., Marois E., Russell S., Burt A., Windbichler N., Crisanti A., Nolan T., 2016. Nat. Biotechnol., (34), 78–83.
- Houdebine L. M., 1998. INRA Prod. Anim., (11), 81–94.
- Houdebine L. M., 2005. Reprod. Domest. Anim., (40), 269–281.
- Hsu P. D., Lander E. S., Zhang F., 2014. Cell, (157), 1262–1278.
- Jacobsen S.-E., Sorensen M., Pedersen S. M., Weiner J., 2013. Agron. Sustain. Dev., (33), 651–662.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E., 2012. Science, (337), 816–821.
- Jo Y.-I., Suresh B., Kim H., Ramakrishna S., 2015. Biochim. Biophys. Acta-Rev. Cancer, (1856), 234–243.
- Khatodia S., Bhatotia K., Passricha N., Khurana S. M. P., Tuteja N., 2016. Front. Plant Sci., (7), 506.
- Kungulovski G., Jeltsch A., 2016. Trends Genet., (32), 101–113.
- Lander E. S., 2016. Cell, (164), 18–28.
- Lavoie M. C. van de, Diamond J. H., Leighton P. A., Mather-Love C., Heyer B. S., Bradshaw R., Kerchner A., Hooi L. T., Gessaro T. M., Swanberg S. E., Delany M. E., Etches R. J., 2006. Nature, 441, 766–769.
- Ledford H., 2015. Transgenic salmon leaps to the dinner table. Nature, (527), 417–418.
- Liu X., Wang Y., Tian Y., Yu Y., Gao M., Hu G., Su F., Pan S., Luo Y., Guo Z., Quan F., Zhang Y., 2014. Proc. R. Soc. B-Biol. Sci., (281), 20133368.
- Lyll J., Irvine R. M., Sherman A., McKinley T. J., Nunez A., Purdie A., Outtrim L., Brown I. H., Rolleston-Smith G., Sang H., Tiley L., 2011. Science, (331), 223–226.
- Ma H., Naseri A., Reyes-Gutierrez P., Wolfe S. A., Zhang S., Pederson T., 2015. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., (112), 3002–3007.
- Maeder M. L., Gersbach C. A., 2016. Mol. Ther., (24), 430–446.
- Mali P., Yang L., Esvelt K. M., Aach J., Guell M., DiCarlo J. E., Norville J. E., Church G. M., 2013. Science, (339), 823–826.
- Marraffini L. A., 2015. Nature, (526), 55–61.
- Maxmen A., 2015. Nature, (528), S2–S3.
- McColl K. A., Clarke B., Doran T. J., 2013. Aust. Vet. J., (91), 113–117.
- Menchaca A., Anegón I., Whitelaw C. B. A., Baldassarre H., Crispo M., 2016. Theriogenology, (86), 160–169.
- Murray J. D., Maga E. A., 2016. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., (113), 3410–3413.

- Niemann H., Petersen B., 2016. *Transgenic Res.*, 25, 361–374.
- Nishijima K., Iijima S., 2013. *Transgenic chickens. Dev. Growth Diff.*, (55), 207–216.
- Oishi I., Yoshii K., Miyahara D., Kagami H., Tagami T., 2016. *Sci Rep*, (6), 23980.
- Park T. S., Lee H. J., Kim K. H., Kim J.-S., Han J. Y., 2014. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (111), 12716–12721.
- Reardon S., 2016. *Nature*, (531), 160–163.
- Schusser B., Collarini E. J., Yi H., Izquierdo S. M., Fesler J., Pedersen D., Klasing K. C., Kaspers B., Harriman W. D., Lavoie M.-C. van de, Etches R. J., Leighton P. A., 2013. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (110), 20170–20175.
- Shalem O., Sanjana N. E., Zhang F., 2015. *Nat. Rev. Genet.*, (16), 299–311.
- Song Y., Cui C., Zhu H., Li Q., Zhao F., Jin Y., 2015. *Protein Expr. Purif.*, (112), 1–7.
- Tan W., Proudfoot C., Lillico S. G., Whitelaw C. B. A., 2016. *Transgenic Res.*, (25), 273–287.
- Tizard M., Hallerman E., Fahrenkrug S., Newell-McGloughlin M., Gibson J., Loos F. de, Wagner S., Laible G., Han J. Y., D'Occhio M., Kelly L., Lowenthal J., Gobius K., Silva P., Cooper C., Doran T., 2016. *Transgenic Res.*, (25), 575–595.
- Tyack S. G., Jenkins K. A., O'Neil T. E., Wise T. G., Morris K. R., Bruce M. P., McLeod S., Wade A. J., McKay J., Moore R. J., Schat K. A., Lowenthal J. W., Doran T. J., 2013. *Transgenic Res.*, (22), 1257–1264.
- Wang H., La Russa M., Qi L. S., 2016. *Annu. Rev. Biochem.*, (85), 227–64.
- Whitelaw C. B. A., Sheets T. P., Lillico S. G., Telugu B. P., 2016. *J. Pathol.*, (238), 247–256.
- Whitworth K. M., Rowland R. R. R., Ewen C. L., Tribble B. R., Kerrigan M. A., Cino-Ozuna A. G., Samuel M. S., Lightner J. E., McLaren D. G., Mileham A. J., Wells K. D., Prather R. S., 2016. *Nat. Biotechnol.*, (34), 20–22.
- Yu S., Luo J., Song Z., Ding F., Dai Y., Li N., 2011. *Cell Res.*, (21), 1638–1640.
- Zhang F., 2015. *FASEB J.*, (29), 214-1.

Figure 1. L'enzyme induisant des cassures double-brin (Cas9) est dirigée vers une séquence très précise de l'ADN cible par l'intermédiaire d'un ARN guide (d'après Maxmen, 2015)

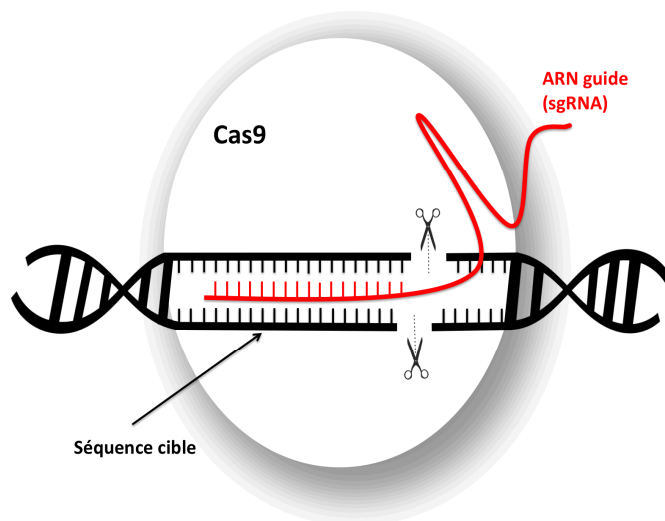


Figure 2. Réparation de la cassure double-brin de type NHEJ (pour *Non Homologous End Joining*, ou ligation non-homologue des extrémités). Si la cassure est induite au niveau d'un gène, les courtes insertions/délétions générées par la réparation induisent classiquement un décalage du cadre de lecture conduisant à l'inactivation, ou *knock-out* (KO), de ce gène (d'après Maxmen, 2015)

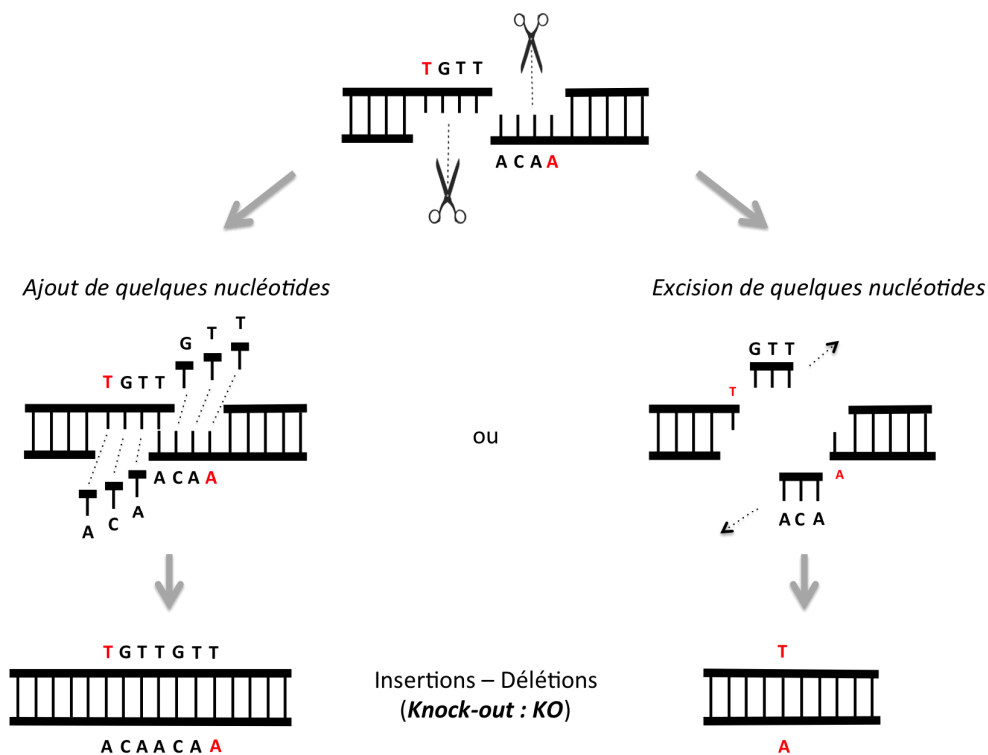


Figure 3. Réparation de la cassure double-brin de type HDR (pour *Homology Directed Repair*, ou recombinaison homologue). Si un modèle d'ADN (en rouge sur la figure) est apporté à la cellule en même temps que le système CRISPR-Cas9, ce modèle peut être inséré à l'endroit de la cassure par des mécanismes de recombinaison homologue, et induire une (des) fonction(s) particulière(s) chez la cellule modifiée (modification *knock-in*, ou KI) (d'après Maxmen, 2015)

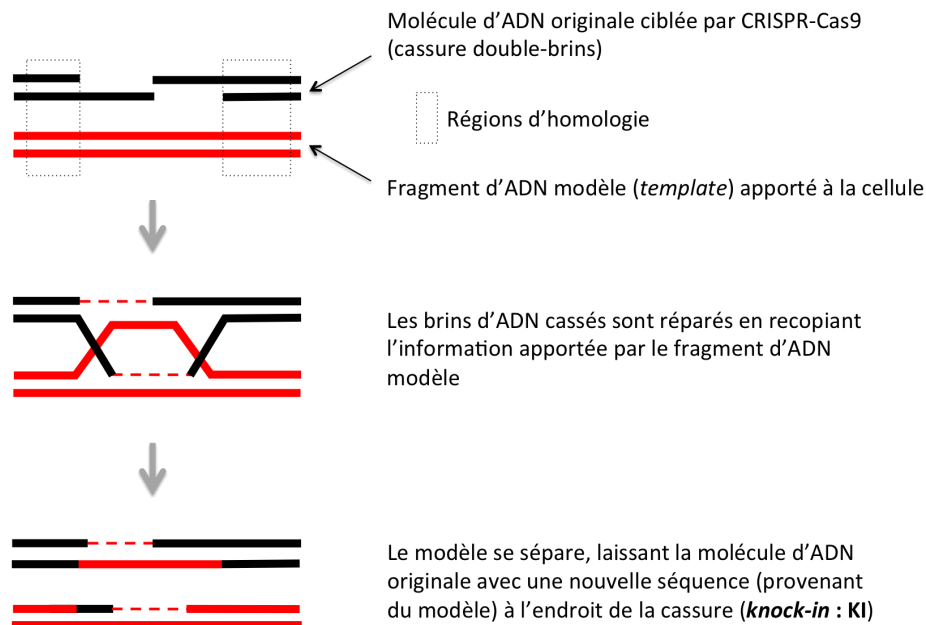
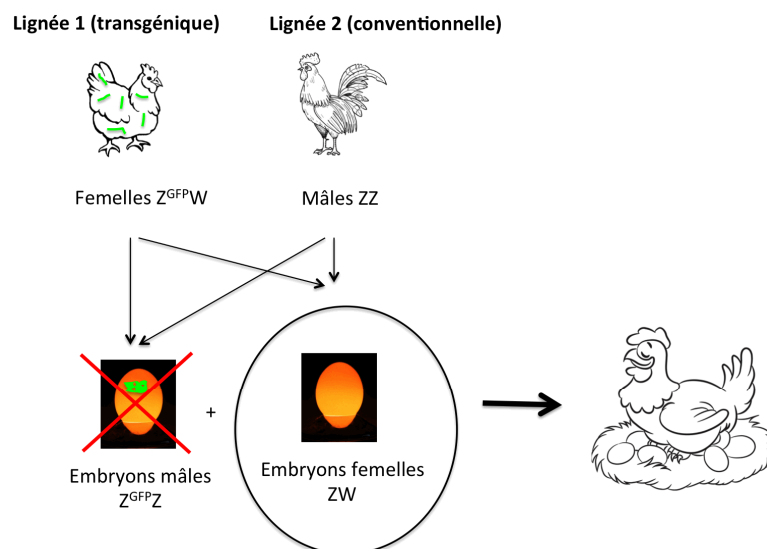


Figure 4. Dispositif imaginé par l'équipe de Mark Tizard et Tim Doran (CSIRO, Australie) permettant de trier les œufs contenant les embryons mâles avant éclosion (production de poussins femelles destinées à la ponte). Ce dispositif valorise une lignée transgénique (animaux ayant intégré le gène codant la protéine GFP sur leur chromosome Z), mais les animaux issus de ce dispositif, destinés à l'élevage, ne portent pas le transgène.



<http://www.isb.vt.edu/documents/animal-biotech/2nd-Intl-Workshop-docs/Day-1/Tizard%20-%20PGE%20in%20chicken.pdf>

VERS DE MEILLEURES PERFORMANCES DE REPRODUCTION EN AVICULTURE : EVALUATION DES PHENOTYPES, PRATIQUES ET AVANCEES

Elisabeth Blesbois¹, M. Govoroun¹, Yves Jégo²

¹UMR-PRC, INRA, CNRS, IFCE, Université François Rabelais ; 37380 NOUZILLY, France.

²HUBBARD, P.O. Box 62144, 35221 CHATEAUBOURG, France.

Elisabeth.blesbois@inra.fr, marina.govoroun@inra.fr, yves.jego@hubbardbreeders.com

RÉSUMÉ

Dans un souci constant d'allier Performance, Qualité, Viabilité, Santé et Bien-être des animaux, les filières avicoles ont besoin d'outils performants pour bien évaluer les phénotypes (capacités) des reproducteurs afin de produire des poussins dans les meilleures conditions possibles de bien-être et d'efficacité. Dans certains cas où seul un sexe est valorisé en production (poule pondeuse, canard mulard), une connaissance précoce du sexe est également très utile. Les progrès physico-biotechniques et les révolutions génétiques et numériques de ces dernières années ont permis un véritable renouvellement de l'approche des capacités de reproduction. Ainsi, les progrès de l'imagerie permettent de visualiser les croissances des gonades et des puces électroniques suivent avec précision les pontes des femelles. L'approche des capacités de reproduction des pères voit émerger une rupture méthodologique avec la mise en place de mesures simplifiées de spectrométrie de masse prédisant la fertilité. Chez la poule, la mise en évidence de gènes différenciellement exprimés en fonction de la fertilité ouvre de nouvelles pistes. Enfin, de nombreuses méthodes d'évaluation précoce du sexe sont en émergence.

ABSTRACT

Avian productions need performing tools of reproductive phenotyping in order to produce progeny in the best efficient and well fair conditions. In specific cases where only one sex is used (laying hen, mule duck), an early knowledge of the sex is also needed. Improvements in physical and biological technics and the recent genetic and numeric revolutions allowed a renewal of the reproductive capacity knowledge. Among others, imaging progress allowed to view better the gonads size and microchips help follow with a high precision the lays. Innovative methods of evaluation of male fertility emerged with simplified use of mass spectrometry methodology adapted to semen. The highlighting of genes differentially expressed between females of contrasted fertility also opens new tracks. Finally, many methods of early sexing are emerging. The present review shows the main recent advances in this area.

I-CONTEXTES ET ENJEUX

Les productions avicoles ont des positions mondialement reconnues. Les viandes de volaille sont en passe de devenir les premières viandes consommées au monde et la production d'œuf de consommation reste très soutenue (sources ITAVI 2015). Sur ce marché mondialisé très dynamique, les filières d'élevage de volailles sont organisées en structure pyramidale segmentée où chacun des trois maillons d'élevage (de haut en bas de la pyramide : sélection, multiplication-accoupage, élevage d'animaux terminaux) impacte fortement le succès du maillon suivant. Ainsi, si la reproduction concerne exclusivement les deux premiers niveaux de la pyramide, ses effets sont ressentis jusqu'à l'élevage des animaux terminaux à travers le nombre et la qualité des poussins mis en élevage.

La fonction de reproduction est capitale pour permettre la production de poussins/dindonneaux/canetons/pintadeaux... de grande qualité.

La compétition mondialisée sur les caractères de production (viande et œufs) a cependant souvent engendré des effets négatifs sur la fonction de reproduction qui présente des caractères complexes, est soumise à de fortes interactions génotype-milieu mais reste fondamentale pour la viabilité des filières. Par son rôle crucial dans la transmission génétique et épigénétique, une reproduction harmonieuse exige de plus des conditions de bien-être des animaux qui ne peuvent pas toujours être aussi bien assurées que souhaité par les éleveurs (ex : problèmes d'élevage et d'alimentation des jeunes futurs reproducteurs).

Dans un souci constant d'allier Performance, Qualité, Viabilité, Santé et Bien-être des animaux, les filières ont besoin d'outils performants pour bien évaluer les phénotypes (capacités) des reproducteurs qui visent à produire des poussins dans les meilleures conditions possibles de bien-être et d'efficacité. Dans certains cas où seul un sexe est valorisé en production (poule pondeuse, canard mulard), une connaissance précoce du sexe est également très utile.

2. DES METHODES DE TERRAIN AVEC DES MARGES DE PROGRESSION IMPORTANTES

De l'œuf à la poule ou de la poule à l'œuf ? La poule produisant des œufs coquillés de grande taille, la première méthode de terrain pour évaluer les capacités de reproduction d'une poule est bien d'observer le nombre et la fréquence des œufs pondus, reflets de l'activité ovarienne et du bon fonctionnement de l'oviducte de la femelle oiseau. Des critères de qualité de l'œuf sont généralement ajoutés. Ils intègrent la forme et la taille des œufs ainsi que des critères de qualité de la coquille qui doit être ni trop poreuse ni trop solide (Sauveur, 1988). Mais le taux de ponte et la qualité des œufs

n'intègrent pas la notion de fertilité des animaux qui est plus difficile à évaluer et impose d'observer les capacités des mâles comme des femelles à se reproduire. De fait, la mesure des taux d'éclosion après incubation artificielle d'œufs fécondés est un critère synthétique qui englobe les paramètres de fertilité des pères et des mères mais a le défaut de prendre aussi en compte des caractéristiques strictement d'incubation (température, hygrométrie, retournement, taux de chargement etc...) qui n'ont rien à voir avec les capacités de reproduction. L'évaluation de la fertilité et du taux de mortalité embryonnaire dit précoce par mirage des œufs en fin de première semaine d'incubation est un critère, également synthétique, plus proche des capacités de reproduction des parents. Mais, en filières avicoles, les fertilités des deux parents « ne pèsent pas le même poids ». D'une façon générale, beaucoup moins de mâles sont mis en élevage de reproducteurs que de femelles. Chez les coqs chair le ratio moyen mâles/femelles est de 9 à 10 %. Les mâles ont donc proportionnellement 10 fois plus de descendants que leurs partenaires et tout défaut de reproduction mâle pose donc un vrai problème.

Évaluer la fertilité d'un père n'est pas aussi simple qu'il y paraît. Le premier critère « objectif » est évidemment la production de semence. L'aspect de la semence renseigne aussi sur la présence de spermatozoïdes. Le nombre de spermatozoïdes produits peut être mesuré avec précision à l'aide d'appareillages simples (photomètres). De nombreux élevages sont équipés pour faire ces observations. Mais les critères de production de semence ne suffisent pas. La connaissance de leur aptitude à féconder est fondamentale. Des critères de qualité *in vitro* de la semence ont été développés pour l'approcher (revue dans Blesbois et al., 2008). Sur le terrain, il s'agit fréquemment d'évaluation de la mobilité des spermatozoïdes par des méthodes subjectives (notation arbitraire par observation au microscope des mouvements des spermatozoïdes) ou objectives (CASA : Computer Semen Analyser) pour lesquelles on trouve même maintenant des utilisations avec smartphones. La mesure de la viabilité des spermatozoïdes est aussi un critère développé avec des colorants ou des fluorochromes adaptés (Chalah et al., 1999) et des observations soit au microscope, soit au cymomètre en flux (Partyka, 2012). D'autres critères comme la résistance des spermatozoïdes aux chocs osmotiques (Santiago-Moreno, 2009), la fluidité membranaire (Blesbois et al., 2005), la présence d'un acrosome (Partyka 2012), et les capacités à réaliser la réaction acrosomique (événement inaugural de la fécondation ; Lemoine et al., 2008 ; 2011 ; Mocé et al 2010) ont été développés mais sont surtout utilisées dans les laboratoires. Ces critères permettent d'éliminer les très mauvais mâles, mais aucun ne permet de prédire efficacement les pouvoirs fécondants.

Et côté femelle, c'est pire puisqu'il n'est pas possible d'accéder de façon non invasive à l'ovocyte pour pouvoir le tester.

Force est donc de constater qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de terrain satisfaisante pour prédire le mieux possible les capacités de reproduction des mâles et des femelles aviaires. Cette absence est un handicap pour l'évaluation de l'amélioration génétique comme pour l'efficacité des filières et leur capacité de suivi et d'optimisation des élevages.

Pour y remédier, de nouvelles méthodes sont mises en œuvre. Profitant des dernières évolutions méthodologiques et scientifiques, elles recouvrent principalement des approches zootechniques, d'imagerie ou des approches génomiques et protéomiques.

3. DES AVANCEES ZOOTECHNIQUES

3.1 -Sélection des mâles sur la taille des testicules évaluée par Imagerie.

Dans les troupeaux Gallus Chair parentaux, les accouplements sont réalisés de manière naturelle, au sol. Dans les élevages de sélection, les lignées mâles doivent par conséquent être reproduites de la même façon afin d'inclure le critère « fertilité en accouplement naturel » dans l'objectif de sélection global. Ceci se pratique dans des parquets pédigrées regroupant un coq et dix poules. Le critère synthétique « fertilité en accouplement naturel » est le résultat d'une composante liée au comportement et d'une composante liée à la production de semence. Dans ce contexte de reproduction naturelle, la mesure de critères liés à la production de semence, notamment le volume de semence, est très difficile et peu fiable. Pour contourner cet écueil les généticiens Hubbard utilisent les techniques d'imagerie médicale afin d'évaluer le volume de testicules à différents moments dans la vie de l'animal. Compte-tenu de la forte corrélation entre le poids testiculaire et la production de spermatozoïdes ($r = 0,9$; d'après de Reviers 1982 cité dans Sauveur 1988), cette méthode permet de classer les coqs en lien avec le nombre de spermatozoïde produits. La figure 1 présente le type d'image du testicule obtenue grâce au scanner.

Un testicule (ovale en centre gauche haut de la photo) est clairement visible et un traitement d'image approprié permet d'estimer le volume total des deux testicules.

La corrélation entre le volume total de testicules mesuré à 26 semaines et la fertilité précoce est égale à 0,51. Cette valeur rend cette méthode intéressante pour améliorer la précision de la sélection pour la fertilité mâle en accouplement naturel.

3-2-Fertilité des femelles.

Dans les lignées femelles, la fertilité est mesurée en inséminant chaque poule avec une dose sous-optimale de spermatozoïdes (80 Millions par dose) issus d'un

mélange de semence de plusieurs mâles afin de maximiser la variabilité femelle. L'héritabilité de ce caractère est de 0,25. La corrélation avec le nombre d'œufs produits à 60 semaines est de 0,48. Cette corrélation positive avec la ponte et l'héritabilité modérée sont des éléments favorables pour une sélection sur la composante femelle de la production d'ovocytes et donc, pour partie, de la fertilité.

3.3-Enregistrement de la ponte dans les lignées de poules pondeuses.

Les systèmes de production des poules pondeuses ont fortement évolué depuis quelques années en Europe et plus récemment en Amérique du Nord, passant progressivement des systèmes de production en cages aux systèmes de production au sol ou en volière. Ces nouveaux systèmes d'élevage incitent les sociétés de génétique à s'intéresser à d'autres critères de sélection dans de nouveaux environnements. En effet, dans ces conditions d'élevage, les critères de comportement prennent une place prépondérante dans le résultat économique de l'élevage.

Depuis quelques années, Novogen développe une nouvelle méthode de sélection au sol permettant d'appréhender le comportement des reproducteurs au sol. Des parquets de mâles et femelles de lignée pures sont ainsi mis en place, chaque animal étant muni d'une identification électronique. Grâce à cette identification, il est possible de connaître quotidiennement l'horaire de ponte, le temps de présence au nid et le lieu de la ponte. La figure 2 représente le décalage quotidien d'heure de ponte d'une poule (en rouge) jusqu'à aboutir à une pause dans la séquence de ponte (chaque trait en abscisse représente un jour). A l'inverse l'oviposition des 2 autres poules (en noir et en bleu) ne se décale quasiment pas dans le temps. Toutes ces informations, mesurées sur les troupeaux de sélection, permettent de sélectionner des poules adaptées aux élevages alternatifs.

Dans le futur l'assignation de parenté par génotypage des descendants permettra d'approcher l'activité sexuelle des mâles

3.4-Un exemple chez le canard

Les généticiens de Grimaud Frères Sélection utilisent la méthode d'assignation de parenté dans le programme de sélection « Pékin Chair ». Cette méthode repose sur l'utilisation de marqueurs micro-satellites choisis pour leur potentiel informatif des gènes. Grâce à cette technologie, la reproduction des troupeaux de sélection peut être réalisée en groupes et en accouplement naturel. L'identification des parents de chaque descendant se fait à posteriori par génotypage des marqueurs micro-satellites choisis. Par rapport à un programme d'accouplements pédigrées traditionnel (un mâle accouplé à un nombre fixé de femelles), grâce à la multiplication des accouplements possibles, on peut attendre de cette méthode une augmentation de la variabilité génétique.

La reproduction en groupe, dans des conditions proches de celles rencontrées sur le terrain, permet également l'expression des comportements sexuels et sociaux. Au sein d'un tel programme, les performances de reproduction (nombre d'œufs, fertilité) sont sélectionnées au plus près des conditions du terrain.

4. DES APPORTS INNOVANTS ISSUS DES METHODES « OMIQUES »

La révolution génétique de ces dernières années a permis de renouveler profondément les connaissances des gènes, de leur traduction en protéines et de leurs fonctions biologiques. S'appuyant sur ces nouvelles connaissances, une masse considérable d'informations biologiques a pu être produite. Dans le même temps, une autre révolution, numérique celle-ci, a produit des technologies permettant le traitement efficace d'un grand nombre de données.

A l'arrivée, des méthodologies dites « omiques » puissantes (génomique, protéomique, métabolomique...) ont émergé. Ces méthodologies combinent à la fois une grande masse de connaissances biologiques et leur traitement et, dans nombre de cas, permettent déjà ou permettront dans un futur proche d'accéder à de bien meilleures évaluations des fonctions physiologiques. Un exemple abouti est la méthode protéomique ICM-MS qui, couplée à un système de modélisation adapté, permet d'évaluer la fertilité des adultes mâles reproducteurs. Et cette méthode a été mise au point en premier chez les oiseaux !

4.1-Un test moléculaire protéomique pour le diagnostic de la fertilité des mâles

La fertilité des mâles est un caractère complexe qui se traduit in fine par la transmission, lors de la fécondation, du patrimoine génétique paternel et de caractères épigénétiques déterminés. Elle aura donc un impact sur toute la vie des descendants. Ce pouvoir fécondant renvoie à différentes fonctions cellulaires des spermatozoïdes du père et à leurs capacités d'interagir efficacement avec l'environnement du tractus génital de la mère. Ces fonctions peuvent être évaluées *in vitro* mais avec des résultats qui restent partiels par rapport à la fertilité totale des mâles.

A l'INRA, nous avons eu l'opportunité d'étudier les spectres protéomiques (ensemble des protéines et peptides) des semences issues de mâles reproducteurs provenant de lignées expérimentales *gallus gallus* (coq-poule) INRA de type « label ». Dans ces lignées, les adultes reproducteurs mâles présentaient des fertilités, caractéristiques de chaque père, s'étendant sur une large gamme (de 5 % à 90 % de fertilité). Nous avons appliqué sur trois échantillons de semence de 16 de ces pères, deux méthodes différentes de protéomique.

La première, dite "bottom up" consiste à découper les protéines en plus petites unités, les peptides, puis à les

passer en spectrométrie de masse (Orbitrap), à confronter les résultats aux bases de données ad hoc et finalement à identifier et à quantifier les protéines d'origine. Cette méthode est très complète et nous a fourni plus de 70 candidats marqueurs de la fertilité (Labas et al, 2015) que nous étudions maintenant au laboratoire. Cette méthode Bottom up est cependant trop compliquée pour une utilisation directe terrain.

La deuxième méthode, dite ICM-MS pour « intact cell Maldi-Tof Mass Spectrometry » consiste à centrer l'étude sur une gamme étroite de protéines, celles dont le poids moléculaire va de 1000 à 20000 daltons, et à analyser ces protéines sur les spermatozoïdes entiers après les avoir déposés sur une matrice spécifique, les avoir ionisés avec un laser UV également spécifique (MALDI), puis avoir séparé les ions en fonction de la masse des protéines (TOF) comme indiqué sur la [figure 3](#).

Il en résulte des spectres de protéines représentés sur la [figure 4](#) qui sont reproductibles pour chaque père et très différents en fonction de leur capacité de fertilité. Ces spectres sont pertinents pour servir de base à l'évaluation de cette fonction complexe. Sur cette figure, 2 pères ayant des productions équivalentes de semence mais l'un étant très fertile (en bas) et l'autre moins (en haut) montrent des profils très différents. Les rectangles et les astérisques indiquent les zones des spectres utilisées par la suite pour valider la méthode.

Nous avons par la suite testé à plus grande échelle et sur d'autres lignées (lignées grand parentales chair et ponte) la validité de notre hypothèse qui visait à utiliser l'ICM-MS pour l'évaluation de la fertilité des pères. Nous avons également complété l'analyse par la mise au point d'une modélisation utilisant un algorithme qui évolue en fonction des données de référence (machine-learning algorithm). Un modèle prédictif de la fertilité a ainsi été construit et validé sur des mâles grands parentaux, chair et ponte dans un premier temps (Soler Vasco et al., 2016a ; 2016b), puis sur des croisements. Cet outil combiné permet de beaucoup mieux évaluer les capacités fécondantes des pères que n'importe quelle autre méthode. Il permet en outre de mieux séparer les « moyens » des « bons ».

La méthode ICM-MS est depuis plusieurs années utilisée dans les hôpitaux pour étudier les spectres bactériens, et est aussi les macrophages et les cellules neurogliales. Nos travaux sont cependant les premiers à montrer une application à l'évaluation de la fertilité grâce, entre autres, à l'évaluation très précise de mesure de fertilité qui peut être réalisée chez les oiseaux (en particulier avec l'incubation artificielle en grand nombre des œufs). En effet la mesure de fertilité reste l'outil indispensable pour la validation du test. Face à l'élargissement des applications de la méthodologie ICM-MS qui est rapide et fiable, des appareils légers apparaissent progressivement sur le marché, ouvrant la possibilité d'en faire, à moyen terme, une méthode de terrain. Le système est par

ailleurs maintenant en développement pour l'évaluation de la fertilité des pères chez les mammifères.

4.2-Des ouvertures sur les connaissances de la fertilité femelle via la génomique

Les poules de type chair présentent des performances de reproduction réduites avec des séries de ponte irrégulières, le syndrome des œufs défectueux, l'absence de hiérarchie folliculaire, une courte durée de période de reproduction, une baisse de nombre d'œufs pondus et de fertilité sans réelle identification des causes (Brillard 2004). Le taux trop élevé de mortalité embryonnaire reste aussi un défi important. La qualité de l'ovocyte est un facteur majeur de la qualité de l'embryon comme cela a été montré chez d'autres espèces (Naz&Rajesh 2005). Les variations de l'expression du génome de l'ovocyte mature chez les animaux présentant des différences de fertilité peuvent expliquer ces différences et peuvent servir au développement de marqueurs de la qualité ovocytaire. Ainsi chez la truite-arc-en-ciel les niveaux d'expression de plusieurs transcrits sont diminués dans les œufs de mauvaise qualité (Aegerter, *et al.* 2005). L'identification de marqueurs moléculaires robustes de la fertilité, avec pour objectif de les inclure dans les schémas de sélection, pourrait être une solution pour restaurer la fertilité des reproductrices des lignées chair. Nous avons réalisé une étude pilote par approche transcriptomique à haut débit (étude de très nombreux ARN messagers codés par les gènes) pour mettre en évidence des différences d'expression du génome au cours de la maturation ovocytaire et du développement embryonnaire précoce chez des poules de lignées qui divergeaient sur la vitesse de croissance ou sur la durée de période fertile et présentaient une bonne ou une mauvaise fertilité (Elis *et al.*, 2007 ; 2008). Cette étude a montré que les variations géniques observées entre les poules présentant une bonne et une mauvaise fertilité étaient de nature différente en fonction du « fond » génétique. Elle a également permis d'identifier cinq gènes dont l'expression dans l'ovocyte est corrélée à la fertilité : (*VWC2*, *CR407412*, *TAPA*, *FGL2* et *TRAP6*). Deux de ces gènes, *TRAP6*, *TAPA*, sont directement liés à l'immunité ce qui suggère son implication dans les problèmes de fertilité. Deux autres gènes *VWC2* et *FGL2* sont respectivement impliqués dans la signalisation cellulaire ou dans l'embryogénèse et l'homéostasie. *TRAP6* a également été identifié comme gène ovocytaire dans cette étude ce qui renforce encore plus l'implication potentielle de ce gène dans les problèmes de fertilité. Ces découvertes ont permis pour la première fois d'apporter une vision cohérente de l'altération de l'expression génique en lien avec la fertilité chez la poule dans différents contextes génétiques. Elle a aussi permis de mettre en évidence des marqueurs potentiels de fertilité femelle.

5. DE NOUVEAUX OUTILS D'EVALUATION PRECOCE DU SEXE

Les productions avicoles hautement spécialisées nécessitent parfois l'élimination précoce d'un des deux sexes. Ainsi pour la production d'œufs, uniquement les poussins femelles sont mis en élevage tandis que les mâles, sans intérêt commercial, sont détruits à la naissance. Au niveau mondial plus de 6 Milliards de poules pondeuses sont mise en place chaque année, un nombre similaire de poussins d'un jour étant détruit annuellement, après le sexage le plus souvent par examen du cloaque. Cette situation est mal acceptée par la société et conduit déjà les gouvernements de certains pays à prendre des décisions sur l'arrêt de ces pratiques. En Allemagne le projet d'interdiction d'extermination des poussins mâles dans les couvoirs a été annoncé par le ministre d'agriculture pour être effectif en 2017. Sur le plan commercial, les œufs du sexe non valorisé occupent la moitié des incubateurs. A cela s'ajoute le coût du sexage des poussins. Dans ce contexte, l'intérêt de développer des techniques de sexage *in ovo* devient urgent. Plusieurs tentatives ont été entreprises dans ce sens à partir des années 70. Celles-ci doivent satisfaire à 3 conditions pour être applicables dans l'industrie : une précision de détermination du sexe proche de 98,5 %, ne pas altérer l'éclosabilité et la viabilité des poussins, être rapide (20000-30000 œufs/heure) et rentable (Phelps *et al.*, 2003). Les méthodes proposées sont soit de nature biologique (moléculaire, biochimique ou immunologique) soit de nature physique.

La technique moléculaire basée sur la détermination par PCR de la présence du chromosome W spécifique des femelles a été utilisée pour déterminer le sexe avant la mise en incubation (Petitte *et al.*, 1995). Mais cette technique nécessite le prélèvement des cellules du blastoderme (l'embryon précoce indifférencié) dans l'œuf fraîchement pondu et conduit à une baisse trop forte de la viabilité des embryons.

La technique basée sur le dosage dans le liquide allantoïdien d'estrogènes (hormones surtout femelles) est développée par la société EMBREX (Gore A. K and Bryan T. E. 2003 ; Phelps P. V. 2003.). Elle consiste à localiser le liquide allantoïdien chez l'embryon de 15-17 jours, à le prélever (aiguille introduite dans le sac allantoïdien) puis à détecter les estrogènes par transactivation de leur récepteur recombinant dans la levure (Tran *et al.*, 2010). Cette technique est très précise, n'altère pas la viabilité et l'éclosabilité, mais l'analyse est réalisée dans la deuxième partie de la période d'incubation, quand l'embryon est déjà capable de sentir la douleur. Le prototype commercial nécessite encore d'être amélioré pour être rentable. Le projet hollandais In Ovo en cours de développement utilise également le liquide allantoïdien pour sexer les œufs. Il se base sur les différences de métabolisme entre les embryons mâles et femelles et propose de doser plusieurs métabolites comme le sucre glucose, la vitamine

choline et l'acide aminé valine, dont les niveaux diffèrent dans le liquide allantoïdien des embryons mâles et femelles (Bruins W.S. and Stutterheim W.M., 2014).

Des méthodes physiques sont aussi proposées. Elles ne nécessitent ni prélèvement ni développement de tests moléculaires, biochimiques ou immunologiques. On s'arrêtera sur deux d'entre elles qui semblent les plus abouties à l'heure actuelle. La première est un procédé allemand, basé sur la différence de quantité d'ADN des cellules embryonnaires mâles et femelles dû à l'hétérogamétie des femelles (ZW) qui contiennent moins d'ADN que le mâle (ZZ). Effectivement le chromosome W, équivalent fonctionnel du Y des mammifères est considérablement plus petit que le Z, entraînant une différence de 2% de quantité d'ADN entre les mâles et femelles. Cette différence peut être détectée par analyse spectrale. Le procédé allemand propose l'analyse par spectroscopie Raman proche infrarouge des cellules sanguine embryonnaires circulant dans les vaisseaux extra embryonnaires (vaisseaux vitellins) dès 3,5 jours d'incubation. La méthode est quand même invasive puisque la coquille est ouverte sur 15 mm au petit bout de l'œuf à l'aide d'un laser. Le plus gros vaisseau vitellin est ensuite recherché puis analysé par spectroscopie Raman avant analyse mathématique et statistique des images spectrales. Finalement la coquille est refermée avec un matériel biocompatible. Cette technique présente une prédiction du sexe de 90%, est plus précise pour les femelles que pour les mâles, et l'éclosabilité est de 81%. Contrairement aux autres méthodes, elle est sans contact avec l'embryon et donc plus sécurisante de point de vue sanitaire. Le prototype commercial est en cours de développement. La deuxième méthode physique est canadienne et récemment brevetée. Elle est basée sur l'analyse ultraspectrale des œufs non incubés avec une précision allant jusqu'à 99% et

conviendrait au sexage des œufs blancs comme bruns (Ngadi et al., 2016). Elle est non invasive et très précoce ce qui est intéressant d'un point de vue sanitaire et commercial. Le développement du prototype commercial a été annoncé. Les techniques allemandes et canadiennes permettent en même temps de déterminer si l'œuf est embryonné et donc d'enlever les œufs clairs à J4 d'incubation (méthode allemande) ou avant même la mise en incubation (méthode canadienne).

Une dernière technique non invasive basée sur l'analyse ultraspectrale de la couleur du plumage a été récemment proposée, permettant le sexage des œufs de 14 jours d'incubation avec 97 % de prédiction. Cependant elle n'est valable que pour les souches avec des différences de couleur liées au sexe (Göhler et al., 2016).

Toutes ces avancées donnent l'espoir de résoudre dans un avenir proche le problème de destruction des poussins du sexe non désiré dans les élevages avicoles.

6. CONCLUSION

Prédire les capacités de reproduction est un défi très ancien. Celui-ci a cependant dû attendre l'émergence de progrès technologiques récents pour pouvoir approcher cet objectif. Aujourd'hui, des méthodes de terrain permettent de mieux suivre le nombre de gamètes mâles et femelles produits par les reproducteurs et des méthodes émergentes issues des révolutions génétiques et numériques permettent de véritables ruptures technologiques visant à mesurer avec précision la fertilité des animaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aegerter S., Jalabert B. & Bobe J. 2005. Large scale real-time PCR analysis of mRNA abundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and post-ovulatory ageing. *Mol Reprod Dev*, 72, 377-385.
- Brillard JP. 2004. Natural mating in broiler breeders: Present and future concerns. *Worlds Poult Sci J* 60:439-445.
- Bruins W.S. and Stutterheim W.M., 1. 2014 Gender, viability and/or developmental stage determination of avian embryos in ovo. Google Patents. <https://www.google.com/patents/WO2014021715A2?cl=en22>
- Galli R, Preusse G, Uckermann O, Bartels T, Krautwald-Junghanns ME, Koch E, Steiner G. 2016. In Ovo Sexing of Domestic Chicken Eggs by Raman Spectroscopy. *Anal Chem*, 88(17), 8657-63.
- Galli R., PREUSSE G., Koch E., Steiner G, Krautwald-Junghanns M. E and T. Bartels. 2016. Method and device for the raman spectroscopic, in ovo sex determination of fertilised and hatched birds' eggs. Google Patents, <https://www.google.com/patents/WO2016000678A1?cl=en>
- Göhler D, Fischer B, Meissner S. 2016 In-ovo sexing of 14-day-old chicken embryos by pattern analysis in hyperspectral images (VIS/NIR spectra): A non-destructive method for layer lines with gender-specific down feather color. *Poult Sci*, doi: 10.3382/ps/pew282
- Gore A. K and Bryan T. E. 2003. Method for localizing allantoic fluid of avian eggs.

- Google Patents. <http://www.google.ch/patents/US6510811>
- Naz RK & Rajesh C 2005 Gene knockouts that cause female infertility: search for novel contraceptive targets. *Front Biosci*, 10, 2447-2459.
- Ngadi, M., Liu, L., Zheng, C. 2016. Systems, devices, and methods for detecting fertility and gender of unhatched eggs. Google Patents, <https://www.google.com/patents/US20160239953>.
- Blesbois, E.; Grasseau, I.; Seigneurin, F.; Mignon-Grasteau, S. ; Saint Jalme, M. ; Mialon-Richard, M.M. 2008. Predictors of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology* 69, 252-261.
- Blesbois, E.; Grasseau, I. Seigneurin, F. 2005. Membrane fluidity and the ability to survive cryopreservation in domestic bird spermatozoa. *Reproduction* 129, 371-378.
- Chalah, T.; Seigneurin, F.; Blesbois, E.; Brillard, J.P. 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, 39, 185-191.
- Elis, S.; Batellier, F.; Couty, I.; Balzergues, S.; Martin-Magniette, M.L.; Blesbois, E.; Govoroun, M. 2008. Identification of genes potentially involved in fertility in the hen. *BMC Genomics* 9: 110, 1-20.
- Elis, S.; Blesbois, E.; Couty, I.; Balzergue, S.; Martin-Magniette, M.L.; Batellier, F.; Govoroun, S. 2009. Identificatin of genes potentially involved in fertility in the hen., *Molecular Reproduction and Development* 76, 1043-1055.
- Labas V., Grasseau I., Cahier K., Gargaros A., Harichaux G., Teixeira-Gomes AP., Alves S., Bourin M., Gerard N., Blesbois E. 2015. Qualitative and quantitative proteomic approaches to phenotyping chicken semen. *Journal of Proteomics* 112, 313-335.
- Lemoine, M.; Grasseau, I.; Brillard, J.P.; Blesbois, E. 2008. A reappraisal of factors involved in the in vitro induction of acrosome reaction in chickens. *Reproduction* 136, 391-399.
- Mocé E, Grasseau I, Blesbois E.2010. Cryoprotectant and Freezing-Process alter the Ability of Chicken Sperm to Acrosome React. *Animal Reproduction Science* 122, 35

Figure 1. Image du testicule de coq obtenue grâce au scanner.
Un testicule (ovale en centre gauche haut de la photo) est clairement visible

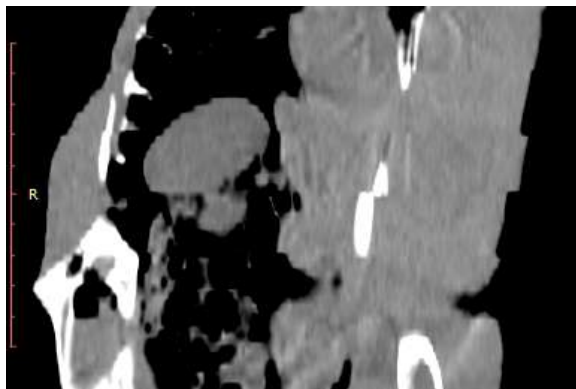


Figure 2. Enregistrement individuel de ponts grâce à une puce électronique.
Chaque couleur représente l'heure quotidienne de ponte d'une femelle particulière. Chaque trait en abscisse représente un jour. Les heures sont en ordonnée

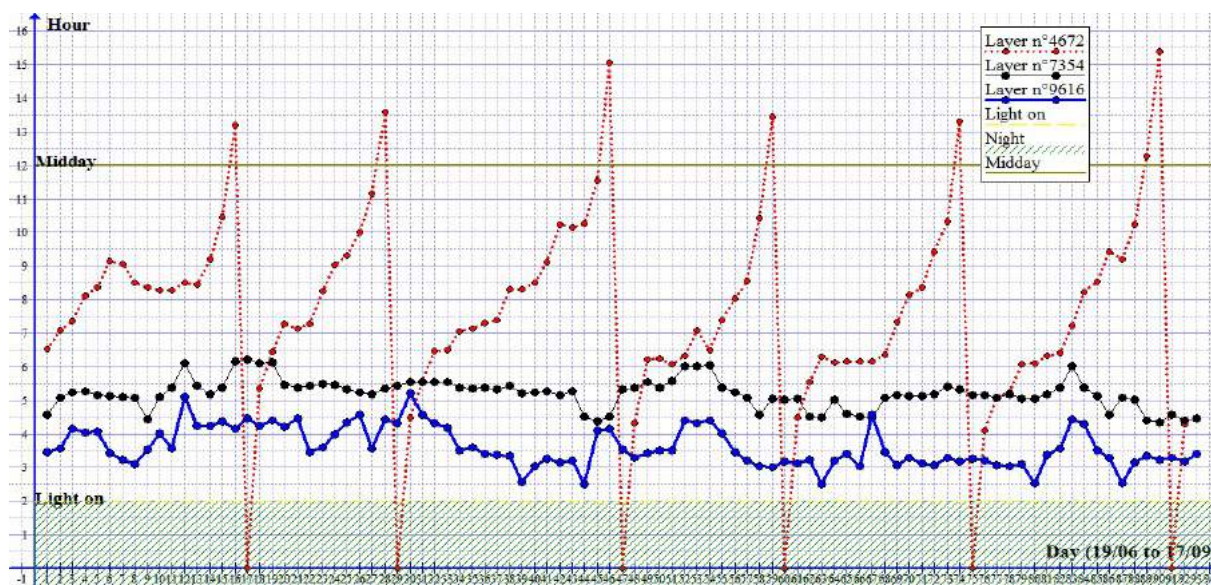


Figure 3. schéma de la méthode de spectrométrie de masse ICM-MS sur cellules entières

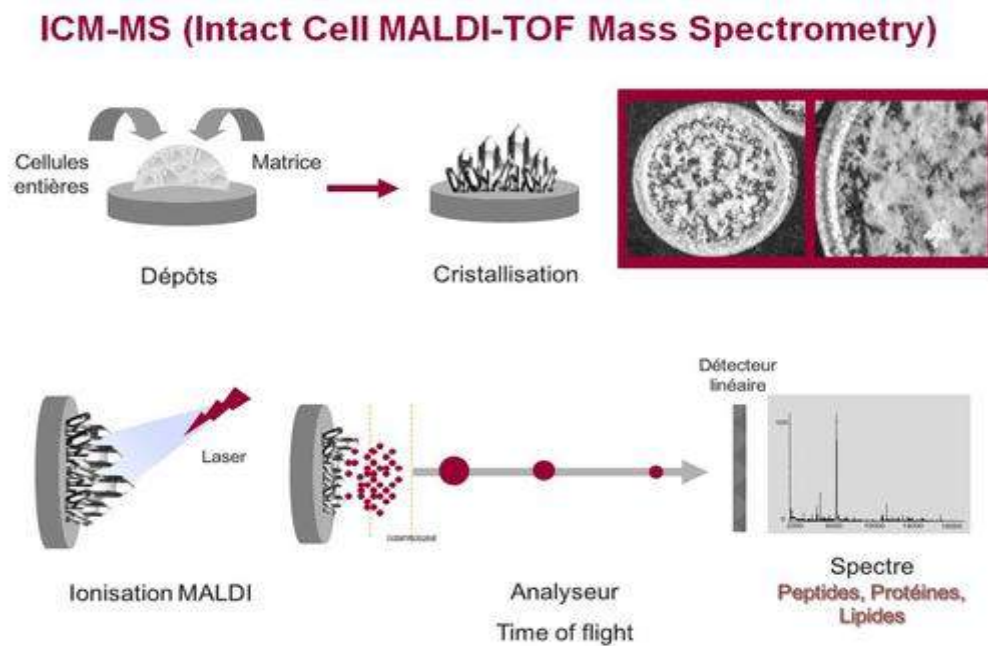
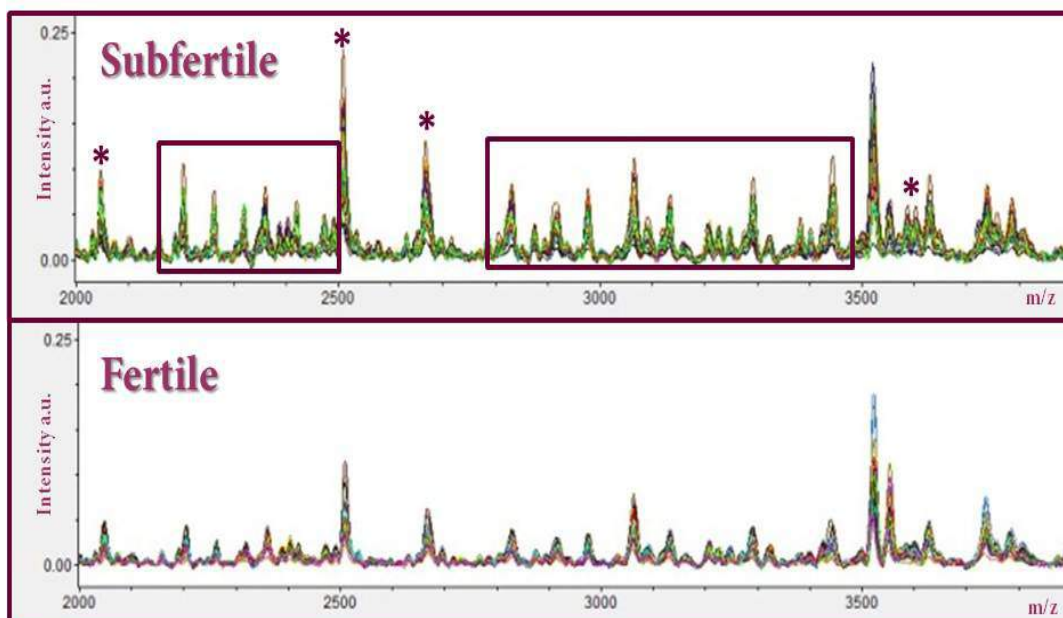


Figure 4. Deux profils de semence de coq obtenus par ICM-MS. La moitié haute de la figure représente la semence d'un coq subfertiles et la partie basse un coq très fertile



SESSION

GENETIQUE - REPRODUCTION

Communications orales

IDENTIFICATION DE REGIONS GENOMIQUES CANDIDATES POUR LE PH ULTIME DE LA VIANDE PAR DETECTION DE SIGNATURES DE SELECTION ET DE QTL AU SEIN DE LIGNEES DIVERGENTES DE POULET DE CHAIR.

Le Bihan-Duval Elisabeth¹, Hennequet-Antier Christelle¹, Berri Cécile¹, Beauclercq Stéphane¹, Bourin Marie², Boulay Maryse³, Demeure Olivier^{4,5}, Boitard Simon⁶

¹URA – INRA – 37380 Nouzilly, France,

²Institut Technique de l'Aviculture (ITAVI) - Centre INRA Val de Loire - 37380 Nouzilly, France,

³Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français (SYSAAF) - Centre INRA Val de Loire, Unité de Recherches Avicoles - 37380 Nouzilly, France,

⁴PEGASE - Agrocampus Ouest, INRA – 35590 Saint-Gilles, France,

⁵Groupe Grimaud - La Corbière - 49450 Roussay, France,

⁶GenPhySE - Université de Toulouse, INRA, INPT, INP-ENVT - 31320, Castanet Tolosan, France.

elisabeth.duval@inra.fr

RÉSUMÉ

Le pH ultime (pHu) est un déterminant majeur des propriétés technologiques et sensorielles de la viande de poulet. Il semble également associé au développement de défauts musculaires tels que les striations blanches ou le Wooden Breast. Alors qu'une forte composante génétique de ce caractère a été mise en évidence, les gènes contrôlant le pHu restent inconnus. L'objectif de notre étude était de rechercher des régions génomiques candidates en exploitant un modèle unique de deux lignées divergentes sélectionnées pour le pH ultime du filet à partir d'une souche commerciale à croissance rapide. Deux approches complémentaires ont été mises en œuvre : la détection de signatures de sélection à chacune des 5 premières générations de sélection (G1 à G5) et la détection de QTL à la sixième génération (G6). Le génotypage grâce à la puce SNP Illumina 57K de 288 pères des générations G0 à G5 a conduit à l'identification de plus d'une centaine de signatures de sélection. Elles déterminent 63 régions candidates dont quelques-unes sont sélectionnées dès la première génération puis tout au long du processus de sélection. L'analyse GWAS de 558 animaux phénotypés et génotypés a mis en évidence 24 régions QTL pour le pHu du filet et 10 pour le pHu de la cuisse. L'ensemble de ces résultats va dans le sens d'un déterminisme polygénique du pH ultime de la viande tout en révélant le rôle important de plusieurs régions candidates.

ABSTRACT

Identification of candidate genomic regions for chicken meat ultimate pH by combined selective sweeps and QTL mapping in chicken divergent lines.

The ultimate pH (pHu) is a major determinant of the technological and sensory properties of chicken meat. It seems also to be associated with the development of muscular defects such as White Striping or Wooden Breast. While a strong genetic component of this trait has been demonstrated, genes controlling pHu remain unknown. The aim of the present study was to look for candidate genomic regions by taking advantage of a unique resource population of two divergent lines selected for the breast meat ultimate pH from a commercial fast-growing line. Two complementary approaches were applied: detection of selection signatures at each of the first 5 generations of selection (G1 to G5) and QTL mapping by genome-wide association study at the sixth generation (G6). Thanks to genotyping with the 57K Illumina SNP array of 288 sires from generations G0 to G5, we identified more than one hundred selection signatures. They determined 63 candidate regions, among which some were selected from the first generation and remained significant throughout the selection process. GWAS analysis of 558 phenotyped and genotyped animals revealed 24 QTL regions for breast meat pHu and 10 QTL for thigh meat pHu. Our results indicated a polygenic determinism of the ultimate pH as well as the important role of several candidate regions.

INTRODUCTION

Chez le poulet, le pH ultime (pHu) est un déterminant majeur des propriétés technologiques et sensorielles de la viande. Alors que le pHu se situe généralement entre 5,8 et 5,9 dans le filet, une déviation de cette valeur moyenne entraîne une détérioration de la qualité et l'apparition de viande de type « acide » ($\text{pHu} < 5,7$) caractérisée par une couleur pâle, une texture dure après cuisson et une faible aptitude à la transformation, ou de type « DFD » ($\text{pHu} > 6,1$) caractérisée par une couleur sombre et une texture sèche en bouche ainsi qu'une moindre aptitude à la conservation (Zhang et Barbut, 2005; Harford *et al.*, 2014). Le pH ultime du filet est déterminé génétiquement par le niveau des réserves du muscle en glycogène, avec une corrélation génétique de -0,97 entre les deux caractères (Le Bihan-Duval *et al.*, 2008). La diminution de ces réserves énergétiques semble être un facteur prédisposant ou en tout cas un indicateur de la sensibilité aux myopathies, de type White Striping et Wooden Breast, en recrudescence chez le poulet (Alnahhas *et al.*, 2016 ; Abasht *et al.*, 2016). Même si le pH ultime présente une héritabilité plutôt élevée (entre 0,3 et 0,5 selon les études), les gènes impliqués dans son déterminisme restent méconnus. Dans cette étude, nous avons tiré parti d'un modèle unique de deux lignées sélectionnées de façon divergente pour le pHu du filet afin d'identifier les régions génomiques associées à la variation génétique de ce caractère. L'étude a porté sur la détection combinée de signatures de sélection et de QTL pour le pHu du filet et de la cuisse.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Présentation des lignées divergentes

En 2009, l'INRA a initié un programme de sélection divergente pour le pH ultime du filet à partir d'une souche grand-parentale de poulet standard à croissance rapide. Cette sélection s'est avérée très efficace puisqu'après 6 générations, le pHu du filet est en moyenne de 5,67 dans la lignée basse (pHu-) et de 6,16 dans la lignée haute (pHu+), soit une différence de 1,8 écart-type phénotypique entre lignées (Figure 1). Ceci signifie qu'environ 61% des filets des animaux pHu- sont de type « acide » et 63% des filets des animaux pHu+ de type « DFD ». Ces fortes variations de pHu reflètent une différence de Potentiel Glycolytique du filet, qui est augmenté d'environ 17% dans la lignée pHu- par rapport à la lignée pHu+ (Alnahhas *et al.*, 2015). L'effet de la sélection sur le métabolisme musculaire semble général plutôt que spécifique du filet, puisque l'on observe également une variation du pHu de la cuisse (en moyenne de 6,20 chez les animaux pHu- et 6,53 chez les pHu+ à la 6^{ème} génération de sélection). La sélection a conduit à des modifications notables de la qualité de la viande, avec un filet moins pâle, moins rouge et moins jaune

dans la lignée pHu+. Le rendement technologique et le pouvoir de rétention d'eau du filet sont également nettement plus élevés chez les pHu+ (Alnahhas *et al.*, 2014). Si la croissance globale et l'engraissement des animaux ne varient pas entre les deux lignées, on observe une augmentation des rendements en filet et en cuisse ainsi que de l'occurrence du défaut White Striping dans la lignée pHu+ (Alnahhas *et al.*, 2016).

1.2 Détection des signatures de sélection.

L'objectif était de rechercher les haplotypes (méthode hapFLK ; Fariello *et al.*, 2013) ou marqueurs SNP (méthode FLK ; Bonhomme *et al.*, 2010) dont la fréquence varie significativement entre lignées, une fois pris en compte l'effet de la dérive génétique. Si tel est le cas, on peut supposer que les régions génomiques mises en évidence contribuent à la variabilité observée du critère de sélection (i.e., le pH ultime). Afin d'analyser la dynamique de sélection des régions, la recherche des signatures de sélection a été réalisée à chacune des 5 premières générations de sélection (G1 à G5). Les analyses ont porté sur l'évolution des fréquences haplotypiques ou alléliques chez les reproducteurs mâles pour lesquels la pression de sélection est la plus importante (autour de 20%). Au total, 288 mâles ont été génotypés avec la puce SNP Illumina 57K. Ils représentaient la quasi-totalité (plus de 91% en moyenne) des reproducteurs des générations G0 à G5, à l'exception de la G1 où une plus faible proportion (60%) des mâles a été génotypée. La détection des signatures de sélection a été réalisée à l'aide du logiciel hapFLK (<https://forge-dga.jouy.inra.fr/projects/hapflk>). Seuls les marqueurs localisés sur les autosomes, avec un call rate > 0,95 et présentant une informativité suffisante (fréquence de l'allèle minoritaire calculée pour l'ensemble des générations > 5%) ont été retenus pour les analyses, soit un total de 42026 SNP représentant 72,9% des marqueurs initialement génotypés sur la puce.

1.3 Détection des QTL

En complément de la détection des signatures de sélection basée sur l'analyse génotypique des reproducteurs, une recherche de QTL pour le pH ultime du filet et de la cuisse a été réalisée par une étude de génétique d'association à l'échelle du génome (GWAS) sur 558 animaux (278 pHu+ et 280 pHu-) génotypés et phénotypés de la 6^{ème} génération. Ces animaux ont été produits en deux lots d'abattage. L'analyse GWAS a été mise en œuvre grâce au logiciel GS3 (Legarra *et al.*, 2012) avec la méthodologie Bayes C π (Habier *et al.*, 2011). Celle-ci utilise un modèle multi-marqueurs en faisant l'hypothèse qu'une faible proportion ($1-\pi$) d'entre eux (fixée dans notre cas à 0,005) est associée au caractère. Sont déclarés comme « forts » ou « très forts » les marqueurs pour lesquels la statistique du Bayes Factor (BF) est comprise entre 20 et 150 ou supérieure à 150, respectivement (Vidal *et al.*, 2005).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Mises en évidence de signatures de sélection.

Du fait du fort niveau d'héritabilité du pHu ($h^2=0,57$) et des réponses observées à la sélection, le dispositif des lignées divergentes apparaissait particulièrement adapté à la recherche de signatures de sélection. En effet, l'analyse en haplotypes (hapFKL) menée à chacune des générations (G1 à G5) a conduit à l'identification de 107 régions significatives. En regroupant des régions chevauchantes nous avons défini 53 régions candidates, retrouvées à une ou plusieurs générations. Ces régions sont localisées sur l'ensemble du génome et de taille très variable (de 30kb à plus de 11 Mb). L'analyse par SNP (FLK) a permis de confirmer 4 de ces régions et d'en identifier 10 nouvelles. A la fois le nombre (53 vs 14) et le niveau de signification (jusqu'à 10^{-16} pour hapFLK et 10^{-8} pour FLK) montre la supériorité de l'approche haplotypique déjà démontrée dans d'autres études (Fariello *et al.*, 2013). La combinaison des deux approches permet néanmoins une détection plus exhaustive des régions génomiques différenciant les deux lignées.

Des lignées divergentes de poulet ont déjà servi de modèles d'étude pour la recherche de signatures de sélection associées notamment à l'engraissement (Zhang *et al.*, 2012; Roux *et al.*, 2015) ou au poids vif (Johansson *et al.*, 2010) des animaux. Ces études font une photographie des régions sélectionnées au bout de plusieurs générations (entre 11 et 50 selon les études). Dans notre étude, nous avons pu établir la dynamique de sélection des régions dès l'initiation du processus de sélection divergente. Comme illustré sur la Figure 2 pour le chromosome 1, la dynamique de sélection varie en fonction des régions. Sur les 10 régions les plus significatives (comme les régions 1b et 1c de la Figure 1), quatre sont détectées dès la première génération (G1) puis à chacune des générations suivantes (G2 à G5). Quatre autres régions correspondent à des événements de sélection plus tardifs qui ne sont détectés qu'en G5 (cas de la région 1f de la Figure 2). Pour les régions les moins significatives, elles présentent des profils de sélection variables mais la plupart ne sont détectées qu'à une seule des 5 générations analysées.

2.2 Détection des régions QTL

Au total, 33 SNP associés au pHu du filet ont été détectés. Ils définissent 24 régions QTL sur 15 chromosomes. Comme illustré sur la Figure 3, un SNP très fort est détecté sur le chromosome 1 (BF=300). D'autres pics d'intérêt sont mis en évidence au niveau notamment des chromosomes 2 (BF=107) ou 24 (BF= 110). Concernant le pH ultime de la cuisse, un total de 18 SNP regroupés au sein de 10 régions a été détecté. Un SNP très fort (BF=257)

est mis en évidence sur le chromosome 4, alors que les autres QTL restent à des niveaux de signification plus modérés ($22 < BF < 50$). Malgré une corrélation génétique positive entre pH ultime du filet et de la cuisse ($rg=0,54$, Alnahhas *et al.*, 2014), peu de co-localisations de QTL pour ces deux caractères sont observées. Ceci suggère que les gènes sous-jacents aux QTL détectés modifient spécifiquement le métabolisme de l'un ou l'autre muscle.

Les SNP présents au sein des régions sous sélection présentent en moyenne une statistique BF supérieure à celle des marqueurs localisés ailleurs dans le génome (p-value de 0.0027 avec un test t bilatéral), suggérant un enrichissement en QTL des régions sous sélection. Néanmoins, les deux approches ne conduisent qu'à des résultats partiellement concordants puisque seulement 7 des 24 régions QTL identifiées pour le pH ultime du filet co-localisent avec les signatures de sélection. Ceci peut notamment s'expliquer par la nature polygénique du pH ultime pour lequel l'ensemble des QTL ne peut être efficacement sélectionné au bout de seulement 6 générations. De plus, la méthodologie de détection des signatures de sélection par analyse haplotypique étant particulièrement puissante, elle permet d'identifier de faibles variations entre lignées plus difficiles à mettre en évidence par analyse d'association entre phénotype et marqueur. Enfin, on ne peut exclure que la sélection divergente ait modifié des caractères ou fonctions sans lien direct avec le critère de sélection et dont le déterminisme serait porté par certaines régions sous sélection.

De façon fort intéressante, la détection de QTL a permis de confirmer mais aussi de préciser la localisation de la plus significative des signatures de sélection, correspondant à la région 1c du chromosome 1 (Figure 2). L'information au marqueur génétique le plus fort au sein de cette région (BF=300) permet de prédire l'appartenance des animaux à l'une ou l'autre des deux lignées, un animal de génotype AA ayant plus de 99% de chance d'appartenir à la lignée pHu- et un animal de génotype GG plus de 98% de chance d'appartenir à la lignée pHu+. Ce marqueur est donc très certainement en déséquilibre de liaison avec une ou plusieurs mutations modifiant le pH ultime de la viande dans ces lignées.

CONCLUSION

L'analyse de ce dispositif unique apporte des résultats originaux sur le contrôle génétique du pH ultime de la viande chez le poulet. Elle confirme une nature polygénique du caractère tout en révélant l'implication de plusieurs régions d'intérêt, dont une particulièrement significative sur le chromosome 1. Ces travaux vont se poursuivre afin de rechercher des gènes candidats ainsi que des mutations dont l'étude

permettra de mieux comprendre le déterminisme des réserves énergétiques musculaires et de développer

des marqueurs génétiques de la qualité de la viande chez le poulet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abasht B., Mutryn M.F., Michalek R.D., Lee W.R., 2016. PLoS ONE, 11(4), e0153750. doi:10.1371/journal.pone.0153750.
- Alnahhas N., Berri C., Boulay M., Baéza E., Jégo Y., Baumard Y., Chabault M., Le Bihan-Duval E., 2014. J. Anim. Sci., (92), 3816-3824.
- Alnahhas N., Le Bihan-Duval E., Baéza E., Chabault M., Chartrin P., Bordeau T., Cailleau-Audouin E., Meteau K., Berri C., 2015. J. Anim. Sci., (3), 4524-4531.
- Alnahhas N., Berri C., Chabault M., Chartrin P., Boulay M., Bourin M.C., Le Bihan-Duval E., 2016. BMC Genetics, (17), 61.
- Bonhomme M., Chevalet C., Servin B., Boitard S., Abdallah J., Blott S., San Cristobal M., 2010. Genetics, (186), 241-26
- Fariello M., Boitard S., Naya H., SanCristobal M., Servin B., 2013. Genetics, (193), 929-941.
- Habier D., Fernando R.L., Kizilkaya K., Garrick D.J., 2011. BMC Bioinformatics, (12), 186.
- Harford I.D., Pavlidis H.O., Anthony N.B., 2014. Poult. Sci., (93), 1059-1066.
- Johansson A.M., Pettersson M.E., Siegel P.B., Carlborg O., 2010. PloS Genetics, 6(11), e1001188.
- Le Bihan-Duval E., Debut M., Berri C.M., Sellier N., Santé-Lhoutellier V., Jégo Y., Beaumont C., 2008. BMC Genetics, (18), 53.
- Legarra A., Ricard A., Filangi O., 2012. User Manual, http://snp.toulouse.inra.fr/~alegarra/manualgs3_last.pdf
- Roux P.-F. et al., 2015. G3 - Genes Genomes Genetics, (5), 517-529.
- Vidal O., Noguera J.L., Amills M., Varona L., Gil M., Jimenez N., Davalos G., Folch J.M., Sanchez A., 2005. J. Anim. Sci., (83), 293-300.
- Zhang L., Barbut S., 2005. Br Poult Sci., (46), 687-93
- Zhang et al., 2012. BMC Genomics, (13), 704.

Figure 1. Evolution phénotypique du pH ultime du filet dans les deux lignées divergentes.

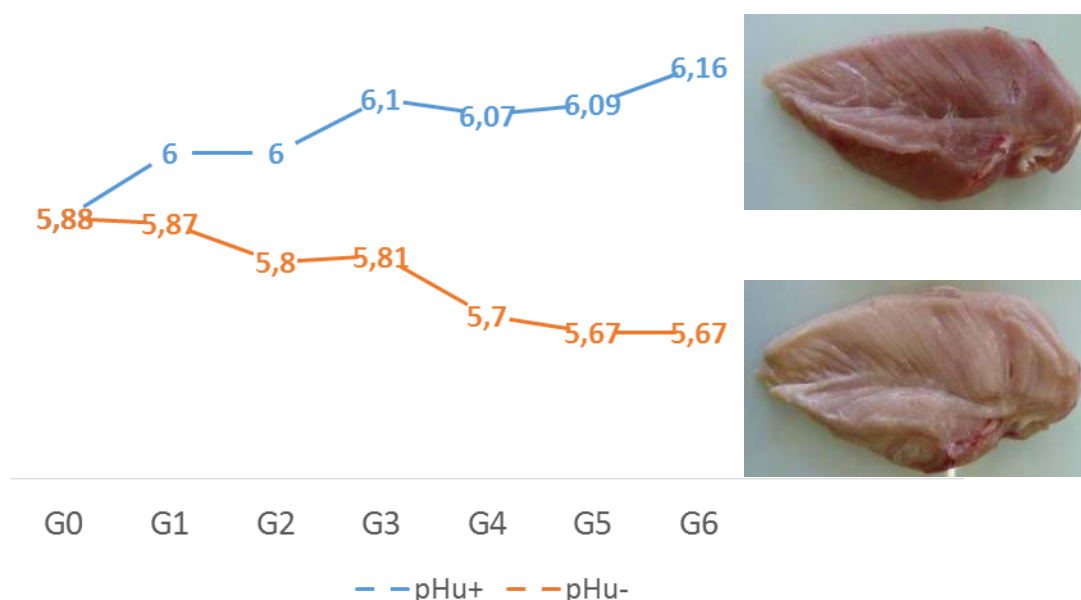


Figure 2. Détection des signatures de sélection : exemple du chromosome 1. Les courbes représentent l'évolution de la p-value du test HapFLK de détection des signatures de sélection en fonction de la position sur le chromosome. Chaque couleur représente une génération différente (jaune pour G1, vert pour G2, bleu pour G3, rouge pour G4, noir pour G5). Les lignes pointillées horizontales indiquent le seuil correspondant à un FDR de 5%.

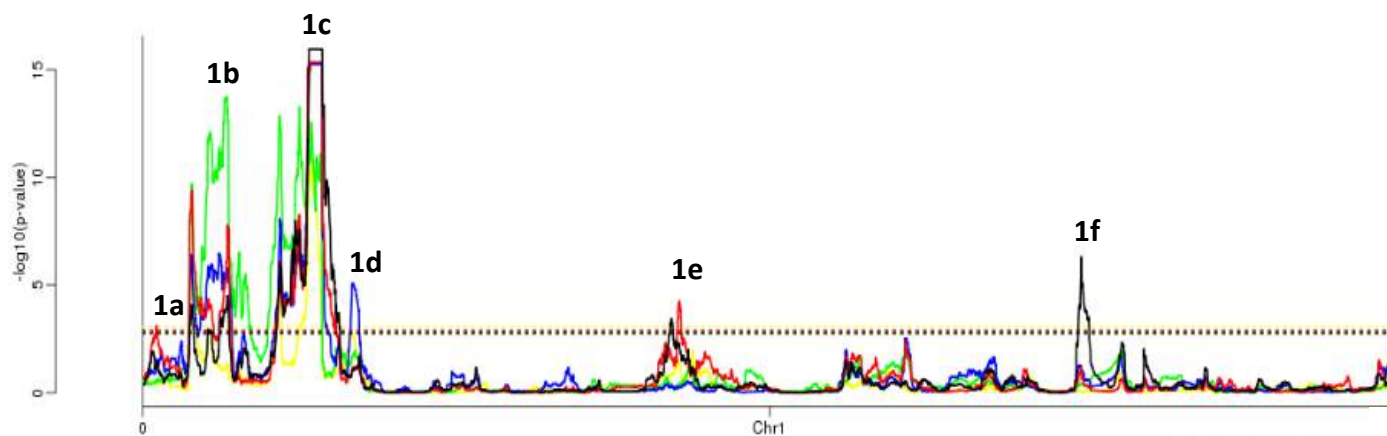
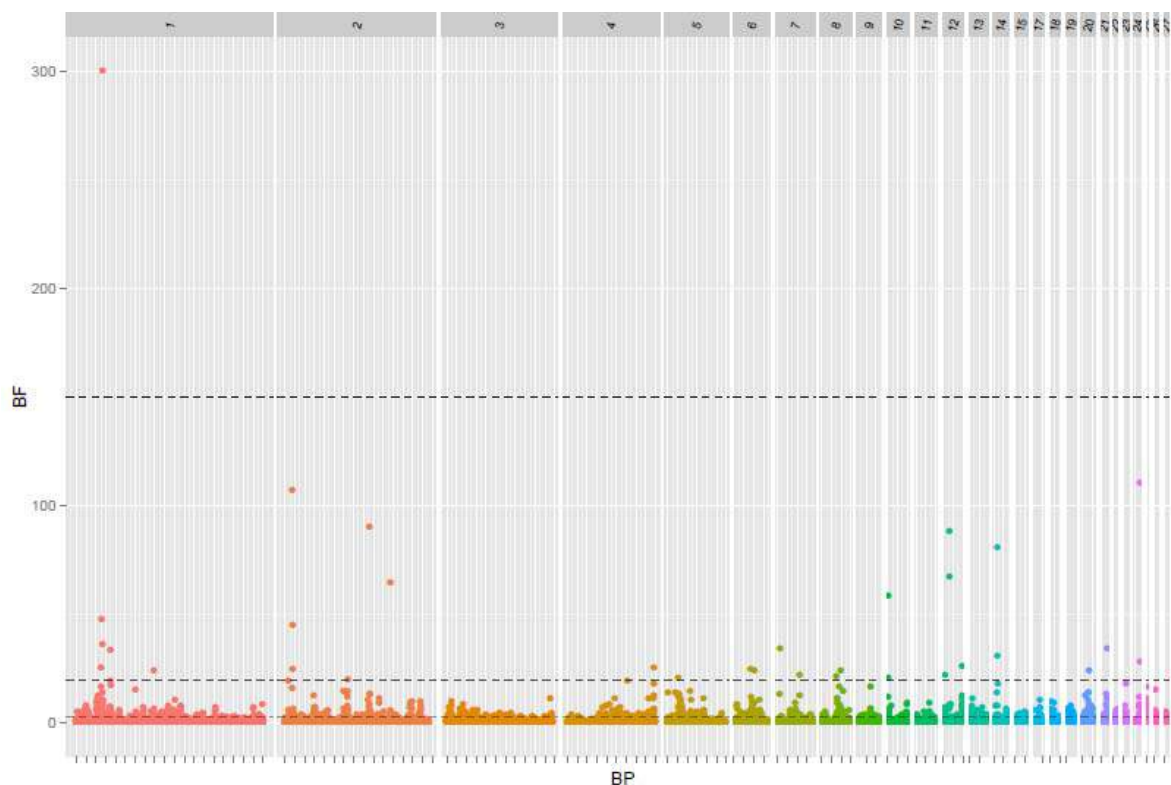


Figure 3. Manhattan plot de la statistique BF du test d'association entre marqueur et pH ultime du filet : la valeur de BF est indiquée pour chaque SNP selon sa position sur chaque chromosome (1 couleur = 1 chromosome). Une valeur comprise entre 20 et 150 indique une relation forte et supérieure à 150 une relation très forte (lignes pointillées horizontales).



IDENTIFICATION DE GENES IMPLIQUES DANS LE CONTROLE DES FONCTIONS DIGESTIVES CHEZ LE POULET DE CHAIR

Amélie Juanchich¹, Christelle Hennequet-Antier¹, Cédric Cabau², Elisabeth Le Bihan-Duval¹, Michel J. Duclos¹, Sandrine Mignon-Grasteau¹, Agnès Narcy¹

¹URA, INRA, 37380, Nouzilly, France

²INRA, SIGENAE, GenPhySE, 31326, Castanet-Tolosan, France
amelie.juanchich@inra.fr

RÉSUMÉ

La durabilité de l'élevage avicole passe par la recherche de systèmes de production plus économes et autonomes en termes d'approvisionnement en matières premières pour l'alimentation animale. Ceci implique une meilleure prise en compte des caractères d'adaptation tels que l'efficacité digestive afin d'aller vers une plus forte utilisation de matières premières alternatives de qualité variable. L'objectif du projet ADIGEN était d'identifier des gènes impliqués dans la digestion en caractérisant le transcriptome de différents compartiments du tube digestif : la jonction entre proventricule et gésier, le gésier, la jonction gastro-duodénale, et le jéjunum. Les ARNs totaux des 4 tissus ont été séquencés sur HiSeq2500 (plateforme GeT-PlaGe, Toulouse) pour 6 individus issus d'un croisement F2 entre 2 lignées divergentes pour leur efficacité digestive (D+/D-). Les analyses bioinformatiques et biostatistiques des données RNA-seq ont mis en évidence un total de 11216 transcrits exprimés différemment entre les 4 tissus. Au total, 8 groupes de gènes présentant des profils d'expression très différents ont été identifiés. L'analyse fonctionnelle par « Gene Ontology » des classes de gènes montre un enrichissement significatif de la fonction immunitaire dans le jéjunum, et de l'activité transcriptionnelle et traductionnelle dans le gésier et le pyllore. Cette analyse nous permet de dresser un premier portrait moléculaire des différents compartiments du tractus digestif, qui servira de base pour les futures études sur le contrôle génétique ou physiologique de la réponse de l'animal aux variations alimentaires.

ABSTRACT

Functional genomics of the digestive function in broiler

The sustainability of poultry farming relies on the development of more efficient and autonomous production systems in terms of supply of raw materials for animal feed. This implies a better integration of adaptive traits in breeding programs, including digestive efficiency, in order to increase the use of various raw materials. The aim of the ADIGEN project was to improve the understanding of genes involved in digestive function by characterizing the transcriptome of different compartments of the digestive tract: the junction between proventriculus and gizzard, the gizzard, the gastroduodenal junction, and the jejunum. Total RNA from the 4 tissues were sequenced on HiSeq2500 (GeT-PlaGe facility, Toulouse) for six individuals from an F2 cross between two divergent lines for their digestive efficiency (D+ / D-). The bioinformatic and biostatistic analysis of RNA-seq data showed a total of 11216 differentially expressed transcripts between the 4 tissues. In total, eight groups of genes with markedly different expression profiles were identified. Functional analysis by "Gene Ontology" on gene groups showed a significant enrichment of immune function in the jejunum, and an enrichment of transcription and translation activity in the gizzard and the gastroduodenal junction. This analysis allows us to draw the first molecular portrait of the different compartments of the digestive tract, which will serve as a basis for future studies on the genetic and physiologic control of the response of the animal to feed variations.

INTRODUCTION

Alors que la sélection avicole a jusqu'ici privilégié des animaux très performants mais aussi très exigeants en ressources alimentaires de qualité et nécessitant un élevage dans un environnement optimisé, l'évolution vers des systèmes d'élevage limitant les intrants (notamment alimentaires) implique la recherche d'animaux résilients face à des conditions changeantes et parfois peu favorables. Ceci passe par une meilleure prise en compte dans les schémas de sélection avicoles de l'équilibre entre production et capacités d'adaptation des animaux, au travers de critères tels que l'efficacité digestive. L'identification des gènes et réseaux de gènes impliqués dans la fonction digestive est un prérequis à la compréhension de cette fonction biologique complexe. Elle peut faciliter sa prise en compte en sélection au travers de l'identification de marqueurs génétiques ou de biomarqueurs de l'efficacité alimentaire. Ceux-ci seront aussi utilisables pour l'évaluation de nouveaux systèmes d'élevage ou d'alimentation. L'objectif du projet ADIGEN (Améliorer la DIgestion par la GENétique) était donc d'identifier les gènes impliqués dans la digestion des poulets de chair en caractérisant le transcriptome de différents compartiments du tractus digestif : l'isthme et la jonction gastroduodénale (régulation de la motilité, activités de sécrétion et de trophicité du tractus digestif), le gésier (activité de broyage et prédigestion) et le jéjunum (site majeur d'absorption des nutriments). Le projet a approfondi la caractérisation de deux lignées de poulets sélectionnées de façon divergente sur leur capacité à digérer le blé (Mignon-Grasteau *et al.* 2004) et qui présentent des variations marquées de la morphologie et l'histologie au niveau de ces compartiments (Rideau *et al.* 2014).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Extraction ARNs et séquençage

Des poulets de chair issus d'un croisement de seconde génération entre 2 lignées de poulets bon digesteurs (D+) ou mauvais digesteurs (D-) ont été élevés au sol pendant 10 jours, puis en cages individuelles pour permettre la mesure de l'efficacité digestif au travers du critère d'EMAn (INRA UE PEAT, Tours). Les animaux grand-parentaux D+ et D- étaient issus de la 8^{ème} génération de sélection et présentaient des EMAn moyens de 3278 ($\pm$ 148) et 2455 ($\pm$ 533) kcal/kg de MS respectivement (Mignon-Grasteau *et al.* 2015). Tout au long de l'expérience, les oiseaux ont été nourris avec un régime contenant 52.5% de blé Rialto, 3110 kcal/kg MS et 21.1% de CP, similaire à celui utilisé lors de la sélection. Cette variété de blé a été choisie car elle est très dure et visqueuse,

et donc particulièrement difficile à digérer. Le bilan digestif a été réalisé entre 20 et 23 jours par collecte totale des fientes, selon le protocole décrit par Mignon-Grasteau *et al.* (2015). L'expression des gènes de 4 tissus clés de la fonction digestive a été étudiée : l'isthme et la jonction gastroduodénale pour leur fonctions de régulation de la motilité, des activités de sécrétion et de la trophicité du tractus digestif, le gésier pour son activité de broyage et pré-digestion et le jéjunum qui est le site majeur d'absorption des nutriments. Les 4 tissus d'intérêt ont été prélevés à l'issue du bilan digestif chez 3 individus sélectionnés sur la base de leur forte efficacité digestive (3 EMAn⁺, μ =3521 kcal/kg MS) et 3 pour leur faible efficacité digestive (EMAn⁺, μ =2610 kcal/kg MS). Les animaux ont été mis à jeun pendant 9h30 puis réalimentés pendant 2h30 avant les prélèvements. Les tissus ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Les ARNs totaux des 4 tissus ont été extraits avec le kit RNeasy Mini (QIAGEN). Les 24 échantillons d'ARNs ont été séquencés de façon appariée sur HiSeq2500 (plateforme GeT-PlaGe, Toulouse) en multiplexant 12 échantillons par ligne selon le protocole classique de séquençage Illumina.

1.2. Analyses bioinformatique et biostatistique

Les lectures ont été alignées sur la version 4 du génome du poulet (Galgal4) avec l'outil TopHat2, les transcrits ont été assemblés avec Cufflinks puis quantifiés avec featureCounts. Les analyses biostatistiques des données RNA-seq sont basées sur une loi binomiale négative (paquet Bioconductor EdgeR) en contrôlant le taux de faux positifs à 0,1 par la correction Benjamini-Hochberg. Une classification hiérarchique des gènes différenciellement exprimés entre organes est construite sur la base d'une corrélation de Pearson et d'une distance d'agrégation du lien moyen. Une coupure modulaire de l'arbre hiérarchique (paquet Dynamic Tree Cut, Langfelder P. *et al.* 2007) permet de regrouper en classe les gènes présentant des profils d'expression similaires (figure 1).

1.3. Enrichissement fonctionnel

Les gènes exprimés différenciellement entre tissus ont été annotés grâce à l'outil g:Profiler pour l'ontologie « Processus Biologique » (Reimand *et al.* 2016). L'enrichissement des fonctions pour chaque classe de gènes a été déterminé grâce à un test exact de Fisher ($p < 0,01$), avec une correction de Benjamini-Hochberg ($p < 0,01$).

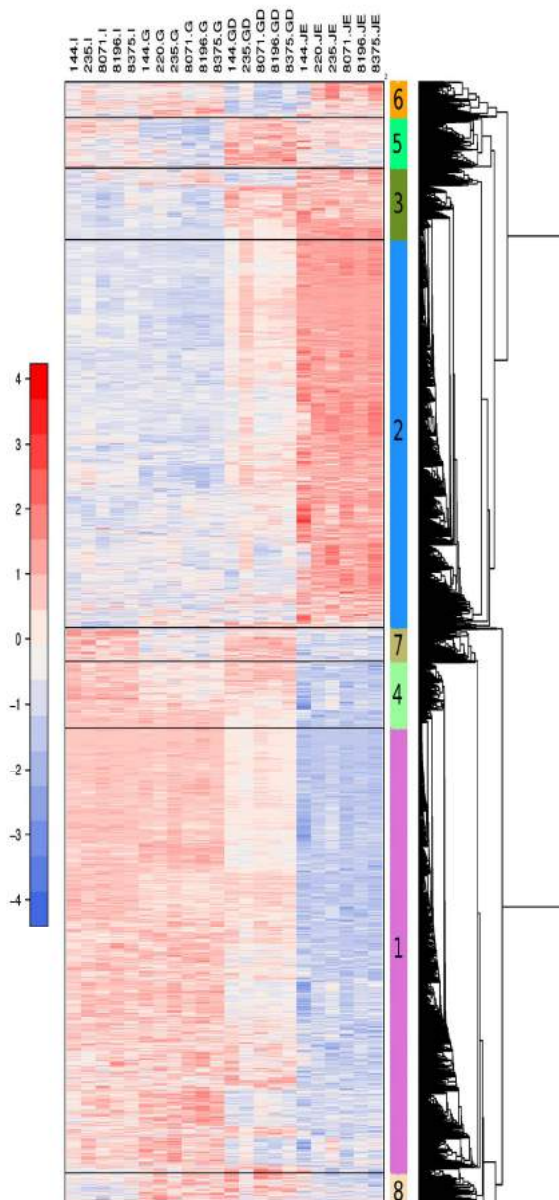
2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1. Profils d'expression des gènes du tractus digestif

Le séquençage des 24 échantillons sur HiSeq2500 a généré entre 5,2 et 10 millions de séquences par

échantillon. L'outil TopHat2 a permis d'aligner 89% des lectures sur la version Galgal4 du génome de poulet. Au total, 56469 transcrits ont été reconstruits grâce à l'outil Cufflinks puis quantifiés sur l'ensemble des 24 échantillons. Les analyses biostatistiques avec l'outil EdgeR ont mis en évidence un total de 11216 transcrits (représentant 9155 gènes) exprimés différemment entre les 4 tissus. Malgré la variabilité phénotypique des animaux, nous mettons en évidence un nombre important de gènes différemment exprimés entre les 4 tissus. Au total, 8 classes de gènes présentant des profils d'expression très différents ont été identifiés (figure 1).

Figure 1. Cluster-heatmap du profil d'expression des gènes du tube digestif dans l'isthme (I), le gésier (G), la jonction gastro-duodénale (GD) et le jéjunum (JE) pour 6 individus (144, 220, 235, 8071, 8196 et 8375)



Les plus grandes différences d'expression sont liées à l'expression des gènes dans le jéjunum (classes 1 et 2) qui représentent 73 % des transcrits différemment exprimés (i.e. 8170 sur 11216). Ce fort impact du jéjunum dans les résultats est cohérent avec les différences de fonctions entre les 4 tissus étudiés. En effet, la fonction principale du gésier est le broyage mécanique et la prédigestion des aliments et les jonctions en amont et en aval du gésier permettent une régulation du transit des aliments dans le gésier. A la différence des 3 autres compartiments, la principale fonction du jéjunum est l'absorption des nutriments. Ces différences de fonctions se traduisent donc par un nombre élevé de gènes différentiels dans le dispositif.

Parmi les 8 classes, nous avons également mis en évidence des signatures particulières de gènes dans les jonctions en amont et en aval du gésier. La classe 7 en particulier comprend 300 gènes surexprimés spécifiquement dans ces 2 compartiments.

2.2. Annotation et enrichissement fonctionnel

Les 9155 gènes exprimés différemment ont été annotés par « Gene Ontology » avec les étiquettes « Processus Biologique ». Sur les 9155 gènes exprimés différemment, 4906 possèdent au moins une étiquette fonctionnelle dans la base de données Ensembl 86. L'analyse fonctionnelle des 8 classes de gènes (figure 2) montre un enrichissement significatif de la fonction de défense de l'organisme (étiquettes « defense response », « immune response », « leukocyte cell-cell adhesion ») et l'absorption intestinale (étiquette « intestinal absorption ») dans le jéjunum (classe 2). De façon plus originale, un enrichissement de gènes impliqués dans la fonction de synthèse protéique (étiquette « ribonucleoprotein complex assembly » notamment) est observé dans le gésier et la jonction gastroduodénale par rapport aux autres compartiments étudiés (classe 8). Une très large majorité des protéines du complexe ribonucléoprotéique (protéines RPS et RPL respectivement de la petite ou de la grande sous-unité du ribosome) est présente dans cette classe, indiquant une activité de synthèse protéique importante dans le gésier et le pylore en comparaison à l'isthme et au jéjunum. Enfin, les gènes appartenant à la classe 7 (surexpression dans les jonctions) présentent un enrichissement dans le contrôle neuronal (étiquettes « synapse assembly » et « regulation of ion transport »). Parmi ces gènes, nous retrouvons des gènes tels que CPLX2 qui est impliqué dans la transduction des signaux neuronaux (McMahon *et al*, 1995) ainsi que des transporteurs d'ions tels que SCN3B, SLC26A5 ou CACNA1D. Ces observations sont en adéquation avec le fait que ces jonctions exercent un rôle spécifique dans le contrôle de la motilité gastrique (Duke, 1992 ; Hall et Duke, 2000).

CONCLUSION

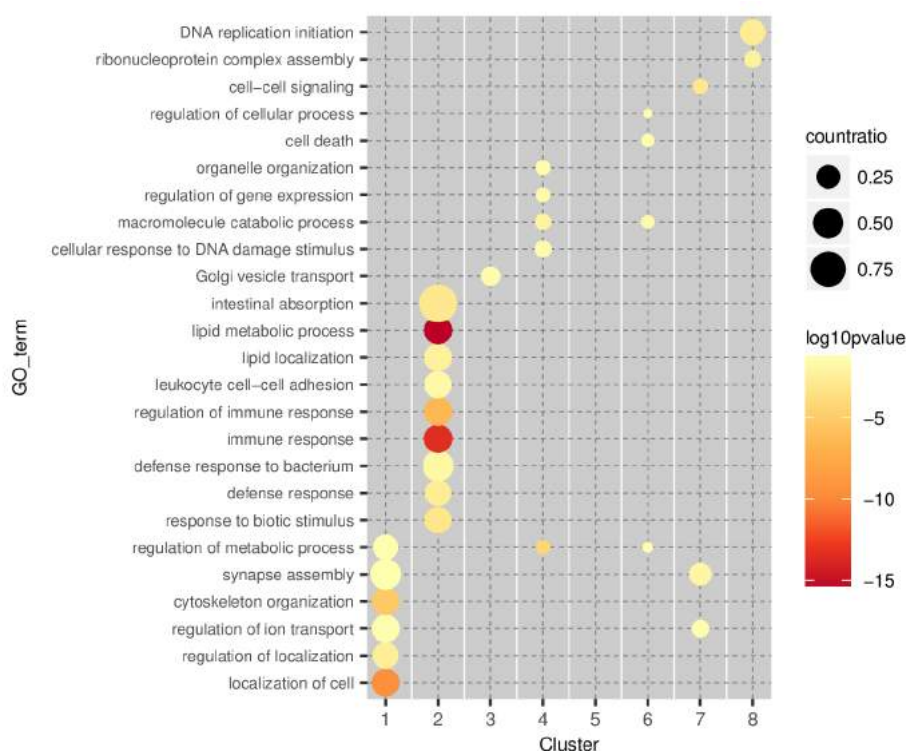
Cette analyse nous permet de dresser un premier portrait moléculaire des différents compartiments du tractus digestif. Il servira de ressource pour les futures études sur le contrôle génétique de l'efficacité digestive ou sur la régulation de ces fonctions par l'alimentation. Il ouvre des perspectives pour identifier des gènes clés impliqués dans le contrôle des fonctions digestives

chez le poulet, et faire émerger, à terme, de nouvelles stratégies d'élevage ou d'alimentation et proposer de nouveaux marqueurs de sélection dans une optique de maîtrise des intrants et des rejets en aviculture.

REMERCIEMENTS

Le projet ADIGEN a été financé par AGENAVI.

Figure 2. Enrichissement fonctionnel basé sur la « Gene Ontology »



Les numéros de classes (1 à 8) font référence aux classes d'expression des transcrits de la figure 1. La taille des ronds est proportionnelle au ratio de gènes présents dans la classe par rapport aux gènes possédant l'étiquette donnée. La colorisation reflète la significativité de l'enrichissement (p-value)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Duke GE, 1992. Poult.Sci., (71), 1-8
Hall AJ, et Duke GE. 2000. Poult. Sci., (79), 240-244
Langfelder P, Zhang B, Horvath S, 2007. Bioinformatics, (24), 719-720
McMahon HT, Missler M, Li C, Sudhof TC, 1995. Cell, (83), 111-119
Mignon-Grasteau S, Muley N, Bastianelli D, Gomez J, Peron A, Sellier N, Millet N, Besnard J, Hallouis JM, Carre B, 2004. Poult.Sci., (83), 860-867
Mignon-Grasteau S, Rideau N, Gabriel I, Chantry-Darmon C, Boscher M-Y, Sellier N, Chabault M, Le Bihan-Duval E, Narcy A, 2015. GSE, 47:74
Reimand J, Arak T, Adler P, Kolberg L, Reisberg S, Peterson H, Vilo J, 2016. Nucleic Acids Res., (44), 83-89
Rideau N, Godet E, Combémourel C, Chaudreau M, Carré B, Mignon-Grasteau S, 2014. Poult.Sci., (93), 1245-1250

LIENS ENTRE EFFICACITE DIGESTIVE ET COMPOSITION DU MICROBIOTE CHEZ LE POULET DE CHAIR

Mignon-Grasteau Sandrine¹, Narcy Agnès¹, Le Bihan-Duval Elisabeth¹, Gabriel Irène¹

¹URA, INRA, 37380, Nouzilly, France
sandrine.grasteau@inra.fr

RÉSUMÉ

Un croisement de deuxième génération entre deux lignées divergentes de poulets de chair sélectionnés sur leur efficacité digestive a permis l'étude des relations entre composition du microbiote caecal et efficacité digestive. La composition du microbiote caecal (quantité de *Lactobacillus*, *L. salivarius*, *L. crispatus*, *C. coccoides*, *C. leptum* et *E. coli* par gramme de contenu caecal) a été déterminée sur 144 animaux présentant une efficacité alimentaire et digestive faible (IC = 2.02, EMAn = 2936 kcal/kg MS) ou forte (IC = 1.41, EMAn = 3444 kcal/kg MS) à 3 semaines. Au niveau phénotypique, une régression linéaire multiple a été réalisée afin de déterminer quelle part de la variabilité de l'efficacité digestive était due à la composition du microbiote. Au niveau génétique, nous avons estimé l'héritabilité de la composition du microbiote et détecté les zones du génome du poulet contrôlant la composition du microbiote (QTL) à partir de 3379 marqueurs SNP. Les animaux peu efficaces présentent 1.66 fois plus de *Lactobacillus*, 2.88 fois plus de *L. salivarius* et 2.56 fois plus d'*E. coli* que les animaux efficaces. Des régressions linéaires multiples montrent que la composition du microbiote explique 19 à 22% de la variabilité de l'efficacité digestive. Nous avons également déterminé qu'il existait chez le poulet un contrôle génétique partiel de la composition du microbiote. En effet, les ratios entre *L. crispatus*, *C. leptum* ou *C. coccoides* et *E. coli* présentent une héritabilité significative (0.16-0.24). Par ailleurs, nous avons également détecté 14 QTL contrôlant la composition du microbiote, impliquant essentiellement *C. leptum* et *Lactobacillus*. Ces zones QTL co-localisent avec des QTL de consommation et de comportement alimentaire (durée des repas), d'anatomie du tube digestif (poids et longueur de l'iléon) et de l'immunité.

ABSTRACT

Relationships between digestive efficiency and microbiota composition in meat-type chicken

A second generation cross between broiler lines divergently selected on their digestive efficiency has been used to study the relationships between the composition of cecal microbiota and digestive efficiency. The composition of cecal microbiota (amount of *Lactobacillus*, *L. salivarius*, *L. crispatus*, *C. coccoides*, *C. leptum* and *E. coli* per gram of cecal content) has been determined on 144 animals with contrasted feed and digestive efficiency (poor efficiency group : FCR=2.02, AMEn=2936 kcal/kg DM ; high efficiency group : FCR=1.41 ; AMEn=3444 kcal/kg DM) at 3 weeks. At the phenotypic level, a multiple linear regression has been done to estimate which part of the variability of digestive efficiency was due to microbiota composition. At the genetic level, we estimated the heritability of the composition of microbiota and detected genomic regions controlling the composition of microbiota (QTL), using 3379 SNP markers. Poorly efficient animals had 1.66 more *Lactobacillus*, 2.88 times more *L. salivarius* and 2.56 times more *E. coli* than efficient animals. Multiple linear regressions indicated that the composition of microbiota explains 19 to 22% of variability of digestive efficiency. We also showed that there is a partial genetic control of the composition of microbiota in chickens. The ratios of *L. crispatus*, *C. leptum* or *C. coccoides* to *E. coli* exhibited a significant heritability (0.16-0.24). Moreover, we also detected 14 QTL controlling microbiota composition, mostly for *C. leptum* and *Lactobacillus*. These QTL regions co-localise with QTL for feed intake, feeding behaviour (length of meals), anatomy of digestive tract (weight and length of ileum) and immunity.

INTRODUCTION

Lors d'études précédentes, nous avons montré que l'efficacité digestive, composante essentielle de l'efficacité alimentaire, était en partie sous contrôle génétique (Mignon-Grasteau et al. 2004). Après 8 générations de sélection divergente sur l'énergie métabolisable corrigée pour un bilan azoté nul (EMAn) à 3 semaines, nous avons créé deux lignées divergentes (D+ et D-) dont les performances d'efficacité digestive diffèrent de 30 à 40%.

La sélection de l'efficacité digestive modifie la physiologie digestive et donc les conditions rencontrées par les bactéries du microbiote intestinal (pH, quantité de mucus, nutriments présents dans la lumière de l'intestin...). Par exemple, le pH du contenu de l'iléon est plus élevé chez les D+ et la quantité de cellules caliciformes productrices de mucus plus élevée chez les D-. De plus, la quantité et la nature des produits non digérés utilisés comme substrat par le microbiote varie en fonction de l'efficacité des animaux à digérer leur aliment, ce qui pourrait avoir abouti à un microbiote différent entre les deux lignées. A l'inverse, le microbiote participe à l'hydrolyse des composants présents dans l'appareil digestif, a des effets sur la physiologie digestive (Choi et al. 2015, Jandhyala et al. 2015) et contribue donc à la digestion. Il pourrait donc contribuer à la différence d'efficacité digestive observée entre les deux lignées. Une étude préliminaire a donc été entreprise sur les lignées D+/D- afin d'identifier les principaux groupes bactériens qui distinguent le microbiote des deux lignées divergentes (Gabriel et al. 2011). Cette étude avait montré qu'il existait des différences de microbiote dans la muqueuse et le contenu de l'iléon et des caeca, tant au niveau de similarité des profils de microbiote intra-lignée que de la composition, les différences les plus importantes étant observées au niveau des contenus des caeca.

La présente étude vise à approfondir ces premiers résultats, en 1/ quantifiant l'intensité du lien entre digestion et composition du microbiote caecal par le biais d'une régression et en 2/ déterminant si l'association entre digestion et microbiote est en partie liée à la génétique de l'hôte, grâce à l'estimation des paramètres génétiques et à la détection de QTL de la composition du microbiote caecal.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et Phénotypes

L'expérience repose sur 144 poulets mâles et femelles choisis parmi les 865 individus d'un croisement de 2^{ème} génération entre les lignées divergentes D+ et D- sélectionnées respectivement sur une forte ou faible efficacité digestive à 3 semaines (Mignon-Grasteau et al. 2004, Tran et al. 2014). Pour chacun des 4 lots

d'élevage, les animaux ont été élevés au sol jusqu'à 9 jours, puis placés en cages individuelles jusqu'à l'abattage à 23 jours, dans 3 cellules d'élevage comprenant chacune 3 rangées de cages. Ils ont été nourris avec un régime difficile à digérer, contenant 52.5% d'une variété de blé de fortes dureté et viscosité, comme celui utilisé pendant le processus de sélection. L'anticoccidien utilisé dans l'aliment est connu pour son effet limité sur le microbiote digestif (Clinacox®, US FDA, 1996). Un bilan digestif a été réalisé de 17 à 20 jours, permettant de mesurer l'indice de consommation, l'énergie métabolisable (EMAn) et les coefficients d'utilisation digestive de la matière sèche (CUDMS), de l'amidon (CUDA), des lipides (CUDL) et des protéines (CUDP). Parmi les 865 animaux de la population initiale, les 144 animaux présentant les valeurs les plus extrêmes pour leur indice de consommation de 17 à 20 jours ont été retenus pour l'étude du microbiote, puis classés en 2 groupes. Les animaux efficaces avaient un indice de consommation moyen de 1.41 et une valeur d'EMAn moyenne de 3444 kcal/kg MS. Les animaux peu efficaces présentaient des valeurs moyennes d'indice de consommation et d'EMAn de 2.02 et 2936 kcal/kg MS, respectivement.

A 23 jours, les animaux ont été abattus par injection de pentobarbital, et le contenu de leurs caeca a été prélevé. L'ADN bactérien a été extrait avec le kit QIAamp DNA mini-kit en incluant une étape mécanique. L'ADN ribosomal 16S a ensuite été amplifié par PCR afin de quantifier les principaux groupes bactériens (*Lactobacillus*, *L. salivarius*, *L. crispatus*, *Clostridium leptum*, *C. coccoides*, *Escherichia coli*, cf. Mignon-Grasteau et al. 2015a pour la procédure complète). Les résultats sont obtenus en nombre de copies d'ADNr 16S par gramme d'échantillon frais.

Les animaux ont été génotypés avec un jeu de 3379 marqueurs SNP répartis sur les chromosomes 1 à 28, 33 et Z, couvrant une distance de 3099.1 cM.

1.2. Analyses statistiques

Les quantifications bactériennes sont converties en logarithme avant analyse. Toutes les combinaisons possibles des ratios « log(groupe A)/log(groupe B) » ont été calculées pour prendre en compte l'équilibre entre les différents groupes bactériens. Une analyse de variance a été réalisée sur l'ensemble de ces caractères avec la procédure GLM de SAS pour déterminer quels groupes bactériens différaient entre animaux efficaces ou peu efficaces.

Afin d'évaluer quelle part de la variabilité de l'efficacité digestive pouvait être attribuée à la composition du microbiote, nous avons effectué des régressions linéaires multiples avec la procédure GLM option stepwise de SAS. Les logarithmes des quantifications bactériennes ainsi que les ratios ont été inclus dans la régression. Le R² de cette régression a été utilisé comme indicateur du pourcentage de

variance de l'efficacité digestive attribuable au microbiote.

Le logiciel VCE 6.0.2. (Kovac et al. 2008) a été utilisé pour estimer l'héritabilité de la composition du microbiote à l'aide d'un modèle animal incluant également les effets du lot, du sexe, de la cellule d'élevage et de la rangée de cages.

Enfin, la détection de QTL a été réalisée à l'aide du logiciel QTLMap (Gilbert et al. 2008) en utilisant un modèle demi-frère par cartographie d'intervalle fondé sur des estimations du maximum de vraisemblance. Le niveau de significativité au niveau du chromosome a été calculé grâce à 5000 simulations réalisées sous l'hypothèse d'absence de QTL.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les animaux peu efficaces présentent 1.66 fois plus de *Lactobacillus*, 2.88 fois plus de *L. salivarius* et 2.57 fois plus d'*E. coli* que les animaux les plus efficaces. Les quantités de *L. crispatus* et de clostridies (*C. coccoides* et *C. leptum*) ne diffèrent pas entre les deux groupes d'animaux. Les ratios entre *L. salivarius* et les autres groupes bactériens (sauf *E. coli*) sont 5 à 10% plus élevés chez les animaux peu efficaces. Enfin, les ratios entre les 2 groupes de clostridies et *Lactobacillus* et entre les 2 groupes de clostridies et *E. coli* sont respectivement 4 à 5% plus faibles et 12% plus faibles chez les animaux peu efficaces.

Le tableau 1 montre que la composition du microbiote explique de 19.5 à 22.4% des paramètres d'efficacité digestive, principalement à cause du ratio *E. coli/Lactobacillus* pour EMAN et CUDMS, le ratio *L. salivarius/C. leptum* pour CUDL et CUDA et *C. leptum/E. coli* pour CUDP. Les études de Torok et al. (2011) et Stanley et al. (2012) avaient déjà identifié ces groupes bactériens comme étant ceux principalement associés aux performances des animaux, bien que le sens de l'association diffère en fonction du génotype, du sexe ou du régime des animaux.

L'héritabilité des différents indicateurs de la composition du microbiote est faible à modérée (0.02 à 0.24). Elle est significativement non nulle pour les ratios *C. coccoides/Lactobacillus* (0.10), *L. crispatus/C. coccoides* (0.14), *C. coccoides/E. coli*

(0.16), *C. leptum/E. coli* (0.21) et *L. crispatus/E. coli* (0.24).

Nous avons détecté un total de 14 QTL de composition du microbiote, significatifs au niveau du chromosome (cf. tableau 2). La plupart de ces QTL impliquent *C. leptum* et *Lactobacillus*. Le QTL pour *C. leptum* sur le chromosome 6 approche la significativité au niveau du génome ($P=0.09$). Cette zone contient principalement des gènes liés aux voies TGF β et NF κ B du système immunitaire (Mignon-Grasteau et al. 2015a). De plus, plusieurs QTL de microbiote co-localisent avec des QTL d'anatomie du tractus digestif, en particulier le poids et la longueur de l'iléon (QTLs 2, 7, 13 et 14, Tran et al., 2014, Mignon-Grasteau et al. 2015b) et le poids du proventricule (QTLs 4 et 6, Tran et al. 2014). Enfin les QTL de *L. crispatus* et *L. crispatus/C. coccoides* sur le chromosome 14 co-localisent avec des QTL de longueur des repas (Mignon-Grasteau et al. 2016). Ces co-localisations suggèrent que les mécanismes qui affectent la composition du microbiote, l'anatomie du tractus digestif, le comportement alimentaire et l'immunité pourraient être en partie identiques.

CONCLUSION

Notre étude démontre que l'impact du microbiote sur la digestion est important (de l'ordre de 20%) et que sa composition est en partie déterminée par la génétique de l'hôte. Cette étude est actuellement étendue aux autres segments intestinaux afin d'établir un profil complet des liens entre efficacité digestive et composition du microbiote. Compte-tenu de l'abondance des gènes impliqués dans l'immunité détectés dans les zones QTL, l'étude génétique intègre également la mesure de paramètres du système immunitaire afin de raffiner les zones QTL et proposer une liste pertinente de gènes candidats.

REMERCIEMENTS

Ce programme a été financé par l'ANR, contrat n° ANR-09-GENM-007.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Choi K.Y., Lee T.K., Sul W.J., 2015. As. Australas. J. Anim. Sci., (28), 1217-1225
- Gabriel I., Guardia S., Konsak B., Leconte M., Rideaud P., Moreau-Vauzelle C., Dupont C., Mignon-Grasteau S., 2011. 9èmes Journées de la Recherche Avicole, 760-764
- Gilbert H., Le Roy P., Moreno C., Robelin D., Elsen J.M., 2008. Ann. Hum. Genet., (72), 694
- Jandhyala S.M., Talukdar R., Subramanyam C., Vuyyuru H., Sasikala M., Reddy D.N., 2015. World J. Gastroenterol., (21), 8787-8803
- Kovac M., Groeneveld E., Garcia-Cortez A., 2008. VCE 6 User's Manual. Version 6.0.2.
- Mignon-Grasteau S., Muley N., Bastianelli D., Gomez J., Péron A., Sellier N., Millet N., Besnard J., Hallouis J.M., Carré B., 2004. Poult. Sci., (83) 860-867

- Mignon-Grasteau S., Narcy A., Rideau N., Chantry-Darmon C., Boscher M.Y., Sellier N., Konsak-Ilievski B., Le Bihan-Duval E., Gabriel I., 2015a. Plos One, (10), e0135488
- Mignon-Grasteau S., Rideau N., Gabriel I., Chantry-Darmon C., Boscher M.Y., Sellier N., Chabault M., Le Bihan-Duval E., Narcy A., 2015b. Genet. Sel. Evol., (47), 74
- Mignon-Grasteau S., Chantry-Darmon C., Boscher M.Y., Sellier N., Le Bihan-Duval E., Bertin A., 2016. Behav. Genet., 1-11
- Stanley D., Denman S.E., Hughes R.J., Geier M.S., Crowley T.M., Chen H., Haring V.R., Moore R.J., 2012. Appl. Microbiol. Biotechnol., (96), 1361-1369
- Torok V.A., Hughes R.J., Mikkelsen L.L., Perez-Maldonado R., Balding K., MacAlpine K., Oercy N.J., Ophel-Keller K., 2011. Appl. Env. Microbiol., (77), 5868-5878
- Tran T.S., Narcy A., Carré B., Gabriel I., Rideau N., Gilbert H., Demeure O., Bed'Hom B., Chantry-Darmon C., Boscher M.Y., Bastianelli D., Sellier N., Chabault M., Calenge F., Le Bihan-Duval E., Beaumont C., Mignon-Grasteau S., 2014. Genet. Sel. Evol., (46), 25
- US FDA, 1996. NADA number 140-951

Tableau 1. Coefficients de détermination des régressions des caractères d'efficacité digestive sur la composition du microbiote caecal.

	EMAn	CUDMS	CUDL	CUDA	CUDP
<i>R² partiels</i>					
log(<i>E. coli</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	0.128	0.129		0.038	0.061
log(<i>L. salivarius</i>)/log(<i>C. leptum</i>)	0.051		0.093	0.117	
log(<i>L. salivarius</i>)/log(<i>C. coccoides</i>)	0.028	0.049			
log(<i>L. salivarius</i>)/log(<i>E. coli</i>)	0.014		0.024	0.052	
log(<i>C. leptum</i>)/log(<i>E. coli</i>)		0.022		0.017	0.102
log(<i>C. coccoides</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)			0.025		
log(<i>C. coccoides</i>)			0.021		
log(<i>L. crispatus</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)			0.015		
log(<i>L. crispatus</i>)/log(<i>C. coccoides</i>)			0.018		
log(<i>L. crispatus</i>)/log(<i>E. coli</i>)					0.029
R ² total	0.220	0.200	0.195	0.224	0.197

Tableau 2. QTL contrôlant le microbiote caecal (d'après Mignon-Grasteau et al. 2015a).

N°	Caractère	Chr	Marqueurs flanquants de l'intervalle de confiance du QTL		Effet du QTL ¹
			Nom	Position	
1	log(<i>L. crispatus</i>)/log(<i>C. coccoides</i>)	1	Gga_rs13911828- Gga_rs13913250	101115495- 102541560	0.814
2	log(<i>C. leptum</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	2	Gga_rs15142674- Gga_rs431871688	111504149- 114972652	0.552
3	log(<i>L. salivarius</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	3	Gga_rs16324984- Gga_rs14399484	94693836- 96453172	0.86
4	log(<i>L. crispatus</i>)/log(<i>C. leptum</i>)	6	Gga_rs14579919- Gga_rs15807987	18604578- 27210078	0.677
5	log(<i>C. leptum</i>)	6	Gga_rs15813564- Gga_rs16565135	29424015- 30730285	0.895
6	log(<i>C. leptum</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	6	Gga_rs19644770- Gga_rs16006607	19644770- 32526626	0.903
7	log(<i>C. leptum</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	8	Gga_rs15892308- Gga_rs318012175	12949- 4647348	0.605
8	log(<i>E. coli</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	12	Gga_rs15632811- Gga_rs14032854	2332254- 3357537	0.52
9	log(<i>L. crispatus</i>)/log(<i>C. coccoides</i>)	14	Gga_rs315655894- Gga_rs431846116	5486990- 5853831	0.897
10	log(<i>L. crispatus</i>)	14	Gga_rs315655894- Gga_rs14074053	5486990- 5748683	1.241
11	log(<i>L. salivarius</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	14	Gga_rs15738570- Gga_rs314499044	10100475- 12533165	0.591
12	log(<i>C. leptum</i>)/log(<i>C. coccoides</i>)	18	Gga_rs31812060- Gga_rs316856036	2984403- 6829371	0.476
13	log(<i>L. salivarius</i>)/log(<i>C. leptum</i>)	21	Gga_rs14285137- Gga_rs14286198	5286156- 6448006	0.605
14	log(<i>L. salivarius</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	26	Gga_rs314058682- Gga_rs15235289	3059337- 3992639	0.532

¹ en proportion de l'écart-type phénotypique du caractère

MODELISATION DETERMINISTE D'UN SCHEMA DE SELECTION AVICOLE

François Yoannah¹, Alnahhas Nabeel¹, Brard Sophie¹, Chapuis Hervé², Elsen Jean-Michel², Le Roy Pascale³

¹SYSAAF - Unité de Recherches Avicoles, Centre INRA Val de Loire - 37380 NOUZILLY,
²INRA, UMR1388 INRA-INPT GenPhySE – 24 chemin de Borde Rouge - 31326 CASTANET-TOLOSAN

³INRA, UMR1348 PEGASE - Domaine de La Prise - 35590 SAINT-GILLES
yoannah.francois@inra.fr

RÉSUMÉ

Modéliser un schéma de sélection permet d'en faire varier les paramètres qui décrivent son organisation et de prédire les gains génétiques attendus afin de comparer différentes organisations. C'est un outil d'aide à la décision très utile pour la profession. La modélisation déterministe consiste à estimer les espérances des valeurs génétiques de cohortes de reproducteurs en s'appuyant sur les valeurs génétiques estimées utilisées pour la sélection, sur les paramètres décrivant la population et le processus de sélection. Le modèle proposé se place dans le cadre d'un schéma de sélection de poules pondeuses avec un objectif incluant de nombreux caractères. Il combine, en deux étapes, un processus de sélection individuelle et un processus de sélection familiale, en distinguant les individus de bonnes familles qui subissent une sélection massale et ceux des familles intermédiaires qui subissent une sélection intra-famille. L'utilité de ce modèle est illustrée par la comparaison de différents scénarios variant par le taux de sélection familiale : son augmentation s'accompagne d'une hausse du progrès génétique prédit jusqu'à atteindre un plateau. Ce modèle sert de base à une exploration en cours des possibilités apportées par la sélection génomique, dont un premier exemple comparant des modèles génétiques et génomiques est donné en illustration dans cet article.

ABSTRACT

Deterministic modeling of a poultry selection scheme

Modeling a selection scheme enables to vary its parameters and to compare different organizations through the predicted genetic gains. This is a useful tool for professionals. The deterministic modeling consists in estimating the breeder true breeding value expectation after a selection process based on estimated breeding values and on the different parameters describing the population and the selection process. This model is based on a layer chicken selection scheme with a breeding goal composed of numerous traits. This is a two steps model that combines an individual selection process and a familial one. Within selected families, candidates from the good families are undergoing a mass selection whereas candidates from medium families are undergoing a within family selection of a fixed number of candidates. The variability of the parameters composing the model enables to compare a large diversity of scenarios. To illustrate the usefulness of this model, we compared different scenarios varying for the familial selection rate: its increase leads to an increase of the predicted genetic gain until it reaches a plateau. An example of comparison between genetic and genomic models is also given in this article, as this model can be used as a basis to explore all the possibilities brought by genomic selection.

INTRODUCTION

Modéliser un schéma de sélection est un moyen d'en comparer différentes organisations en faisant varier les paramètres qui le décrivent et au travers des prédictions de gains génétiques qui en résultent (Elsen, 1992). C'est un outil d'aide à la décision qui peut s'avérer utile pour la profession car il peut permettre l'identification de leviers d'actions dans les schémas modélisés.

Le projet OPTIVOL au sein duquel s'inscrit cette étude, a pour objectif d'évaluer les gains et limites de sélection génomique par rapport à la sélection traditionnelle chez les volailles. La modélisation d'un schéma de sélection traditionnel est une première étape importante car elle permet d'établir une base de comparaison fiable pour d'autres scénarios et schémas de sélection, qu'ils soient traditionnels ou génomiques. Le but de cet article est de présenter un modèle de schéma de sélection avicole, basé sur un schéma de sélection traditionnel de poules pondeuses, ainsi qu'une illustration de son utilisation.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Présentation du schéma modélisé

Le schéma modélisé dans cette étude est un schéma de sélection d'une lignée de poules pondeuses, représenté dans la figure 1. Dans ce schéma, un cycle de sélection comporte deux étapes de sélection successives (classique en aviculture) correspondant à deux phases d'élevage et de mesures différentes portant sur des critères de qualité d'œufs, de performance de ponte et de poids corporel. Les schémas avicoles se caractérisant par un grand nombre de critères de sélection, les contraintes zootechniques et celles relatives à la conservation d'un nombre minimal d'origines familiales font que le processus de sélection ne peut se résumer à une règle simple d'une sélection sur une valeur d'index au-dessus d'un seuil fixé par le taux de sélection appliqué. C'est la raison pour laquelle notre modélisation s'appuiera sur des index rétrospectifs (Allaire et Henderson, 1966), qui reflètent au mieux l'importance relative des différents caractères dans la pratique de la sélection.

1.2. Modélisation du schéma de sélection

La modélisation envisagée du schéma de sélection est de type déterministe. Dans cette approche les conséquences de la sélection sur l'évolution des distributions des valeurs génétiques sont décrites et calculées grâce à des équations reliant cette évolution aux variables (effectifs, taux de sélection) qui caractérisent la population. Elle se base sur une description détaillée du schéma, de la démographie de la population, des critères de sélection et des pressions de sélection appliqués ou encore de la précision de sélection (corrélation entre l'objectif de sélection et l'index des critères de sélection). Un point clé de cette

modélisation est l'estimation de l'espérance de la valeur génétique vraie ($E[g|I > s]$) des reproducteurs dont l'index I se situe au-delà d'un seuil s donné : $E[g|I > s] = i(q) * r(I, H) * \sigma_H$. Dans l'équation, $i(q)$ correspond à l'intensité de sélection appliquée au cheptel, $r(I, H)$ est la corrélation entre l'index I et l'objectif de sélection, σ_g est l'écart-type génétique du caractère évalué.

Deux index rétrospectifs (I_1 et I_2) sont utilisés dans la modélisation, un pour chacune des deux étapes de sélection (figure 1) et sont calculés en tenant compte de l'information disponible, y compris les performances des apparentées. La première étape de sélection est modélisée en 2 sous-étapes (figure 2) : une familiale et une intrafamiliale.

Les familles sont triées selon la moyenne familiale des index I_1 ($x_i = \frac{1}{n_i} \sum_j \hat{I}_{1ij}$, où n_i est le nombre d'individus composant la $i^{\text{ème}}$ famille). La proportion Q_f de familles que l'on doit conserver lors de la sélection détermine un seuil τ_a . Les moins bonnes familles, telles que $x_i < \tau_a$ sont alors éliminées. Parmi les familles retenues, on distingue deux groupes : les « bonnes » et les « intermédiaires », séparées sur la moyenne familiale par un seuil τ_b , avec deux processus de sélection intrafamiliale différents. Dans le groupe des familles intermédiaires ($x_i < \tau_b$), on retient la même proportion Q_{min} d'individus par famille, c'est-à-dire les individus dont l'écart à la moyenne familiale est supérieure à un seuil s_a à déterminer ($y_{ij} > x_i + s_a$, avec y_{ij} la valeur d'index du $j^{\text{ème}}$ individu de la $i^{\text{ème}}$ famille). Dans le groupe des meilleures familles ($x_i > \tau_b$), les individus sont sélectionnés sur leurs propres valeurs d'index ($\hat{I}_{1ij}$) selon un seuil s_b commun à toutes les familles du groupe et à déterminer lui aussi. Autrement dit, pour ces bonnes familles, le nombre d'individus sélectionnés en première étape est variable et dépend de la moyenne familiale. La deuxième étape de sélection du schéma correspond à un processus de sélection individuelle. Les candidates sont sélectionnées si leur valeur d'index I_2 est supérieure à un seuil s_z déterminé par le taux de sélection appliqué à cette étape. La supériorité génétique Δ des femelles sélectionnées peut alors s'écrire comme la somme des espérances des supériorités génétiques dans les familles intermédiaires et dans les bonnes familles :

$$\Delta = \frac{Q_1}{Q_1 + Q_2} Ma + \frac{Q_2}{Q_1 + Q_2} Mb$$

$$Ma = E[g|x_i \in [\tau_a, \tau_b], y_{ij} > s_a, z_{ij} > s_z]$$

$$Mb = E[g|x_i > \tau_b, y_{ij} > s_b, z_{ij} > s_z]$$

Les seuils τ_a et s_a sont déterminés à partir des taux de sélection Q_f et Q_{min} , respectivement. Les seuils s_b et s_z sont déterminés de façon à respecter les taux de sélection Q_1 et Q_2 , respectivement, et le seuil τ_b (à partir duquel une famille est considérée parmi les

meilleures) est déterminé de façon à maximiser la supériorité génétique que l'on cherche à prédire.

1.3. Modélisation d'un schéma de sélection génomique.

Le modèle de génomique proposé utilise un index (I_g) et combine un processus de sélection familiale où les familles sont triées selon la moyenne familiale x_{gi} de l'index et un processus de sélection intra-famille où les individus sont triés selon leur propre valeur d'index (y_{gij}). L'espérance de la valeur « génomique » des reproducteurs s'écrit : $\Delta_g = E[g|x_{gi} > s_f, y_{gij} > s_c]$, où s_f est le seuil de troncature donné par le taux de sélection familial et s_c est le seuil de troncature donné par le taux de sélection individuel.

Les calculs nécessaires aux deux modèles, de résolution des intégrales ou encore de maximisation de la fonction, ont été réalisés avec l'aide des fonctions G01EAF, G01FAF et des routines C05ADF, D01FCF et E04ABF de la librairie NAG (Numerical Algorithms Group Ltd., Oxford, UK).

1.4. Mise en œuvre du modèle

Afin d'illustrer l'utilisation possible du modèle proposé, celui-ci a été mis en œuvre pour déterminer l'influence des paramètres Q_f (taux de sélection familial, c'est-à-dire la proportion d'origines maternelles représentées parmi les femelles conservées à l'issue de la première étape) et Q_{min} (proportion d'individus sélectionnés dans les familles intermédiaires) sur les prédictions de progrès génétique espéré. Le modèle est multi-caractères, mais seuls les résultats obtenus pour le caractère de poids d'œuf ($h^2=0,29$) sont présentés, les autres caractères présentant des résultats similaires. Les deux modèles proposés ont également été mis en œuvre pour comparer les prédictions de gain génétiques espérés sur deux caractères fictifs, C1 et C2, présentant des héritabilités de 0,12 et 0,33, respectivement et une pondération dans l'objectif de 40% et 60%, respectivement. La corrélation entre les deux caractères varie de 0 à 0,7.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

La figure 3 présente les prédictions de supériorité génétique pour un caractère de poids d'œuf obtenues après utilisation du modèle pour des valeurs de Q_f allant de 30% à 50% et des valeurs de Q_{min} de 1/10, 3/10 et 5/10 (pour plus de simplicité, nous avons supposé toutes les familles de mère de même taille, égales à 10 pleines sœurs). Malgré la faible échelle dans laquelle s'inscrivent ces résultats (0,015 points d'écart entre les valeurs les plus extrêmes), une tendance se dégage. L'augmentation de la proportion de familles sélectionnées s'accompagne d'une légère

hausse des valeurs des espérances prédites (de 0,256 à 0,26) jusqu'à atteindre un plateau lorsque Q_f dépasse 41% autour de 0,26. Ce constat est le même quelle que soit la valeur de Q_{min} , c'est-à-dire quel que soit le nombre d'individus que l'on impose de choisir dans les familles intermédiaires. De plus, la valeur de Q_{min} imposée ne semble pas ou peu influencer la valeur de l'espérance prédite : pour $Q_f=30\%$ et $Q_f=41\%$, le résultat obtenu est le même pour les 3 valeurs de Q_{min} , alors que pour les autres valeurs de Q_f , une combinaison avec $Q_{min}=1/10$ ou $Q_{min}=5/10$ semble plus performante. Le modèle est conçu de manière à maximiser le progrès prédit quel que soit le paramétrage Q_f/Q_{min} demandé, ce qui peut expliquer en partie le faible écart entre les valeurs des différentes conditions.

La figure 4 présente les premiers résultats de comparaison des prédictions de gain génétique obtenus par les deux modèles proposés. Quelle que soit la corrélation, le gain génétique obtenu par le modèle génomique est nettement supérieur à celui obtenu par le modèle classique. Dans ce cas, les progrès des deux caractères sont équivalents quelle que soit la corrélation. En revanche, dans le cas génomique, le progrès du caractère C1 diminue plus fortement que celui du caractère C2 quand la corrélation diminue. C1 étant moins héritable que le C2, cette différence semble due à la plus faible pondération de C1 par rapport à C2 et à la diminution de la corrélation. Il semble ainsi que le modèle génomique soit plus sensible que le modèle génétique aux différents paramètres que sont l'héritabilité, la pondération et la corrélation, mais cette hypothèse nécessite d'être étayée.

Comme précisé ci-dessus, les résultats présentés ici pour illustrer la mise en œuvre du modèle ne concernent qu'un seul caractère. Cependant, le modèle a été conçu pour pouvoir traiter une approche multi-caractères et prédire par une seule utilisation les supériorités génétiques potentielles des caractères composant les index utilisés. Les index peuvent ainsi n'être composés que d'un seul ou de plusieurs caractères.

CONCLUSION

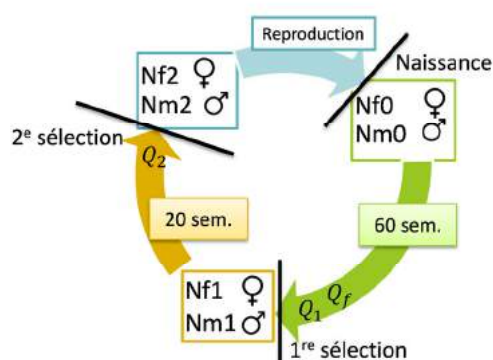
Le modèle présenté dans cet article fait intervenir de nombreux paramètres dont la variabilité amène à comparer des scénarios de schémas de sélection différents. Dans un contexte d'optimisation de schéma pour en maximiser les gains, il peut permettre d'identifier les paramètres clés ou les combinaisons de paramètres optimales des schémas modélisés. Dans un contexte d'évaluation de la sélection génomique, ce modèle servira de base de comparaison et pourra être adapté à la génomique pour comparer différents scénarios de sélection génomique entre eux et avec le modèle de sélection traditionnelle.

Remerciements : Nous remercions AGENAVI, financeur du projet OPTIVOL dans lequel s'inscrit cette étude, ainsi que NOVOGEN, partenaire du projet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

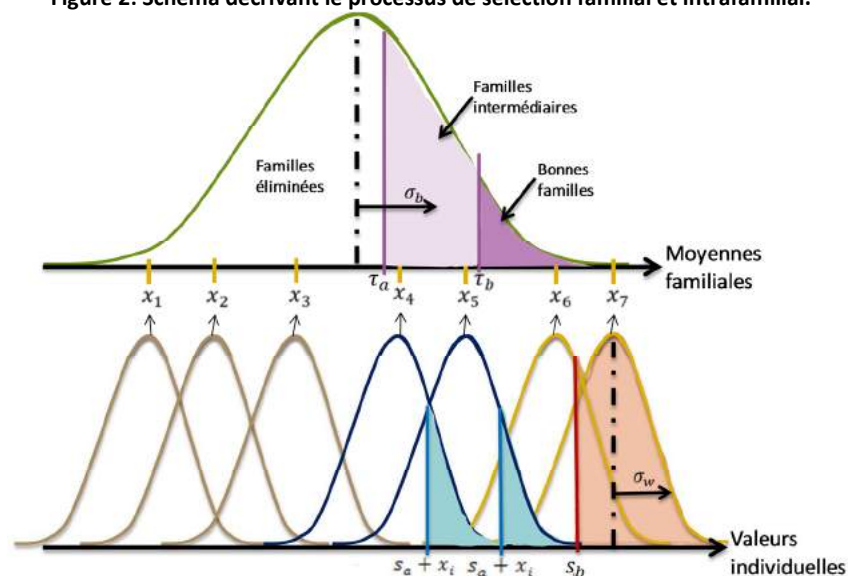
- Allaire F.R., Henderson C.R., 1966, Sélection practiced among dairy cows II. Total production over a sequence of lactation. J. Dairy Sci., 49 (11), 1435-1440.
- Elsen, J.-M., 1992 De l'optimisation au progrès génétique réalisé dans les schémas de sélection. INRA Productions animales, 1992, hs, 237-242.

Figure 1 : Schématisation d'un cycle de sélection de poules pondeuses.



Q_1 et Q_2 sont les taux de sélections appliqués aux candidats aux étapes 1 et 2, respectivement. Q_f est le taux de sélection familial appliqué lors de la 1^{re} étape de sélection. **Nf** et **Nm** sont les effectifs des femelles et des mâles, respectivement, aux différentes étapes du cycle de sélection.

Figure 2 : Schéma décrivant le processus de sélection familial et intrafamilial.



Les familles sont numérotées de 1 à 7 et triées selon leur moyenne x . Dans les familles intermédiaires (4 et 5), un nombre fixe d'individus est choisi, déterminé par un seuil $x_i + s_a$. Dans les bonnes familles, les meilleurs candidats sont choisis, sélectionnés selon un seuil s_b .

Figure 3 : Prédications de gain génétique annuel par le modèle de sélection classique pour différentes valeurs de Q_f et de Q_{min}

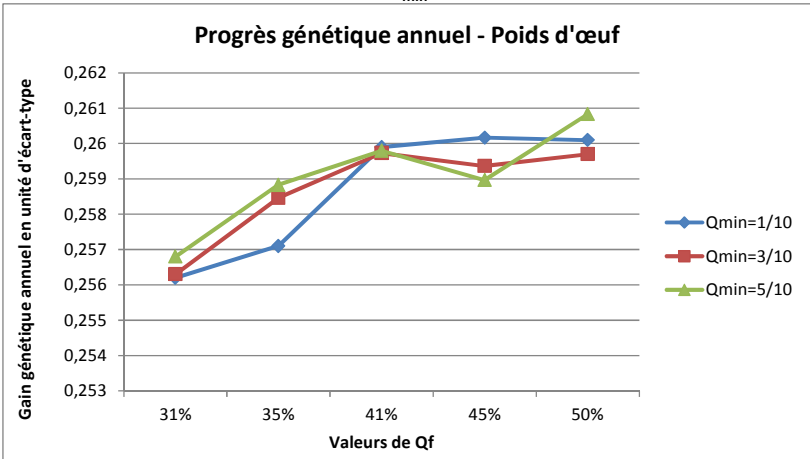
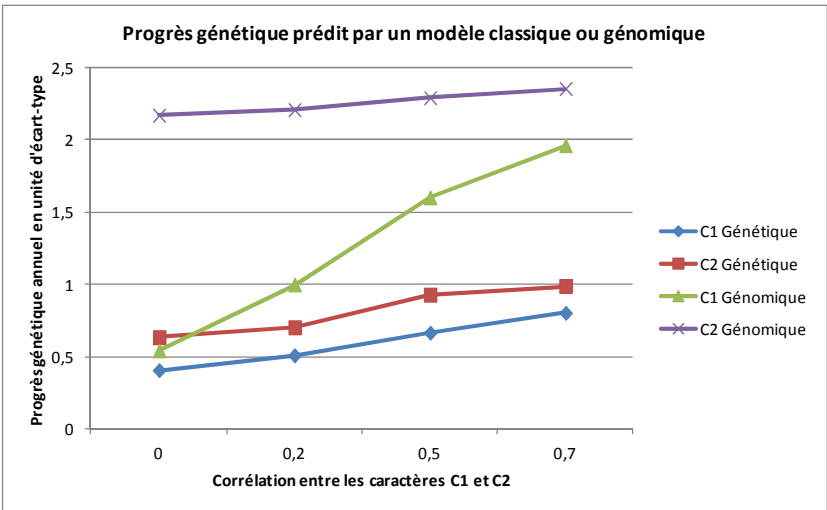


Figure 4 : Progrès génétiques prédits par les modèles classiques et génomique selon la corrélation entre les deux caractères C1 et C2.



ANALYSE FONCTIONNELLE DES REGIONS GENOMIQUES ASSOCIEES A LA REPONSE A LA COCCIDIOSE A *EIMERIA MAXIMA* CHEZ DES POULETS DE CHAIR

**Hamzić Edin^{1,2}, Pinard-van der Laan Marie-Hélène¹, Buitenhuis Bart²,
Hawken Rachel³, Bed'Hom Bertrand¹**

¹GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay - 78350 JOUY-EN-JOSAS, France

²Center for Quantitative Genetics & Genomics, Department of Molecular Biology & Genetics, Aarhus University - Blichers Allé 20, P.O. Box 50 - 8830 TJELE, Denmark

³Cobb-Vantress Inc. - AR 72761 SILOAM SPRINGS, USA

bertrand.bedhom@inra.fr

RÉSUMÉ

La coccidiose est une parasitose intestinale causée par des espèces du genre *Eimeria*, très répandue dans les élevages avicoles à l'origine de pertes importantes par son impact direct sur la production et les mesures de lutte associées. La gestion intégrée de cette pathologie devrait conduire à inclure dans les programmes de sélection des critères relatifs à la réponse des animaux à la coccidiose. Notre objectif a donc été d'étudier la variabilité de la réponse de poulets de chair à *Eimeria maxima* et d'identifier les régions génomiques associées, puis de comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents. Pour cela, nous avons réalisé une infection expérimentale sur 2 024 animaux et mesuré des phénotypes (poids, température, lésions et de nombreux paramètres sanguins) de la réponse des animaux. Afin de comprendre les bases génétiques de cette réponse, ces animaux ont été génotypés à l'aide d'un panel de 580K marqueurs SNP. L'étude d'association génomique a permis d'identifier des régions du génome très significativement associées avec le gain de poids, la coloration plasmatique ou le taux plasmatique de β 2-globuline. Une analyse des fonctions biologiques des gènes a révélé la grande importance des voies biologiques de métabolisme énergétique et de certains paramètres de réponse innée. Une analyse des interactions a identifié des réseaux très significatifs centrés sur des fonctions de réparation intestinale ou cardiovasculaires. Les marqueurs génétiques identifiés lors de cette étude peuvent être utilisés dans des programmes de sélection.

ABSTRACT

Functional analysis of genomic regions associated to response to coccidiosis caused by *Eimeria maxima* in broilers

Coccidiosis is a parasitic disease caused by species from *Eimeria* genus, widespread in poultry farming, leading to important losses by its direct impact on production and the associated control measures. The integrative management against this disease should lead to include new parameters of animal's response to coccidiosis in selection schemes. Our goal was to study the variability of broilers' response to coccidiosis caused by *Eimeria maxima*, to identify associated genomic regions and to understand underlying biological mechanisms. We performed an experimental infection with 2 024 animals and measured phenotypes of animals' response (body weight, temperature, lesions and many blood parameters). Animals have been genotyped using a 580K SNP panel, and the genome-wide association study has revealed genomic regions highly significantly associated to body weight gain, plasma colour and plasma β 2-globuline concentration. The analysis of biological functions of genes has shown the major role played by biological pathways of metabolism and some innate immune parameters. The analysis of interactions has shown very significant networks centred on gut repair or cardiovascular functions. The genetic markers identified during this study can be used in selection programmes.

INTRODUCTION

La coccidiose est une des pathologies les plus communes et coûteuses de la production avicole. Elle est causée par des protozoaires du genre *Eimeria*. Le contrôle actuel de la coccidiose est basé sur l'utilisation de médicaments anticoccidiens et la vaccination, et rencontre de sérieux obstacles comme la résistance des pathogènes aux traitements ou le coût élevé de la vaccination. Donc, ces programmes de contrôle doivent être intégrés avec des approches complémentaires comme la sélection génétique d'animaux présentant une meilleure réponse aux infections par *Eimeria*. Cette étude des bases génétiques des variations de réponse à la coccidiose a été conduite sur des poulets de chair exposés à l'agent pathogène *Eimeria maxima*.

Pour étudier la variabilité génétique de cette réponse, une infection expérimentale à grande échelle a été réalisée, dans des conditions proches des conditions de production, afin de mesurer de nombreux phénotypes de réponse des animaux aux pathogènes, de faire une étude d'association entre des marqueurs du génome et les variations de ces phénotypes, puis d'étudier les fonctions biologiques et les réseaux d'interaction des gènes identifiés.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Infection expérimentale

L'étude expérimentale a été conduite sur des poulets de chair Cobb500, en deux étapes: une première étude pilote a été réalisée sur 240 animaux pour la mise au point des paramètres étudiés, suivie par une seconde à grande échelle comportant 2 024 animaux (Hamzić et al., 2015a). Pour cette dernière, 1 936 animaux ont été infectés individuellement à l'âge de 16 jours avec une dose de 50 000 oocystes d'*Eimeria maxima*, 88 animaux ont été conservés comme témoins non infectés pendant les 7 jours de l'étude infectieuse.

Les phénotypes ont été mesurés à deux stades (au moment de l'infection et à la fin de l'expérimentation 7 jours plus tard) et à deux échelles : paramètres simples ou automatisables sur tous les animaux (poids corporel, hématocrite, couleur du plasma sur tout le spectre visible et température corporelle), paramètres invasifs ou complexes sur un sous-ensemble de 184 animaux choisis pour des valeurs extrêmes de gain de poids (numération de cellules sanguines, électrophorèse des protéines plasmatiques, scores lésionnels et comptage des oocystes).

Les analyses statistiques des données ont été réalisées à l'aide d'un modèle linéaire mixte (LMM), afin de déterminer l'effet de l'infection. Une régression des moindres carrés partielle (PLSR) a été utilisée pour déterminer les relations entre les phénotypes mesurés et tenter de prédire les phénotypes complexes à partir de phénotypes plus simples.

1.2. Génotypage et analyse fonctionnelle

Nous avons conduit une analyse de type GWAS (*Genome-Wide Association Study*) pour identifier les régions génomiques associées aux phénotypes, suivie d'une exploration fonctionnelle à partir des résultats obtenus, pour identifier les mécanismes et les voies biologiques impliquées dans la réponse à *Eimeria maxima* (Hamzić et al., 2015b).

L'ADN de 1 972 individus de l'étude expérimentale a été extrait à partir d'échantillons sanguins, et le génotypage a été réalisé à l'aide de la puce de génotype Affymetrix Axiom HD 580K. Après les contrôles qualité, l'analyse d'association a été réalisée à partir de 443 587 SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) informatifs avec l'algorithme GEMMA et un modèle mixte linéaire (LMM) tenant compte de la structure d'apparentement génomique entre les individus. La signification de l'association SNP-phénotype est calculée après correction FDR (*False Discovery Rate*) pour les tests multiples.

Les voies biologiques des gènes présents dans les régions du génome comprenant des SNP associées aux caractères ($p\text{-value} < 10^{-4}$) ont été déterminées à l'aide de la base de données KEGG. Les analyses de réseaux d'interaction entre ces gènes ont été réalisées à l'aide de la base de données de relations biologiques d'*Ingenuity Pathway Analysis*.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les paramètres de croissance des animaux témoins (non infectés) ont montré que les performances de croissance attendues pour des poulets de chair Cobb500 étaient parfaitement respectées, ce qui confirme que les conditions expérimentales sont proches des conditions réelles de production.

La plupart des paramètres mesurés lors des études expérimentales sont affectés par l'infection à *Eimeria maxima*. Le tableau 1 présente les statistiques descriptives des phénotypes mesurés sur l'ensemble des animaux. Les phénotypes les plus significativement affectés ($p\text{-value} < 10^{-3}$) sont le gain de poids corporel et la couleur du plasma. Parmi les caractères complexes mesurés seulement sur le sous-ensemble de 184 animaux, les plus significativement affectés ($p\text{-value} < 10^{-3}$) sont les scores lésionnels et les taux de certaines protéines plasmatiques : albumine, $\alpha 2$ -globuline et $\beta 2$ -globuline. Ces protéines plasmatiques se révèlent donc de nouveaux paramètres très pertinents pour déterminer la réponse des animaux à l'infection par *Eimeria maxima*.

Le gain de poids est un caractère cible majeur pour les poulets de chair. Il est très fortement affecté par l'infection, en raison de la pathogénicité propre d'*Eimeria*, de la réponse inflammatoire associée et de la prostration induisant une baisse de la consommation alimentaire.

L'hématocrite n'est pas un paramètre très significativement affecté par l'infection à *Eimeria maxima*, contrairement à ce qui est décrit pour

d'autres espèces comme *Eimeria tenella*. Ceci est compatible avec la physiopathologie de ces deux espèces, *Eimeria tenella* causant des lésions intestinales hémorragiques, tandis qu'*Eimeria maxima* est responsable de malabsorption intestinale.

C'est probablement ce phénomène de malabsorption intestinale qui explique en partie le phénotype de couleur du plasma (et de moindre gain de poids). En effet, les densités optiques mesurées sur les plasmas sont les plus significativement différentes entre témoins et infectés entre 450 et 500 nm, zone correspondant à l'absorbance maximale des caroténoïdes, d'origine alimentaire.

La prédiction des scores lésionnels à partir de tous les autres paramètres est assez bonne ($R^2 \approx 0,66$), mais pas encore suffisamment précise pour pouvoir être utilisée en remplacement de ce paramètre invasif et fastidieux à établir.

L'analyse d'association a permis d'identifier 22 SNP hautement significatifs avec un test FDR strict ($q\text{-value} < 0.1$). Ces SNP ont été détectés en association avec les phénotypes mesurés sur tous les animaux : gain de masse corporelle (3 SNP sur le chromosome GGA5, 1 SNP sur le chromosome GGA1, 1 SNP sur le chromosome GGA3) et couleur du plasma aux longueurs d'ondes entre 465 et 510 nm (10 SNP sur le chromosome GGA10), ou en association avec les phénotypes détaillés mesurés sur le sous-ensemble de 184 animaux extrêmes : pourcentage de $\beta 2$ -globuline dans le plasma sanguin (15 SNP sur le chromosome GGA1 et 1 SNP sur le chromosome GGA2). La figure 1 présente un exemple de profil d'association génomique entre les SNP génotypés et le gain de poids. Les régions concernées par les associations les plus significatives sont présentées dans le tableau 2. La part de variance expliquée par chaque région génomique est de l'ordre de 2 à 3% pour les caractères de gain de poids (3 régions) et de couleur du plasma (1 région), et de 13 à 14% pour la $\beta 2$ -globuline (2 régions).

L'analyse des voies biologiques surreprésentées parmi les gènes des régions du génome avec des SNP associés aux caractères montre que la réponse à *Eimeria maxima* a une relation forte avec des gènes de voies métaboliques anaboliques, notamment celles d'acides aminés (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) ou des purines et de la voie des pentoses phosphates (métabolisme énergétique). Les zones du

génomique associées aux phénotypes étudiés sont également enrichies en gènes codant pour des composantes de réponse innée (endocytose et péroxysome)

Enfin, les analyses de réseaux d'interaction entre les gènes des régions du génome avec des SNP associés aux caractères ont permis de mettre en évidence deux réseaux très significatifs. Le premier est centré sur les gènes LATS1 et LAT2 (Figure 2), qui sont impliqués dans le renouvellement de l'épithélium intestinal, ce qui est compatible avec un rôle majeur de la réparation des lésions causées par la coccidiose. Le second réseau, centré sur MYH6, est en lien avec le maintien d'une fonction cardiovasculaire normale.

CONCLUSION

Cette étude expérimentale a été réalisée avec succès à grande échelle dans des conditions proches des conditions de productions habituelles. Elle a montré que les poulets de chair étudiés expriment des réponses fortes et variables pour les phénotypes mesurés après infection expérimentale, suggérant que la réponse à *Eimeria maxima* a un déterminisme génétique fort, et que la capacité de réponse des animaux peut donc être améliorée par sélection génétique. Cette étude a permis d'identifier plusieurs gènes candidats importants et des régions génomiques associées aux caractères de réponse à l'infection à *Eimeria maxima* chez le poulet de chair.

Les SNP très significatifs pourraient être utilisés pour une sélection génétique d'animaux qui ont une meilleure réponse à la coccidiose. Cette application peut être directe pour la population de poulets de chair étudiée ici. Pour d'autres populations de poulets de chair, une application des résultats reste possible, mais nécessite au minimum de contrôler l'informativité des SNP cibles dans ces populations, voire de valider expérimentalement l'effet de ces SNP sur les caractères d'intérêt.

Enfin, l'analyse fonctionnelle indique que des voies biologiques et des réseaux génétiques impliqués dans la réparation et la prolifération cellulaire ainsi que dans la réponse immunitaire innée précoce jouent probablement un rôle majeur durant les premiers stades de l'infection.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hamzić E., Bed'Hom B., Juin H., Hawken R., Abrahamsen M.S., Elsen J.M., Servin B., Pinard-van der Laan M.H., Demeure O., 2015a. J.Anim.Sci., (93), 1830-1840.
Hamzić E., Buitenhuis B., Hérault F., Hawken R., Abrahamsen M.S., Servin B., Elsen J.M., Pinard-van der Laan M.H., Bed'Hom B., 2015b. Genet.Sel.Evol., (47), 91.

Tableau 1. Statistiques descriptives (Moy. = moyenne, σ = écart-type) de paramètres mesurés sur tous les animaux, estimation et significativité des effets de l’infection (p-value : NS = non significatif, * = $P \leq 0.05$, *** = $P \leq 0.001$) entre les animaux témoins (non infectés) et les animaux infectés.

Paramètres	Non infectés		Infectés		Effet	p-value
	Moy.	σ	Moy.	σ		
Gain de poids J15-J22 (g)	487.22	52.67	302.13	57.18	-200.16	***
Température (°C)	41.64	0.40	41.42	0.42	- 0.06	*
Hématocrite (%)	31.42	2.90	30.00	4.16	-1.25	NS
DO plasma à 450 nm	0.78	0.12	0.42	0.17	-2.02	***
DO plasma à 470 nm	0.67	0.10	0.30	0.11	-2.17	***

Tableau 2. Régions du génome (position selon assemblage galGal4) présentant une association significative avec des caractères mesurés après correction pour tests multiples (q-value < 0.1), gènes candidats de ces régions et part de variance du caractère concerné expliquée par le marqueur SNP le plus fortement associé.

Caractère	Chromosome	Position (Mb)	Gène	p-value	% variance
Gain de poids J15-J22 (g)	1	42,1	MGAT4C	$3,55.10^{-7}$	2,8%
Gain de poids J15-J22 (g)	3	104,9	KCNK3	$3,86.10^{-7}$	2,6%
Gain de poids J15-J22 (g)	5	29	THBS1	$6,49.10^{-8}$	2,1%
Couleur du plasma	10	2,1	MAN2C1	$2,82.10^{-8}$	2,3%
$\beta 2$ -globuline	1	52,6	LARGE	$3,57.10^{-6}$	13,4%
$\beta 2$ -globuline	2	83,3	FHOD3	$1,90.10^{-6}$	14,2%

Figure 1. Représentation (*Manhattan-plot* avec les $-\log(p\text{-value})$) des associations entre SNP et gain de poids. Les SNP significatifs après la correction pour tests multiples (FDR) sont situés au-dessus de la ligne rouge.

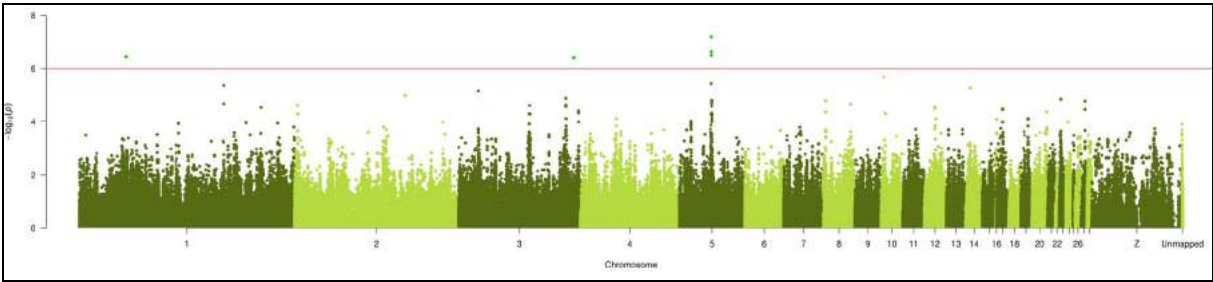
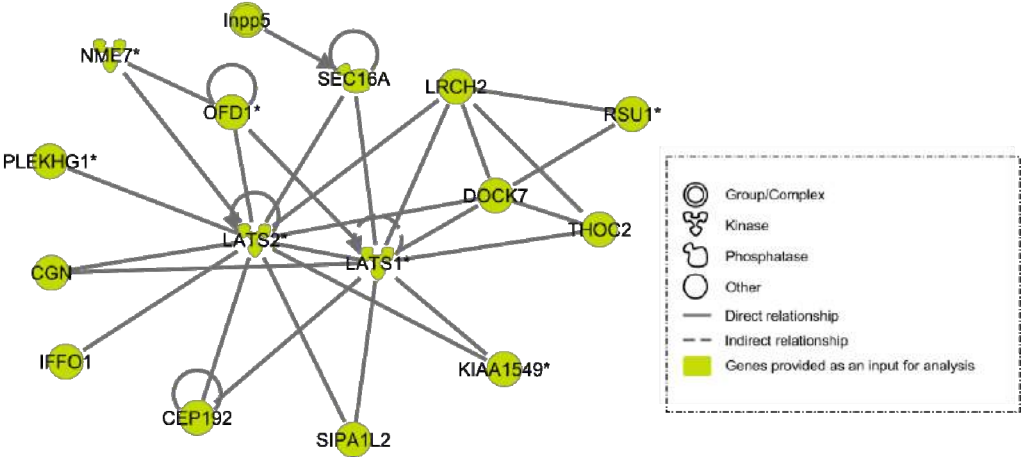


Figure 2. Réseau d’interaction de gènes candidats construit à l’aide d’*Ingenuity Pathway Analysis*. Ce réseau est centré sur les gènes LATS1 et LATS2, impliqués dans le renouvellement de l’épithélium intestinal.



EXPRESSION DE GENES DANS LE FOIE DE CANARDS NOURRIS AD LIBITUM OU GAVES

Hérault Frédéric¹, Houée-Bigot Magalie², Baéza Elisabeth³, Bouchez Olivier^{4,5}, Esquerré Diane^{4,5}, Klopp Christophe^{6,7}, Diot Christian¹

¹UMR PEGASE - INRA-Agrocampus Ouest -3590 SAINT-GILLES,

²MATHEMATIQUES APPLIQUEES - Agrocampus Ouest - 35042 RENNES

³URA - INRA - 37380 NOUZILLY

⁴UMR GENPhySE - INRA - 31326 CASTANET TOLOSAN

⁵GeT PlaGE - GenoToul - 31326 CASTANET TOLOSAN

⁶Bioinfo - GenoToul - 31326 CASTANET TOLOSAN

⁷SIGENAE - INRA - 31326 CASTANET TOLOSAN

Christian.diot@inra.fr

RÉSUMÉ

L'analyse des transcriptomes de foies de canards de différents types génétiques, nourris *ad libitum* ou gavés et présentant des aptitudes différentes à la production de foie gras, a été conduite afin de mettre en évidence les gènes présentant des différences d'expression et ainsi mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de la stéatose hépatique.

Des ARN ont donc été extraits de foies provenant de canards communs, de Barbarie et de leurs hybrides réciproques mulards et hinnies, gavés ou non. Ces ARN ont été séquencés à haut débit et l'analyse des données d'expression a été réalisée. Des analyses par classification hiérarchique ou en composantes principales montrent que le premier regroupement des individus se fait en fonction du régime alimentaire, les différences entre types génétiques n'intervenant qu'ensuite. Les canards de Barbarie nourris *ad libitum* sont cependant plus proches des canards de Barbarie gavés que des autres canards nourris *ad libitum*. Parmi tous les groupes constitués, celui des canards Pékin gavés est le plus hétérogène. Par contre, et pour chacun des deux régimes, les canards mulards et hinnies ne peuvent pas être distingués. De nombreux gènes présentent des différences d'expression selon le régime alimentaire, gènes impliqués dans diverses voies métaboliques plus ou moins attendues comme le catabolisme des sucres, la lipogenèse ou le cycle cellulaire, l'immunité et la réponse inflammatoire. Enfin, ces processus d'annotation fonctionnelle permettent aussi de distinguer des fonctions discriminant les réponses au gavage des différents types génétiques.

Au final, ce projet permet d'améliorer la connaissance des fonctions mises en œuvre lors du gavage et impliquées dans le développement de la stéatose hépatique dans quatre types génétiques de canards.

ABSTRACT

Gene expression in the liver of ducks *ad libitum* fed or overfed

Transcriptome analyses have been conducted on RNAs extracted from the livers of ducks, *ad libitum* fed or overfed and presenting different susceptibility to fatty liver production, in order to identify genes with differences in expression and thus to better describe mechanisms involved in hepatic steatosis.

RNAs have been extracted from the liver of "pure species", Pekin and Muscovy ducks, and of their reciprocal hybrids, mule and hinny. RNAs have been sequenced and sequencing data have been analyzed. Hierarchic clustering and principal component analyses indicate that differences between individuals lie primarily in feeding effect, differences between genotypes being less important. However, Muscovy ducks *ad libitum* fed and overfed are clustered together. Interestingly, hinny and mule ducks are clustered together according to feeding. Many genes with differences in expression between overfed and *ad libitum* fed have been identified. Analyses of functional annotations associated to these differential genes highlight some expected functions (carbohydrate and lipid metabolisms) but also some unexpected ones (cell proliferation and immunity). These analyses also allow to evidence differences in response to overfeeding between the different genotypes.

Finally, these RNA sequence analyses help to better characterize functions involved in hepatic steatosis in ducks.

INTRODUCTION

Les canards sont des espèces de rente importantes en France, notamment au regard de la production du foie gras qui représente plus de 75 % du total mondial. En fait, 95% du foie gras produit provient de mâles mulards gavés, hybrides résultant du croisement inter-générique entre des femelles communes (*Anas platyrhynchos*), par exemple de type Pékin, et des mâles Barbarie (*Cairina moschata*). Il convient de préciser qu'à l'inverse, le hinny n'est pas utilisé pour la production de foie gras. Cela est essentiellement dû à une efficacité de procréation de canetons hinny bien moindre. Aussi, très peu de travaux se sont intéressés à la production de foie gras chez le hinny.

La sélection directe de caractères d'intérêt chez le canard mulard est coûteuse puisque nécessitant la procréation des canetons, leur gavage et abattage. Certaines mesures de qualité des foies (notamment, l'évaluation du rendement technologique à la cuisson) sont destructrices. De plus, les mulards sont stériles : la sélection doit donc se faire sur les deux parents, de genres différents. Par conséquent, la filière est très demandeuse de prédicteurs précoces, marqueurs ou gènes, chez les espèces parentales expliquant une part de la variabilité des caractères exprimés chez le canard mulard. La connaissance et la maîtrise génétique des mécanismes mis en œuvre lors de la stéatose hépatique est donc nécessaire. Quelques travaux ont ainsi été entrepris pour améliorer ces connaissances chez le canard : estimation des paramètres génétiques relatifs à l'aptitude au gavage et à la qualité et composition des foies gras (Marie-Etancelin et al., 2011), recherche de QTL (Kileh-Wais et al., 2013), séquençage d'ARN à moyen débit (Pitel et al., 2010) et expression de quelques gènes ou protéines candidats (Hérault et al., 2010 ; Molette et al., 2012 ; Tavernier et al., 2016).

Le présent projet vise à compléter les résultats obtenus, par séquençage à haut débit des ARNs (RNA-Seq) de foies de canards Pékin et de Barbarie et de leurs hybrides réciproques, mulard et hinny, tous nourris *ad libitum* ou gavés. Son objectif majeur est d'analyser l'ensemble du transcriptome hépatique de ces canards afin de mettre en évidence des différences d'expression entre types génétiques et/ou statuts nutritionnels et ainsi mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de la stéatose hépatique.

Au final, ce projet devrait améliorer la connaissance des fonctions et métabolismes impliqués dans le développement de la stéatose hépatique chez les canards.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Dispositif expérimental et séquençages

Quatre-vingt échantillons de foies de canards de 4 types génétiques différents (Pékin, Barbarie, mulard et hinny), gavés ou non (Chartrin et al., 2006), soit 10 échantillons par condition, ont été utilisés dans cette étude. Les ARNs totaux ont été extraits de ces échantillons selon le protocole déjà décrit (Hérault et al., 2008) à l'aide de kits NucleoSpin® RNA L (Macherey–Nagel EURL).

La préparation des banques à partir des ARNs totaux et les séquençages « paired-ends » en multiplex de 6 ont été réalisés à la plateforme Génome et Transcriptome - PlaGe de la Génopole Toulousaine (<http://get.genotoul.fr>) avec la technologie Hiseq 2000 et à l'aide du kit TruSeq v3 (Illumina), nécessitant 14 lignes de séquençage.

1.2. Analyses des données

Le prétraitement des données de séquençage a été réalisé par l'équipe Sigenae (INRA Toulouse). Celui-ci a consisté en un nettoyage des séquences, leur alignement sur le génome de référence *Anas platyrhynchos*, la détermination des transcrits et des gènes correspondants et au comptage des séquences correspondant à chacun de ces gènes.

Ces données de comptage, directement proportionnelles aux niveaux d'expression des gènes, ont alors été analysées dans l'environnement R. Elles ont tout d'abord été normalisées pour s'affranchir au mieux des différences artefactuelles.

Des analyses en composantes principales (ACP) et en classification ascendante hiérarchique (CAH) ont ensuite été réalisées pour comparer les échantillons sur la base de l'expression des gènes.

Des analyses ont également été conduites à l'aide du module (package) edgeR (Empirical Analysis of Digital Gene Expression Data in R, Robinson et al., 2010) afin d'identifier les gènes présentant des différences d'expression entre les différentes conditions expérimentales (types génétiques et modalités d'alimentation).

Enfin, les fonctions associées à ces gènes différentiellement exprimés ont été déterminées à l'aide de DAVID (Huang et al., 2009), outil permettant de mesurer l'enrichissement des fonctions associées à des listes de gènes différentiels par rapport aux fonctions représentées par l'ensemble des gènes présents dans le génome.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Environ 60 millions de séquences ont été obtenues par échantillon, soit un total de 4,8 milliards, attestant de la véracité de l'assertion « haut-débit » associée à ces nouvelles méthodes de séquençage.

Ces nombreuses séquences ont été assemblées sur le génome en 23059 gènes et 40551 transcrits différents. Pour chacun de ces gènes, le nombre de séquences alignées a été déterminé par échantillon et traité comme valeur d'expression des différents gènes.

Ces données d'expression ont été traitées par ACP et CAH pour comparer les différents individus. La première dimension de l'ACP discrimine les individus en fonction du régime alimentaire, les différences entre types génétiques n'intervenant qu'ensuite (figure 1A). Des résultats tout à fait similaires sont obtenus après CAH (figure 1B). Les canards de Barbarie nourris *ad libitum* sont cependant plus proches des canards de Barbarie gavés que des autres canards nourris *ad libitum*. Parmi tous les groupes constitués, celui des canards Pékin gavés est le plus hétérogène. Par contre, et pour chacune des deux modalités d'alimentation, les canards mulards et hennies ne peuvent pas être distingués.

Pour chaque type génétique, les gènes présentant des différences d'expression significatives et supérieures ou égales à 2 entre animaux gavés et nourris *ad libitum* ont été identifiés (2233, 2144, 2545, 2238, respectivement chez les Pékin, Barbarie, mulards et hennies). Après ACP et CAH sur la base des gènes présentant des différences d'expression *ad libitum*/gavés, les mêmes groupes sont constitués, les canards de Barbarie constituant néanmoins deux groupes bien distincts.

L'analyse de ces gènes différentiellement exprimés avec DAVID (<https://david-d.ncifcrf.gov/>) montrent que, comme attendu, les processus biologiques associés aux métabolismes des lipides et des sucres

sont significativement (après correction par la procédure Benjamini-Hochberg) enrichis (figure 2). De manière plus surprenante, les processus associés au cycle cellulaire, à l'organisation de la matrice extracellulaire, la coagulation et la réponse immunitaire sont également enrichis.

Enfin, lorsque les niveaux d'expression de ces gènes sont comparés entre types génétiques, il apparaît quelques fonctions plus ou moins enrichies, indiquant quelques différences qualitatives (différents gènes) et quantitatives (différence d'amplitude) de réponse au gavage entre types génétiques.

CONCLUSION

Ces travaux permettent de mieux caractériser les réponses au gavage de différents types génétiques et d'identifier des fonctions et métabolismes susceptibles de jouer un rôle important dans ces réponses.

Au-delà de leur portée cognitive, tout à fait intéressante, ces résultats pourraient aussi constituer les premiers jalons d'une sélection précoce, chez les parents du mulard, de canards gras présentant des caractères intéressant la profession en identifiant des gènes présentant des niveaux d'expression différents entre types génétiques et corrélés à leur production de foie gras.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chartrin P., Bernadet M., Guy G., Mourot J., Hocquette J., Rideau N., Duclos M.J., Baéza E., 2006. Comp. Biochem. Physiol. A, (145), 390-396.
- Hérault F., Robert E., Diot C., 2008. Anim. Genet., (39), 325-327.
- Hérault F., Saez G., Robert E., Al Mohammad A., Davail S., Chartrin P., Baéza E., Diot C., 2010. Anim. Genet., (41), 12-20.
- Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A., 2009. Nucleic Acids Res (37), 1-13.
- Kileh-Wais M., Elsen J.M., Vignal A., Feves K., Vignoles F., Fernandez X., Manse H., Davail S., André J.M., Bastianelli D., Bonnal L., Filangi O., Baéza E., Guéméné D., Genêt C., Bernadet M.D., Dubos F., Marie-Etancelin C., 2013. J. Anim. Sci. (91), 588-604.
- Marie-Etancelin C., Basso B., Davail S., Gontier K., Fernandez X., Vitezica Z.G., Bastianelli D., Baéza E., Bernadet M.D., Guy G., Brun J.M., Legarra A., 2011. J. Anim. Sci., (89), 669-679.
- Molette C., Théron L., Marty-Gasset N., Fernandez X., Rémignon H., 2012. J. Proteomics (75), 4290-4295.
- Pitel F., Leroux S., Fève K., Vignoles F., Duby C., Bernadet M.D., Marie-Etancelin C., Basso B., Klopp C., Vignal A., Diot C., 2010. 9èmes Journées de la Recherche Filière Palmipèdes à Foie Gras, Bordeaux, France, 07-08 octobre 2010.
- Robinson M.D., McCarthy D.J. and Smyth G.K. 2010. Bioinformatics (26), 1.
- Tavernier A., Davail S., Ricaud K., Bernadet M.D., Gontier K., 2016. Mol. Cell. Biochem., Epub ahead of print

Figure 1. Regroupement des individus par ACP (A) et CHA (B).
Bleu : Pékin ; vert : Barbarie ; rouge : mulard ; gris : hinny ;
Couleurs claires : ad libitum ; foncées : gavé.

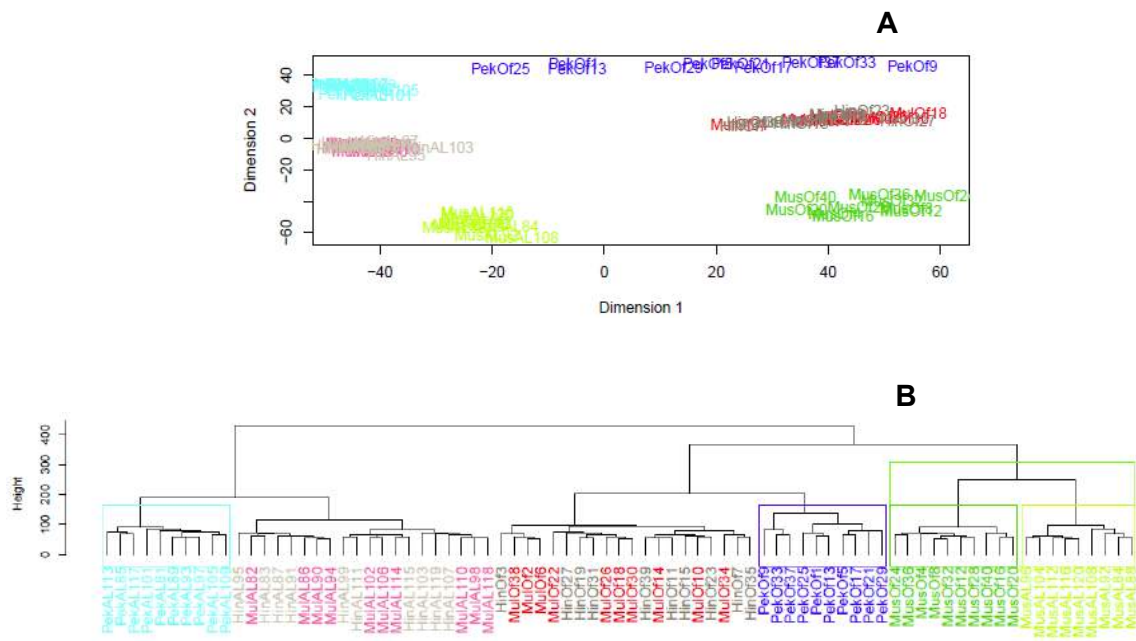
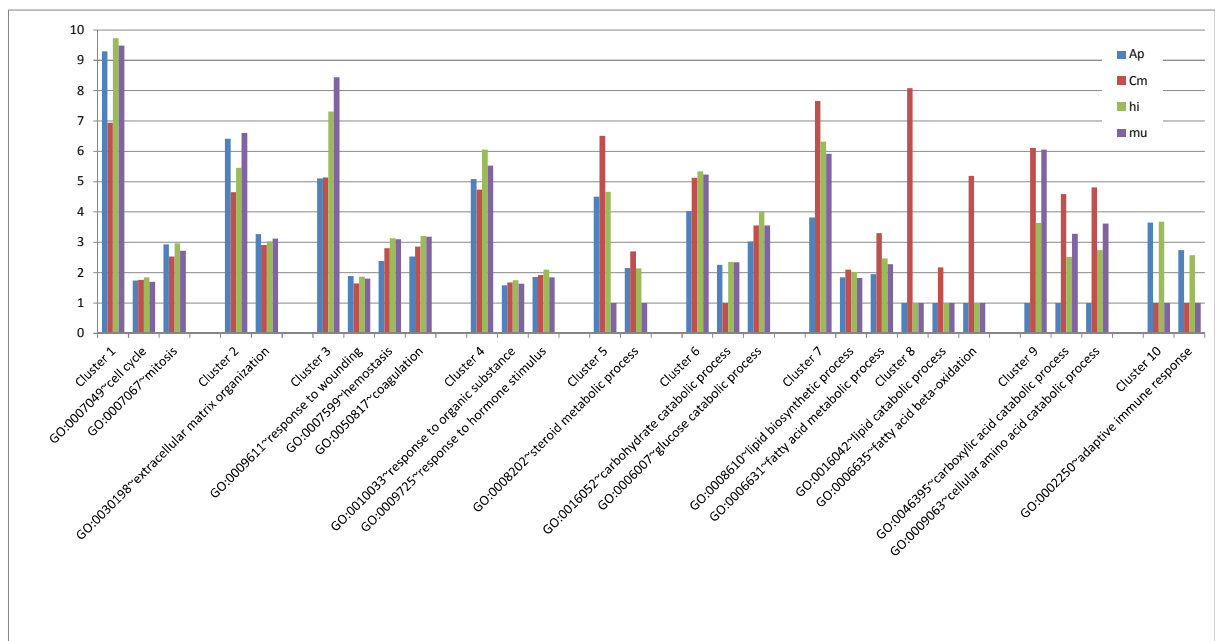


Figure 2. Enrichissement en processus biologiques en réponse au gavage.
Les valeurs en ordonnée correspondent aux taux d’enrichissement des clusters et processus biologiques (GO)
calculés par DAVID.
Ap : Pékin ; Cm : Barbarie ; hi : hinny ; mu : mulard.



EFFET D'UNE RESTRICTION ALIMENTAIRE ET D'UNE SUPPLEMENTATION EN ACIDE GRAS OMEGA 3 SUR LA FERTILITE, LA STEROIDOGENESE ET LA QUALITE DE PONTE CHEZ LA POULE REPRODUCTRICE

Mellouk Namy¹, Ramé Christelle¹, Delaveau Joël², Rat Christophe², Marchand Maxime², Mercierand Frédéric², Rigoreau Harold², Travel Angélique³, Bignon Laure³, Chartrin Pascal⁴, Ma Linlin¹, Froment Pascal¹, Dupont Joëlle¹

¹INRA, UMR085 Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements PRC - 37380 NOUZILLY

²INRA - Unité Expérimentale du Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours UE PEAT - 37380 NOUZILLY

³ITAVI - Centre INRA Centre Val de Loire - 37380 NOUZILLY

⁴INRA- UMR083 Unité de Recherches Avicoles – 37380 NOUZILLY

joelle.dupont@inra.fr

RÉSUMÉ

Chez la volaille de type chair, une croissance rapide est souvent accompagnée d'une altération de la reproduction. Une des méthodes utilisées par les éleveurs pour pallier à ces conséquences défavorables sur la fertilité est la restriction alimentaire. L'objectif de cette étude est d'évaluer les conséquences de ce type d'alimentation et d'une supplémentation en acide gras polyinsaturés (AGPI), connus pour augmenter la production d'adipocytokines (hormones produites par le tissu adipeux), sur la fertilité, la stéroïdogenèse et la qualité de ponte. Ainsi, nous avons suivi 320 poules réparties en 4 groupes égaux nourries avec une alimentation restreinte (Rt) ou *ad libitum* (Ad), recevant une quantité d'aliment permettant une croissance 1.7 fois plus importante que celle des animaux Rt), supplémentée ou non en AGPI. Nos analyses ont montré que les poules Ad pondent significativement ($p < 0.05$) plus d'œufs sur 39 semaines que les animaux Rt. Cependant, la qualité des œufs pondus est de moins bonne qualité, avec un nombre d'œufs mous, cassés et doubles plus importants chez les animaux Ad que chez les animaux Rt. De plus, nous observons que la supplémentation en AGPI diminue le nombre d'œufs pondus chez les animaux Rt mais n'a aucun effet sur la qualité des œufs et le nombre total d'œufs. D'autre part, nous observons une diminution de la fertilité des animaux Ad ainsi qu'une production plus faible de progestérone en réponse à l'IGF1 (ou LH) dans les cellules de granulosa cultivées *in vitro* et dans le jaune d'œuf par rapport aux animaux Rt. Cependant, la supplémentation en AGPI n'a aucun effet sur la fertilité des animaux Ad et sur la production de progestérone dans les cellules de granulosa cultivées *in vitro* des animaux Rt, alors qu'elle améliore la fertilité et la production de progestérone en réponse à l'IGF1 (ou LH) dans les cellules de granulosa cultivées *in vitro* des animaux Rt ainsi que la production de progestérone dans le jaune d'œuf des animaux Ad et Rt. Ce dernier fait peut être expliqué par le maintien de concentrations élevées en AGPI dans les jaunes d'œufs des animaux ayant reçu la supplémentation. Ainsi, la quantité et la composition en AGPI de l'alimentation modifient la ponte, la qualité des œufs, la fertilité et la stéroïdogenèse chez la poule reproductrice de chair.

ABSTRACT

Effect of feed restriction and fatty acid supplementation on fertility, steroidogenesis and eggs quantity and quality in hens

In broiler hens, rapid growth is often associated with a disruption of reproduction. One of the methods used by farmers to limit the decline of fertility is feed restriction. The aim of this study is to assess the consequences of this type of feed intake management and polyunsaturated fatty acid supplementation (FAS) known to increase adipokines (hormones produced by the adipose tissue) production, on fertility, steroidogenesis and eggs quantity and quality. Hence, we followed 320 hens divided into 4 equal groups fed with a restricted (Rt) or *ad libitum* (Ad, receiving an amount of feed to reach a 1.7 times heavier weight than the animals of the restricted diet), supplemented or not with FAS (1%). Our analyses have shown that Ad hens lay significantly ($p < 0.05$) more eggs in 39 weeks than Rt animals. However, the quality of eggs laid is of lower quality, with a higher number of soft, broken and double eggs in Ad animals than in Rt animals. In addition, we observe that the FAS reduces the number of laid eggs in Rt animals but has no effect on egg quality and the total number of eggs. On the other hand, we observe a decrease in fertility of Ad animals associated with lower progesterone production in response to IGF1 (or LH) in cultured granulosa cells and in egg yolk compared to Rt animals. However, the FAS supplementation has no effect on the fertility of Ad animals and on the production of progesterone in cultured granulosa cells of Rt animals. Otherwise, it improves fertility and progesterone production in response to IGF1 (or LH) in the *in vitro* cultured granulosa cells of the Rt animals as well as the production of progesterone in the egg yolk of the Ad and Rt animals. This fact can be explained by the maintenance of high concentrations of FAS in egg yolks of animals receiving supplementation. Thus, the amount and the FAS composition of diet affect laying, egg quality, fertility and reproductive steroidogenesis in broiler hens.

INTRODUCTION

Chez la poule reproductrice de type chair, l'augmentation rapide de la croissance, via une alimentation *ad libitum*, génère un développement anarchique des follicules ovariens pouvant conduire à la coexistence de plusieurs hiérarchies folliculaires qui perturbe les ovulations (Hocking et al. 1989). Hocking et al. ont aussi montré une relation entre le poids des poules à la maturité sexuelle et le nombre de gros follicules en croissance sur l'ovaire (Hocking et al. 1993). Le maintien des performances de reproduction (ponte et fertilité) ne peut être assuré qu'à condition d'appliquer dès le très jeune âge (2-3 semaines après éclosion) un rationnement alimentaire strict d'au moins 30%. Il s'avère cependant que l'application de ce rationnement a des effets secondaires sur le bien-être de l'animal qui se manifestent par des modifications du comportement social et alimentaire (Savory et al. 1993). Par ailleurs, le tissu adipeux a été pendant longtemps considéré uniquement comme un tissu de stockage, emmagasinant les graisses en période d'abondance et les régulant en périodes de jeûne. Or, nous savons maintenant depuis la découverte de la leptine en 1994 que le tissu adipeux est impliqué dans la régulation hormonale au niveau central et gonadique par la production et sécrétion vers la circulation sanguine de nombreux facteurs appelés adipocytokines (Trayhurn et al. 2006). Trois hormones sont à cet égard particulièrement importantes : l'adiponectine, la visfatine et la chémérine. Comme la leptine, elles jouent un rôle critique dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique et nous avons récemment montré un rôle important dans le contrôle de la reproduction chez la poule. D'autre part chez les rongeurs et l'homme, il a été montré qu'une supplémentation en AGPI augmente la production de ces adipocytokines impliqués dans la régulation de la reproduction.

Cette étude a pour objectifs de déterminer chez la poule reproductrice si la combinaison d'une restriction alimentaire et d'une supplémentation en AGPI affecte la production et la qualité des œufs mais aussi la fertilité et si elle modifie les concentrations des adipocytokines au cours de la ponte et finalement si ces changements nutritionnels affectent l'expression des adipocytokines et de leur(s) récepteur(s) au sein même des cellules ovariennes.

1. MATERIELS ET METHODES

Le protocole mis en place a reçu un avis favorable par le comité d'éthique (CEEA VdL) sous la référence du dossier : 01607.02

1.1. Les animaux

Pour cette étude 320 poussins femelles de type chair (Cobb 500) âgés de un jour ont été élevés au sein de

l'Unité Expérimentale du Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours (UE PEAT). Les animaux ont été répartis en 32 groupes homogènes de 10 et élevés au sol dans des parquets de 3 m² selon les conditions classiques d'élevage. Le programme lumineux comportait une première phase, avec 14 h de lumière à l'éclosion puis une deuxième phase de diminution progressive de l'exposition à la lumière jusqu'à atteindre 8 heures de lumière au moment de la ponte (21^{ème} semaine) puis une dernière phase d'augmentation progressive de l'exposition à la lumière jusqu'à atteindre 15 h de lumière à la fin de l'étude (39^{ème} semaine).

1.2. Les régimes alimentaires

Du 1^{er} jour à la 3^{ème} semaine, les 320 poussins femelles ont reçu une alimentation de démarrage de type *ad libitum* (libre accès à la nourriture). A partir de la 3^{ème} semaine les poules ont été séparées en deux groupes. Un premier groupe (n=160) a continué à recevoir une alimentation *ad libitum* (Ad) et le second groupe (n=160) a reçu une alimentation restreinte (Rt) (consommation 1,7 fois moins importante que chez les animaux *ad libitum*). De la 9^{ème} à la 39^{ème} semaine, ces deux groupes ont été subdivisés pour former 4 groupes auquel nous avons ajouté ou non une supplémentation en acide gras polyinsaturés (AGPI) (groupe A : Rt supplémenté, groupe B : Ad supplémenté, groupe C : Rt non supplémenté, groupe D : Ad non supplémenté). La supplémentation en AGPI utilisée (OMG 750) est composée de 77% d'huile de poisson raffinée (dont 14% d'acide éicosapentanoïque (EPA) et 9% d'acide docosahexaénoïque (DHA)) et de 23% de gélatine (capsule) et a été utilisée à 1% de l'alimentation totale.

1.3. Profil en acide gras de l'aliment

Les lipides totaux ont été extraits après homogénéisation des échantillons avec un mélange chloroforme/méthanol. Les classes de lipides ont été déterminées après chromatographie sur couche mince de gel de silice. La composition en acide gras a été déterminée après trans-méthylation des lipides par chromatographie gazeuse (Perkin Elmer Autosystem, St Quentin en Yvelines, France) (Morrisson et al. 1964) (tableau 1).

1.4. Mesure de la production et de la qualité des œufs

Dès la 23^{ème} semaine, les œufs de chaque parquet ont été collectés, comptés, pesés à l'aide d'une balance (Ohaus, Pionner) 2 fois par jour. Les œufs mous, fêlés, cassés ont été dénombrés. A la 25^{ème} semaine, les œufs pondus par les quatre groupes d'animaux ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse numérique (Mitutoyo, CD-20DCX). Leur rigidité statique (Sd) et leur résistance à la rupture (F) ont été évalués à l'aide

d'un Instron (Instron, UK527). Le module élastique de la coquille (module de Young, exprimé en N/mm²) et la ténacité (N/mm³=2) ont été estimés selon les formules développées par Bain (Bain, 1990, Sauveur, 1988, Guesdon et al. 2006). La détection des œufs micro-fêlés a été réalisée à l'aide d'un Acoustic Egg Tester (Coucke et al. 1999, Dunn et al. 2005).

1.5. Mesure de la fertilité

La semence de 65 coqs (Cobb500) a été collectée et regroupée pour former un unique pool. Les poules ont été inséminées avec 2.10⁸ spermatozoïdes issus du pool à la 27^{ème} et la 32^{ème} semaine puis les œufs ont été collectés tous les jours pendant 3 semaines et mis en incubation tous les 7 jours. Les œufs clairs, les mortalités embryonnaires précoces (M1) et tardives (M2) ont été évaluées par cassage des œufs, et mirage au 7^{ème} et 14^{ème} jour d'incubation. Le pourcentage de fertilité a été calculé comme 100 fois le ratio du nombre de poussin nés sur le nombre d'œufs incubés.

1.6. Mesure *in vitro* de la sécrétion de progestérone par les cellules de granulosa

Les cellules de granulosa du follicule pré-ovulatoire F1 de 3 poules par groupe (25-26^{ème} semaine) ont été collectées et mises en culture dans un milieu composé de DMEM et de 5% de FCS (sérum de veau foetal). Après privation de sérum pendant une nuit les cellules ont été stimulées ou non avec de l'IGF (10⁻⁸ M) ou de la LH (10⁻⁸ M) pendant 48 heures. La concentration de progestérone sécrétée dans le milieu par les cellules de granulosa dans les différentes conditions a été déterminée suivant un protocole ELISA comme décrit précédemment (Canepa et al. 2008). Cette expérience a été réalisée sur quatre séries de trois poules pour les quatre groupes nutritionnels étudiés.

1.7. Mesure de la sécrétion de progestérone dans le jaune d'œuf

Les stéroïdes des jaunes d'œufs (2x30 jaunes par condition alimentaire analysés à 36 et 38 semaines) étaient extraits avec du diethyl-éther après forte agitation et centrifugation. La phase du diethyl-éther contenant les stéroïdes était décantée après congélation des tubes dans l'azote pendant 10 secondes. Les solvants organiques étaient ensuite évaporés et les extraits repris dans du tampon phosphate. La progestérone est alors mesurée dans les extraits par dosage ELISA selon Canepa et al. (2008).

1.8 Mesure plasmatique des adipocytokines

Les concentrations plasmatiques des adipocytokines ont été obtenues à l'aide des kits spécifiques poulet de chez BlueGene (E12V0003 sensibilité 1 ng/mL, E12A0125 sensibilité 0.1 ng/mL et E112C0104 sensibilité 1 pg/mL respectivement pour la visfatine, l'adiponectine et la chémérine).

1.9. Mesure de l'expression des adipocytokines et de leurs récepteurs dans les cellules de la granulosa

L'ARN total des cellules de granulosa issue du follicule pré ovulatoire F1 ou F3 de 8 animaux âgés de 39 semaines a été extrait par homogénéisation dans le réactif TRIzol® à l'aide d'un Ultraturax selon les recommandations du fabricant (Invitrogen™ par Life technologies™, Villebon sur Yvette, France). La transcription inverse (RT) de l'ARN total et la PCR en temps réel ont été réalisées par Diot et al., 2015.

1.9. Analyses statistiques

Les résultats sont représentés sous forme de moyenne par groupe (A, B, C et D) de poule ± SEM. Une analyse de variance en mesure répétées a été utilisée pour comparer les moyennes de nombre d'œufs normaux, mous, cassés, et doubles entre les différents régimes alimentaires selon un modèle à deux effets avec interaction, au cours du temps. Un test ANOVA unidirectionnel (modèle à deux effets avec interaction) a été utilisé pour comparer les moyennes de concentration de progestérone sécrétée et d'expression des adipocytokines et de leurs récepteurs entre les différents groupes. Un test de Chi2 a été utilisé pour les analyses de pourcentage de fertilité entre les différents paramètres. Le logiciel SAS a été utilisé pour toutes les analyses.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Effet de la restriction alimentaire et de la supplémentation en AGPI sur la quantité et la qualité des œufs pondus

Nous observons un retard d'une semaine de l'entrée en ponte chez les poules Rt (24^{ème} semaine) par rapport aux poules Ad (23^{ème} semaine). De même, nous observons un pic de ponte plus précoce chez les poules Ad (27^{ème} semaine) par rapport aux poules Rt (29-30 semaine). La supplémentation en AGPI repousse d'une semaine le pic de ponte seulement pour les poules Rt (30^{ème} semaine) et n'a aucun effet sur le démarrage de la ponte (figure 1 A). D'autre part, nous notons que sur l'ensemble de l'étude les poules Ad pondent plus d'œufs (11666) que les poules Rt (10653). Cependant, lorsque nous comparons le nombre d'œufs pondus avant le pic de ponte, nous remarquons que les poules Rt pondent plus d'œufs (4331) que les poules Ad (3526) alors qu'on observe l'inverse après le pic de ponte (respectivement 6322 et 8140 pour les poules Rt et Ad). Bien que le nombre d'œufs pondus soit plus important chez les animaux Ad, il s'avère que leur qualité est significativement ($p < 0.05$) moins bonne. Parmi l'ensemble des œufs pondus, on dénombre 95.2% ($\pm 0.9\%$) d'œuf normaux, 1.75% ($\pm 0.6\%$) d'œufs cassés, 0.5% ($\pm 0.4\%$) d'œufs mous et 2.55% ($\pm 0.5\%$) d'œufs doubles chez les poules Ad. A contrario, on retrouve 98.05% ($\pm 1.25\%$) d'œufs normaux, 0.9% ($\pm 0.7\%$) d'œufs cassés, 0.1

% (± 0.1 %) d'œufs mous et 0.95 % (± 0.7 %) d'œufs doubles chez les poules Rt. Aucun effet de la supplémentation en AGPI n'est observé sur la qualité des œufs (tableau 2).

2.2. Effet de la restriction alimentaire et de la supplémentation en AGPI sur la fertilité

Les impacts de la restriction alimentaire et de la supplémentation en AGPI sur la fertilité des poules sont analysés par le suivi du nombre d'œufs donnant un poussin suite à une insémination artificielle. Après chaque insémination artificielle (27^{ème} et 32^{ème} semaine), le meilleur taux de fertilité apparaît 2 jours après la 1^{ère} insémination pour les poules Rt et 3 jours chez les poules Ad. A l'inverse, lors de la seconde insémination (32^{ème} semaine) le meilleur taux de fertilité est plus précoce chez les poules Ad (2^{ème} jour) que chez les poules Rt (5^{ème} jour). La fertilité des poules sur l'ensemble des 3 semaines après la 1^{ère} insémination est meilleure avec une restriction alimentaire qu'avec une alimentation ad libitum, avec ou sans supplémentation en AGPI (figure 1B). Ces effets ne sont plus observés après la seconde insémination. Ces différences entre groupe peuvent s'expliquer par l'âge des poules mais aussi par un effet du régime et de la supplémentation en AGPI sur la capacité des poules à conserver des spermatozoïdes fonctionnels ainsi que sur les profils hormonaux au niveau plasmatique, adipeux ou ovarien.

2.3. Effet de la restriction alimentaire et de la supplémentation en AGPI sur la stéroïdogénèse

In vitro, la LH (10^{-8} M) augmente significativement la production de progestérone par les cellules de la granulosa issues de chaque groupe alors que l'IGF-1 (10^{-8} M) ne l'augmente que dans les cellules de granulosa issues de poules Rt. D'autre part, la restriction alimentaire augmente significativement la production de progestérone par les cellules de granulosa stimulées ou non avec de l'IGF 1 ou de la LH. De plus, à l'état Ad la supplémentation en AGPI augmente la production de progestérone dans les mêmes conditions de stimulation alors qu'elle n'a aucun effet chez les poules Rt (figure 1 C). Des effets similaires de la restriction alimentaire sont retrouvés sur la production de progestérone dans les jaunes d'œufs et la supplémentation en AGPI l'améliore chez les animaux Rt et Ad (figure 1 D).

2.4. Effet de la restriction alimentaire et de la supplémentation en AGPI sur la concentration et l'expression des adipocytokines (chémérine, adiponectine, et visfatine) au cours de la ponte

Les adipocytokines (chémérine, adiponectine et visfatine) sont des hormones sécrétées par le tissu adipeux mais qui sont aussi exprimées dans différents types cellulaires ovariens (Dupont et al. 2015). Nous avons récemment montré une implication de ces adipocytokines dans la régulation de la stéroïdogénèse chez les mammifères et les oiseaux (Reverchon et al. 2012, 2014, Diot et al. 2015, Chabrolle et al. 2007). Avant la ponte (21^{ème} semaine), le régime Rt et la supplémentation augmentent seulement les concentrations plasmatiques de la chémérine. Au pic de ponte et à la 39^{ème} semaine, nous n'observons aucun effet sur les trois adipocytokines étudiées.

Nous n'observons pas non plus effet du régime et de la supplémentation sur l'expression transcriptionnelle des adipocytokines et de leurs récepteurs (CMKLR1, CCRL2, AdipoR1 et AdipoR2).

CONCLUSION

En conclusion, nous montrons que la quantité et la composition lipidique de l'alimentation apportée aux animaux au cours de leur développement et pendant la ponte influence quantitativement et qualitativement les performances de reproduction (ponte et fertilité). Le régime restreint et la supplémentation en AGPI améliorent significativement la production de progestérone à la fois dans le jaune d'œuf et dans les cellules ovariennes (granulosa). Ces résultats pourraient expliquer les effets bénéfiques de ces deux traitements sur la fertilité. D'autre part au cours de cette étude nous avons montré que les trois adipocytokines, adiponectine, visfatine et chémérine sont présentes au niveau du plasma et des cellules ovariennes (granulosa). Cependant, seules les concentrations plasmatiques de la chémérine sont affectées par le régime et la supplémentation avant le pic de ponte. A ce titre, deux hypothèses peuvent être postulées : 1) la régulation de la stéroïdogénèse par l'alimentation ne passe pas par les adipocytokines produites de manière locale mais par des signaux périphériques (tissu adipeux) ou 2) d'autres adipocytokines qui n'ont pas été testées dans notre étude seraient impliquées. Ainsi, la restriction alimentaire et la supplémentation en AGPI modifient la ponte, la qualité des œufs, la fertilité et la stéroïdogénèse chez la poule reproductrice.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chabrolle C., 2007, Domestic Animal Endocrinology 33(4): 480–487.
 Diot M., 2015, Reproductive Biology and Endocrinology 13:81.
 Diot M., 2015, Reproduction (Cambridge, England) 150(1): 53–63.
 Dupont J., 2015, Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation 24(1): 11–24.
 Hocking P.M., 1993, British Poultry Science 34(4): 793–801.
 Hocking P.M., 1989, British Poultry Science 30(1): 161–173.

Morrison W.R, 1964, Journal of Lipid Research 5: 600-608.
Reverchon M., 2014, Biology of Reproduction 90(5): 102.
Reverchon M., 2012, Human Reproduction (Oxford, England) 27(6): 1790–1800.
Savory C.J., 1993, Behavioural Processes 29(3): 179–189.
Trayhurn P., 2006, The Journal of Nutrition 136(7 Suppl): 1935S–1939S

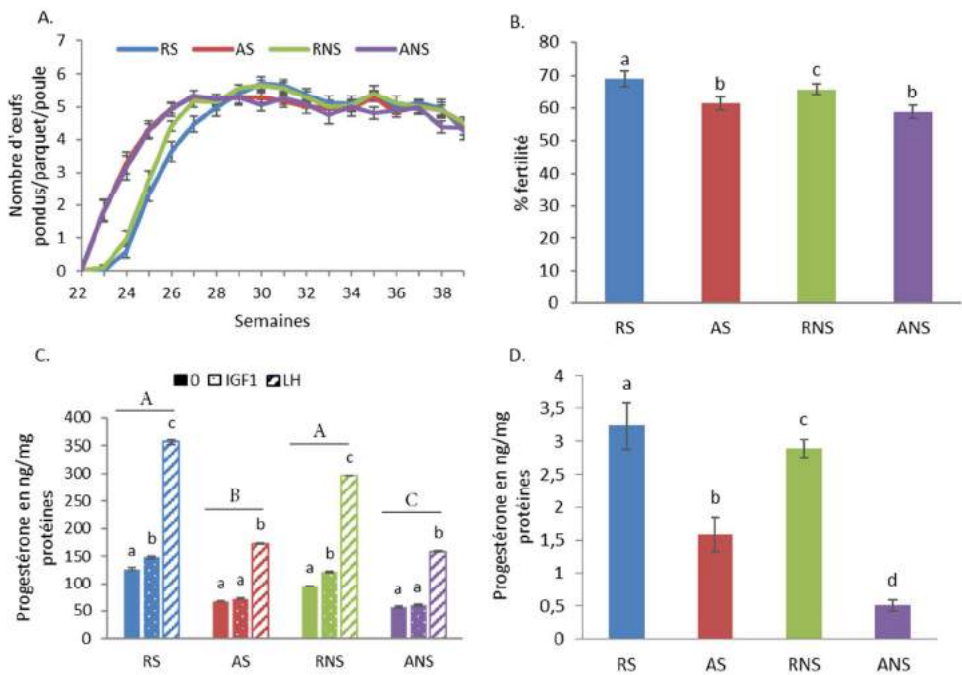
Tableau 1: Profil en acide gras de l'aliment. OMG: OMG750

Aliment	Semaine	DHA	EPA	EPA/DHA	n-6/n-3
démarrage	0 à 4	0,65	0,37	0,57	8,88
croissance	5 à 9	0,23	0,10	0,43	13,17
expé sans OMG	9 à 19	0,00	0,07		14,46
expé avec OMG	9 à 19	1,45	0,93	0,64	11,34
pré ponte sans OMG	20 à 22	0,00	0,00		13,04
pré ponte avec OMG	20 à 22	3,51	2,15	0,61	5,71
ponte sans OMG	23 à 39	0,07	0,08		8,41
ponte avec OMG	23 à 39	1,46	0,97	0,66	6,49

Tableau 2: Effet de la restriction alimentaire et de la supplémentation en AGPI sur la qualité des œufs.

Régime	Supplémentation	Nombre d'œufs sur la durée (23 à 39 semaines)				
		Normaux	Cassés	Mous	Doublets	Totaux
Ad libitum	non	727,4±33,3 a	14,0±1,1 a	4,0±1,2 a	19,1±1,6 a	764,5±33,8 a
Ad libitum	oui	708,9±25,4 a	11,8±1,6 ac	3,8±0,7 a	19,1±1,2 a	743,5±24,9 ab
Restreint	non	692,4±35,4 a	5,5±1,2 b	1,6±0,4 a	6,1±1,9 b	705,0±35,6 ab
Restreint	oui	650,5±35,1 a	7,6±2,5 bc	1,8±0,3 a	6,3±1,4 b	664,3±34,6 b
Significativité (P)						
Effet régime		0,1627	0,0006	0,0344	<0,0001	0,0418
Effet Supplémentation		0,3618	0,957	0,9595	0,9679	0,3504
Interaction		0,7223	0,1989	0,839	0,9679	0,7636

Figure 1. Effet de la restriction alimentaire et de la supplémentation en AGPI sur le nombre d’œufs pondus (A), le pourcentage de fertilité (B), la production de progestérone par les cellules de la granulosa (C) et dans le jaune d’œufs (D). RS : Restreint supplémenté, AS : Ad libitum supplémenté, RNS : Restreint non supplémenté ANS : Ad libitum non supplémenté. Les résultats sont représentés sous formes de moyenne ±SEM. Les différentes lettres indiquent des différences significatives.



ETUDE DE L'IMPACT DE L'ACCLIMATATION EMBRYONNAIRE A LA CHALEUR DU POULET DE CHAIR SUR DES MODIFICATIONS EPIGENETIQUES

DAVID Sarah-Anne¹, PIEGU Benoît², HENNEQUET-ANTIER Christelle¹, BIGOT
Yves², BORDEAU Thierry¹, CROCHET Sabine¹, COUROSSE Nathalie¹,
BEAUCLAIR Linda², COLLIN Anne¹, COUSTHAM Vincent¹

¹URA, INRA, 37380, Nouzilly, France

²PRC, CNRS, IFCE, INRA, Université de Tours, 37380, Nouzilly, France
vincent.coustham@inra.fr

RÉSUMÉ

Les poulets sélectionnés pour leurs performances de croissance sont sensibles aux variations de température. Le traitement d'acclimatation embryonnaire à la chaleur permet de rendre les animaux plus tolérants à la chaleur à l'âge d'abattage (J35). Ce traitement consiste à augmenter de façon cyclique la température d'incubation des œufs entre les jours E7 et E16 de l'embryogenèse. Il modifie la physiologie, le métabolisme et l'expression des gènes à long terme. L'altération de l'environnement précoce peut avoir un impact à long terme sur l'expression des gènes notamment par le biais de modifications épigénétiques. Les modifications d'expression de gènes observées chez les poulets à J35 pourraient être dues à une altération de l'épigénome induite par le traitement lors de l'embryogenèse et persistant au cours du développement. Nous étudions deux modifications post-traductionnelles des histones, la triméthylation de la lysine 27 sur l'histone H3 (H3K27me3) décrite comme ayant un rôle dans la mémoire épigénétique sous l'influence de l'environnement et la triméthylation de la lysine 4 sur l'histone H3 (H3K4me3) associée à des gènes transcriptionnellement actifs. Afin de caractériser ces marques nous avons mis au point la technique d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) pour l'hypothalamus, centre de la thermorégulation. Le ChIP a été suivi d'un séquençage haut débit afin de déterminer sans *a priori* les régions différenciellement enrichies en ces deux marques entre les individus témoins et acclimatés. Les premiers résultats issus du séquençage sur l'hypothalamus seront présentés.

ABSTRACT

Impact of embryonic heat acclimation on epigenetic modifications in broilers

Broilers genetically selected for their performance suffer from heat exposure at slaughter age (D35). In a context of global warming, it is possible to enhance heat tolerance by heat acclimation during embryogenesis. The treatment consists in increasing cyclically the incubation temperature of the eggs during the embryonic days E7 to E16. This heat acclimation modifies physiology, metabolism and gene expression in the long term. The alteration of the early environment can impact gene expression by epigenetic modifications. Therefore the gene expression variations observed at D35 could be linked to a modification of the epigenome induced by the embryonic treatment, which persists throughout development. Two post-translational modifications could be implicated, the tri-methylation of lysine 27 on the histone H3 (H3K27me3) involved in epigenetic memory under an environmental stimulus and the tri-methylation of lysine 4 on the histone H3 (H3K4me3) linked to gene transcriptional activation. To study these marks we have adjusted the chromatin immunoprecipitation (ChIP) technique to the hypothalamus, which is the center of thermoregulation. ChIP was followed by high throughput sequencing to study without bias the differentially enriched regions between the controls and the heat acclimated chicken. Preliminary sequencing results for the hypothalamus will be presented.

INTRODUCTION

L'environnement (nutrition, médication, pollution...) influence le phénotype des individus. Ces altérations peuvent être dues à des modifications épigénétiques. L'épigénétique décrit des mécanismes moléculaires impliqués dans la variation d'expression de gènes sans altérer la séquence de l'ADN, réversibles et héréditaires (par mitose, voire méiose) (Bird, 2007). A l'heure actuelle, les modifications les plus étudiées sont la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones (HPTM). L'ensemble des modifications épigénétiques constitue l'épigénome. La période la plus propice à des altérations de l'épigénome est l'embryogenèse (Kanhkar et al., 2014). De nombreuses études ont porté sur l'influence de l'environnement précoce sur les phénotypes via des altérations épigénétiques. Chez les souris agouti, par exemple, la modification du régime maternel lors de la gestation a un impact à long terme sur le phénotype des petits via la méthylation de l'ADN (Feil and Fraga, 2012).

Les poulets de chair élevés actuellement sont issus de plus de 50 ans de sélection génétique basée sur leurs performances de croissance et d'efficacité alimentaire. Cependant l'accroissement de leur masse musculaire n'a pas été accompagné par le développement similaire des systèmes cardio-vasculaire et respiratoire (Havenstein et al., 2003), affectant ainsi leur capacité de résistance à des variations de températures (Yahav and McMurtry, 2001). En France, la canicule de 2003 a eu un fort impact sur la production aviaire avec la mort de millions d'individus entraînant des pertes économiques importantes (Amand et al., 2004). Afin d'améliorer les capacités d'adaptation à la chaleur des poulets, il est possible de les acclimater à la chaleur dès l'embryogenèse (Piestun et al., 2008; Loyau et al., 2015). A l'âge d'abattage (J35), ce traitement améliore la thermo-résistance des individus mâles acclimatés (Piestun et al., 2008) et des modifications physiologiques et métaboliques ont également été décrites (Loyau et al., 2013, 2014).

Le muscle (*P. major*) est un effecteur de la thermorégulation. Il est en effet impliqué dans la production de chaleur. Une étude du transcriptome de ce tissu à J35 a mis en évidence une trentaine de gènes différentiellement exprimés entre des poulets de chair témoins et acclimatés pendant l'embryogenèse (Loyau et al., 2016). Ces différences d'expressions pourraient être dues à des modifications de l'épigénome mises en place lors du traitement d'acclimatation embryonnaire à la chaleur (TAEC) et qui persistent au cours du développement. Plusieurs études basées sur cette hypothèse ont permis de mettre en évidence des modifications de la méthylation de l'ADN (voir la communication JRA2015 Coustham et

al., 2015) dans le muscle. Dans l'hypothalamus, qui est le régulateur central de la thermorégulation, des modifications de certaines MPTH ont également été décrites suite à un traitement post-éclosion d'acclimatation à la chaleur, notamment au locus du gène *BDNF* qui joue un rôle dans la plasticité synaptique et la maintenance de la mémoire à long terme (Kisliouk and Meiri, 2009; Kisliouk et al., 2011).

À l'heure actuelle aucune étude n'a été réalisée sur l'impact du TAEC sur des MPTH chez le poulet. Nous nous sommes ainsi intéressés à deux MPTH, H3K27me3 qui est généralement associée au maintien de la répression génique et H3K4me3 qui est associée à des gènes exprimés (Margueron and Reinberg, 2011).

Dans le cadre de cette communication, nous avons cartographié deux MPTH (H3K27me3 et H3K4me3) dans l'hypothalamus d'individus témoins et acclimatés. Afin de les étudier sans *a priori* nous avons effectué des immuno-précipitations de la chromatine suivies d'un séquençage haut-débit (ChIP-seq) sur des individus témoins et acclimatés à J35. Les résultats préliminaires seront présentés.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Traitement d'acclimatation embryonnaire à la chaleur et élevage

240 œufs d'une lignée commerciale de poulets de chair (Cobb500) ont été mis en incubation par condition (témoins et acclimatés). Les œufs témoins ont été incubés en conditions standard (37.8°C et 55% humidité relative) et les acclimatés ont été incubés selon le protocole établi par Piestun et al. (2008). Le TAEC consiste à augmenter la température d'incubation des œufs de 1.7°C (soit de 37.8°C en conditions normales à 39.5°C) de façon cyclique (12 heures par jour) pendant les jours E7 à E16 inclus de l'embryogenèse. Dans notre modèle E0 correspond au 1^{er} jour d'incubation. Pour éviter la déshydratation des œufs, l'hygrométrie est également augmentée pendant le TAEC (de 55% à 65%) (Figure 1). À l'éclosion les animaux ont été mis en élevage au sol avec de l'eau et de la nourriture *ad libitum* jusqu'à l'âge d'abattage (J35).

1.2. Prélèvement des échantillons

Les hypothalamus de 4 individus mâles par condition à J35 ont été prélevés, congelés et conservés à -80°C jusqu'à l'immuno-précipitation de la chromatine.

1.3. Immuno-précipitation de la chromatine (ChIP)

Les échantillons d'hypothalamus congelés ont été broyés au mortier/pilon dans l'azote. Pour la fixation et la fragmentation de la chromatine, notre protocole

est adapté du protocole du consortium NIH « Roadmap Epigenomics Mapping » de fixation et de sonication de la chromatine à partir de tissus (Ren Lab, <http://www.roadmapepigenomics.org/protocols/to-pic/histone-modification>). Les interactions entre l'ADN et les protéines sont fixées 5 minutes dans le tampon de fixation contenant du formaldéhyde 1%. La chromatine est ensuite soniquée 20 minutes pour obtenir des fragments compris entre 100 et 600 pb. Le protocole des immuno-précipitations est adapté de celui de Song et al. (2014). Pour chaque individu les immuno-précipitations de H3K27me3, H3K4me3, et du contrôle négatif (sans anticorps) ainsi que de la fraction non immuno-précipitée (quantité d'ADN total fragmenté) ont été obtenues.

1.4. Contrôle des enrichissements par PCR en temps réel (qPCR)

Les immuno-précipitations ont été suivies par des qPCR sur des gènes contrôles afin de valider les enrichissements en marques à certains loci. Nous avons choisi *PAX5* et *GAPDH* enrichis respectivement en H3K27me3 et H3K4me3 chez l'Homme et la souris (Bernstein et al., 2010, Asp et al., 2011). Le pourcentage d'enrichissement en marques est défini par rapport à l'input qui est la quantité totale d'ADN fragmenté non immuno-précipité.

1.5. Dosages des échantillons et création des librairies

Les échantillons ont été dosés par Qubit (Qubit® dsDNA HS Assay Kit, ThermoFisher Scientific). Les librairies pour le séquençage ont été créées avec le kit NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs). Le nombre de cycles d'amplification a été ajusté en fonction de la quantité d'ADN de départ, comme recommandé par le fournisseur.

1.6. Séquençage haut-débit et analyses bio-informatiques

Les échantillons ont été séquencés en 1×50pb sur un Illumina HiSeq4000 (Illumina) par la plateforme de séquençage de l'IGBMC à Strasbourg (IGBMC Microarray and Sequencing platform). Jusqu'à la détection de régions d'enrichissements, les séquences produites ont été traitées avec le pipeline ChIP-seq ENCODE (<http://www.encodeproject.org/chip-seq/histone/>). Les séquences ont été alignées sur le génome de référence du poulet (Galgal5). Les enrichissements ont été détectés avec l'outil PePr (Zhang et al., 2014). Les données issues de séquençage ainsi que les enrichissements ont été visualisés avec l'outil Integrative Genomics Viewer (IGV, Thorvaldsdóttir et al., 2013).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Nous avons prélevé à l'âge d'abattage (J35) les hypothalamus de poulets de chair ayant subi un traitement d'acclimatation embryonnaire à la chaleur (TAEC) (Figure1) et ceux d'individus témoins afin de cartographier sur tout le génome deux modifications post-traductionnelles des histones (MPTH).

2.1 Immuno-précipitation de la chromatine

Nous avons réalisé des immuno-précipitations de la chromatine (ChIP), ce qui permet d'étudier des régions de l'ADN associées à des protéines histones H3 modifiées au niveau post-traductionnel sur leurs résidus lysine 4 et 27 (H3K4me3 et H3K27me3). Nous avons contrôlé les pourcentages d'enrichissements relatifs des marques par rapport à la quantité d'ADN total (input) au niveau de deux loci en PCR en temps réel (qPCR) (Figure 2). Nous observons pour H3K4me3 un enrichissement au niveau du locus de la *GAPDH* contrairement au niveau du locus de *PAX5* (Figure 2.A) et inversement pour H3K27me3 (Figure 2.B). Les enrichissements observés sont en accord avec les enrichissements attendus en qPCR ce qui permet de valider nos immuno-précipitations.

2.2 Séquençage haut-débit

Nous avons ensuite créé des librairies de séquençage pour le séquençage haut débit (Illumina 4000). La création de librairies consiste à ajouter sur les fragments d'ADN un adaptateur pour le séquençage ainsi qu'une étiquette pour différencier les échantillons entre eux. Afin de cartographier les marques nous avons estimé le nombre minimum de séquences uniques nécessaire à notre analyse. Le nombre de séquences uniques pour la détection de MPTH varie en fonction de la marque étudiée et de l'espèce (Jung et al., 2014). Dans cette étude, le nombre de lectures uniques nécessaire à l'étude de MPTH a été défini comme étant celui au-delà duquel le pourcentage de découverte de régions enrichies était inférieur à 1% par million de lectures. Chez l'Homme 40 millions de séquences uniques pour H3K27me3 sont nécessaires et 25 millions pour H3K4me3 (Tableau 1). A l'heure actuelle, aucune recommandation n'a été définie pour les oiseaux, nous avons donc utilisé les recommandations émises pour l'Homme. En moyenne, nous avons obtenu un nombre de séquences uniques 2,5 fois plus important que le nombre recommandé pour l'Homme. De plus, les deux marques recouvrent approximativement 20% du génome, ce qui a été observé avec ces marques chez l'Homme (Jung et al., 2014). Ces critères nous permettent de détecter les enrichissements de ces deux marques sur tout le génome.

2.3 Visualisation des enrichissements

Grâce à l'outil IGV, nous avons vérifié la présence de régions d'enrichissement pour les marques H3K27me3 et H3K4me3 par rapport à l'input qui correspond au bruit de fond (Figure 3). Au niveau de nos gènes contrôles *GAPDH* et *PAX5* nous avons visualisé, comme observé avec les qPCR, un enrichissement en H3K4me3 au niveau du locus de la *GAPDH* (Figure 3.A) et un enrichissement en H3K27me3 au niveau de *PAX5* (Figure 3.B). Ces résultats couplés à ceux de qPCR attestent de la qualité de nos immuno-précipitations, de nos librairies ainsi que du séquençage.

Des analyses bio-informatiques et bio-statistiques sont en cours afin de déterminer des régions différentiellement enrichies pour les deux marques dans l'hypothalamus à l'âge d'abattage. À l'heure actuelle environ 2000 régions différentielles ont été détectées pour H3K4me3 et 80 pour H3K27me3 grâce à l'outil DESeq2 (Love et al., 2014). Les régions les plus différentielles, une dizaine par marque, seront alors validées en ChIP-qPCR. Une étude de Gene Ontology sera également réalisée afin de mettre en lien les régions d'enrichissements avec des réseaux de gènes et ainsi comprendre les processus biologiques impactés par le traitement d'acclimatation dans l'hypothalamus.

CONCLUSION

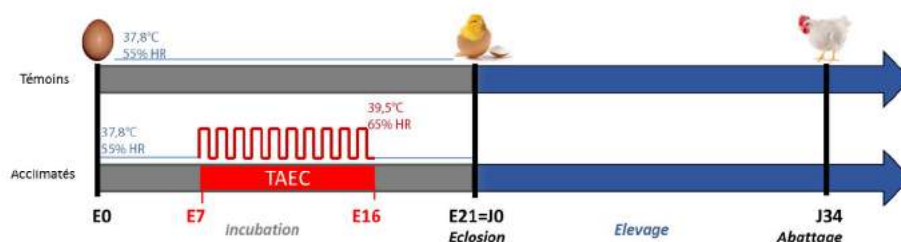
Le modèle d'acclimatation à la chaleur pendant l'embryogenèse a un intérêt agronomique de par son effet sur l'amélioration de la tolérance à la chaleur des poulets de chair et sa facilité de mise en place. L'étude de mécanismes épigénétiques impliqués dans le traitement d'acclimatation embryonnaire à la chaleur pourrait permettre de comprendre les mécanismes moléculaires liés à cette acquisition précoce de thermotolérance à la chaleur, mais également de mettre en avant des marqueurs épigénétiques de résistance à la chaleur chez certains individus. Cette étude est la première caractérisation sans *a priori* de deux marques d'histones dans l'hypothalamus de poulet.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par un co-financement de thèse (département INRA PHASE et Région Centre Val-de-Loire) et par un financement INRA sur crédit incitatif « Stressepimark » (2015). Les auteurs tiennent également à remercier les membres de l'équipe MOQA (URA, INRA Nouzilly) ainsi que J. Delaveau, C. Rat, P. Ganier, O. Callut, C. Le Bourhis, F. Mercierand et les membres de l'Unité Expérimentale PEAT (UE PEAT, INRA Nouzilly) pour leur contribution à cette étude.

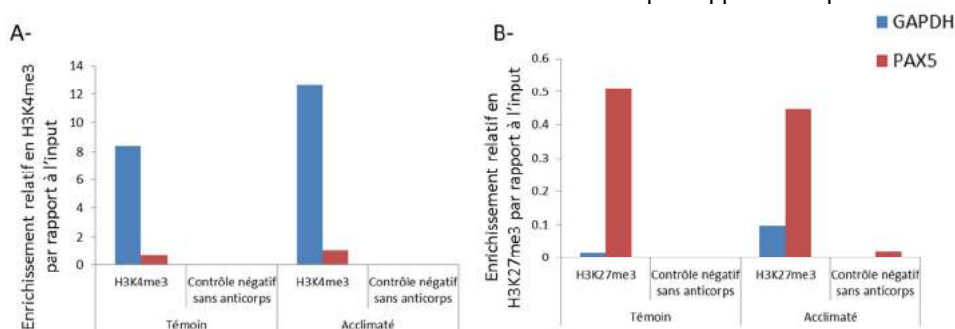
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amand G., *et al.*, (2004). *Sci. Tech.*
 Asp P., *et al.*, (2011). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, E149–E158.
 Bernstein B.E., *et al.*, (2010). *Nat. Biotechnol.* 28, 1045–1048.
 Bird A. (2007). *Nature* 447, 396–398.
 Coustham V., *et al.*, (2015). In 11e Journées de La Recherche Avicole et Palmipèdes À Foie Gras, (Tours), p.330-334
 Feil R., and Fraga M.F. (2012). *Nat. Rev. Genet.* 13, 97–109.
 Havenstein G.B., *et al.*, (2003). *Poult. Sci.* 82, 1509–1518.
 Jung Y.L., *et al.*, (2014). *Nucleic Acids Res.* 42, 1–10.
 Kanherkar R.R., *et al.*, (2014). *Front. Cell Dev. Biol.* 2, 49.
 Kisliouk T., and Meiri N. (2009). *Eur. J. Neurosci.* 30, 1909–1922.
 Kisliouk T., *et al.*, (2011). *Eur. J. Neurosci.* 33, 224–235.
 Love M.I., *et al.*, (2014). *Genome Biol.* 15, 550.
 Loyau T., *et al.*, (2013). *J. Anim. Sci.* 91, 3674–3685.
 Loyau T., *et al.*, (2014). *PLoS One* 9, e105339.
 Loyau T., *et al.*, (2016). *BMC Genomics* 17, 329.
 Margueron R., and Reinberg D. (2011). *Nature* 469, 343–349.
 Piastun Y., *et al.*, (2008). *Poult. Sci.* 87, 1516–1525.
 Rivera C.M., and Ren B. (2013). *Cell* 155, 39–55.
 Song J., *et al.*, (2014). In *Plant Epigenetics and Epigenomics: Methods and Protocols*, edit. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 165–175.
 Thorvaldsdóttir H. *et al.*, (2013). *Brief. Bioinform.* 14, 178–192.
 Yahav S., and McMurtry J.P. (2001). *Poult. Sci.* 80, 1662–1666.
 Zhang Y., *et al.*, (2014). *Bioinformatics* 30, 2568–2575

Figure 1. Protocole expérimental d'acclimation embryonnaire à la chaleur**Figure 2.** Validation des enrichissements par ChIP-qPCR aux loci de deux gènes contrôles : GAPDH, PAX5

A- Enrichissement relatif de H3K4me3 par rapport à l'input

B- Enrichissement relatif de H3K27me3 par rapport à l'input

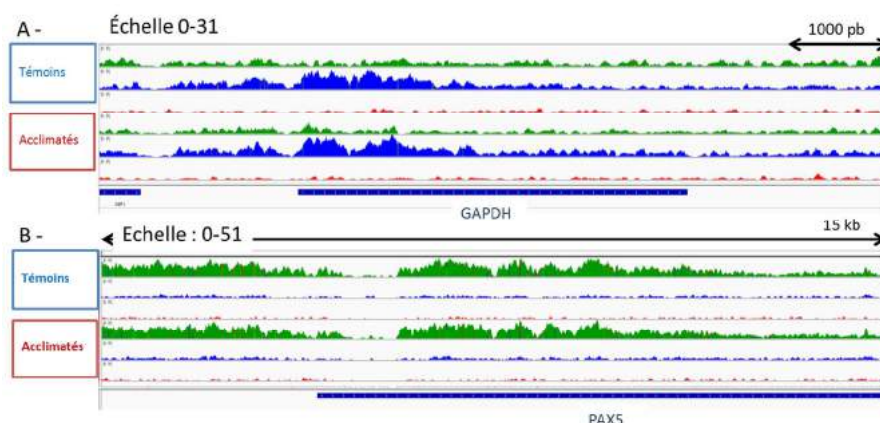
**Tableau 1.** Résumé du nombre de lectures obtenu par séquençage

Marques	Nombre de séquences uniques recommandées pour l'Homme	Nombre moyen de séquences uniques obtenues
H3K27me3	40 millions	106 millions
H3K4me3	25 millions	58 millions
Input	Equivalent à la marque d'intérêt	39 millions

Figure 3. Visualisation des échantillons issus du séquençage chez deux individus (un témoin et un acclimaté) par le logiciel IGV au niveau des loci des gènes contrôles, où sont représentés pour chaque échantillon les enrichissements en H3K27me3 (en vert) et H3K4me3 (en bleu) ainsi que l'input (ADN fragmenté non immuno-précipité, en rouge)

A- GAPDH, contrôle positif pour un enrichissement en H3K4me3

B- PAX5 contrôle positif pour un enrichissement en H3K27me3



CARACTERISER POUR MIEUX COMPRENDRE LE ROLE DES FLUIDES AMNIOTIQUE ET ALLANTOÏQUE AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE L'EMBRYON DE POULET

Da Silva Mylène¹, Labas Valérie², Nys Yves¹, Réhault-Godbert Sophie¹

¹INRA, UR83 Recherches Avicoles, 37380 NOUZILLY, ²INRA, Plateforme d'Analyse Intégrative des Biomolécules, Laboratoire de Spectrométrie de Masse, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 NOUZILLY

sophie.rehault-godbert@inra.fr

RÉSUMÉ

Chez les ovipares, le développement de l'embryon repose sur des structures extra-embryonnaires telles que les sacs vitellin, amniotique et allantoïque. Pour comprendre l'implication de ces structures dans le développement de l'embryon chez la poule, nous avons caractérisé les propriétés physicochimiques et les activités biologiques des fluides allantoïque (LC) et amniotique (LA) du 8^{ème} au 16^{ème} jour de l'incubation. Nous avons montré que le pH du LA reste stable tout au long de l'incubation (~7,5) tandis que le pH et l'osmolalité du LC diminuent significativement. En parallèle, des changements drastiques dans la composition du LA ont été observés par SDS-PAGE à partir du 12^{ème} jour, avec le transfert des protéines du blanc dans le sac amniotique, alors que le LC conserve une composition protéique stable, constituée majoritairement de protéines du jaune. Une étude complémentaire par spectrométrie de masse a permis de définir les protéines majeures du LC comme impliquées dans le métabolisme des vitamines et lipides, ainsi que dans le transport d'ions métalliques, alors que celles du LA sont des protéines vraisemblablement impliquées dans la nutrition de l'embryon et dans sa protection contre les pathogènes. D'autre part, des activités protéolytiques ont été visualisées par zymographie et une analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier 12 protéases dans le LC contre seulement 5 dans le LA. Ces protéases sont décrites comme impliquées dans la morphogénèse et la régénération de tissus, et 4 d'entre-elles, spécifiquement identifiées dans le LC, sont des protéases digestives. Ces résultats suggèrent une implication importante des deux fluides dans les processus du développement embryonnaire. A terme, cette étude permettra d'identifier les paramètres et les molécules témoignant du bon développement de l'embryon, et d'évaluer l'impact d'injections *in ovo* dans ces fluides (vaccins/probiotiques) sur leur composition, et leur éventuelle répercussion sur le développement de l'embryon et la santé du futur poussin.

ABSTRACT

Investigating the role of the amniotic and allantoic fluids during the development of the chicken embryo

In oviparous, the embryonic development depends on the extra-embryonic structures, namely the yolk, amniotic and allantoic sacs. To better appreciate their role in the development of the chicken embryo, we analyzed the physicochemical properties and biological activities of the amniotic (LA) and allantoic (LC) fluids from the 8th to 16th day of incubation. We showed that LA pH remains stable throughout the incubation (~7.5), while LC pH and osmolality values decrease significantly. Furthermore, from day 12 onwards, drastic changes in LA protein pattern have been observed by SDS-PAGE analysis, with the transfer of egg white proteins in the amniotic sac, whereas the LC protein composition remains stable with proteins mainly coming from the egg yolk. Moreover, the LC major proteins identified by mass spectrometry are associated with lipid and vitamin metabolisms, as well as in metal ion transport, while the LA major proteins refer to embryo's nutrition and protection against pathogens. On the other hand, active proteases have been identified in the two fluids using gelatin zymography. By mass spectrometry analysis, a total of 12 proteases was detected in the LC, compared to only 5 in the LA. These proteases are defined to be involved in morphogenesis and tissue remodeling, and 4 of them, uniquely found in the LC, are digestive proteases. Altogether, these data give new insights in the respective properties and roles of LA and LC in embryo development. This study will allow us to identify biomarkers reflecting a good embryonic development, to evaluate the impact of *in ovo* injections (vaccines, probiotics) on LA and LC compositions and explore their repercussions on the development of the embryo and chick health.

INTRODUCTION

Chez les espèces ovipares, les structures extra-embryonnaires maintiennent les fonctions vitales de l'embryon, comme la respiration et la digestion, jusqu'à ce que les organes de l'embryon deviennent fonctionnels. Il existe trois compartiments extra-embryonnaires pour les espèces ovipares : les sacs vitellin, amniotique et allantoïque. Chez la poule, le sac vitellin a été démontré comme impliqué dans la digestion des protéines et des lipoprotéines contenues dans le jaune d'œuf (Speier et al., 2012). Le sac allantoïque quant à lui est directement relié aux reins de l'embryon et sert de compartiment de stockage pour ses excréments (Everaert et al., 2011). Le sac allantoïque tout comme le sac vitellin est un diverticule de l'intestin, toutefois ses capacités digestives - démontrées pour le sac vitellin - n'ont jamais été étudiées (Romanoff, 1960).

Pour l'ensemble des amniotes, le sac amniotique protège l'embryon contre les chocs mécaniques et contre la déshydratation. Toutefois, le fluide amniotique semble posséder des fonctions plus spécifiques chez l'homme, comme la protection de l'embryon contre les pathogènes (Michaels et al., 2007) ; mais ces fonctions n'ont jamais été explorées chez les espèces ovipares. En outre, le transfert du blanc dans le sac amniotique au 12^{ème} jour du développement (J12) reste un événement majeur du développement de l'embryon d'oiseau, puisqu'il participe à sa nutrition (absorption orale par l'embryon), et ainsi, à la croissance de ses organes. Cependant l'influence exacte des composés du fluide amniotique sur les protéines du blanc et leur assimilation reste à l'heure actuelle inconnue.

Dans cette étude, nous avons tout d'abord suivi l'évolution de certains paramètres physicochimiques des fluides amniotique (LA) et allantoïque (LC), ainsi que l'évolution de leurs profils protéiques par SDS-PAGE, de J8 à J16. Des analyses par spectrométrie de masse nous ont ensuite permis d'identifier les protéines majoritaires de deux fluides, pour mieux appréhender leurs rôles au cours de l'incubation. En parallèle, nous avons étudié la présence et l'activité de protéases à l'aide de tests enzymatiques couplés à une analyse par spectrométrie de masse, pour mieux comprendre les rôles des fluides dans l'activation de précurseurs protéiques et/ou dans les processus de digestion du jaune et du blanc d'œuf.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Procédures d'incubation et échantillonnage

Des œufs embryonnés de poules pondeuses (ISA Brown, Hendrix Genetics, Saint Briec, France) ont été conservés pendant 3 jours à 16°C et 85% d'humidité pour synchroniser le développement des embryons, puis les œufs ont été incubés à 37,8°C et

45% d'humidité. 25 œufs par stade ont été sélectionnés (poids et taille équivalents), et les œufs microfêlés (Acoustic Egg Tester, KU Leuven, Belgium), ou ceux contenant des embryons non synchronisés (table d'Hamburger et Hamilton, 1951) ont été écartés de l'analyse. Les LA et LC ont été prélevés à l'aide d'une seringue, à travers les membranes amniotique et chorioallantoïque, respectivement. En cas de contamination (sang, méconium), les prélèvements étaient stoppés. Les échantillons ont été stockés à -20°C.

1.2. Mesure des paramètres physicochimiques

Les LA et LC ont été centrifugés (3000 g, 10 min, 4°C) pour éliminer les contaminants cellulaires. Le volume, le pH (Microelectrode pH InLab 423, Fisher Scientific, Illkirch, France), et l'osmolalité (Fiske Mark 3 Osmometer, Advanced Instruments, Niederbronn Les Bains, France) ont ensuite été mesurés. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Pour chaque fluide, les comparaisons entre les différents stades du développement ont été réalisées à l'aide d'un test ANOVA à 1 facteur.

1.3. Analyse des profils protéiques par SDS-PAGE

Pour chaque fluide et stade, 9 échantillons homogènes ont été mélangés (sélection en fonction des paramètres physicochimiques mesurés), pour une analyse comparative par SDS-PAGE. Les concentrations en protéines ont été déterminées par la méthode de Lowry à l'aide du kit DC Protein Assay (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Pour les LA J8-11 et LC J8-16, 16 µl d'échantillon brut ont été mélangés avec 4 µl de tampon de charge (0,25 M Tris-HCl, 0,05% bleu de bromophénol, 50% glycérol, 5% SDS, pH 6,8) avant dépôt sur gel. Pour les LA J12-16 et les blancs, 10 µg par puits ont été déposés. Le gel a ensuite été coloré au bleu de Coomassie.

1.4. Analyse par spectrométrie de masse

Les bandes de gel découpées ont été lavées avec un mélange d'eau et d'acétonitrile. Les protéines ont été réduites, alkylées, et digérées par la trypsine selon la méthode de Shevchenko et al. (Shevchenko et al., 1996). Les peptides extraits du gel avec de l'acide formique et de l'acétonitrile, ont été concentrés puis analysés à l'aide d'un spectromètre de masse LTQ Orbitrap Velos (ThermoSavant, ThermoFisher Scientific) couplé à une chromatographie liquide Ultimate® 3000 RSLC (Dionex, Amsterdam, The Netherlands). Les banques de données ont été interrogées à l'aide de Mascot et les protéines validées par Scaffold (95% de probabilité, 2 peptides uniques).

1.5. Activité protéolytique

Les activités protéolytiques ont été visualisées par zymographie (substrat : gélatine 0,3%). Les quantités déposées sont les mêmes que celles utilisées pour les gels SDS-PAGE (voir section 1.3.). Après incubation dans du Triton X-100 pour enlever toute trace de SDS, les gels ont été incubés sur la nuit, à 37°C dans un tampon d'activation (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM CaCl₂, pH 7,5) et ensuite coloré au bleu de Coomassie.

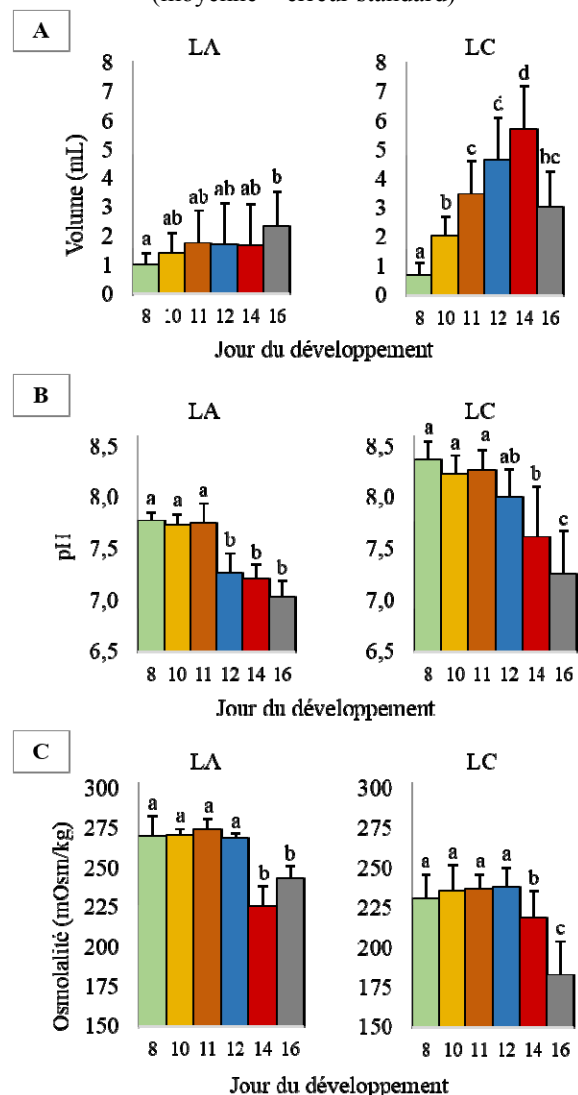
2. RESULTATS ET DISCUSSION

De J8 à J16, les propriétés physicochimiques et les profils protéiques des LA et LC évoluent. Alors que le volume du LA ne cesse d'augmenter de J8 à J16 (1,02 à 2,36 ml) (Figure 1A), le pH et l'osmolalité du fluide diminuent à partir de la seconde moitié du développement. En effet, le pH passe de 7,75 à 7,04 (J11 à J16) et l'osmolalité diminue de 269 à 226 mOsm/kg (J12 à J16) (Figure 1B et 1C respectivement). Toutefois, il a été démontré que ces paramètres ré-augmentaient assez rapidement pour atteindre de nouveau leurs valeurs initiales (Boutillier et al., 1977 ; Bolin G. and Burggren W., 2013), et ce, dans le but de maintenir un environnement homéostatique autour de l'embryon. Les changements de pH et d'osmolalité à J12 pourraient s'expliquer par le transfert massif des protéines du blanc dans le sac amniotique, que l'on visualise sur le gel SDS-PAGE à partir de J12 (Figure 2A). Les profils protéiques du blanc ainsi visualisés dans le LA correspondent exactement aux profils observés pour le blanc seul de J8 à J16, ce qui suggère que les protéines du blanc ne sont pas affectées par leur transfert dans le LA. Ainsi les antiprotéases du blanc qui inhibent la protéolyse dans le blanc (Saxena and Tayyab, 1997), pourrait aussi limiter la lyse des protéines dans le LA. Toutefois, si aucun changement n'est observé dans la fraction protéique majoritaire du LA, des changements plus subtils pourraient intervenir dans la fraction minoritaire, non visible sur gel, et ainsi entraîner des modifications dans les activités du fluide. De telles variations de profils protéiques ont déjà été observées pour la fraction héparine du blanc d'œufs fertilisés sur gel SDS-PAGE (Guyot et al., 2016).

A l'inverse du LA, le profil protéique du LC semble peu affecté au cours du développement (Figure 2A). De légères variations d'intensité de bande sont toutefois observées de J8 à J16. Le volume du LC qui augmente au départ sous le flux d'urine en provenance des reins de l'embryon, diminue rapidement de J14 à J16 en passant de 5,74 à 3,07 ml (Figure 1A). En effet, le métabolisme embryonnaire s'accélérait à partir de J12, l'eau présente dans les compartiments extra-embryonnaires est transférée vers l'embryon sous l'action de la membrane allantoïque interne mature qui transporte

sélectivement les ions Na⁺ et Cl⁻ du LC vers le plasma. Ce transfert entraîne une diminution de l'osmolalité dans le LC de 238 à 183 mOsm/kg (J12 à J16) (Figure 1C) et crée ainsi un gradient osmotique entre le LC et le plasma (~270 mOsm/kg). Sous l'effet du gradient, l'eau est transférée du LC vers le plasma, et ainsi redirigée vers l'embryon. L'accélération du métabolisme à J12 entraîne également une sécrétion de protons dans le LC illustrée par la diminution du pH de J11 à J16 de 8,27 à 7,26 (Figure 1B), pour ensuite atteindre 5,9 à J19 (Boutillier et al., 1977). Cette forte variation de pH a encore des effets inconnus sur les composés du LC et leurs fonctions.

Figure 1. Evolution des volumes (A), pH (B) et osmolalités (C) des fluides amniotique (LA) et allantoïque (LC) au cours du développement (moyenne ± erreur standard)

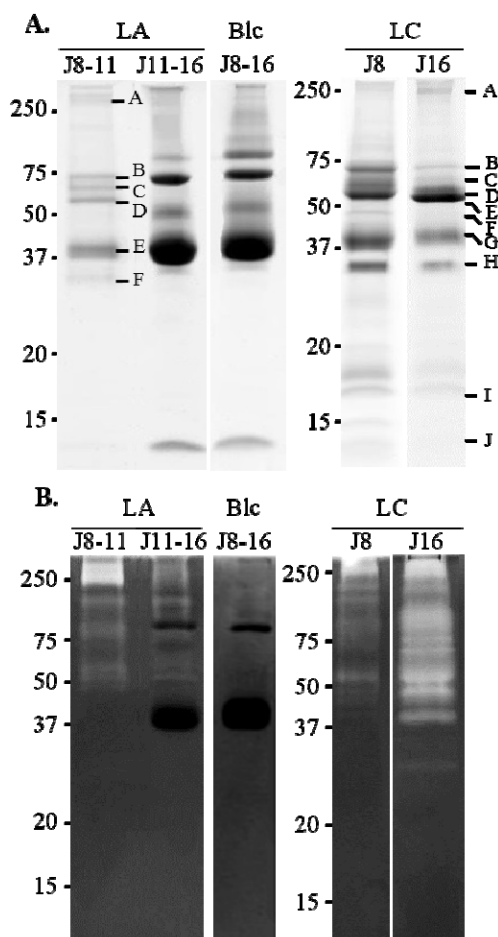


Les différences significatives entre les stades sont indiquées par les lettres a, b, c et d (p -value < 0,05).

Pour mieux comprendre les rôles respectifs du LA et du LC, nous avons approfondi notre étude en identifiant les protéines les plus abondantes des deux

fluides. Pour cela, les bandes observées sur les gels SDS-PAGE ont été découpées (lettres, Figure 2A) et, après digestion trypsique, les peptides ont été analysés par spectrométrie de masse à haute résolution couplée à de la chromatographie liquide. Sept protéines ont ainsi été identifiées dans le LA à J11 (Figure 2A) : l'ovalbumine (bande #E) et l'ovotransferrine (#B et #C) qui sont également connues en tant que protéines majeures du blanc ; l'albumine sérique (#D), l'immunoglobuline Y (#A), la transthyréline et la vitellogénine-1 (#F) qui sont issues du jaune d'œuf, et en partie resynthétisées par la membrane du sac vitellin lors du développement ; et enfin l'alpha-fetoprotéine (#D) qui est synthétisée par l'embryon. Il semblerait donc que les protéines du LA aient des origines variées, avec notamment des protéines en provenance du blanc, et ce, même avant son transfert massif à J12.

Figure 2. Profils protéiques (A) et zymographies (B) des fluides amniotique (LA) et allantoïque (LC), et du blanc d'œuf (Blc) du 8^{ème} au 16^{ème} jour du développement embryonnaire (J8-16)



Les lettres correspondent aux bandes découpées et analysées par spectrométrie de masse.

Dix protéines majeures ont été identifiées par cette même technique dans le LC à J16 (Figure 2A). Tout comme pour le LA, l'ovalbumine (#G),

l'ovotransferrine (#B et #C), l'albumine sérique (#E), la transthyréline (#H) et l'alpha-fetoprotéine (#D) ont été identifiées. Des protéines impliquées dans le transport de lipides telles que les apolipoprotéines AI et B (#I et #A respectivement) ou la protéine liant les acides gras extracellulaires (#I) ont également été identifiées ainsi qu'une protéine impliquée dans le transport de vitamine D (#F). Une autre protéine majeure du blanc d'œuf a également été identifiée, le lysozyme (#J).

Avec des protéines en provenance des différents compartiments de l'œuf (jaune, blanc, et embryon), le LC conserve une dominante de protéines originaires du jaune. Ce phénomène s'explique par le système d'assimilation des composés du jaune par les différentes structures de l'œuf. En effet, la membrane du sac vitellin absorbe - et digère - les protéines et lipoprotéines du jaune qui sont ensuite transférées vers l'embryon via le système sanguin très développé à la surface du sac vitellin (Romanoff, 1960). Une fois assimilées, une partie de ces protéines sont excrétées par l'embryon dans l'allantoïde, et se retrouvent mélangées avec les autres composés du LC.

Tout comme le sac vitellin, l'allantoïde est un diverticule de l'intestin dont la membrane présente un système sanguin très développé. Les propriétés d'absorption de la membrane allantoïque ont déjà été démontrées pour les ions Na^+ et Cl^- , mais sa capacité à absorber ou digérer les autres composés du LC, et surtout les protéines, n'a jamais été explorée. Des études précédentes ont toutefois démontré la présence de protéases dans le LC sans jamais identifier leur rôle exact dans ce compartiment (Kandeil et al., 2014). Dans un premier temps, pour visualiser ces activités protéolytiques, des zymographies ont été réalisées en utilisant de la gélatine comme substrat pour les protéases, ainsi qu'un tampon à pH 7,5 (pH physiologique moyen pour le LC sur la période étudiée). Des protéases actives ont ainsi été détectées dans les échantillons de LC avec une activité croissante de J8 à J16 (Figure 2B). Pour identifier les protéases responsables de l'activité, les bandes sur gel SDS-PAGE correspondantes aux bandes de lyse sur la zymographie ont été découpées et analysées par spectrométrie de masse. Douze protéases ont ainsi pu être identifiées dans le LC. Certaines sont impliquées dans le remodelage tissulaire ou la morphogénèse (la protéase à sérine transmembranaire 9, la matriptase, la métalloprotéase de matrice 2, l'activateur du facteur de croissance hépatocytaire, et la métalloprotéase astacin-like), d'autres dans la coagulation (le plasminogène, la prothrombine, et le facteur de coagulation X) ou dans la digestion (l'aminopeptidase N, la dipeptidyl peptidase 4, et la méprine A). Ce potentiel d'activités digestives combiné à la forte baisse de pH observée pour le LC dans les derniers stades du développement (Boutilier et al., 1977), en font un milieu idéal pour la digestion de protéines.

D'autre part pour mieux comprendre l'impact des composés du LA sur l'assimilation du blanc après son

transfert dans le sac amniotique, la même stratégie a été appliquée. Des protéases actives ont été visualisées sur zymographie de J8 à J16 (Figure 2B) et 5 protéases précédemment identifiées par spectrométrie de masse dans le LC ont été mises en évidence dans ce fluide (la protéase à sérine transmembranaire 9, la matriptase, la métalloprotéase astacin-like, la carboxypeptidase M et le plasminogène). A l'inverse du LC, elles ne semblent pas impliquées dans des processus de digestion. En ce sens, l'impact du LA sur les composés du blanc semble minime, expliquant de ce fait l'absence de changement dans les profils du blanc avant et après transfert dans le sac amniotique (Figure 2A). De plus des protéines du blanc ont été retrouvées non dégradées dans les organes de l'embryon suggérant un transfert de protéines entières depuis le sac amniotique vers les organes embryonnaires (Sugimoto et al., 1999).

CONCLUSION

Les paramètres physicochimiques des fluides amniotique et allantoïque varient au cours du développement embryonnaire, particulièrement à J12 avec l'accélération du métabolisme de l'embryon, et le transfert du blanc dans le sac amniotique.

Des protéines et protéases similaires ont été identifiées dans les deux fluides, avec des fonctions dans le métabolisme des lipides et des vitamines, mais également dans la défense, la morphogénèse et le remodelage tissulaire. Toutefois, les compositions globales des deux fluides en protéines diffèrent, avec une composition proche de celle du jaune pour le LC et proche de celle du blanc pour le LA. Par ailleurs, des protéases digestives ont spécifiquement été identifiées dans le LC. L'ensemble de ces résultats suggère des fonctions biologiques plus complexes qu'initialement décrites pour les deux fluides extra-embryonnaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bolin G. and Burggren W., 2013. *Comparative Biochemistry and Physiology* (166), 343-350
 Boutilier R. et al., 1977. *Respiration physiology* (31), 81-89
 Everaert N. et al., 2011. *Respiratory physiology & neurobiology* (178), 118-28
 Guyot N. et al., 2016. *Poultry Science* (ahead of print)
 Hamburger V. and Hamilton H., 1951. *Journal of Morphology* (88), 49-92
 Kandeil A. et al., 2014. *Journal of virological methods* (202), 28-33
 Michaels J. and al., 2007. *Journal of Proteome Research* (6) 1277-85
 Romanoff A., 1960. *The Macmillan Company*
 Saxena I. and Tayyab S., 1997. *Cellular and Molecular Life Sciences* (53), 13-23
 Shevchenko A. et al., 1996. *Analytical Chemistry* (68), 850-8
 Speier J. et al., 2012. *Poultry Science* (91), 1941-9
 Sugimoto Y. et al., 1999. *The Journal of biological chemistry* (274), 11030-7

PARAMETRES GENETIQUES DU COMPORTEMENT ALIMENTAIRE MESURE A L'AIDE DE MANGEOIRES AUTOMATISEES SUR DES CANARDS PEKINS DE CHAIR

Chapuis Hervé¹, Blanchet Magali², Guillaume Le Mignon²

¹INRA, UMR 1388 INRA-INPT GenPhySE - 24 Chemin de Borde Rouge - 31326 CASTANET TOLOSAN

²GRIMAUD FRERES SELECTION - 3 La Corbière, Roussay - 49450 SEVREMOINE
guillaume.lemignon@grimaudfreres.com

RÉSUMÉ

Etant donnée la part de l'aliment dans les coûts de production, l'efficacité alimentaire est logiquement intégrée, tout comme le poids vif, à l'objectif de sélection des canards de chair. Les dispositifs RFID (Identification Electronique) enregistrant la fréquentation des mangeoires et la quantité d'aliment ingérée par des animaux élevés au sol dans des conditions de terrain, permettent de mieux analyser la consommation en s'intéressant aux comportements alimentaires sous-jacents. Nous avons analysé les données de 2 lignées Grimaud Frères Sélection de canard Pékin de chair collectées pendant 28j entre 3 et 7 semaines d'âge. Les animaux des deux sexes ont été mesurés. Le nombre d'observations RFID était de N=5121 dans la lignée A (lignée femelle) et N=4356 dans la lignée B (lignée mâle), le pedigree s'étendant sur une dizaine de générations successives. Les visites élémentaires à la mangeoire ont été regroupées en repas selon les méthodes décrites dans la littérature (1 repas = 1,27 et 1,33 visites dans les lignées A et B respectivement), ce qui a permis de calculer des critères originaux tels que le nombre de repas, la quantité ingérée par repas, la durée des repas, la proportion quotidienne de consommation efficace par repas, la vitesse d'ingestion et la consommation moyenne quotidienne. Malgré un nombre de repas plus élevé dans la lignée A, la consommation par repas et totale était plus importante dans la lignée B. Les caractères de comportement alimentaire présentent tous une héritabilité modérée à forte (de 0,20 pour l'ingéré quotidien à 0,69 pour le nombre de repas quotidien dans la lignée femelle) mais une faible corrélation avec les caractères classiquement sélectionnés, à l'exception de la consommation moyenne quotidienne, fortement liée à l'Indice de Consommation ($\rho \geq 0,84$) dans les deux lignées.

ABSTRACT

Genetic Parameters of Electronically Recorded Feeding Behavior Traits in Meat Pekin Ducks. In meat duck production, feed efficiency is integrated in breeding objectives alongside with growth traits, thus aiming at reducing the high feeding costs without impairing the performances on other economic traits. Electronic measurement of individual feed intake in groups of animals, based on RFID technology, now allows for a better understanding between feeding behavior and food consumption traits. Genetic parameters of electronically recorded feeding behavior traits were estimated in two Grimaud Frères Sélection Pekin lines. Data were collected on both males and females during 28 days, on ducks aged from 3 to 7 weeks. The number of records was 5121 and 4356 for the maternal line A and paternal line B, respectively. Up to 10 successive generations of pedigree information was available. According to literature, visits to feeders were grouped into meals or feeding sessions. A single meal in our data was 1.27 visits in line A and 1.33 visits in line B. New traits, such as number of meals, meal duration, feed intake per meal, feeding rate and time per day spent feeding were computed. Despite a higher number of meals, feed intake was lower in line A. Feeding behavior traits all exhibited a moderate to high heritability (0.2 to 0.69) and a low correlation with the classical economic traits, except Average Daily Feed Intake (ADFI), which was strongly correlated ($\rho \geq 0.84$) with Feed Consumption Ratio (FCR) in both lines.

INTRODUCTION

Le coût de l'aliment représente aujourd'hui environ 70% du coût de production des produits avicoles (Waller, 2007). Pour la filière Pékin de chair, l'efficacité alimentaire est devenue aujourd'hui le critère de sélection prioritaire tout en se souciant de ne pas dégrader le niveau de performance des autres caractères de production (poids vif, rendement en viande, nombre d'œufs...).

Pour répondre à cette attente, Grimaud Frères Sélection a développé son système de mangeoires automatiques équipées en RFID (Radio Frequency Identification) permettant de contrôler avec une grande fiabilité les niveaux d'ingestion de ses principales lignées Pékin de chair. Les avantages d'un tel outil par rapport à une sélection en cage individuelle sont nombreux : possibilité de passer plus d'animaux sur une plus longue période de test amplifiant *in fine* le progrès génétique annuel, prise en compte des interactions sociales entre les animaux élevés en groupe (plus proche des conditions terrains), amélioration des conditions de bien-être animal...

Un autre atout non négligeable de cette technologie est qu'elle permet d'accéder à de nombreux critères témoignant du comportement alimentaire des sujets (nombre de visites, débit alimentaire, intervalle de temps entre les visites ou encore temps passé par jour aux mangeoires...). L'objectif de cette étude consiste à estimer les paramètres génétiques de ces nouveaux critères (héritabilités et liaisons génétiques entre eux et avec les caractères classiques d'intérêt agronomique) afin de valider l'intérêt de les incorporer dans les programmes de sélection.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Populations et caractères étudiés

Nous avons analysé les données de 2 lignées Grimaud Frères Sélection de canard Pékin de chair collectées pendant 28 jours entre 3 et 7 semaines d'âge. Les animaux des deux sexes ont été mesurés. Le nombre de sujets était de N=5121 dans la lignée A (lignée femelle) et N=8940 dans la lignée B (lignée mâle), même si dans cette dernière lignée, seuls 4356 animaux ont des mesures RFID.

Les canetons âgés de 1 jour ont été placés dans des parcs équipés de mangeoires automatisées afin de se familiariser au matériel, puis élevés *ad libitum* jusqu'à 49 jours. Les individus, équipés d'une puce électronique à l'aile, sont ainsi détectés par une antenne lors de chaque visite à la mangeoire. La centralisation des données permet ensuite d'accéder à un unique fichier compilant l'ensemble des visites détectées dans le bâtiment sous le format suivant : numéro de l'animal, numéro du transpondeur, horodatage de la visite, temps de la visite, poids

d'entrée de la balance aliment, poids de sortie de la balance aliment et différence de poids de la balance.

Ces données brutes sont ensuite successivement traitées par différents algorithmes afin :

1. De repérer puis filtrer les visites aberrantes selon différentes méthodes décrites par Casey *et al.* (2005).
2. De déterminer l'unité de temps appropriée ou « critère repas » plus pertinente pour analyser la structure temporelle du comportement alimentaire (concept décrit par Howie *et al.* (2009)).
3. De calculer les variables du comportement alimentaire sur la base de ce critère repas (1 repas = 1,27 et 1,33 visites dans les lignées A et B respectivement).

Les 8 variables de comportement alimentaire utilisées dans cette étude sont obtenues en moyennant l'ensemble des données cumulées entre 3 et 7 semaines d'âge :

- NM : nombre total de repas sur l'essai,
- MD : durée des repas,
- FIM : quantité d'aliment par repas,
- FRV : débit alimentaire,
- ADFI : quantité d'aliment consommé par jour,
- VM : nombre de visites par repas,
- TDSF : temps passé à consommer total par jour,
- PFTM : Rapport entre le temps de consommation « efficace » et le temps global de chaque repas.

Les 3 critères de performances mesurés sont les suivants :

- BW7 : Poids des sujets à 49 jours
- FI : Aliment total consommé entre 3 et 7 semaines
- FCR : Indice de consommation entre 3 et 7 semaines

La description phénotypique des caractères analysés est donnée dans le tableau 1.

1.2. Analyses statistiques

Les 11 caractères ont été analysés simultanément avec le modèle mixte suivant :

$$y_{ijkl} = \text{sexe}_{il} + \text{lot}_{jl} + \text{animal}_{kl} + \epsilon_{ijkl},$$

où i désigne le sexe, j le lot, k l'animal, l le caractère et ϵ_{ijkl} le résidu. Nous avons utilisé le logiciel gibbs2f90 issu du paquet blupf90 (Misztal *et al.* 2002). La méthodologie du Gibbs Sampling permet d'accéder à la distribution *a posteriori* des paramètres, que nous résumerons par leur moyenne et l'intervalle de confiance à 95% de la valeur la plus probable. L'analyse des chaînes issues de gibbs2f90 a été

réalisée avec le module CODA du logiciel R (R Development Core Team, 2008).

Le pedigree s'étendait sur une dizaine de générations successives et contenait 7414 individus dans la lignée A et 9103 dans la lignée B.

Afin de tenir compte du format de l'animal, les 8 caractères de comportement alimentaire ont été pré-correctés par BW7. Autrement dit, les données pour ces 8 caractères ont d'abord été régressées sur le poids vif à 49 jours avec un modèle linéaire en utilisant le logiciel R, puis les résidus ont été considérés comme les performances de base, en entrée de gibbs2f90. Comme souligné par Howie *et al* (2011), ce processus en deux étapes est requis pour éviter les problèmes théoriques connus quand un caractère est à la fois utilisé comme une variable d'intérêt et comme une covariable dans une matrice de variances et covariances.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Comparaison entre lignées (données brutes).

La lecture du tableau 1 fait apparaître des différences de comportement alimentaire entre les deux lignées, outre leur différence de format : dans la lignée A, le nombre de repas (NM) est plus important, mais leur durée (MD) et la quantité ingérée par repas (FIM) est plus faible que dans la lignée B. Par conséquent le temps effectif passé à se nourrir (TDSF), et la quantité ingérée totale sur la durée de l'essai (FI) sont plus importants dans la lignée mâle.

2.1 Caractères de comportement alimentaire

Après correction pour le poids vif des animaux à 7 semaines, les 8 caractères de comportement alimentaires sont modérément à fortement héritables (tableau 2) : de 0,32 pour la proportion du temps de consommation efficace par repas (PFTM) en lignée mâle à 0,69 pour le nombre de repas en lignée femelle (NM). La consommation quotidienne (ADFI) est moins héritable ($h^2 = 0,20$ en lignée femelle et $h^2=0,30$ en lignée mâle) et il s'agit du caractère le plus affecté par la précorrection. Si l'on analyse les 10 caractères sans introduire le poids vif à 7 semaines en covariable (ADFI et FI ne peuvent être analysés simultanément car ils sont proportionnels) on obtient des héritabilités très semblables, mais avec une valeur pour ADFI qui est de 0,45 en lignée A et 0,49 en lignée B. La précorrection préconisée par Howie *et al*. (2011) montre que si la consommation est logiquement liée à la croissance, il existe une variabilité résiduelle de la consommation, exploitable en sélection.

La comparaison des héritabilités entre lignées (tableau 2) laisse apparaître de grandes similitudes pour la

variabilité génétique des caractères de comportement alimentaire, à l'exception du débit alimentaire FRV, qui est nettement plus héritable dans la lignée femelle. Les intervalles de confiance à 95% pour ce paramètre ne se chevauchent pas.

Parmi les corrélations génétiques (tableau 3) « fortes » ($|\rho_G| > 0,5$), certaines sont attendues par la construction des variables : positive et élevée entre la durée des repas MD et le temps quotidien consacré aux repas TDSF dans les deux lignées (+0,89 et +0,83), négative entre le débit alimentaire FRV et MD (-0,76 et -0,70) ou entre FRV et TDSF (-0,87 et -0,89 dans les lignées A et B respectivement). On note une corrélation de +0,69 entre la durée des repas et le nombre de visites par repas dans la lignée B, et plus faible ($\rho_G = 0,39$) dans la lignée A. D'autres corrélations sont moins intuitives : $\rho_G = -0,97$ dans les deux lignées entre le nombre de repas NM et la quantité ingérée par repas FIM et $\rho_G = -0,62$ entre NM et la proportion du temps passé à la mangeoire effectivement consacré à s'alimenter PFTM.

La plupart des autres corrélations entre les caractères de comportement alimentaires sont modérées, ce qui laisse supposer que l'on peut agir sur l'un sans fortement modifier les autres.

2.3 Liaison avec les caractères classiques d'intérêt agronomiques

Les héritabilités de BW7 et FI sont similaires dans les deux lignées. Celle de l'indice de consommation FCR est plus élevée dans la lignée mâle, mais les intervalles de confiance se recoupent.

Après correction de ADFI pour le poids vif, ce caractère présente une forte liaison avec l'indice de consommation FCR ($\rho_G = 0,84$ en lignée A et $\rho_G = 0,86$ en lignée B).

A l'exception de l'ADFI, FCR présente des liaisons faibles à modérées avec les caractères de comportement alimentaire dans la lignée A et légèrement plus importantes dans la lignée B. L'impact de la prise en compte de ces caractères sur la précision des valeurs génétiques des critères habituellement sélectionnés doit faire l'objet d'une analyse dédiée. Compte tenu de la faible amplitude de ces corrélations, le gain attendu sera vraisemblablement modéré, mais peut être non négligeable, du fait de la relative indépendance entre les caractères de comportement alimentaire, qui permet de cumuler l'information apportée par chacun d'entre eux.

CONCLUSION

Cette analyse constitue la première analyse de ce type publiée chez le Pékin de chair. Les paramètres obtenus sont du même ordre de grandeur que ceux estimés par Howie *et al* (2011), chez le poulet de

chair. Les caractères de comportement alimentaires apparaissent modérément à fortement héréditaires et donc aisément sélectionnables, étant données les faibles corrélations avec les caractères d'intérêt agronomique classiques. Comme eux, nous obtenons des différences seulement marginales entre les lignées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Casey D.S., Stern H. S., Dekkers J.S.M. (2005) Journal of Animal Science, 83: 969-982.
 Howie J. A., Tolkamp B. J., Avendano S., Kyriazakis I. (2009) Poultry Science, 88:1143-1150.
 Howie J. A., Avendano S., Tolkamp B. J., Kyriazakis I. (2011) Poultry Science, 90:1197-1205.
 Misztal I., Tsuruta S., Strabel T., Auvray B., Druet T., Lee D.H. (2002), 7th WCGALP, Montpellier, France
 R Development Core Team (2008) ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
 Waller A (2007). Poultry International, 46:12-15.

Tableau 1. Statistiques élémentaires des performances analysées.

	Lignée A (lignée ♀)			Lignée B (lignée ♂)			lig née
	n	moyen ne	écart type	n	moye nne	écart type	
NM	5121	256,8	72,2	4356	231,9	61,5	** *
MD (min/ repas)	4436	2,37	1,6	4356	2,49	1,2	** *
FIM (g/rep as)	4436	24,4	7,0	4356	30,9	8,9	** *
FRV (g/mi n)	4436	25,2	6,7	4356	27,2	7,1	*
ADFI (g/jou r)	4436	212,6	26,2	4356	246,1	32,0	** *
VM	5121	1.272	0,18	4356	1,33	0,21	** *
TDSF (min/j our)	4436	11,9	5,4	4356	12,71	4,6	*
PFT M	4434	0,64	0,2	4356	0,67	0,2	** *
BW7 (g)	5121	3465	315	8940	3835	390,0	**
FI (g)	4893	5706	998	4356	6722	1184	*
FCR	4291	2,47	0,25	4356	2,54	0,27	-

NM= nombre total de repas, MD= durée des repas, FIM= quantité d'aliment par repas, FRV= débit alimentaire, ADFI= quantité totale d'aliment consommé par jour, VM= nombre de visites par repas, TDSF= temps à consommer total par jour, PFTM=rappport entre le temps à consommer par jour et le temps de présence cumulée à la mangeoire. BW7 = Poids vif 49j, FI = consommation totale, FCR = Indice de consommation

Niveau de signification de l'effet lignée en tenant compte de l'hétérogénéité introduite par les lots et le sexe: '- ' = P<0.1, '* ' = P<0.05 ; '** ' = P<0.01 ; '*** ' P<0.001

La filière canard est très segmentée et l'exploitation des données RFID pour le Pékin de chair laisse entrevoir un grand intérêt à explorer également les comportements alimentaires du canard gras (l'hybride mulard entre une cane Pékin et un mâle de Barbarie) en liaison avec son aptitude au gavage et avec le comportement alimentaire de ses parents.

Tableau 2 : Héritabilités (et Intervalle de Confiance à 95%) des 11 caractères analysés (après correction des caractères de comportement par BW7).

caractère	Lignée A (lignée ♀)		Lignée B (lignée ♂)	
	h ²	IC _{95%} (min ; max)	h ²	IC _{95%} (min ; max)
NM	0,69	0,62 ; 0,75	0,67	0,59 ; 0,74
MD (min/repas)	0,44	0,36 ; 0,51	0,44	0,36 ; 0,51
FIM (g/repas)	0,67	0,60 ; 0,73	0,66	0,59 ; 0,72
FRV (g/min)	0,60	0,53 ; 0,68	0,45	0,39 ; 0,52
ADFI (g/jour)	0,20	0,15 ; 0,26	0,30	0,24 ; 0,37
VM	0,37	0,30 ; 0,44	0,42	0,36 ; 0,50
TDSF (min/jour)	0,55	0,47 ; 0,63	0,46	0,38 ; 0,54
PFTM	0,40	0,33 ; 0,47	0,32	0,26 ; 0,38
BW7 (g)	0,68	0,62 ; 0,75	0,68	0,63 ; 0,73
FI (g)	0,47	0,41 ; 0,54	0,50	0,44 ; 0,57
FCR	0,24	0,18 ; 0,30	0,31	0,25 ; 0,38

NM= nombre total de repas, MD= durée des repas, FIM= quantité d'aliment par repas, FRV= débit alimentaire, ADFI= quantité totale d'aliment consommé par jour, VM= nombre de visites par repas, TDSF= temps à consommer total par jour, PFTM=rappport entre le temps à consommer par jour et le temps de présence cumulée à la mangeoire. BW7 = Poids vif 49j, FI = consommation totale, FCR = Indice de consommation

Tableau 3 : corrélations génétiques entre caractères et intervalle de confiance à 95% (lignée A au-dessus de la diagonale et lignée B en dessous de la diagonale).

	NM	MD	FIM	FRV	ADFI	VM	TDSF	PFTM	BW7	FI	FCR
NM		-0.13	-0.97	-0.02	0.09	-0.30	0.05	-0.62	-0.16	-0.08	-0.05
		-0.24	-0.98	-0.12	-0.05	-0.41	-0.06	-0.70	-0.25	-0.18	-0.19
MD	-0.38		0.15	-0.76	-0.00	0.39	0.89	-0.30	-0.09	-0.07	0.07
	-0.49	-0.25		-0.82	-0.19	0.25	0.85	-0.43	-0.21	-0.20	-0.09
FIM	-0.97	0.41	0.02	0.26	0.07	0.36	-0.05	0.59	0.19	0.17	0.18
	-0.98	-0.96		0.01	0.07	0.24	-0.17	0.06	0.09	0.06	0.04
FRV	0.06	-0.70	-0.06		0.06	-0.25	-0.87	0.05	0.14	0.14	-0.00
	-0.06	0.19	-0.18	0.07	-0.10	-0.39	-0.91	-0.09	0.04	0.02	-0.15
ADFI	-0.02	0.18	0.20	-0.01	0.23	0.08	0.10	0.06	0.18	0.62	0.84
	-0.17	0.12	0.06	0.33		-0.10	-0.08	-0.12	0.03	0.52	0.77
VM	-0.44	0.69	0.46	-0.36	0.13		0.20	-0.23	0.02	0.05	0.13
	-0.54	-0.31	0.35	0.57	-0.04	0.29	0.06	0.35	-0.11	-0.08	-0.05
TDSF	-0.01	0.83	0.06	-0.89	0.26	0.41		-0.13	-0.13	-0.05	0.15
	-0.15	0.13	-0.08	0.19	0.11	0.41	-0.27	0.01	-0.24	-0.18	-0.01
PFTM	-0.61	-0.05	0.63	-0.21	0.07	-0.08	0.00		0.24	0.21	0.08
	-0.70	-0.50	0.54	0.72	-0.09	0.23	-0.15	0.15	0.13	0.35	-0.09
BW7	-0.02	-0.05	0.06	-0.09	0.16	-0.05	0.14	0.34		0.88	0.02
	-0.13	0.10	-0.05	0.17	0.02	0.29	0.00	0.27		0.84	0.91
FI	-0.03	0.07	0.16	-0.08	0.69	0.05	0.26	0.28	0.82		0.42
	-0.15	0.10	0.04	0.28	0.61	0.76	0.12	0.39	0.77	0.86	0.30
FCR	-0.16	0.27	0.33	0.05	0.86	0.22	0.19	0.00	-0.05	0.46	0.53
	-0.30	-0.01	0.12	0.41	0.81	0.90	0.03	0.33	-0.16	0.16	0.56
			0.19	0.45	0.81	0.90	0.06	0.36	-0.18	0.09	

NM= nombre total de repas, MD= durée des repas, FIM= quantité d'aliment par repas, FRV= débit alimentaire, ADFI= quantité totale d'aliment consommé par jour, VM= nombre de visites par repas, TDSF = temps à consommer total par jour, PFTM=rappor entre le temps à consommer par jour et le temps de présence cumulée à la mangeoire. BW7 = Poids vif 49j, FI = consommation totale, FCR = Indice de consommation

SESSION
GENETIQUE - REPRODUCTION

Posters

RECHERCHE DES REGIONS GENOMIQUES RESPONSABLES DU DIABETE INSIPIDE ET DE LA COULEUR DE COUILLE CELADON CHEZ LA CAILLE JAPONAISE PAR RADSEQ.

Leroux Sophie^{1*}, Marissal Anna^{1*}, Bernard Maria^{2,6}, Esquerré Diane³, Barbieri Johanna³, Gourichon David⁴, Rivière Sandrine⁴, Robic Annie¹, Hochu Isabelle¹, Lagarrigue Sandrine⁵, Klopp Christophe⁶, Zerjal Tatiana², Bed'hom Bertrand², Minvielle Francis², Pitel Frédérique¹

¹GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, ENVT, 31326 CASTANET TOLOSAN;

²GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78352 JOUY-EN-JOSAS; ³INRA, GeT-PlaGe Genotoul, 31326 Castanet Tolosan; ⁴INRA, PEAT, 37380 NOUZILLY; ⁵UMR INRA-Agrocampus Ouest, PEGASE, 35000 RENNES; ⁶INRA, Sigenae - BIA, 31326

CASTANET-TOLOSAN

**co-premiers auteurs*

frederique.pitel@inra.fr

RÉSUMÉ

La caille japonaise est une espèce pour laquelle il n'existe pas de puce de génotypage commerciale. Nous avons testé l'utilisation de la technique de RADSeq (Restriction site Associated DNA Sequencing), pour la première fois sur cette espèce. Le RADSeq est une technique de génotypage par séquençage d'une sous-représentation du génome - la même pour tous les individus - obtenue par sélection de fragments d'ADN issus de la digestion du génome par des enzymes de restriction. Les séquences obtenues sont ensuite comparées pour détecter des polymorphismes de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) et analyser le génotype de chaque individu en ces positions variables. Cette technique a été appliquée à l'étude de deux phénotypes : "céladon" et "diabète insipide", dont le caractère mendélien est connu ou soupçonné. Le premier est responsable de la couleur de coquille "céladon" (bleu-vert) ; le second, qui est présent à faible fréquence dans les populations commerciales, se manifeste par une polydipsie et une polyurie très marquées chez les femelles, et par une diminution de l'hématocrite. Un dispositif familial dans lequel ségrègent ces deux phénotypes a été mis en place : 158 femelles F2, informatives pour les deux caractères, ont été obtenues par croisement de lignées fixées pour l'un ou l'autre des phénotypes. Plus de 230 000 SNP ont été identifiés, et 36 244 ont été utilisés pour des analyses d'association avec les caractères étudiés, ce qui a permis d'identifier la région de "céladon" sur le chromosome 16. La région du "diabète insipide" n'a pas pu être localisée, des analyses complémentaires sont en cours.

ABSTRACT

Using RADSeq to search genomic regions causing diabetes insipidus and eggshell color "celadon" in Japanese quail.

Japanese quail is a species for which there is no commercial genotyping chip. We tested the RADSeq (Restriction site associated DNA Sequencing) technique for the first time in this species. RADSeq is a technique for genotyping by sequencing a reduced representation of the genome - the same for all individuals - obtained by selecting DNA fragments derived from restriction enzyme digestion of the genome. The sequences obtained are then compared to detect Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) and to analyze the genotype of each individual in these variable positions. This technique has been applied to the study of two phenotypes: "celadon" and "diabetes insipidus". The former is responsible for the shell color called "celadon" (blue-green); the latter, which is present at low frequency in commercial populations, is characterized by polydipsia and polyuria, very marked in females, and by a decrease of hematocrit levels. A family design in which both phenotypes are segregating has been established: 158 F2 females informative for both traits were obtained by crossing quail lines fixed for either phenotype. More than 230,000 SNPs were identified, and 36,000 were used for association analyzes with the traits under study, identifying the "celadon" region on chromosome 16. The "diabetes insipidus" region could not be localized, and additional analyzes are under way.

INTRODUCTION

Les nouveaux outils de génotypage à haut débit qui ont émergé il y a quelques années, comme les puces à SNP (Single Nucleotide Polymorphism), ont largement permis d'améliorer les capacités d'analyse des génomes des espèces agronomiques d'intérêt. Cependant, les espèces moins étudiées, comme la caille, ne disposent pas encore de puce de génotypage. L'étude menée ici a pour but de localiser deux gènes majeurs chez la caille japonaise *Coturnix japonica*, ce qui nécessite une bonne couverture du génome par des marqueurs polymorphes. Nous avons donc choisi de mettre en œuvre une technique de génotypage par séquençage, le RADSeq (Restriction-site Associated DNA Sequencing), qui permet de détecter efficacement un grand nombre de marqueurs sur l'ensemble du génome, que celui-ci soit connu ou non.

Diabète insipide

Des travaux menés il y a quelques années ont montré que le diabète insipide chez la caille japonaise était un caractère mendélien déterminé par une mutation récessive autosomale : *di* (Minvielle *et al.* 2007). La proximité phylogénétique entre *Gallus* et *Coturnix*, le travail antérieur sur l'hérédité de *di* chez la poule et les recherches récentes menées sur diverses mutations communes aux deux taxa laissent penser qu'un même gène, qui reste à découvrir, pourrait être impliqué dans les deux espèces. La lignée de cailles diabétiques (*di/di*) que nous avons développée et caractérisée (Minvielle *et al.* 2007) constitue une ressource unique pour trouver une mutation responsable du diabète insipide chez les oiseaux. Cette mutation (*di*) qui se maintient à faible fréquence dans les élevages commerciaux se manifeste par une polydipsie et une polyurie, très marquées chez les femelles, ainsi que par une diminution de l'hématocrite. Le syndrome n'est pas associé à une altération significative des performances zootechniques mesurées habituellement, sauf pour la consommation résiduelle qui est augmentée, certainement en relation avec le coût métabolique du phénomène polydipsie/polyurie. Chez l'homme et la souris, le diabète insipide est associé à une mutation du gène du récepteur 2 à la vasopressine, lié au sexe, ou à une mutation dans le gène autosomal de l'aquaporine 2 (Bichet 2009). Chez les oiseaux, l'hormone vasotocine AVT, homologue de la vasopressine des mammifères, joue un rôle central dans la régulation de l'équilibre hydrique mais nous n'avons trouvé de différence de concentration de l'hormone ni dans le cerveau ni dans le plasma des cailles *di/di*. En revanche, des travaux préliminaires menés sur la morphologie des structures rénales et sur le gène de l'aquaporine 2, qui est régulé par la vasotocine, ont montré des différences au niveau de la zone médullaire du rein et une diminution d'expression de ce gène, mais pas de différence dans sa séquence (Yang *et al.* 2008). A ce stade, si l'on

peut penser que c'est au niveau du rein qu'il faut chercher les effets de la mutation *di* aviaire, aucun gène candidat particulier n'est privilégié et c'est donc une recherche au niveau du génome complet que nous avons conduite.

Celadon

Cette mutation (*ce*), autosomale récessive, supprime complètement le dépôt de la pigmentation brune de surface de l'œuf qui donne le patron de coloration usuel chez la caille, et produit donc un œuf qui montre la couleur verte sous-jacente de la coquille. Or le patron de coloration de l'œuf de caille constitue un exemple typique du camouflage des œufs très répandu chez les oiseaux, et la connaissance de la mutation *ce* est donc une possible clé d'entrée dans la compréhension de l'architecture génétique de ce caractère complexe. Un précédent projet visait à localiser chez la caille quatre mutations particulièrement intéressantes car sans homologue connu chez la poule : deux mutations du plumage, "rusty" et "curly", et deux mutations de la couleur de la coquille des œufs, "white" et "celadon", qui produit un œuf bleu-vert (Leroux *et al.* 2013). L'analyse d'association conduite a mis en évidence des associations très significatives pour 3 des phénotypes, mais l'association avec *ce* est seulement suggérée, sur l'équivalent chez la Caille du chromosome 16 de la poule, dont la séquence de référence est très incomplète.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Dispositif animal et phénotypage

Les cailles ont été élevées au Pôle Expérimental Avicole de Tours (PEAT). Cinq mâles F0 de la lignée céladon (homozygotes *ce/ce*) et cinq femelles F0 de la lignée diabète insipide (homozygotes *di/di*) ont été croisés (1 mâle pour 1 femelle), pour obtenir une génération F1 hétérozygote pour les deux mutations. Puis, 5 mâles F1 ont été croisés avec 20 femelles F1 (1 mâle pour 4 femelles), en évitant les croisements entre apparentés. Au total 158 femelles F2 ont été obtenues, sur lesquelles nous avons évalué la couleur de l'œuf et la polyurie (caractérisée par des fientes liquides). Ces F2 présentaient bien les 4 types de phénotypes attendus : 10 [CE, DI] (*ce/ce* et *di/di*), 33 [CE, WT] (*ce/ce*, et *di+/di* ou *di+/di+*), 33 [WT, DI] (*ce+/ce* ou *ce/ce*, et *di/di*), et 82 [WT, WT] (*ce+/ce* ou *ce+/ce+*, et *di+/di* ou *di+/di+*), avec "WT" : phénotype sauvage, "ce+" : allèle sauvage au locus *ce*, "di+" : allèle sauvage au locus *di*. Les proportions observées (10, 33, 33, 82) sont compatibles avec les proportions mendéliennes attendues (1/16, 3/16, 3/16, 9/16 soit 10, 30, 30 et 88 individus respectivement). Ainsi, nous disposons au sein de la même population de 43 femelles de phénotype mutant et 115 femelles de phénotype sauvage pour chacun des deux caractères CE et DI.

Des prélèvements de tissus (reins en particulier) ont été réalisés pour des analyses fonctionnelles ultérieures, et les échantillons de sang prélevés ont permis d'effectuer les extractions d'ADN.

1.2. Génotypage et analyses d'association

Au total, 192 individus ont été analysés par la technique de RADSeq (Baird *et al.*, 2008), soit l'ensemble des individus F0, F1 et F2, à l'exception d'une mère F1 dont le sang n'était pas disponible pour l'extraction d'ADN. Les ADN génomiques ont été digérés par deux enzymes de restriction (*EcoRI* et *TaqI*) et les fragments obtenus ont subi une ligation d'adaptateurs universels. Les résultats de ligation ont été soumis à une PCR effectuée grâce à des amorces Illumina indexées, permettant l'identification ultérieure de l'individu d'origine de chaque lecture. Les 192 échantillons ont été regroupés pour être séquencés ensemble sur trois lignes de HiSeq 3000 (2x150 bp). La fraction de l'amplifiat comprise entre 150 et 850 bp environ a préalablement été sélectionnée, en récupérant la fenêtre correspondant à la taille souhaitée après migration sur gel. Nous avons utilisé un logiciel dédié à l'analyse des résultats de RADSeq pour détecter les SNP et en déduire le génotypage des animaux : Stacks (Catchen *et al.*, 2011). Des scripts ont été développés pour en faciliter l'utilisation sur nos données. L'assemblage du génome de la caille (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_00157_7835.1) ayant été rendu public en mars 2016, il a été possible d'utiliser l'option de Stacks qui permet un alignement des lectures sur le génome de référence avant la détection des SNP. Les analyses d'association (détails en Figure 2) ont été réalisées avec le package R GenABEL (Aulchenko *et al.*, 2007).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Détection de SNP et génotypage

Pour les 192 individus et les 3 lignes réunies, 1 275 116 654 lectures ont été obtenues et analysées avec Stacks. Le contrôle qualité a permis de conserver 78,4% des lectures. En moyenne, 99 469 loci (fragments du génome obtenus après digestion et séquençage) par individu ont été obtenus. Parmi ces loci, 27,6% présentaient des SNP, à hauteur de 2,3 SNP par locus en moyenne. Ainsi, 88 006 loci polymorphes pour 233 339 SNP uniques ont été obtenus. Sur l'ensemble de ces loci génotypés, la profondeur moyenne est de 33,1X. Deux individus comportaient très peu de séquences et ont donc été écartés lors des contrôles qualité de GenABEL, à cause d'une trop faible proportion de génotypes couverts sur l'ensemble des marqueurs. Parmi les 233 339 SNP obtenus, 36 244 SNP uniques sont conservés avec un taux de génotypage de 0,95, c'est-à-dire 95% des individus génotypés pour chaque SNP.

La répartition des SNP obtenus pour un taux de génotypage de 0,95 est représentée sur la Figure 1. On voit que les SNP sont répartis de façon assez homogène sur le génome de la caille. La distance moyenne entre marqueurs, hors chromosomes sexuels, est de 22,6 kb, avec une distance médiane de 35 kb, et une distance maximale de 1,2 Mb (sur le chromosome 3). La grande majorité (98,6%) des SNP sont présents sur des chromosomes identifiés, le reste se trouvant sur des "scaffolds" non assignés. Mis à part les chromosomes sexuels et le microchromosome 16 - dont l'assemblage est très fragmentaire -, la quantité de SNP sur un chromosome ou un scaffold est proportionnelle à la taille de celui-ci, ce qui confirme une bonne répartition des SNP à travers tout le génome. Enfin, le nombre de SNP reste homogène entre chromosomes avant et après les filtres qualité utilisés avec GenABEL.

2.2. Analyses d'association

La Figure 2 présente les graphiques de type "Manhattan-plots" obtenus pour chacun des caractères avec les SNP présentant un taux de typage de 0,95. Pour le caractère "céladon", un pic majeur apparaît au niveau du chromosome 16 (CM003796.1) (Fig. 2A), où 16 SNP ont une p.valeur inférieure au seuil de $1,38 \cdot 10^{-6}$ ($\alpha=0,05$, correction de Bonferroni). Le marqueur le plus associé (p.valeur = $6,24 \cdot 10^{-23}$) est localisé sur le scaffold 492. Ce résultat suggère que ce scaffold pourrait appartenir au chromosome 16. Nous avons confirmé cette hypothèse par analyse de liaison (résultats non présentés). L'assemblage du génome de la caille dans la région étant incomplet, tout comme celui de la poule, aucun gène candidat n'a pu être mis en évidence. Un séquençage des individus recombinants dans la région est en cours.

Aucune association significative n'est apparue pour le caractère "diabète insipide" (Figure 2B). Parmi les hypothèses permettant d'expliquer ce résultat, on peut mettre en avant les difficultés de phénotypage de ce caractère, et la possibilité de n'avoir pas généré de marqueurs dans la région portant le gène impliqué. Les données de RADSeq vont être complétées par le séquençage tout génome d'un mélange d'individus de la lignée d'origine, porteurs à l'état homozygote de l'allèle défavorable.

CONCLUSION

La technique de RADSeq a été utilisée avec succès chez la caille. Elle a permis de générer plus de 36 000 SNP de bonne qualité pour les analyses d'association dans ce dispositif sur l'ensemble du génome de la caille, et de localiser la région du génome impliquée dans la couleur céladon de la coquille sur le chromosome 16. Des analyses complémentaires sont en cours (en particulier le séquençage d'individus recombinants) pour tenter d'identifier les causes moléculaires des phénotypes étudiés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aulchenko, Y. S., D. J. de Koning and C. Haley, 2007. *Genetics* (177): 577-85.
- Baird, N. A., P. D. Etter, T. S. Atwood, M. C. Currey, A. L. Shiver, Z. A. Lewis, E. U. Selker, W. A. Cresko and E. A. Johnson, 2008. *PLoS One* (3): e3376.
- Bichet, D. G., 2009. *Prog Mol Biol Transl Sci* (89): 15-29.
- Catchen, J. M., A. Amores, P. Hohenlohe, W. Cresko and J. H. Postlethwait, 2011. *G3* (Bethesda) (1): 171-82.
- Leroux S., Dehais P., Vignal A., Bouchez O., Faraut T., Rossignol M., Arnould C., Leterrier C., Pitel F., Minvielle F., 2013. *Dixièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras*, La Rochelle, France.
- Minvielle, F., R. Grossmann and D. Gourichon, 2007. *Poult Sci* (86): 249-54.
- Yang, Y., F. Minvielle, R. J. Kuykindoll, J.-M. Gasc, T. Yamamoto and H. Nishimura, 2008. *FASEB J* (22): 24.

Figure 1 : Répartition des 36 244 SNP utilisés sur le génome de référence de la caille (Coja2)
En abscisse : position sur le chromosome (en bases) ; en ordonnée : chromosome (ou groupe de liaison)

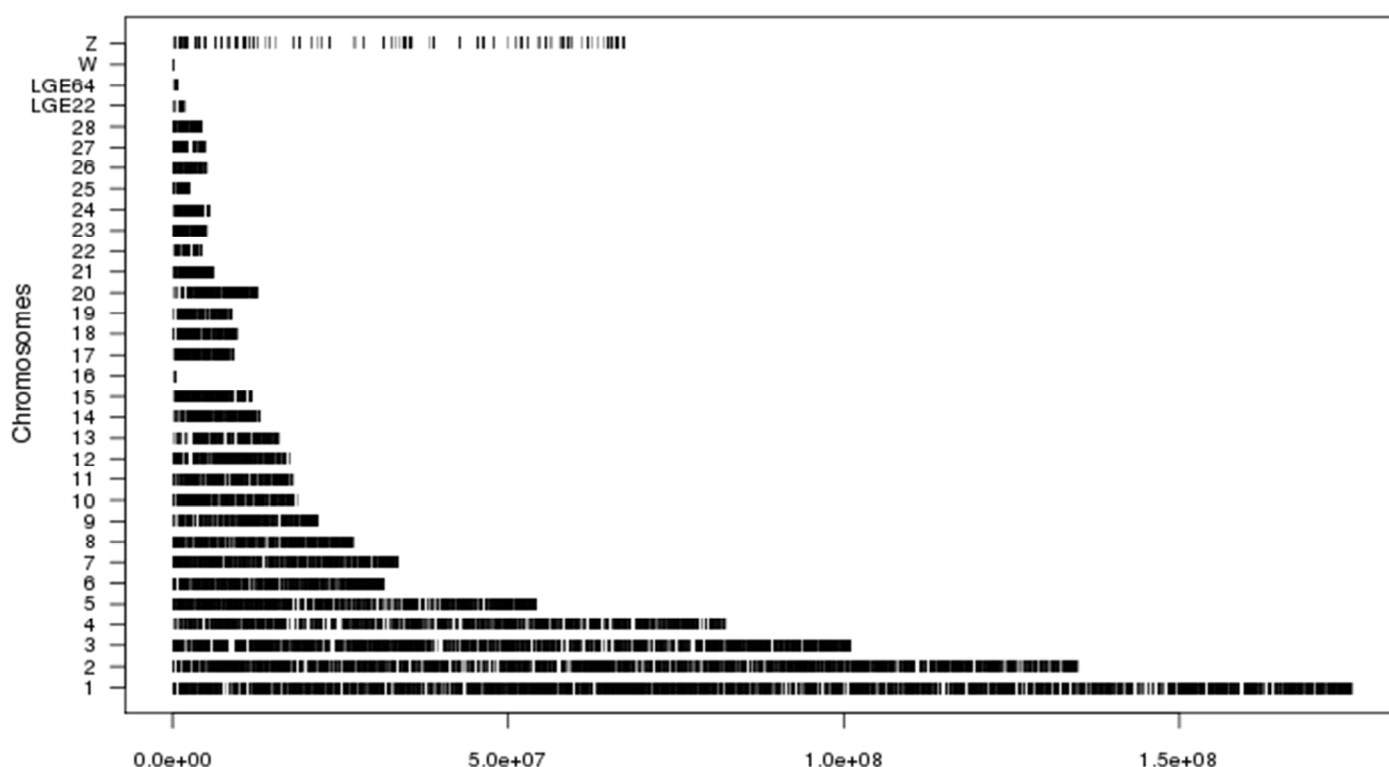
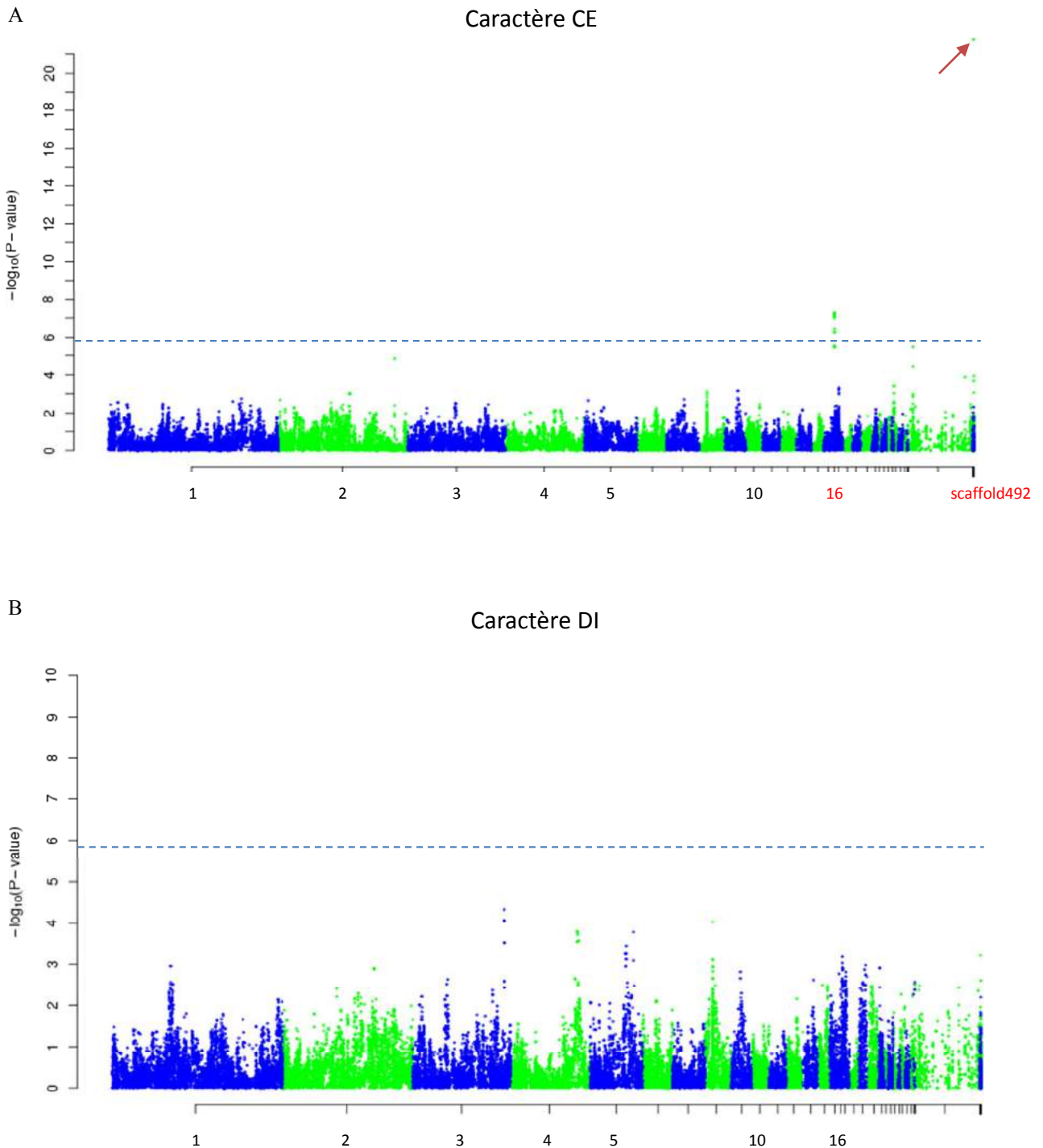


Figure 2 : Résultats d'association des marqueurs avec le caractère étudié

(A) Caractère "couleur de la coquille céladon " (CE). (B) Caractère "diabète insipide " (DI).

Les analyses ont été réalisées sur l'ensemble des individus génotypés. Chaque point, en fonction de la position du SNP sur le génome, indique le degré de significativité du test d'association d'un SNP avec le caractère en question ($-\log_{10}(p\text{-valeur})$). Nous avons appliqué une correction de Bonferroni, conservative, pour établir le seuil de significativité, en considérant 36 244 tests indépendants. Chaque changement de chromosome est illustré par un changement de couleur. La p.valeur pour chaque marqueur est obtenue par un modèle linéaire mixte incluant l'effet additif du SNP à chaque position, tenant compte de l'apparentement (FASTA, Family-based Score Test for Association). Un test utilisant un modèle linéaire récessif a également été utilisé pour DI, sans plus de succès (résultats non présentés).



CARACTERISATION D'UNE DUPLICATION DE 71 KB AU LOCUS ASIP IMPLIQUEE DANS LE PHENOTYPE BEIGE/FAWN DU PLUMAGE DE LA CAILLE JAPONAISE

**Robic Annie¹, Leroux Sophie¹, Gourichon David², Trussardi Damien¹, Zerjal Tatiana³,
Esquerre Diane⁴, Plisson-Petit Florence¹, Fillon Valérie¹, Vignal Alain¹,
Minvielle Francis³, Pitel Frédérique¹, Morisson Mireille¹**

¹ GenPhySE, Université de Toulouse INRA INPT ENVT 31326 Castanet-Tolosan,

² INRA PEAT 37380 Tours, ³ GABI UMR INRA/AgroParisTech 78352 Jouy-en-Josas,

⁴ INRA GeT-PlaGe Genotoul 31326 Castanet Tolosan,

annie.robic@inra.fr

RÉSUMÉ

La récente mise à disposition du génome de référence de la caille japonaise (mars 2016) a rendu possible la caractérisation moléculaire par séquençage haut débit de mutations causales de phénotypes dont le locus impliqué est connu, comme le phénotype *Beige* (Fawn) impliquant le gène ASIP. Les lectures appariées obtenues par séquençage de deux cailles de phénotype *Beige* ont été alignées sur le génome de référence de la caille. Cet alignement a été examiné attentivement dans la région du gène ASIP (Chromosome 20 de la caille) et une duplication d'une région de près de 71 kb a été mise en évidence. Dans cette région dupliquée, il y a une copie du gène ASIP qui est dans une situation normale alors que la seconde copie est incluse dans un gène de fusion ITCH-ASIP. Après avoir caractérisé les différents transcrits issus de la région, nous avons caractérisé le transcrit du gène de fusion : ce transcrit contient l'exon 1 (non codant) d'ITCH et les trois exons codants d'ASIP. La mutation était déjà connue pour entraîner un excès de transcrits ASIP, évalués sur la partie codante, aussi nous avons réalisé des PCR quantitatives pour évaluer l'importance des différents transcrits d'ASIP et du gène de fusion. Ces dosages montrent clairement que c'est la transcription excessive du gène ITCH-ASIP en un transcrit de fusion qui aboutit à cet excès de transcrits codants pour une protéine ASIP.

ABSTRACT

Characterization of a 71 kb duplication at ASIP locus involved in the Fawn phenotype of the plumage of Japanese quail.

The recent availability of the reference genome of the Japanese quail (March 2016) allows the molecular characterization by high-throughput sequencing of causal mutations of phenotypes for which the locus responsible is known, as for the Fawn phenotype involving the ASIP gene. The reads obtained by paired-end sequencing of two Fawn quails were aligned on the quail reference genome. This alignment was carefully examined in the ASIP gene region (quail chromosome 20) and we found a tandem duplication of a region of about 71 kb. In this new region, there was a copy of the ASIP gene that was in a normal situation, while the second copy was included in an ITCH-ASIP fusion gene. After characterization of different transcripts from the region, we characterized the transcript of the fusion gene: this transcript contained exon 1 (non-coding) of ITCH and the three coding exons of ASIP. The mutation is already known to cause an excess of ASIP transcripts, measured on the coding region. In addition, quantitative PCR was performed to evaluate the importance of different transcripts issued from this region. These assays clearly show that it is the excessive transcription of the ITCH-ASIP gene into a fusion transcript that leads to the excess of transcripts coding for the ASIP protein.

INTRODUCTION

La récente mise à disposition du génome de référence de la caille japonaise (mars 2016) a rendu possible la caractérisation moléculaire par séquençage haut débit de mutations causales de phénotypes dont le locus impliqué est connu. Quand cette mutation relève d'une modification de la structure du génome de ce locus (et pas uniquement une modification ponctuelle, SNP), le séquençage d'un ou deux individus peut suffire.

Nous nous sommes intéressés au phénotype *Beige* (*Fawn*) qui justement était susceptible d'avoir ces deux caractéristiques :

- Nous savions déjà que la mutation causale impliquait le locus du gène ASIP (chromosome 20 de la caille japonaise) (Hiragaki et al. 2008).
- Plusieurs mutations du gène ASIP conduisant à des phanères plus claires que chez l'animal de phénotype sauvage sont connues (*Lethal Yellow* chez la souris ; *Viable Yellow* chez la souris, le mouton *Merinos* ; Alpaga blanc ; et *Lethal Yellow* chez la caille) et elles sont toutes explicables par une modification structurale de leur génome, au locus ASIP.

Etant donné que nous souhaitions rechercher prioritairement une modification structurale, il nous « suffisait » de réaliser le séquençage « appairé » d'un ou deux individus porteurs de cette mutation et de comparer ces données avec le génome de référence.

Le phénotype *Fawn* est causé par une mutation mise en évidence par plusieurs auteurs et est appelée *Fawn*, *Fawn-2* ou *Beige* (Tsudzuki 2008). C'est un phénotype Mendélien à transmission autosomale dominante. A la naissance, le plumage de l'homozygote se caractérise par un plumage jaune clair avec trois bandes sombres sur le dos (mais pas sur la tête). A l'état adulte, les homozygotes sont plus clairs et avec un dimorphisme sexuel plus marqué que pour les individus de phénotype sauvage (Tsudzuki et al. 1996). D'autre part, une étude avait précédemment permis de montrer que le gène ASIP bénéficiait d'une transcription plus active au niveau de la peau chez les individus *Fawn* (Hiragaki et al. 2008).

Après avoir séquencé deux individus de phénotype *Beige* et caractérisé un segment dupliqué chez ceux-ci, nous avons étudié les conséquences de cette duplication, sur la transcription des gènes de la région. La présence excessive de transcrits codants pour une protéine ASIP chez les individus beige a trouvé une explication.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Le séquençage « appairé » d'un génome

Nous avons choisi de séquencer deux animaux issus de deux populations séparées depuis plus de 25 ans, maintenues à l'UE PEAT, présentant le phénotype

Beige/Fawn à l'état homozygote (fixé). L'ADN de ces animaux a été extrait à partir de sang. Les séquençages ont été réalisés sur la plateforme GeT-PlaGe de la Génomole de Toulouse.

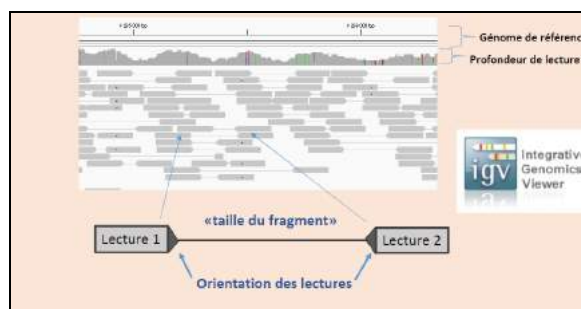
L'ADN de l'individu choisi est extrait puis fragmenté afin d'en retenir une banque de fragments de 350 pb environ. Le séquençage de cette banque a été réalisé avec la technologie illumina Hiseq3000 afin de proposer des lectures de tous ces fragments par chacune des deux extrémités. Il s'agit de lectures de 150 pb, associées par paire (les lectures sont dites appairées) qui sont comparables aux séquençages d'un fragment inséré dans un vecteur, obtenu par clonage. Ici la taille des fragments attendus est donc de 350 pb.

1.2. Alignement du génome séquencé sur le génome de référence

Le génome de référence de la caille est un ensemble de 2012 fichiers de séquences, attribués ou non à des chromosomes.

Le résultat du séquençage de l'individu qui nous intéresse, est un ensemble de lectures associées par paire. Nous utilisons un programme d'alignement, *BWA-MEM* spécialement adapté à l'alignement de ces lectures de 150 pb sur le génome de référence. Ces alignements sont ensuite nettoyés des artéfacts possibles de séquençage redondant (*Rmdup*). Tous ces traitements bioinformatiques ont été réalisés sur la plateforme Galaxy de la Génomole de Toulouse (<http://bioinfo.genotoul.fr/index.php?id=124>).

Figure 1 : Visualisation des alignements avec IGV



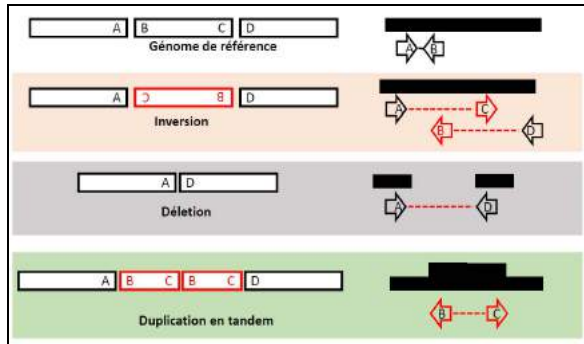
Les paires de lectures sont alignées sur le génome de référence. Chacune d'entre-elles est symbolisée par deux grosses flèches, orientées tête-à-tête, séparées par un trait mince (partie du fragment non séquencé).

Pour visualiser l'alignement de ces lectures sur le génome de référence, nous avons utilisé le programme *Integrative Genome Viewer*, IGV. Classiquement les paires de lectures s'alignent tête à tête sur le locus considéré du génome de référence (Figure 1) avec une taille de fragment compatible avec la sélection de taille réalisée avant le séquençage. De plus ce logiciel propose une évaluation de la quantité de séquences alignées à chaque locus (profondeur de lecture, sur la Figure 1).

1.3. Détection visuelle des anomalies de structure

Les principaux types de modifications structurales reconnaissables par cette méthode visuelle sont l'inversion d'un segment de séquence, la délétion ou perte d'un segment de séquence et la duplication en tandem d'un segment (Figure 2).

Figure 2 : Anomalies de structure du génome et détection visuelle dans IGV



Les anomalies de l'alignement des lectures dans la région de la modification de la structure s'observent sur l'orientation de certaines extrémités de lecture, sur la taille apparente du fragment, et éventuellement une abondance différente de lectures dans la région de la modification.

1.4. Techniques biologiques

Les ARN d'embryons ont été extraits à partir de peau (avec le duvet) : nous avons utilisé des embryons de 15 jours, issus d'une population beige et des embryons d'une population au plumage sauvage. Pour pouvoir rechercher et doser les différents transcrits, les ADNc ont été synthétisés par une transcription inverse des ARN avec un amorçage au hasard (dN9).

Des amplifications PCR ont été réalisées en choisissant deux amorces aux extrémités de la région à amplifier, à partir des séquences connues. Les PCR quantitative (qPCR) ont été effectuées sur ABI7900HT avec du Sybr green et deux transcrits de référence (RPS13 et GAPDH). Dans tous les cas, les deux amorces ont été choisies sur deux exons différents.

Des séquençages de fragments PCR ont été réalisés (ABI3700).

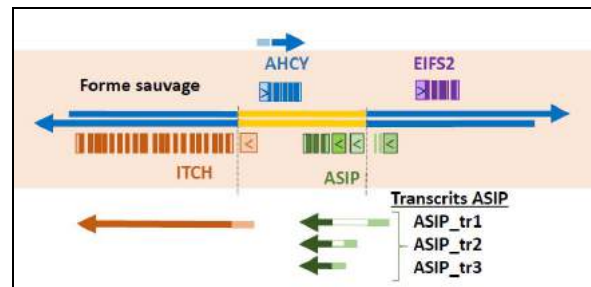
2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Présentation du contenu de la région ASIP

L'annotation du génome de la caille a été faite parallèlement à l'assemblage du génome de référence et nous disposons donc d'un génome de référence annoté. Dans la région, on notera que le gène ASIP se trouve sur le même brin que le gène ITCH, alors qu'AHCY et EIFS2 sont sur l'autre brin (Figure 3).

Le gène ASIP est correctement annoté pour sa partie codante (trois exons) mais nous savons par les connaissances acquises chez la poule qu'il possède vraisemblablement cinq exons non codants (dits 5'NC) dont le n°1, n°4 et le n°5 qui pourraient être départ de transcription. Le gène ASIP a donc probablement trois promoteurs et sa transcription pourrait aboutir à trois types de transcrits (Figure 3). La séquence codante débute dans l'exon n°6. Les gènes ITCH et AHCY sont plus simples puisqu'ils n'ont qu'un exon 5'NC et donc un seul départ possible pour leur transcription.

Figure 3 : La région du gène ASIP chez la caille



Chaque gène est représenté par une couleur : les exons codants sont schématisés par des rectangles foncés alors que les exons 5'NC le sont par des rectangles de même couleur mais plus claire. Les exons 5'NC pouvant être le site de démarrage de la transcription sont symbolisés par un rectangle avec une flèche. Nous attendons trois types de transcrits codants pour la même protéine ASIP, alors que ITCH et AHCY n'ont qu'un transcrit.

2.2. Mise en évidence d'une duplication en tandem

Dans cette étude nous avons obtenu 100 millions de lectures de 150 pb par individu, soit 15 Gb séquencées par individu (séquences brutes). Après alignement sur le génome de référence, près de 80 % de ces lectures peuvent être alignées correctement sur le génome de référence de la caille japonaise.

Figure 4 : Caractérisation d'une duplication de près de 71 Kb



Grace à IGV, nous visualisons des paires de lectures orientées queue-queue et éloignées de près de 71 kb. De plus, une présence excessive de lectures dans l'ensemble de cette région permet de soupçonner l'existence d'une duplication en tandem de 71 kb.

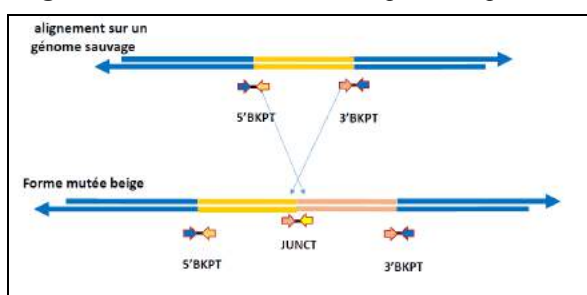
Ces alignements ont été examinés attentivement dans la région du gène ASIP (Chromosome 20 de la caille). En utilisant IGV, nous avons trouvé les trois éléments caractérisant une duplication en tandem (Figure 2)

dans la région d'ASIP (Figure 4). Cette duplication de 71 kb est localisable à quelques paires de bases près, grâce à ce logiciel : il suffit de zoomer sur les deux limites que nous appellerons points de cassures 5' et 3' (5'BKPT et 3'BKPT).

2.3. Caractérisation de la duplication et lien avec le phénotype *Beige/Fawn*

Pour séquencer les deux points de cassure, il suffit de définir deux couples d'amorces de part et d'autres des points de cassure et de séquencer les deux fragments PCR correspondants. La Figure 5 permet de comprendre qu'en cas de duplication (et seulement dans ce cas de figure), il y a un troisième couple qui génèrera un fragment PCR.

Figure 5 : Caractérisation de la duplication par PCR



Les deux points de cassure (5'BKPT et 3'BKPT) peuvent être amplifiés par deux couples d'amorces. Si on prend la première amorce de la PCR-3'BKPT avec la seconde amorce de la PCR-5'BKPT, on amplifie chez les animaux ayant la duplication un fragment de jonction (JUNCT).

Les deux points de cassure ont été séquencés chez un individu beige et chez un autre de phénotype sauvage. Le point de jonction a été amplifié et séquencé sur un individu beige. Les séquences sont conformes à ce que nous attendions et permettent de caractériser une apparente délétion de 70895 pb. Aux trois points stratégiques, une micro-homologie de 3 pb est observée. L'absence d'une séquence répétée importante exclut à priori la possibilité de trouver des caillies avec 3 ou 4 copies de ce segment.

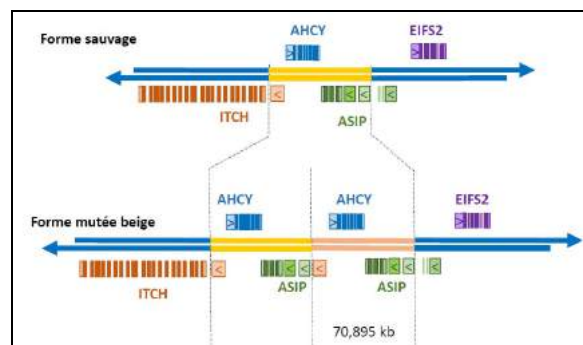
Les fragments 3'BKPT et JUNCT ont été utilisés pour montrer que la duplication existait chez toutes les caillies présentant le phénotype *Beige* et seulement chez celles-ci.

2.4. Conséquences de la duplication sur le locus ASIP

Les points de cassure de cette duplication en tandem sont localisés en aval de l'exon n°1 d'ITCH et en amont de l'exon n°4 d'ASIP (5'NC). La région dupliquée de 70895 pb inclut sur un brin le gène AHCY dans son ensemble et sur l'autre brin, une partie des gènes ASIP et ITCH (Figure 6). Aucun gène ne paraît détruit dans ce remaniement, mais la

nouvelle copie d'ASIP (privée de ses trois premiers exons) se trouve placée juste après le premier exon d'ITCH, point de démarrage possible d'une transcription. De plus, ce gène de fusion ITCH-ASIP possède encore les deux exons ASIP (n°4 et n°5) permettant éventuellement un démarrage de la transcription.

Figure 6 : Région ASIP chez les caillies de phénotypes sauvage et beige



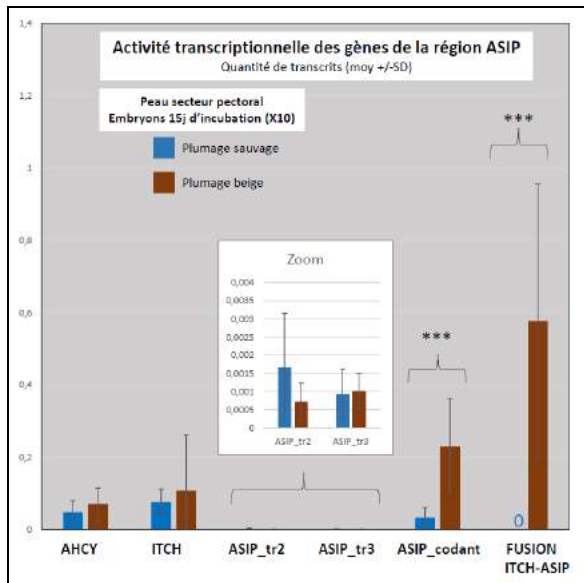
Chez la caillie beige, la duplication en tandem d'un segment conduit sur un brin à la présence de l'exon 1 dupliqué d'ITCH suivi d'une nouvelle copie tronquée du gène ASIP, et à une seconde copie du gène AHCY sur l'autre brin.

Après avoir séquencé dans des prélèvements de peau d'embryon de 15 jours, les trois transcrits d'ASIP et le transcrit d'ITCH chez la caillie, nous avons caractérisé le transcrit du gène de fusion : ce transcrit contient l'exon 1 (NC) d'ITCH et les 3 exons codants d'ASIP. Les exons non codants n°4 et n°5 d'ASIP ne sont pas incorporés dans le transcrit de fusion. Le gène de fusion peut aussi proposer des transcrits ASIP_tr2 et ASIP_tr3, mais nous n'avons aucun moyen de les différencier de ceux issus de la première copie du gène. Après avoir testé plusieurs prélèvements de peau d'embryons, le prélèvement de peau du secteur pectoral, a été retenu pour la suite.

2.5. Conséquences sur la transcription des gènes de la région

Nous avons réalisé des PCR quantitatives pour évaluer l'importance des différents transcrits d'ASIP et du gène de fusion dans la responsabilité moléculaire de cette surexpression.

Comme l'avaient déjà montré Hiragaki et coll. (2008) nous observons une différence statistiquement significative des transcrits codants pour ASIP, entre les caillies de phénotype sauvages et les caillies beiges (Figure 7). Le transcrit de fusion ITCH-ASIP n'est retrouvé que chez les caillies beiges (il ne peut d'ailleurs pas exister chez les autres caillies). Ces dosages montrent clairement que c'est la transcription excessive de la copie fusionnée, ITCH-ASIP, en un transcrit de fusion qui aboutit à cet excès de transcrits codants pour une protéine ASIP.

Figure 7 : Evaluation de l'expression des gènes

Les transcrits *ASIP_tr2* et *ASIP_tr3* sont trouvés en quantités très faibles (zoom) alors que le transcrit de fusion n'est trouvé que chez les animaux beiges. Cette étude a été faite dans la peau d'embryons de 15 jours.

Néanmoins nous observons plus de transcrits de fusion que de transcrits contenant les trois exons codants d'ASIP (*ASIP_codant*). Ceci montre qu'il existe probablement une partie de ces transcrits issus du gène de fusion qui se terminent prématurément et qui ne contiennent probablement pas l'ensemble des trois exons codants pour ASIP. La technologie de qPCR ne permet pas de doser le transcrit de fusion autrement qu'en dosant le transcrit contenant l'exon-1 d'ITCH et l'exon-6 d'ASIP (1^{er} exon codant d'ASIP). Les différences de quantités de transcrits *ASIP_tr2*, *ASIP_tr3*, d'AHCY, et d'ITCH ne sont pas significativement différentes entre animaux de phénotypes sauvages et beiges. Il est à noter que le transcrit de fusion est trouvé en plus grande quantité que le transcrit ITCH, alors que ces deux transcrits sont transcrits à partir d'un promoteur ITCH.

2.6. Ressemblances avec les moutons *Merinos*

La région du gène ASIP est particulièrement bien conservée chez les oiseaux mais aussi chez les mammifères (ordre des gènes et orientation). Chez les

moutons *Merinos*, une duplication similaire a déjà été caractérisée (Norris and Whan 2008) : les points de cassure de cette duplication en tandem sont localisés en aval de l'exon-1 d'ITCH et en amont des exons codants d'ASIP et un transcrit de fusion ITCH-ASIP est aussi mis en évidence. Toutefois, le gène ASIP du segment original paraît être inactivé chez les moutons *Merinos* (blancs). Dans le cas de la caille, nous n'avons recueilli aucun élément allant dans ce sens. De plus chez le mouton, on trouve une séquence répétée, de type SINE, aux pieds de chaque répétition et il est possible de trouver des animaux présentant plusieurs répétitions de ce segment génomique.

CONCLUSION

Une duplication de près de 71 kb dans la région d'ASIP a été mise en évidence chez les cailles beiges et seulement chez celles-ci. La région issue de cette duplication contient deux copies du gène AHCY et surtout un gène issu de la fusion entre le 1^{er} exon d'ITCH (5'NC) et une partie du gène ASIP qui a conservé ses trois exons codants. La transcription de ce gène fusion abouti, en particulier, à un transcrit ITCH-ASIP codant pour une protéine ASIP. Nous avons montré que, chez les animaux beiges, ce transcrit de fusion était le principal transcrit codant pour une protéine ASIP. La surproduction de transcrits codants pour une protéine ASIP normale dans la peau à la base des plumes est très certainement responsable du phénotype de plumage beige.

Le locus ASIP est assez particulier puisque l'on trouve une nouvelle fois le même type de mutations chez un oiseau (caille beige) que chez un mammifère (mouton *Merinos*). En effet on connaissait déjà la délétion mise en évidence chez la souris *Lethal Yellow* qui est très similaire à celle repérée chez la caille *Lethal Yellow* (Nadeau et al. 2008).

D'un point de vue méthodologique, l'insertion de séquences issues d'un autre locus (comme chez l'Alpaga blanc, (Chandramohan et al. 2013)) aurait été très difficile à mettre en évidence par cette méthode, c'est pourquoi des chercheurs travaillent à la mise au point de techniques de détection par voie bioinformatique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chandramohan, B. et al. 2013. *Gene* (521) 303-310.
 Hiragaki, T. et al.. 2008. *Genetics* (178) 771-775.
 Nadeau, N. J. et al. 2008. *Genetics* (178)777-786.
 Norris, B. J. and V. A. Whan. 2008. *Genome Research* (18) 1282-1293.
 Tsudzuki, M. 2008. *The Journal of Poultry Science* (45) 159-179.
 Tsudzuki, M. et al. 1996. *The Journal of Heredity* (87) 248-2

CRÉATION D'UNE PUCE BASSE DENSITÉ POUR LA SÉLECTION GÉNOMIQUE EN POULE PONDEUSE

Herry Florian^{1,2}, Hérault Frédéric², Varenne Amandine¹, Burlot Thierry¹, Le Roy
Pascale² et Allais Sophie²

¹NOVOGEN, Mauguierand 22800 Le Foeil, ²PEGASE, INRA, Agrocampus Ouest, Domaine
de la Prise 35590 Saint-Gilles

florian.herry@inra.fr

RESUMÉ

La sélection génomique utilise des informations sur les polymorphismes de l'ADN, notamment SNP, en complément des mesures de performances, afin de choisir les futurs reproducteurs parmi un ensemble de candidats à la sélection. Depuis 2013, une puce commerciale de génotypages à haute densité (600 000 marqueurs) de l'espèce poule a permis le développement de la sélection génomique dans les filières ponte et chair. Toutefois, les coûts de génotypages avec cette puce restent élevés pour une utilisation en routine sur un grand nombre de candidats à la sélection. Un des enjeux actuels de la sélection génomique est donc le développement de puces de génotypage de basse densité (dites puces LD) à plus faible coût. Il s'agit pour cela de sélectionner un panel de marqueurs SNP permettant une imputation (prédiction) des génotypes manquants sur puce haute densité (puce HD).

Dans cette optique, différentes études ont été menées afin de choisir la stratégie de génotypages basse densité la mieux adaptée à une lignée de poule pondeuse. Différentes densités de génotypages, plusieurs scénarii de populations et deux logiciels ont été testés. Les puces basse densité ont été construites selon deux stratégies : choix des SNP selon un clustering basé sur un seuil de déséquilibre de liaison ou choix de SNP à intervalles réguliers. Trois critères d'efficacité des imputations ont été comparés : taux d'erreur génotypique, taux d'erreur allélique et corrélation entre génotypes imputés et réels. Le taux d'erreur génotypique s'est révélé un critère plus discriminant que les autres. Le logiciel FImpute apparaît plus intéressant que le logiciel Beagle car c'est un meilleur compromis entre efficacité de l'imputation et temps de calcul. L'étude des différentes puces basse densité montre que les imputations sont meilleures lorsque la densité des SNP augmente, lorsque le seuil de LD augmente et lorsque des SNP avec une faible MAF (Fréquence Allélique Mineure) sont pris en compte. Les études de populations montrent que les imputations sont meilleures lorsque la taille de la population de référence augmente. L'influence du degré d'apparentement entre population de référence et candidats ainsi que l'impact sur la précision des évaluations génomiques restent à approfondir.

ABSTRACT

Design of a low density chip for genomic selection in layer chickens

Genomic selection uses information on DNA polymorphisms, in particular SNP, in addition of performance measures, in order to choose breeders of the next generation among a set of selection candidates. Since 2013, a commercial high density genotyping chip (600000 markers) for chicken allowed the implementation of genomic selection in layer and broiler breeding. However, genotyping costs with this chip still remain high for a routine use on a large number of selection candidates. Consequently, one of the current stakes of genomic selection is the development at a lower cost of low density genotyping chips (LD chips). To do so, a set of SNP markers has to be selected to enable an imputation (prediction) of missing genotypes on a high density chip (HD chip).

In this regard, various studies were conducted to choose the low density genotyping strategy the best suited to laying hens line. Different genotyping densities, several population scenarii and two software were tested. Low density genotyping chips were built according to two strategies: a choice of SNP depending on a clustering based on linkage disequilibrium threshold or a choice of SNP at regular intervals. Three criteria of imputation accuracy were compared: genotypic error rate, allelic error rate and correlation. The genotypic error rate appeared to be a criterion more discriminating than the others. FImpute software is preferred to Beagle software because FImpute is a better compromise between imputation accuracy and calculation time. The study of different low density genotyping chips shows that imputations improve with SNP density, when the LD threshold increases and when SNP with low MAF (Minor Allele Frequency) are considered. Population studies show that imputations are better when the size of the reference population increases. The influence of the kinship degree between reference population and target population, and the impact on accuracy of genomic evaluations still remain to be deepened.

INTRODUCTION

Les années 2000 ont été marquées par l'utilisation massive des SNP pour le génotypage suite à la publication des génomes de référence pour de nombreuses espèces d'élevage. Au sein d'une population, les SNP correspondent à des changements d'une seule base (A, T, G ou C), à un locus donné, très fréquents et apparaissant de façon régulière le long de l'ADN. Depuis 2013, une puce commerciale de génotypages à haute densité (HD) (600 000 SNP) de l'espèce poule (Kranis et al., 2013) a permis le développement de la sélection génomique dans les filières ponte et chair. Avec la connaissance des génotypes et performances d'une population de référence, il est possible d'estimer la valeur génomique d'un individu dont on ne connaît que le génotype. L'objectif principal est de choisir parmi l'ensemble des candidats à la sélection de la génération n les meilleurs individus reproducteurs pour un ou plusieurs caractères qui permettront de produire les individus de la génération $n+1$.

Toutefois, les coûts de génotypages avec une puce HD restent élevés pour une utilisation en routine sur un grand nombre de candidats à la sélection. Un des enjeux de la sélection génomique est donc de développer des puces à SNP basse densité (LD) à plus faible coût. À partir des génotypages des candidats obtenus avec une puce LD, la technique de l'imputation permet de remonter aux génotypages HD des candidats à la sélection. L'imputation consiste à prédire les génotypages HD des candidats à la sélection à partir de leur génotypages LD et des génotypages HD de la population parentale. Cette technique s'appuie sur les règles de la transmission mendélienne et sur le déséquilibre de liaison (DL).

De nombreux travaux ont été menés jusqu'à aujourd'hui, aussi bien en filière bovine, porcine, ovine et avicole. Ces travaux ont été menés sur différents logiciels dont FImpute (Sargolzaei et al., 2014) et Beagle (Browning and Browning, 2016) et ont étudié plusieurs facteurs pouvant influencer la qualité des imputations. Ces facteurs doivent être pris en compte pour créer une puce LD et pour obtenir de bons résultats d'imputation. La densité de SNP sur les puces LD (Dassonneville et al., 2012), le seuil de déséquilibre de liaison utilisé pour la construction des puces LD (Hozé et al., 2013), l'intégration de SNP avec une faible MAF (Hayes et al., 2012 ; Heidaritabar et al., 2015), la taille de la population de référence ou le degré d'apparentement entre population de référence et population candidate (Hozé et al., 2013 ; Heidaritabar et al., 2015) sont des facteurs identifiés dans la littérature comme influençant la qualité des imputations et ayant un impact sur la précision des évaluations génomiques (Dassonneville et al., 2011 ; Heidaritabar et al., 2014 ; Wolc et al., 2014). Toutefois, les particularités du génome aviaire notamment en matière de structure du DL n'ont pas été totalement explorées. L'objectif de

cette étude est donc de déterminer quelle est la stratégie de construction de puce basse densité la mieux adaptée au monde avicole.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1 Population d'étude

La population d'étude est constituée de trois générations de coqs et de poules pondeuses issues d'une lignée pure commerciale créée et sélectionnée par la société Novogen du Groupe Grimaud (Le Foeil, 22). La première génération (G0) est constituée de 437 coqs dont 134 ont été mis en reproduction pour produire la deuxième génération (G1), constituée de 565 coqs dont 125 sont les pères de la troisième génération (G2). Cette dernière génération est constituée de 132 coqs et 635 poules pondeuses.

Des prises de sang ont été réalisées au niveau de la veine brachiale des animaux et l'ADN a été extrait et hybridé sur la puce de génotypage 600K Affymetrix® Axiom® HD par le laboratoire Ark-Genomics (Édimbourg, Royaume-Uni). Au total, l'ensemble des animaux a été génotypé pour 580 961 SNP. Les génotypages ont ensuite été filtrés par un contrôle qualité permettant de retenir 282 928 SNP informatifs pour les analyses, répartis sur les macro-chromosomes (1 à 5), les chromosomes intermédiaires (6 à 10), les micro-chromosomes (11 à 33) et le chromosome sexuel Z. Ces SNP sont désignés sous l'appellation 300K par la suite.

1.2 Simulation des puces basse-densité

À partir de la puce 300K, sept puces ont été simulées en « effaçant » une partie des génotypages, le but étant d'imputer les génotypages manquants. Deux méthodologies intra-chromosomes ont été utilisées pour construire les puces :

- La méthode « équadistante », consistant à sélectionner des SNP à intervalles réguliers. 3 puces ont été créées : la puce 20Kequi (18 196 SNP), la puce 10Kequi (9 352 SNP) et la puce 3Kequi (3 337 SNP).
- La méthode « DL », consistant à sélectionner des SNP en se basant sur le DL entre SNP. La sélection des SNP se fait sous R avec le package hclust et la méthode « Ward.D » à partir de la matrice des R^2 obtenue avec Plink. Cette méthode permet d'obtenir des clusters de SNP en très fort DL les uns avec les autres en maximisant la variance inter-cluster et en minimisant la variance intra-cluster. 4 puces ont été créées en fonction du seuil de DL étudié : la puce DL 0.5 (9 820 SNP), la puce DL 0.2 (5 224 SNP), la puce DL 0.1 (3 988 SNP) et la puce DL 0.05 (3 357 SNP).

Enfin, une puce supplémentaire a été créée en ajoutant sur la puce DL 0.5 294 SNP marqueurs de QTL affectant des caractères de production et de qualité des œufs. Il s'agit de la puce QTL (10 114 SNP).

1.3 Scénarii populations

Quatre scénarii de taille et de relations de parenté différentes ont été étudiés. Les générations constituant les populations de référence et candidate sont détaillées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Détail des populations de référence et candidate en fonction des scénarii

Scénario	Référence	Candidats
Utopige	G0	G1
Population totale	G0 - G1	G2
G1 → G2	G1	G2
Saut de génération	G0	G2

Utopige correspond au nom d'un projet ANR à l'origine de la mise en place d'une sélection génomique pour l'entreprise et qui a utilisé G0 et G1 comme population d'étude.

1.4 Stratégies d'imputation étudiées

6 stratégies d'imputations différentes ont été étudiées. À partir des puces, nous avons étudié l'effet :

- de la densité des SNP sur les puces LD,
- du seuil de DL utilisé pour construire les puces,
- de l'intégration de SNP marqueurs de QTL à effets forts,
- de l'intérêt de choisir les SNP sur la notion de distance entre SNP ou bien sur le seuil de DL.

Enfin à partir des scénarii population, nous avons étudié l'effet :

- de la taille de la population de référence,
- du degré d'apparentement entre population de référence et population candidate.

1.5 Logiciels étudiés

Les performances des logiciels FImpute V2.2 (Sargolzaei et al., 2014) et Beagle V4.1 (Browning and Browning, 2016) en termes de temps de calcul et d'efficacité d'imputation ont été comparées sur le scénario Utopige.

1.6 Mesure d'efficacité de l'imputation

Quatre critères sont pris en compte pour mesurer l'efficacité de l'imputation (Dassonneville et al., 2012) :

- Taux d'erreur génotypique : différences par SNP entre les génotypes HD et les génotypes imputés. Si les génotypes diffèrent d'un ou deux allèles, une erreur complète est comptabilisée.
- Taux d'erreur allélique : si les génotypes ne diffèrent que d'un allèle, une demi-erreur est alors comptabilisée.
- Corrélations : Calcul par SNP des corrélations de Pearson entre génotypes HD et génotypes imputés.
- Impact sur les évaluations génomiques de trois caractères aux déterminismes génétiques différents (intensité de ponte, couleur de coquille, poids

d'œufs) (Romé et al., 2015) : calcul des corrélations de Spearman sur les 150 candidats ayant la plus grande GEBV (Genomic Estimated Breeding Value) à partir des génotypes HD afin d'évaluer leur éventuel reclassement selon leur GEBV calculée à partir des génotypes imputés.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1 Comparaison des mesures d'efficacité de l'imputation

Les mesures d'efficacité de l'imputation ont été comparées sur le scénario Utopige pour les puces DL 0.5, QTL et 10Kqui, avec FImpute. On constate que le taux d'erreur génotypique pour la puce 10Kqui est de 3.08%, taux supérieur à celui de la puce DL 0.5 (2.36%), et celui de la puce QTL (2.31%). Des résultats similaires sont obtenus en utilisant le taux d'erreur allélique ou les corrélations. Le taux d'erreur génotypique reste cependant plus intéressant car plus discriminant. De plus, on peut aussi considérer que si l'imputation est mauvaise au niveau d'un des deux allèles, cela pourra avoir des conséquences importantes si elle concerne un SNP à effet fort. Enfin, il est intéressant de noter que le taux d'erreur génotypique est 1.98 fois supérieur au taux d'erreur allélique ce qui indique que la majorité des erreurs d'imputation est une erreur au niveau d'un seul allèle.

2.2 Comparaison des logiciels

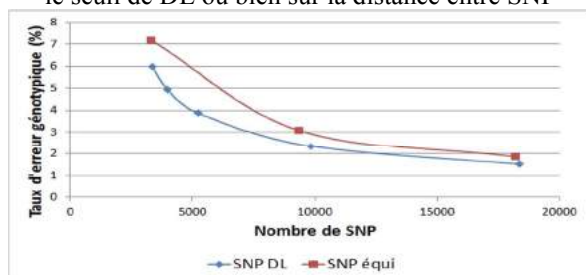
Une comparaison du taux d'erreur génotypique obtenu avec les deux logiciels testés est réalisée sur le scénario Utopige pour les puces DL 0.5, QTL et 10Kqui. On constate que les résultats sont meilleurs sur les trois puces avec Beagle avec des taux d'erreurs génotypiques de 1.98%, 1.55% et 1.54% pour les puces 10Kqui, DL 0.5 et QTL, respectivement. Le classement des puces reste inchangé.

Toutefois, le temps mis par Beagle pour réaliser l'imputation sur la puce QTL est supérieur à 24h contre seulement moins de 4min pour FImpute, ce qui explique l'utilisation de FImpute par la suite. Ces résultats sont bien en accord avec ceux indiqués par Sargolzaei et al. (2014). Ainsi, une utilisation en routine de Beagle sur l'ensemble des candidats à la sélection sera compliquée compte tenu du temps de calcul et du gain en terme d'efficacité qui ne justifient pas une telle contrainte.

2.3 Influence de la densité de marqueurs

La Figure 1 illustre sur le scénario Utopige l'évolution du taux d'erreur génotypique en fonction du nombre de SNP présents sur la puce LD. On constate, pour les deux méthodologies utilisées une diminution du taux d'erreur avec une augmentation du nombre de SNP sur les puces LD. Avec des SNP choisis selon le DL, pour 3 357 SNP et 9 820 SNP, les taux d'erreurs sont

Figure 1. Évolution du taux d'erreur génotypique en fonction du nombre de SNP pour des puces basées sur le seuil de DL ou bien sur la distance entre SNP

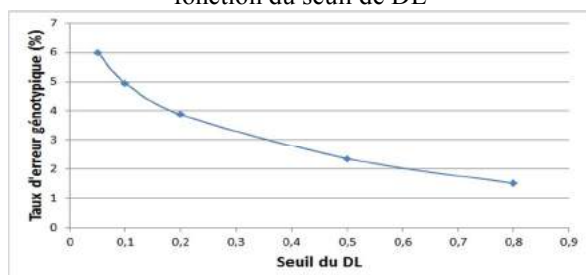


respectivement de 6.00% et 2.36%. De même avec des SNP équidistants, pour 3 337 SNP et 9 352 SNP, les taux d'erreurs sont respectivement de 7.18% et 3.18%. Avec un plus grand nombre de SNP sur puces LD, le nombre de génotypes présents permettant d'identifier les haplotypes de référence correspondants augmente, ce qui diminue la probabilité d'identifier par hasard des haplotypes en commun entre les populations de référence et candidate (Dassonneville et al., 2012).

2.4 Influence du seuil de déséquilibre de liaison

La Figure 2 montre que, pour les puces DL 0.05, DL 0.2 et DL 0.5, les taux d'erreurs génotypiques sont respectivement de 6.00%, 3.88% et 2.36%. Le taux d'erreur diminue avec une augmentation du seuil de DL. Or avec une augmentation du seuil de DL, le nombre de SNP sur les puces augmente. Pour les mêmes raisons que précédemment, le taux d'erreur diminue avec l'augmentation du nombre de SNP sur puces LD. De plus, en augmentant le seuil de DL, un SNP fortement associé aux autres SNP du cluster dans lequel il se trouve est choisi comme représentant du cluster. C'est un « bon » SNP pour l'imputation.

Figure 2. Évolution du taux d'erreur génotypique en fonction du seuil de DL



2.5 Influence des marqueurs avec faible MAF

Avec la comparaison des mesures d'efficacité de l'imputation, il a été observé que la puce QTL présentait un taux d'erreur génotypique plus faible que la puce DL 0.5 (2.31% contre 2.36%). Cette amélioration s'explique par les 294 SNP supplémentaires, marqueurs de QTL à effets forts, inclus sur la puce LD. Cela s'explique aussi par la faible MAF des 294 SNP supplémentaires qui seront

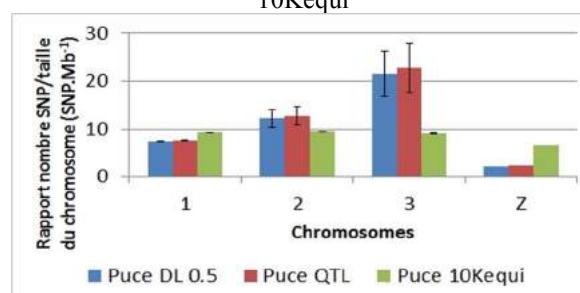
alors moins bien imputés car ne sont pas forcément retrouvés dans la population de référence, ce qui aboutit à une mauvaise imputation. Les prendre en compte améliore la qualité des imputations.

2.6 Choix de la méthodologie de sélection des SNP

Il ressort des études précédentes que la méthodologie DL, tout en tenant compte des marqueurs avec une faible MAF, serait, à densité de SNP équivalente, la plus adaptée pour obtenir de bons résultats d'imputation.

En effet, avec la méthodologie équidistante, le nombre de SNP retenus sur la puce LD est proportionnel à la taille du chromosome, ce qui n'est pas le cas avec la méthodologie DL (Figure 3). Cela s'explique par une persistance du DL différente entre les macro-chromosomes et les micro-chromosomes (Robert et al., 2015). La persistance du DL diminue des macro-chromosomes aux micro-chromosomes. Il faut donc, en proportion, un plus grand nombre de SNP sur les micro-chromosomes pour couvrir tout le chromosome. En rajoutant en plus des SNP avec une faible MAF, on améliore les résultats pour chaque type de chromosome. La puce QTL construite avec la méthodologie DL et tenant compte de marqueurs avec une faible MAF serait donc la mieux adaptée pour obtenir de bonnes imputations.

Figure 3. Évolution du rapport Nombre de SNP/Taille du chromosome en fonction du type de chromosome sur le scénario Utopige pour les puces DL 0.5, QTL et 10Kequi



1 : Macro-chromosomes (1 à 5) ; 2 : Chromosomes intermédiaires (6 à 10) ; 3 : Micro-chromosomes (11 à 33) ; Z : chromosome sexuel Z

2.7 Effet de la taille de la population de référence

En comparant le scénario « Utopige » avec le scénario « Population totale », nous avons pu étudier l'effet d'une augmentation de taille de la population de référence sur l'imputation des puces DL 0.5, QTL et 10Kequi. On constate ainsi, pour les trois puces, une amélioration du taux d'erreur génotypique qui passe de 3.08% à 2.33% pour la puce 10Kequi, de 2.36% à 2.03% pour la puce DL 0.5 et de 2.31 à 2.00% pour la puce QTL. Le classement des puces reste inchangé. En effet, une augmentation de la taille de la population de référence augmente la taille de la librairie d'haplotypes de référence. La probabilité

d'identifier par hasard, pour un candidat, un mauvais haplotype dans la librairie de référence diminue.

2.8 Effet des relations de parenté entre les populations de référence et candidates

Sur le scénario « Saut de génération », on constate que le taux d'erreur génotypique augmente par rapport aux deux scénarii précédents pour la puce 10Kequi en passant à 3.33%. Plus les individus sont proches en terme de parenté, plus ils ont en commun des fragments d'haplotypes de grandes tailles. En conséquence, la probabilité d'identifier par hasard un mauvais fragment d'haplotype pour un candidat diminue, ce qui permet d'obtenir de bonnes imputations. À l'inverse, en diminuant les relations de parenté (en sautant une génération par exemple), on va donc dégrader le taux d'erreur génotypique (Dassonneville et al., 2011 ; Hayes et al., 2011 ; Hozé et al., 2013). Or, pour les puces DL 0.5 et QTL, avec un saut de génération, les taux d'erreurs diminuent (1.78% et 1.74% respectivement). Ce résultat surprenant peut s'expliquer par une différence de comportement entre les puces équidistantes construites avec une méthodologie mendélienne et les puces basées sur le DL construites avec une méthodologie populationnelle.

2.9 Impact sur les évaluations génomiques

Les sélectionneurs travaillant sur un classement des individus les uns par rapport aux autres, les corrélations de Spearman (rang) ont été calculées sur les 150 candidats ayant les meilleurs résultats d'évaluations à partir des génotypes HD afin d'étudier leur éventuel reclassement selon leurs résultats obtenus à partir des génotypes imputés. Il est noté, pour les trois caractères étudiés (intensité de ponte, couleur de la coquille et poids d'œufs), une diminution significative des corrélations avec une diminution du nombre de SNP sur puces LD quand on compare la puce 10Kequi (9 352 SNP) avec la 3Kequi (3 337 SNP). De même, une baisse significative des résultats est observée entre la puce DL 0.5 et DL 0.05.

Les corrélations entre GEBV diminuent lorsque le nombre de SNP sur puces LD et le déséquilibre de liaison diminuent, et donc lorsque les imputations sont moins bonnes.

En revanche, à densité de SNP équivalente, les résultats sont meilleurs significativement pour la puce 10Kequi comparée à la puce DL 0.5 et QTL pour la couleur de coquille (0.9695 contre 0.9460 et 0.9499) et le poids d'œufs (0.9855 contre 0.9741 et 0.9755). De même pour la puce 3Kequi comparée avec la puce DL 0.05, les résultats sont significativement meilleurs pour la couleur de coquille avec la puce 3Kequi. Et cela malgré des taux d'erreurs plus élevés sur les puces équidistantes comparées aux puces DL.

Trois hypothèses peuvent être avancées et seront à étudier par la suite. La première est que certaines erreurs d'imputations pourraient avoir plus d'importance que d'autres. Se tromper sur un SNP à effet fort peut avoir plus de conséquences que de se tromper un SNP à effet plus faible sur les caractères étudiés. La deuxième est que des erreurs techniques pourraient se produire en laboratoire lors du génotypage HD et subsister malgré le contrôle qualité. La dernière est que les évaluations génomiques sont réalisées en BLUP Single Step (Legarra et al, 2009), méthode qui favoriserait alors les puces équidistantes.

CONCLUSION

Cette étude a permis de poser les bases d'une problématique qui sera à approfondir par la suite : faut-il choisir une puce LD construite sur le seuil du DL ou bien sur la notion de distance entre SNP ? En effet, des taux d'erreurs plus faibles sont obtenus avec les puces DL plutôt que les puces équidistantes. Toutefois l'objectif de la sélection génétique est de choisir les individus ayant le meilleur potentiel génétique pour les caractères étudiés. Nous avons pu constater que les résultats des évaluations génomiques étaient meilleurs, à densité de SNP équivalente, pour les puces équidistantes. Conclure sur l'intérêt d'utiliser une puce basée sur le seuil de DL ou bien sur la notion de distance entre SNP est donc actuellement compliqué.

BIBLIOGRAPHIE

1. Browning B.L. et Browning S.R., 2016. *Am. J. Hum. Genet.* Vol. 98, n° 1, pp. 116-126.
2. Dassonneville R., Brøndum R.F., Druet T. et al., 2011. *J. Dairy Sci.* Vol. 94, n° 7, pp. 3679-3686.
3. Dassonneville R., Fritz S., Ducrocq V. et al., 2012. *J. Dairy Sci.* Vol. 95, n° 7, pp. 4136-4140.
4. Hayes B.J., Bowman P.J., Daetwyler H.D. et al., 2012. *Anim. Genet.* Vol. 43, n° 1, pp. 72-80.
5. Heidaritabar M., Calus M.P.L., Vereijken A. et al., 2014. *10th W.C.G.A.L.P.* pp. 3.
6. Heidaritabar M., Calus M.P.L., Vereijken A. et al., 2015. *BMC Genet.* Vol. 16, n° 1, pp. 101-114.
7. Hozé C., Fouilloux M.N., Venot E. et al., 2013. *Genet Sel Evol.* Vol. 45, n° 1, pp. 33-43.
8. Kranis A., Gheyas A.A., Boschiero C. et al., 2013. *BMC Genom.* Vol. 14, n° 1, pp. 59-71.
9. Legarra A., Aguilar I. et Misztal I., 2009. *J. Dairy Sci.* Vol. 92, n° 9, pp. 4656-4663.
10. Romé H., Varenne A., Hérault F. et al., 2015. *Genet. Selec. Evol.* Vol. 47, n° 1, pp. 83-93.
11. Sargolzaei M., Chesnaïs J.P. et Schenkel F.S., 2014. *BMC Genom.* Vol. 15, n° 1, pp. 478.
12. Wolc A., Kranis A., Arango J. et al., 2014. *10th W.C.G.A.L.P.* pp. 6.
13. Robert R., Hérault F., Romé H. et al., 2015. *9th E.S.P.G.* pp. 43.

CRÉATION D'UNE PUCE BASSE-DENSITÉ POUR LA SÉLECTION GÉNOMIQUE EN POULE PONDEUSE

Herry Florian^{1,2}, Hérault Frédéric², Varenne Amandine¹, Burlot Thierry¹, Le Roy Pascale² et Allais Sophie²

¹NOVOGEN, 22800 Le Foeil, ²PEGASE, INRA, Agrocampus Ouest, 35590 Saint-Gilles

INTRODUCTION

Depuis 2013, une puce commerciale de génotypages à haute densité (HD) de 600 000 SNP pour l'espèce poule est disponible et permet la mise en place de la sélection génomique dans cette espèce. Toutefois, les coûts de génotypages avec cette puce restant élevés, seuls les reproducteurs peuvent être génotypés en routine sur cette puce. Un génotypage sur puce basse densité (BD), à coût réduit, doit être envisagé sur les candidats à la sélection qui sont très nombreux. Si les marqueurs sont bien choisis, l'imputation permet ensuite de déduire les génotypes manquants sur puce HD.

L'objectif de cette étude est de choisir la stratégie de génotypages basse densité la mieux adaptée à la lignée de poule pondeuse considérée, afin d'optimiser à la fois précision des évaluations génomiques des candidats et coût du schéma de sélection.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Population d'étude :

Étude de deux générations de coqs d'une lignée de poules pondeuses de la société Novogen du groupe Grimaud, génotypés sur puce HD (Figure 1). Après contrôle qualité, 282 928 SNP sont retenus et répartis sur les macro-chromosomes (1 à 5), les chromosomes intermédiaires (6 à 10), les micro-chromosomes (11 à 33) et le chromosome Z.

Puce basse densité :

Simulation de 8 puces basse densité (Tableau 1) selon deux méthodologies intra-chromosomes.

- Méthodologie « équidistante » : Sélection de SNP à intervalles réguliers.
- Méthodologie « DL » : Sélection de SNP en fonction du DL entre SNP, par clustering hiérarchique.

Stratégies d'imputation : utilisation du logiciel Fimpute (Sargolzaei et al., 2014)

À partir des puces, étude de l'effet de la densité des SNP sur puces BD, du seuil de DL utilisé pour construire les puces, et de la méthodologie utilisée sur le taux d'erreur génotypique.

Évaluations génomiques : utilisation de la méthode du BLUP Single Step (Legarra et al., 2009)

- Évaluations génomiques des candidats sur trois caractères bien distincts : intensité de ponte, poids d'œuf et couleur de la coquille des œufs (Lab).
- Comparaison des classements des 150 meilleurs individus obtenus avec les génotypages HD et les génotypages imputés.

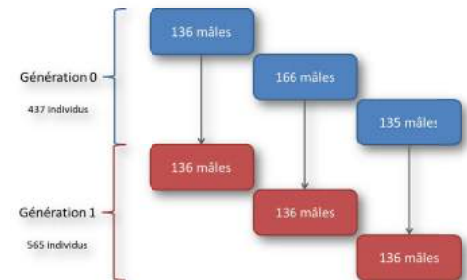


Figure 1 : Structure de la population d'étude

Méthodologie	Puce	Nombre de SNP
Équidistante	20Kequi	18 196
	10Kequi	9 352
	3Kequi	3 337
Déséquilibre de liaison (DL)	DL 0.8	18 359
	DL 0.5	9 820
	DL 0.2	5 224
	DL 0.1	3 988
	DL 0.05	3 357

Tableau 1 : Récapitulatif des puces étudiées

RÉSULTATS ET DISCUSSION

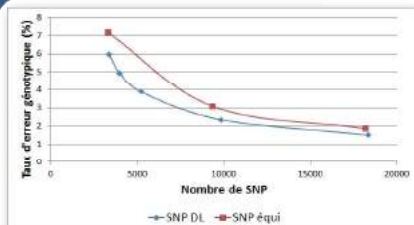


Figure 2 : Évolution du taux d'erreur génotypique en fonction du nombre de SNP sur puces BD

Influence de la densité de marqueurs :

- Diminution du taux d'erreur génotypique avec une augmentation du nombre de SNP (Figure 2).
- Valable pour les deux méthodologies.

Influence du seuil de déséquilibre de liaison :

- Diminution du taux d'erreur génotypique avec une augmentation du seuil de DL (Figure 3).
- En augmentant le seuil de DL, le nombre de SNP sur puce BD augmente. L'augmentation du seuil de DL permet également de choisir un SNP encore plus représentatif de son groupe.

Choix de la méthodologie :

- Méthodologie équidistante : nombre de SNP retenus sur puce LD proportionnel à la taille du chromosome (Figure 4).
- Méthodologie DL : Prise en compte de la structure particulière du DL de l'espèce poule et de la persistance du DL plus faible sur les micro-chromosomes que sur les macro-chromosomes.
 - Un plus grand nombre de SNP est nécessaire sur les micro-chromosomes pour couvrir tout le chromosome (Figure 4).
- Méthodologie DL qui semble la plus adaptée pour obtenir des bonnes imputations.

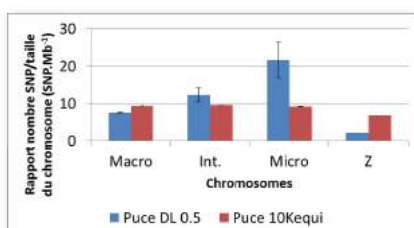


Figure 4 : Évolution du rapport Nombre de SNP/Taille du chromosome en fonction du type de chromosome pour les puces DL 0.5 et 10Kequi

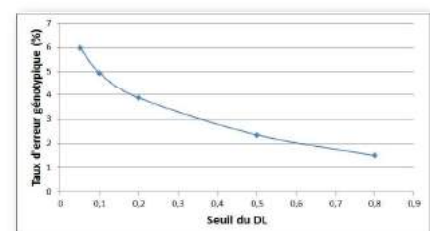


Figure 3 : Évolution du taux d'erreur génotypique en fonction du seuil de DL

Impact sur les évaluations génomiques :

- Le but de l'évaluation génomique est de classer les individus les uns par rapport aux autres.
- Pour les trois caractères étudiés, diminution significative des corrélations avec une diminution du nombre de SNP sur puces BD ainsi qu'avec une diminution du seuil de DL.
- À densité de SNP équivalente, résultats meilleurs significativement pour la puce 10Kequi comparée à la puce DL 0.5 pour la couleur de coquille (0.9695 contre 0.9460) et le poids d'œuf (0.9855 contre 0.9741).
- De même, résultats significativement meilleurs pour la couleur de coquille avec la puce 3Kequi (par rapport à la puce DL 0.05).

- Meilleurs résultats d'imputation obtenus avec les puces DL.
- Résultats des évaluations génomiques, à densité de SNP équivalente, meilleurs pour certains caractères avec les puces équidistantes.
- Nécessité d'étudier l'influence de la méthodologie d'évaluation sur ces résultats.

METHODES DE GESTION DES POPULATIONS A PETITS EFFECTIFS

**Hervé Chapuis¹, Alnahhas Nabeel², Maryse Boulay²,
Estelle Vanbergue², Daniel Guémené²**

¹*INRA, UMR 1388 INRA-INPT GenPhySE - 24 Chemin de Borde Rouge - 31326 CASTANET TOLOSAN*

²*SYSAAF, Unité de Recherches Avicoles, Centre INRA Val de Loire, 37380 NOUZILLY
herve.chapuis@inra.fr*

RÉSUMÉ

Qu'il s'agisse de lignées commerciales, expérimentales ou de races locales, les populations à faibles effectifs doivent concilier la recherche d'un progrès génétique (ou au moins du maintien des caractéristiques à un niveau acceptable) et la préservation de la variabilité. L'obtention d'un progrès immédiat sans hypothéquer les gains futurs est le propre de chaque démarche de sélection, mais est ici plus délicate et requiert des méthodes adaptées. Par simulation nous comparons différentes méthodes de choix des reproducteurs et de construction des plans d'accouplement, pour une population composée de 15 pères, chacun accouplé à 3 femelles, chaque couple produisant en moyenne 3 descendants de chaque sexe. Les générations sont successives et répétées jusqu'à 30 cycles de sélection. La méthode de référence pour les choix de reproducteurs consiste à trier les candidats intra famille, après une troncature arbitraire sur l'index secondaire visant à limiter sa dégradation. Elle permet d'assurer un compromis honorable entre le gain sur l'objectif de sélection et la pente d'augmentation de la consanguinité. Les méthodes optimisées, s'appuyant sur l'algorithme du recuit simulé et agissant sur le mode de sélection pour minimiser l'apparentement moyen et/ou sur la constitution des plans d'accouplements pour minimiser la consanguinité attendue, permettent d'améliorer les indicateurs du gain génétique et ceux de la variabilité sur le moyen et le long terme, en particulier quand l'objectif de sélection fait intervenir des caractères négativement corrélés entre eux (l'évolution nulle du second caractère est alors explicite). L'optimisation des plans d'accouplement, sans modifier significativement le taux d'accroissement de la consanguinité, se traduit principalement par un retard, visible sur les graphes, dans le point d'apparition de la consanguinité. Par ailleurs, interdire l'accouplement d'un mâle à des femelles apparentées entre elles ne réduit pas significativement ce taux, même s'il contribue probablement à atténuer les conséquences des accidents d'élevage (par exemple mort ou infertilité d'un mâle). La modélisation suggère que les informations données par le pedigree ne permettent de stabiliser les indicateurs qu'en cumulant au moins 10 générations.

ABSTRACT

Monitoring Small Poultry Populations Using Simulated Annealing Algorithms.

When dealing with small populations, which may be the case of local breeds or experimental lines, combining immediate genetic gain and preservation of genetic variability is a well-known issue, which requires relevant methods. Using stochastic simulation, we compared various methods of selection and mating allocation in a population obtained from 15 sires, each mated with 3 dams. Each full-sib family consisted of 3 male and 3 female offspring. Up to 30 successive selection cycles were simulated. Reference selection method consisted in sorting the male and female candidates on the main objective, within sire and dam families respectively, after truncation on the ancillary objective. It actually led to an acceptable trade-off between genetic gain and inbreeding rate. Optimized methods, based on Simulated Annealing Algorithm, can be used both for the selection of breeding animals, in order to reduce their average co-ancestry, and on mating allocation, in order to minimize the expected inbreeding. They thus improved both genetic gain and genetic variability indicators, especially when the breeding objective included antagonist traits. The optimization of mating allocation did not significantly affect the inbreeding rate, but delayed the onset of inbreeding by four generations. Preventing the mating of related females to the same sire did not significantly reduce the inbreeding rate. This avoidance practice should nevertheless be perpetuated, lest a deficient sire would reduce the progeny of a complete dam family to zero. Finally, results suggested that pedigree depth should exceed 10 generations to ascertain reliability of pedigree-based genetic variability indicators.

INTRODUCTION

Depuis la généralisation de l'utilisation du « BLUP modèle animal » en sélection, dans les années 1990, la préservation de la variabilité génétique, « carburant » des progrès futurs est devenue sujet de nombreux travaux (Wooliams et Thompson, 1994 ; Meuwissen et Wooliams 1994, Brisbane et Gibson, 1995 ; Wray et Goddard, 1994 ; Meuwissen, 1997). En effet, si le BLUP exploite de façon optimale l'information généalogique pour fournir les prédictors les plus précis de la valeur génétique des candidats, il conduit aussi à attribuer des valeurs similaires à des fratries entières, spécialement pour les caractères peu héréditaires. Ce phénomène est d'autant plus notable dans les populations avicoles, avec un schéma d'accouplement hiérarchique (1 mâle est accouplé à un « parquet » de plusieurs femelles, une femelle avec un seul mâle). Sur la base du BLUP, on sélectionne (ou on écarte donc) des familles entières, ce qui peut entraîner un appauvrissement de la base de sélection.

Il est maintenant convenu d'agir sur deux leviers. D'abord le choix des reproducteurs pour concilier l'obtention d'un gain génétique et le maintien de la parenté moyenne à des valeurs acceptables. Ensuite la recherche d'un plan d'accouplement qui minimise la consanguinité attendue aux générations suivantes.

Dans le cas de populations de petite taille, telles que les lignées expérimentales ou les races locales, caractérisées par un faible nombre de reproducteurs, ces problématiques ont encore plus d'acuité. Des méthodes de gestion adaptées sont donc requises.

L'objectif de cette étude est de présenter l'intérêt opérationnel des méthodes qui s'appuient sur l'algorithme du Recuit Simulé (Kirkpatrick *et al*, 1983) pour agir simultanément sur les deux leviers précités.

1. MATERIELS ET METHODES

Notre démonstration est basée sur des simulations de populations *in silico*, qui permettent de mimer le fonctionnement de populations fictives comme s'il s'agissait d'une population réelle. On crée alors un fichier de pedigree et de performances, ce qui permet de calculer des indices et d'estimer la consanguinité et la taille efficace (voir 1.3).

1.1. Algorithme du recuit simulé.

Dans nos schémas, la théorie des contributions génétiques optimales de Meuwissen (1997) ne s'applique pas facilement à cause des contraintes zootechniques : les contributions sont discrètes (l'animal est choisi ou non) et égales ; une fois choisi, un ♂ va être accouplé à n ♀ et on fait l'hypothèse d'un nombre égal de descendants (les

périodes de ramassage des œufs ne sont pas plus longues pour les meilleurs). Un algorithme adapté aux contributions discrètes était donc nécessaire. L'algorithme du Recuit Simulé (RS) s'est imposé par sa grande modularité. Il consiste, en partant d'un état donné, à tester de multiples permutations et à retenir celles qui le font évoluer vers l'objectif recherché. L'originalité de cet algorithme est qu'il peut également accepter des permutations qui momentanément dégradent l'objectif, ce qui lui permet d'explorer plus de solutions possibles, afin d'éviter le piège des optimums locaux. Le nom donné s'inspire d'un phénomène connu en métallurgie : pour assurer la solidité d'un alliage (qui est l'objectif), le refroidissement (que l'on assimile à la progression de l'algorithme) peut être interrompu par des phases de réchauffement (ou recuit). Dans sa version native, cet algorithme peut optimiser des fonctions simples : minimisation de l'appareillement moyen des reproducteurs sélectionnés (premier levier) ou de la consanguinité attendue après accouplement des reproducteurs (second levier). On peut également l'utiliser dans des cas d'optimisation sous contraintes (Colleau *et al*, 2004), ce qui est particulièrement adapté dans le cas présent (Chapuis *et al*, 2014 et 2016) pour maximiser un objectif principal sous la double contrainte de maintenir des objectifs secondaires à des niveaux désirés et l'accroissement de la consanguinité à une valeur acceptable (RSC = Recuit Simulé sous Contraintes).

1.2. Population simulée et scénarios étudiés.

La simulation mime une population réaliste, pour laquelle des effectifs similaires sont observés dans des races locales ou des lignées expérimentales de volailles. Chaque génération est constituée de 15 reproducteurs ♂, chacun accouplé à 3 ♀. Chaque couple ainsi constitué a en espérance 3 descendants de chaque sexe. Les cycles de sélection sont répétés sur 30 générations. 2 caractères modérément héréditaires ($h_1^2 = 0,4$ et $h_2^2 = 0,2$) et antagonistes ($\rho_G = \rho_E = -0,25$) sont simulés. En génération 1, la performance moyenne est de 100 pour chacun des caractères, avec un écart type de 10. Le premier caractère (objectif de sélection) est mesuré sur tous les candidats, tandis que le second, mesuré uniquement sur les femelles, est assimilé à un caractère de ponte, que l'on cherche à ne pas dégrader. Pour la sélection des individus, un scénario de référence (REF) est comparé aux scénarios optimisés. Dans cette situation, on vise l'amélioration de l'objectif tout en contrôlant l'augmentation de la consanguinité en procédant au tri intra-famille de père (candidats ♂) et intra famille de mères (candidates ♀). Afin de limiter la dégradation de la ponte, seuls les individus avec une valeur génétique pour le caractère 2 supérieure à un seuil arbitraire sont effectivement candidats.

Ce seuil est ici moins un demi écart type génétique et la condition est donc $u_{i2} > -0.5\sigma_{G2}$, où u_{i2} désigne la valeur génétique estimée et σ_G l'écart type génétique de la ponte.

Les scénarios de choix optimisés sont au nombre de deux. Le premier (BLUP50) vise à maximiser le gain sur le caractère 1 sans dégrader la ponte et en obtenant une pente de consanguinité équivalente à la moitié de celle obtenue en choisissant simplement les candidats avec les meilleurs indices BLUP pour le caractère 1. Le second scénario optimisé (CONSANGT) cherche à minimiser l'apparement des reproducteurs tout en assurant un gain au moins égal au scénario de référence pour le caractère 1 et toujours sans dégrader la ponte.

En agissant sur le second levier (plans d'accouplement), il est aussi possible d'interdire de grouper des sœurs au sein du même parquet. En effet, intuitivement on pense plus efficace sur le court terme de répartir les femelles sans imposer de contraintes, en les associant au mâle qui leur est le moins apparenté. Ce faisant on craint cependant de décaler le problème en créant plus de groupes de cousins à la génération suivante. On a donc comparé 3 scénarios de choix des reproducteurs (REF, BLUP50, CONSANGT) en combinaison avec des accouplements au hasard ou optimisés avec (ou sans) la contrainte portant sur le regroupement des sœurs dans un même parquet.

1.3 Indicateurs utilisés

Pour comparer les scénarios, nous disposons des performances et des valeurs génétiques vraies à chaque génération. Nous pouvons également calculer la consanguinité et l'apparement moyens par génération, ainsi que des indicateurs plus synthétiques de la variabilité génétique : la taille efficace N_e (voir Leroy *et al.*, 2013 pour différentes formules de calcul). Nous avons ainsi calculé, à chaque génération, une taille notée N_e CERV estimée à partir de l'apparement moyen entre individus pris deux à deux (Cervantes *et al.*, 2011). Cet indicateur utilise l'ensemble de l'information pedigree disponible et diffère en cela du N_{eD} « démographique » pour lequel on n'a besoin que du nombre de reproducteurs mâles N_σ et femelles N_φ utilisés, et qui s'appuie sur un choix totalement aléatoire des reproducteurs, ce qui n'est pas le cas ici.

$$N_{eD} = \frac{4 \times N_\sigma \times N_\varphi}{N_\sigma + N_\varphi}$$

Dans nos scénarios où le nombre de reproducteurs est constant (15 ♂ et 45 ♀), $N_{eD} = 45$

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Supériorité des méthodes de choix optimisées

Si la méthode de référence présente l'avantage de la simplicité opérationnelle tout en offrant un compromis acceptable entre progrès sur l'objectif de sélection et évolution de la consanguinité, on constate (figures 1 et 2) que les méthodes optimisées s'appuyant sur le Recuit Simulé offrent de meilleurs résultats sur ces deux indicateurs : BLUP 50 pour les performances et CONSANGT pour la maîtrise de la consanguinité. Par ailleurs, ce sont les seuls scénarios qui effectivement garantissent le maintien à l'identique du niveau génétique sur la ponte. La méthode empirique de référence entraîne une dégradation sur le long terme qui pourrait devenir préjudiciable. Le RSC est par ailleurs le seul algorithme documenté à ce jour permettant d'associer une contrainte à la fois sur l'apparement des reproducteurs et sur le niveau souhaité d'objectifs secondaires.

2.2 Evolution des indicateurs de taille efficace

Trois points importants sont à signaler (figure 3). Primo, un lien existe entre la méthode de gestion et l'évolution au cours du temps de la taille efficace calculée selon les formules de Cervantes *et al.* (2011). Le scénario visant à minimiser explicitement l'apparement moyen des reproducteurs conduit à la taille efficace la plus élevée. Secundo, l'optimisation des accouplements n'a pas le même effet sur la taille efficace, selon que les choix s'appuient ou non sur le Recuit Simulé (et tiennent ainsi explicitement compte de l'apparement des reproducteurs). Enfin, tertio, on constate la grande instabilité de cet indicateur de taille efficace basé sur l'information généalogique, tant que celle-ci est incomplète. Ainsi une augmentation très forte (et contre-intuitive) de la taille efficace est observée au début, tant que l'information marginale apportée par chaque nouvelle génération est importante. Ensuite seulement on observe une stabilisation (REF et CONSANGT) ou une diminution (BLUP50). Ce constat incite à de la prudence quand on estime la taille efficace dans une population. En effet on l'envisage plutôt comme une ressource initiale qui, dans une population fermée, ne peut que diminuer à un rythme plus ou moins soutenu, selon le soin accordé à sa préservation. Or l'estimation de N_e avant d'avoir obtenu une information généalogique suffisante contredit cette supposition. Il semblerait que 5 générations d'ancienneté (seuil usuellement retenu pour considérer l'information pedigree pertinente) ne soit pas suffisant, et qu'il faille lui préférer au moins 10 générations.

2.3 Optimisation des accouplements.

Nos simulations (figure 2) ont démontré l'absence d'effet de l'interdiction d'associer des sœurs à un même mâle (on ne distingue pas les deux types

d'accouplements optimisés). Contrairement à ce qui avait été envisagé, la création de cousins (descendants issus de sœurs) à la génération $n+1$ ne rend pas plus difficile la minimisation ultérieure de la consanguinité. Il n'y a pas davantage d'effets sur les valeurs génétiques, alors qu'on pourrait craindre un moindre brassage des origines et donc une baisse d'efficacité de l'indexation. L'absence d'effet étant démontrée, il est conseillé de continuer à éviter de regrouper les sœurs car la modélisation ne tient pas compte des accidents d'élevage qui peuvent toujours survenir si, par exemple, un mâle se révélait hypofertile. En répartissant mieux les femelles, on diminue le risque de perdre des origines. Par ailleurs, comme Meuwissen (1997), on note qu'au niveau de la consanguinité, l'optimisation des accouplements se traduit essentiellement par un décalage à l'origine et non par une différence de pente.

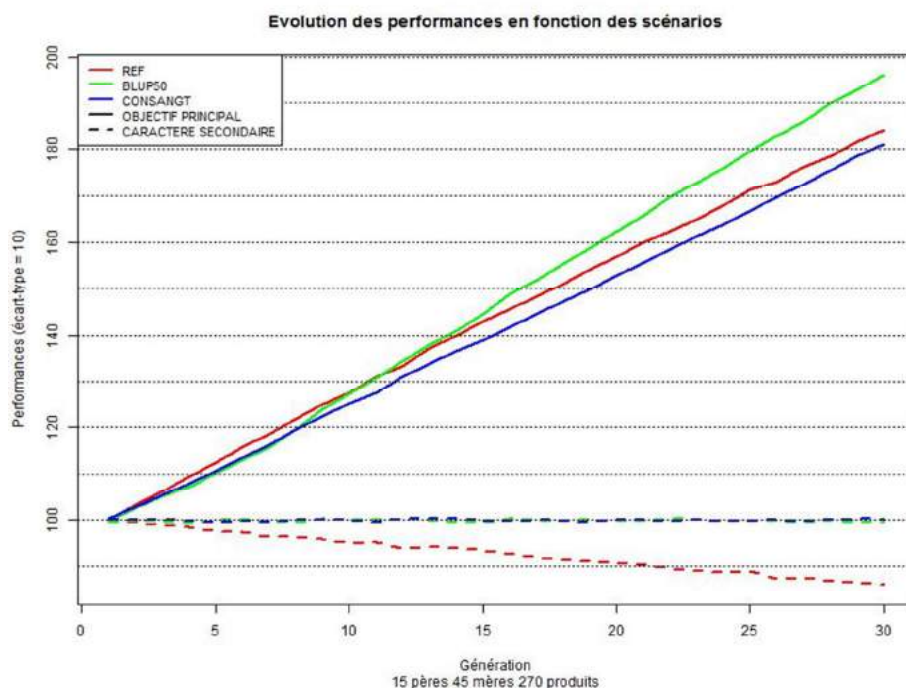
CONCLUSION

Ces travaux démontrent l'intérêt des méthodes de gestion optimisées pour les populations de taille limitée. D'autres prolongement seront nécessaires pour évaluer l'intérêt de ces méthodes dans le cas, par exemple d'une gestion sans le recours à l'insémination artificielle avec une reproduction au sol au sein de groupes de taille à déterminer. Le pedigree serait alors connu *a posteriori* par assignation de parenté en utilisant des marqueurs moléculaires. La sélection et l'accouplement des reproducteurs devra alors faire l'objet d'un soin tout particulier, dans le contexte d'une représentation familiale qui n'aura plus rien d'uniforme, afin de préserver la puissance d'assignation des jeux de marqueurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

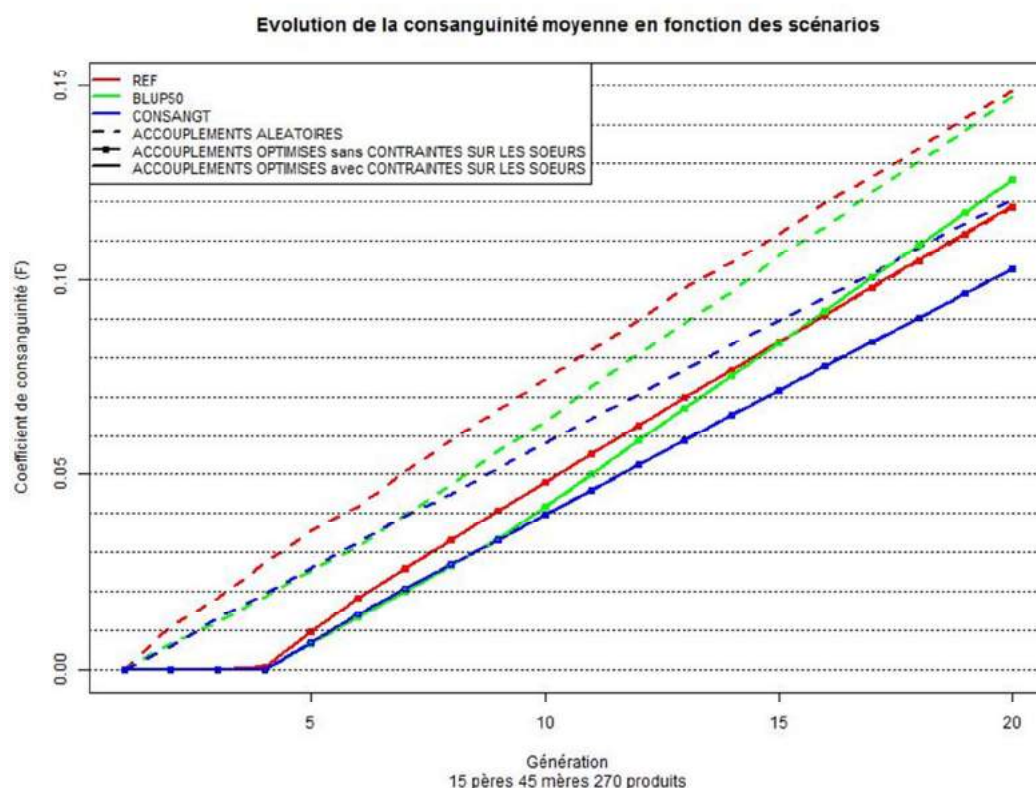
- Brisbane J.R., Gibson J.P., 1995, Theor. Appl. Genet., (91), 421–431.
 Cervantes I., Goyache F., Molina A., Valera M., Gutierrez J.P., 2011, J. Anim. Breed. Genet., (128), 56-63.
 Chapuis H., Pincet C., Colleau J.J., 2014, 10th WCGALP, Vancouver, Canada, Communication 23-02.
 Chapuis H., Pincet C., Colleau J.J., 2016, J. Anim. Breed. Genet., (133), 3-12.
 Colleau J.J., Tual K., de Préaumont H., Regalado D., 2009, Genet. Sel. Evol., (41), 7.
 Leroy G., Mary-Huard T., Verrier E., Danvy S., Charvolin E., Danchin-Burge C., 2013, Genet. Sel. Evol., 45:1
 Meuwissen T.H.E., Woolliams J.A., 1994, J. Dairy Sci., (77), 1905–1916.
 Meuwissen T.H.E., 1997, J. Anim. Sci., (75), 934–940.
 Woolliams J.A., Thompson R., 1994, 5th WCGALP, Guelph, Canada, (19), 127–133.
 Wray N.R., Goddard M.E., 1994, Genet. Sel. Evol., (26), 431–451.

Figure 1. Prédiction des performances sur l'objectif principal (trait plein) et sur le caractère secondaire (trait pointillé).



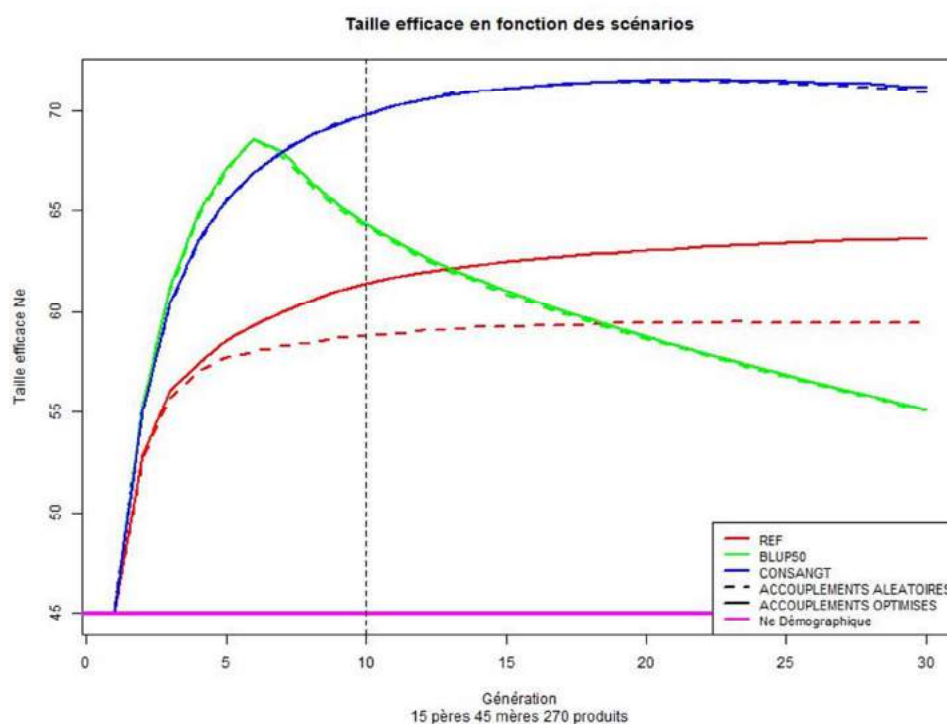
REF = scénario de référence. BLUP50 et CONSANGT sont des scénarios optimisés visant à maximiser le gain génétique ou à réduire la consanguinité. Par souci de clarté seuls les scénarios avec optimisation des accouplements sont représentés, mais ils se superposent, pour les performances, aux courbes obtenues avec des accouplements aléatoires.

Figure 2 : Coefficients de consanguinité



REF = scénario de référence. BLUP50 et CONSANGT sont des scénarios optimisés visant à maximiser le gain génétique ou à réduire la consanguinité.

Figure3 : Evolution de l'estimation de la taille efficace N_e selon l'information généalogique disponible



REF = scénario de référence. BLUP50 et CONSANGT sont des scénarios optimisés visant à maximiser le gain génétique ou à réduire la consanguinité.

LA TAILLE EFFICACE D'UNE POPULATION SOUS SÉLECTION DÉPEND À LA FOIS DU MODE DE GESTION ET DU NOMBRE DE REPRODUCTEURS UTILISÉS

Alnahhas Nabeel¹, Bailliard Amélie¹, Chapuis Hervé², Boulay Maryse¹, Vanbergue Estelle¹, Guémené Daniel¹

¹*SYSAAF - Centre INRA Val de Loire, URA - 37380 Nouzilly,*

²*INRA - Centre INRA Toulouse, GenPhySE - 31326 Castanet Tolosan*

Nabeel.alnahhas@inra.fr

RÉSUMÉ

En France, les lignées génétiques destinées à la production de produits terminaux vendus sous le signe Label Rouge doivent être conformes au référentiel SYSAAF. Ce référentiel exige des seuils minimaux sur le nombre de reproducteurs utilisés et de descendants produits à chaque génération. Depuis 1994, ces seuils sont, pour les lignées Label à diffusion limitée (< 1,000,000 de terminaux/an), de 20 pères, de 100 mères et de 500 descendants. Aujourd'hui, le SYSAAF dispose d'outils de choix de reproducteurs et de réalisation de plans d'accouplement basés sur l'algorithme de recuit simulé. Théoriquement, ces outils permettent, au moyen et long terme, de concilier la réalisation de gain génétique et la conservation de la variabilité génétique. Donc, la question de la pertinence du maintien de ces seuils, dont le respect entraîne souvent des coûts importants au regard du marché concerné, se pose concrètement aujourd'hui. L'objectif de ce travail était d'étudier par simulation l'effet de : 1) l'effectif de reproducteurs retenus et de descendants produits, 2) la méthode de gestion de la variabilité génétique. Pour le premier facteur, 6 scénarios ont été simulés, analysés et comparés. Pour le deuxième, les méthodes de sélection basée sur le recuit simulé ont été comparées à celles basées uniquement sur la conservation des origines familiales. Afin d'analyser l'effet des seuils de reproducteurs, les comparaisons ont été effectuées intra-méthode inter-scénarios alors que pour analyser l'effet de la méthode de gestion, les comparaisons ont été effectuées intra-scénario inter-méthodes. En conclusion, quelle que soit la méthode de gestion de variabilité, une baisse d'effectif de reproducteurs entraîne une baisse du niveau initial de la variabilité génétique. Au moyen et long terme, les méthodes de gestion par recuit simulé permettent une meilleure conservation de la variabilité génétique quel que soit l'effectif des reproducteurs retenus.

ABSTRACT

The effective size of a population under selection jointly depends on selection method and number of breeding animals

In France, genetic lines intended for the production of terminal products marketed as Label Rouge must comply with the guidelines of the SYSAAF. These guidelines require minimum thresholds for the number of breeders and descendants produced per generation. Since 1994, these thresholds have been limited to a minimum of 20 sires, 100 dams and 500 descendants for Label lines diffusing less than one million terminal products/year. Today, the SYSAAF implements selection of breeders based on the simulated annealing algorithm (SA). Theoretically, tools based on SA allow to reconcile the realization of genetic gain and the conservation of the genetic variability. Thus, the relevance of maintaining these thresholds, which often entails significant costs with regard to the concerned market, should be reexamined. The objective of this work was to study by simulation the effect of: 1) the number of selected breeders and produced descendants, and 2) the method of selection. For the first factor, 6 scenarios were simulated, analyzed and compared. For the second, several methods of selection based on SA were compared to those based solely on the conservation of familial origins. In order to analyze the effect of the thresholds, comparisons were performed intra-method inter-scenarios, whereas to analyze the effect of the selection method, comparisons were performed intra-scenario inter-methods. In conclusion, reducing breeders' number leads to a decrease in the initial level of variability. However, in the long-term, methods of management based on SA allow a better conservation of the genetic variability regardless of the number of breeders retained per generation.

INTRODUCTION

La gestion de la variabilité génétique au sein des lignées (ou populations) gérées par les entreprises de sélection est une des préoccupations majeures de ces entreprises ainsi que de leur fédération (SYSAAF). Auparavant, la variabilité génétique était gérée par le maintien des origines familiales avec objectif de conserver le maximum de familles de pères et de familles de mères afin de limiter autant que possible l'évolution de la consanguinité. Depuis 2012, le SYSAAF utilise des méthodes d'optimisation dédiées (Colleau et al., 2004) pour gérer cette variabilité. L'algorithme vise à minimiser autant que possible l'évolution de la parenté moyenne tout en maximisant le gain génétique sur l'objectif de sélection et en stabilisant celui d'autres caractères (Chapuis et al., 2016). Le référentiel de bonnes pratiques de sélection du SYSAAF (Bailliard et Guémené, 2015) exige, depuis 1994, le respect de seuils minimaux de reproducteurs sélectionnés et de descendants produits à chaque génération afin de pérenniser la sélection. Pour les lignées à diffusion limitée (nombre de produits terminaux diffusés/an inférieur à un million), les seuils minimaux sont les suivants : au moins 20 pères et 100 mères mis en place et au moins 500 descendants mesurés. Le maintien de ces seuils impose aux sélectionneurs la mobilisation de moyens techniques et économiques parfois très importants par rapport au marché concerné. Si ces moyens ne sont pas disponibles, l'activité de sélection au sein de ces lignées (ou populations) risque de cesser et le patrimoine génétique de ces populations, notamment les races locales de faible effectif, risque de disparaître. Compte tenu de l'évolution méthodologique dans la gestion de la variabilité et des coûts économiques imposés sur les sélectionneurs de lignées à faible effectif, on peut s'interroger sur la pertinence du maintien des seuils d'effectif définis il y a plus de 20 ans. L'objectif du travail présenté ici était d'analyser l'impact de la variation de ces seuils mais aussi l'effet des nouvelles méthodes de gestion des populations sur les indicateurs de la variabilité génétique ainsi que sur l'espérance du progrès génétique au sein des populations avicoles à faible effectif. Des pistes pour faire évoluer le référentiel du SYSAAF étaient également attendues.

1. MATERIELS ET METHODES

Nous avons procédé par simulation sur ordinateur, ce qui consiste à générer des données (pedigree et performances) mimant de façon réaliste le fonctionnement d'une population réelle. Cette modélisation s'appuie des processus aléatoires (génération puis transmission à la descendance des valeurs génétiques et tirage des effets d'environnement) et doit être répétée un grand nombre de fois pour dégager des tendances

exploitables (moyenne et variance des résultats). Ici, pour chaque modalité étudiée, 300 répétitions indépendantes ont été effectuées.

1.1. Les simulations effectuées

Dans toutes les simulations, le caractère principal dans les objectifs de sélection était le poids vif des animaux à l'âge d'abattage (héritabilité : $h^2 = 0.4$) alors que le taux de ponte ($h^2 = 0.2$) était un caractère secondaire. La corrélation génétique entre les deux caractères était fixée à -0.25, de même que la corrélation résiduelle (non génétique).

Six scénarios différents ont été simulés en termes d'effectifs (Tableau 1). Pour chaque scénario, 4 méthodes de choix de reproducteurs ont été comparées.

Dans tous les cas, les accouplements étaient optimisés afin de minimiser la consanguinité attendue à la génération suivante.

Méthodes de choix de reproducteurs :

- Conservation des origines familiales (**Conservatoire**). Les fils sont classés intra-famille de père alors que les filles sont classées intra-famille de mère. Le meilleur fils de chaque père et la meilleure fille de chaque mère sont sélectionnés. Les meilleurs s'entendent ici comme les valeurs génétiques les plus élevées pour le poids vif. Une contrainte est appliquée au préalable sur le second caractère afin d'en limiter la dégradation : seuls les animaux avec une valeur génétique estimée pour la ponte supérieure à -0,5 écart type génétique sont candidats.
- Minimisation de la parenté moyenne par sans réalisation de progrès génétique (**Minimisation**).
- La même que (b) mais le taux de progrès de l'index principal est fixé à celle de la sélection conservatoire, l'index secondaire est stabilisé, la parenté moyenne est minimisée (**Stabilisation**).
- Choix optimisé. Ici, l'index principal est maximisé, l'index secondaire est stabilisé et l'accroissement de parenté moyenne est fixée à la moitié de la pente de consanguinité quand on n'a aucune contrainte (**Progrès**).

1.2. Indicateurs de variabilité génétique :

Nous avons étudié l'impact des 4 méthodes de gestion sur la taille efficace de la population (N_e), estimée selon diverses méthodes. N_e est l'équivalent d'un nombre de reproducteurs, les deux sexes confondus, et représente la taille d'une population dite « idéale » qui présenterait la même évolution de variabilité que la population étudiée. Cet indicateur permet les comparaisons entre situations très diverses. Son calcul peut être plus ou moins complexe selon l'information considérée. Le N_e démographique (N_{eD} , Falconer et Mackay, 1994) ne considère que le nombre de

reproducteurs utilisés. Dans notre cas il reste constant au cours des générations. D'autres indicateurs plus élaborés utilisent toute l'information généalogique disponible. Gutierrez *et al* (2009) utilisent l'évolution de la consanguinité (Ne_G), tandis que Cervantes *et al* (2011) s'appuient sur l'évolution de la parenté moyenne entre individus (Ne_C). Pour une comparaison à grande échelle de ces méthodes d'estimation, voir Leroy *et al.* (2013).

1.3. Analyse statistique

Dans un premier temps, les valeurs des indicateurs enregistrés ont été moyennées sur les 300 répétitions simulées. Ensuite, les moyennes générationnelles ont été régressées, intra-scénario et intra-méthode de gestion, sur le numéro de génération. Afin de s'affranchir des fluctuations inhérentes à une profondeur de pedigree insuffisante, seules les générations de 11 à 30 ont été analysées. Enfin, les pentes de régression, qui représentent le taux d'évolution des indicateurs analysés, et leurs intervalles de confiance (IC) à 95% ont été estimés à travers un modèle de régression linéaire. Grâce aux IC, les comparaisons des pentes intra-scénario inter-méthodes de gestion, pour quantifier l'effet de la méthode de gestion, et inter-scénarios intra-méthode de gestion, pour quantifier l'impact de l'effectif sur l'évolution des indicateurs de la variabilité génétique, ont été effectuées. L'analyse statistique a été réalisée dans l'environnement de programmation et d'analyse statistique R (R Core Team, 2016).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'objectif de ce travail était d'étudier, par simulation, les conséquences d'une évolution des seuils d'effectif du référentiel SYSAF sur la variabilité génétique au sein des populations simulées.

Le tableau 1 montre l'impact des scénarios sur Ne_D , (Ne démographique). Sur la base de ce seul constat, on pourrait penser qu'il est prudent de ne surtout pas relâcher ces seuils. Un examen plus approfondi nuance toutefois cet avis.

La comparaison des pentes de régression inter-scénario intra-méthode de gestion (Tableau 2) montre que les seuils alternatifs proposés n'entraînent qu'une évolution de parenté et de consanguinité légèrement plus rapide que le scénario actuel (20 pères 100 mères 500 descendants) avec la méthode conservatoire, qui prévalait en 1994, lors de la fixation des seuils. Avec les stratégies de minimisation ou de stabilisation, on obtient même une pente inférieure à la référence, alors que l'on a réduit sensiblement le nombre de mères (scénarios 2 et 3). Quand on diminue aussi le nombre de pères (scénarios 3 à 5), les pentes de consanguinité et de parenté dépassent la référence, mais l'écart est moindre que pour Ne_D .

La Figure 1 montre qu'en utilisant la méthode de référence des choix « conservatoire », la taille efficace calculée en utilisant toute l'information généalogique disponible est fortement liée aux effectifs de

reproducteurs. On observe alors une relative stabilité de la taille efficace dans le temps. Avec des méthodes de choix alternatives, on observe soit une augmentation du Ne au cours du temps (choix « minimisation » et « stabilisation ») soit un bouleversement de la hiérarchie des scénarios (choix « progrès »). Dans le cas du choix « progrès », le scénario 1 n'est pas celui avec la plus forte valeur de Ne . A cela au moins deux raisons : d'une part, on a choisi d'écarter les générations 1 à 10, pour lesquelles l'information généalogique n'est pas suffisante et, d'autre part, dans un scénario de « progrès » la pression de sélection intervient également. Les scénarios 2 et 3 ont certes des effectifs de reproducteurs inférieurs mais aussi une pression de sélection plus faible (qui se traduit par un gain de poids vif moins élevé). C'est la raison pour laquelle, ils conduisent à une estimation de Ne supérieure à celle du scénario 1.

Quand l'objectif de sélection est strictement de stabiliser le niveau génétique des animaux tout en conservant la variabilité génétique, comme c'est souvent le cas des populations à faible effectif, les méthodes cherchant à minimiser la parenté moyenne des reproducteurs sont plus efficaces que la simple conservation d'origines familiales pour maîtriser l'évolution de la parenté (Ne_G) à moyen et long termes (Choix « minimisation » vs. Choix « Conservatoire », Tableau 2 et Figure 2). A noter aussi que les méthodes optimisées permettent de réaliser le même progrès génétique que la conservation tout en étant plus performantes en termes de parenté et de consanguinité (Choix « Stabilisation » vs. Choix « Conservatoire », Tableau 2). Même quand l'objectif est de maximiser le progrès génétique de l'index principal (choix « Progrès »), la vitesse de diminution de la taille efficace n'est que légèrement plus élevée que celle de la conservation d'origines (*i.e.* pentes de régression négatives des tailles efficaces, Figure 2). De plus, les méthodes alternatives permettent un meilleur gain génétique sur le caractère principal (*i.e.* pentes positives du poids vif) ainsi qu'une meilleure stabilisation de l'index secondaire (*i.e.* pentes nulles de la ponte) (Tableau 2). Cela représente un compromis réaliste entre gain et variabilité génétique pour les populations à faible effectif.

CONCLUSION

Les méthodes de gestion de lignées et/ou populations fondées sur l'optimisation conjointe des valeurs génétiques et des parentés permettent une meilleure conservation de la variabilité génétique que celles simplement fondées sur le décompte des origines familiales conservées. Cette meilleure gestion se traduit par une évolution moins importante en termes de parenté et de consanguinité moyennes ainsi que par une perte d'effectif efficace moins importante. La mise en application de ces méthodes devrait donc

permettre un allègement des seuils d'effectif imposés actuellement par le référentiel de bonnes pratiques de

sélection, hérités d'une époque antérieure à la mise en place des nouveaux outils de choix des reproducteurs.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Bailliard, A., Guémené, D., 2015. RefAvi-SYSAAF V14.1 : Mode de Sélection des Lignées et de Production de Reproducteurs Parentaux Avicole. Disponible sur : <https://www.sysaaf.fr/>
- Cervantes I., Goyache F., Molina A., Valera M., Gutierrez J.P., 2011, J. Anim. Breed. Genet., (128), 56-63.
- Chapuis et al., 2016. J. Anim. Breed. Genet., (133), 3-12.
- Colleau et al., 2004. Genet. Sel. Evol., (36), 373-394.
- Falconer and Mackay, 1996. In: Introduction to Quantitative Genetics (Longman edit.) Pearson Prentice Hall, pp 65.
- Gutiérrez J.P., Cervantes I., Goyache F., 2009, J. Anim. Breed. Genet., (126), 327-332.
- Leroy G., Mary-Huard T., Verrier E., Danvy S., Charvolin E., Danchin-Burge C. (2013) Estimating the effective population size using pedigree data: what method in practice? Examples in Dog, Sheep, Cattle and Horses. Genetics Selection Evolution 45, 1.
- R Core Team, 2016. Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Tableau 1. Scénarios de seuils d'effectif simulés.

Scénario	Pères	Mères	Descendants	Ne_D	Diff
1	20	100	500	66.6	-
2	20	60	240	60.0	-11%
3	20	40	160	53,3	-20%
4	15	60	360	48.0	-28%
5	15	60	240	48.0	-28%
6	15	45	270	45.0	-32%

Ne_D = Ne démographique calculé selon Falconer et Mackay (1994). Diff = écart (%) entre le Ne_D du scénario et le Ne_D du scénario de référence (scénario 1).

Tableau 2. Pentas de régression sur le temps des indicateurs enregistrés au cours des simulations, avec leur intervalle de confiance entre parenthèses*.

Scénario	Choix	Parenté	Consanguinité	Ne_C	Ne_G	PV	Ponte
20_100_500	C	0.50 (0.49, 0.50)	0.51 (0.50, 0.51)	0.12 (0.11, 0.14)	-1.64 (-1.93, -1.35)	0.49 (0.48, 0.49)	-0.11 (-0.11, -0.11)
20_100_500	M	0.40 (0.40, 0.40)	0.41 (0.40, 0.41)	0.26 (0.23, 0.30)	-2.43 (-2.88, -1.98)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00)
20_100_500	S	0.44 (0.44, 0.45)	0.45 (0.45, 0.45)	0.08 (0.05, 0.10)	-2.36 (-2.77, -1.95)	0.49 (0.49, 0.49)	0.00 (0.00, 0.00)
20_100_500	P	0.65 (0.65, 0.65)	0.66 (0.66, 0.66)	-0.47 (-0.50, -0.44)	-2.46 (-2.90, -2.02)	0.61 (0.61, 0.61)	0.00 (0.00, 0.00)
20_60_240	C	0.53 (0.53, 0.54)	0.55 (0.54, 0.55)	0.11 (0.10, 0.13)	-1.52 (-1.79, -1.25)	0.38 (0.38, 0.38)	-0.09 (-0.09, -0.09)
20_60_240	M	0.41 (0.41, 0.42)	0.42 (0.42, 0.43)	0.28 (0.24, 0.31)	-2.33 (-2.76, -1.89)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00)
20_60_240	S	0.49 (0.48, 0.49)	0.49 (0.49, 0.50)	0.05 (0.02, 0.08)	-2.15 (-2.52, -1.78)	0.38 (0.38, 0.38)	0.00 (0.00, 0.00)
20_60_240	P	0.60 (0.60, 0.60)	0.61 (0.61, 0.61)	-0.48 (-0.51, -0.45)	-2.94 (-3.49, -2.38)	0.46 (0.46, 0.46)	0.00 (0.00, 0.00)
20_40_160	C	0.57 (0.56, 0.57)	0.58 (0.58, 0.59)	0.12 (0.10, 0.13)	-1.40 (-1.65, -1.15)	0.31 (0.31, 0.32)	-0.07 (-0.07, -0.07)
20_40_160	M	0.45 (0.45, 0.45)	0.46 (0.46, 0.46)	0.26 (0.23, 0.30)	-2.11 (-2.51, -1.72)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00)
20_40_160	S	0.51 (0.51, 0.51)	0.52 (0.52, 0.52)	0.09 (0.06, 0.12)	-1.96 (-2.31, -1.62)	0.31 (0.31, 0.31)	0.00 (0.00, 0.00)
20_40_160	P	0.62 (0.62, 0.62)	0.63 (0.63, 0.63)	-0.47 (-0.49, -0.44)	-2.93 (-3.48, -2.38)	0.39 (0.39, 0.39)	0.00 (0.00, 0.00)
15_60_360	C	0.65 (0.64, 0.65)	0.67 (0.66, 0.67)	0.09 (0.08, 0.10)	-1.08 (-1.27, -0.89)	0.49 (0.48, 0.49)	-0.11 (-0.11, -0.11)
15_60_360	M	0.52 (0.52, 0.53)	0.54 (0.53, 0.54)	0.20 (0.17, 0.22)	-1.56 (-1.84, -1.28)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00)
15_60_360	S	0.60 (0.59, 0.60)	0.61 (0.61, 0.61)	0.01 (-0.01, 0.04)	-1.57 (-1.82, -1.31)	0.49 (0.49, 0.49)	0.00 (0.00, 0.00)
15_60_360	P	0.80 (0.80, 0.80)	0.82 (0.82, 0.82)	-0.43 (-0.46, -0.41)	-1.98 (-2.32, -1.63)	0.59 (0.59, 0.59)	0.00 (0.00, 0.00)
15_60_240	C	0.66 (0.65, 0.66)	0.68 (0.67, 0.68)	0.09 (0.08, 0.10)	-1.03 (-1.21, -0.85)	0.52 (0.51, 0.52)	-0.11 (-0.11, -0.11)
15_60_240	M	0.53 (0.52, 0.53)	0.54 (0.54, 0.54)	0.19 (0.17, 0.22)	-1.55 (-1.83, -1.27)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00)
15_60_240	S	0.61 (0.61, 0.62)	0.63 (0.63, 0.63)	0.00 (-0.03, 0.02)	-1.52 (-1.76, -1.27)	0.41 (0.41, 0.41)	0.00 (0.00, 0.00)
15_60_240	P	0.70 (0.70, 0.71)	0.71 (0.71, 0.72)	-0.44 (-0.46, -0.42)	-2.25 (-2.59, -1.92)	0.47 (0.47, 0.47)	0.00 (0.00, 0.00)
15_45_270	C	0.66 (0.65, 0.66)	0.68 (0.67, 0.69)	0.10 (0.08, 0.11)	-1.07 (-1.26, -0.88)	0.45 (0.44, 0.45)	-0.10 (-0.10, -0.10)
15_45_270	M	0.53 (0.53, 0.54)	0.55 (0.55, 0.55)	0.20 (0.18, 0.23)	-1.52 (-1.79, -1.24)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00)
15_45_270	S	0.61 (0.60, 0.61)	0.62 (0.62, 0.62)	0.04 (0.01, 0.06)	-1.51 (-1.76, -1.26)	0.44 (0.44, 0.44)	0.00 (0.00, 0.00)
15_45_270	P	0.82 (0.82, 0.82)	0.84 (0.84, 0.84)	-0.43 (-0.45, -0.40)	-1.96 (-2.29, -1.62)	0.55 (0.55, 0.55)	0.00 (0.00, 0.00)

Scénario : Les alternatifs aux seuils d'effectif actuels, Choix : Méthode de gestion ; C = Conservatoire, M = Minimisation, S = Stabilisation, P = Progrès. Parenté : Pente de régression de la parenté moyenne, Consanguinité : Pente de régression de la consanguinité moyenne, Ne_C : Pente de régression de la taille efficace de Cervantes et al. (2011), Ne_G : Pente de régression de la taille efficace de Gutiérrez et al. (2009), PV : Pente de régression des valeurs génétiques du poids vif, Ponte : Pente de régression des valeurs génétiques de la ponte.

*Les pentes de régression pour lesquelles les intervalles de confiance ne se chevauchent pas sont significativement différentes ($p < 0.05$).

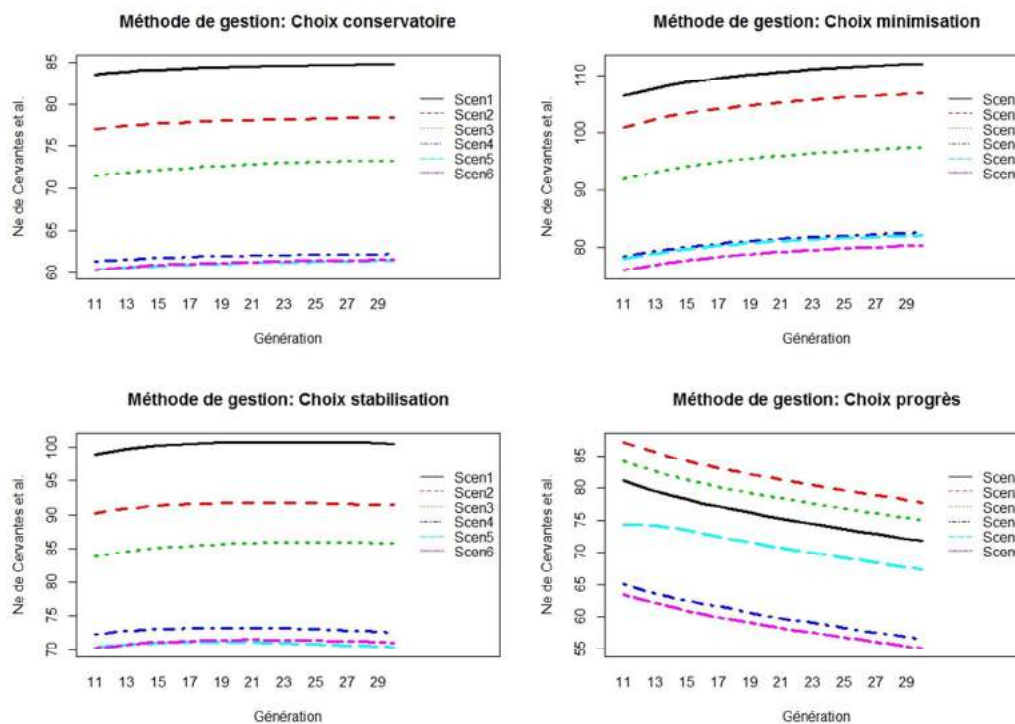


Figure 1 : Taille efficace de Cervantes et al. (2011) : Comparaisons de scénarios intra-méthode de gestion.

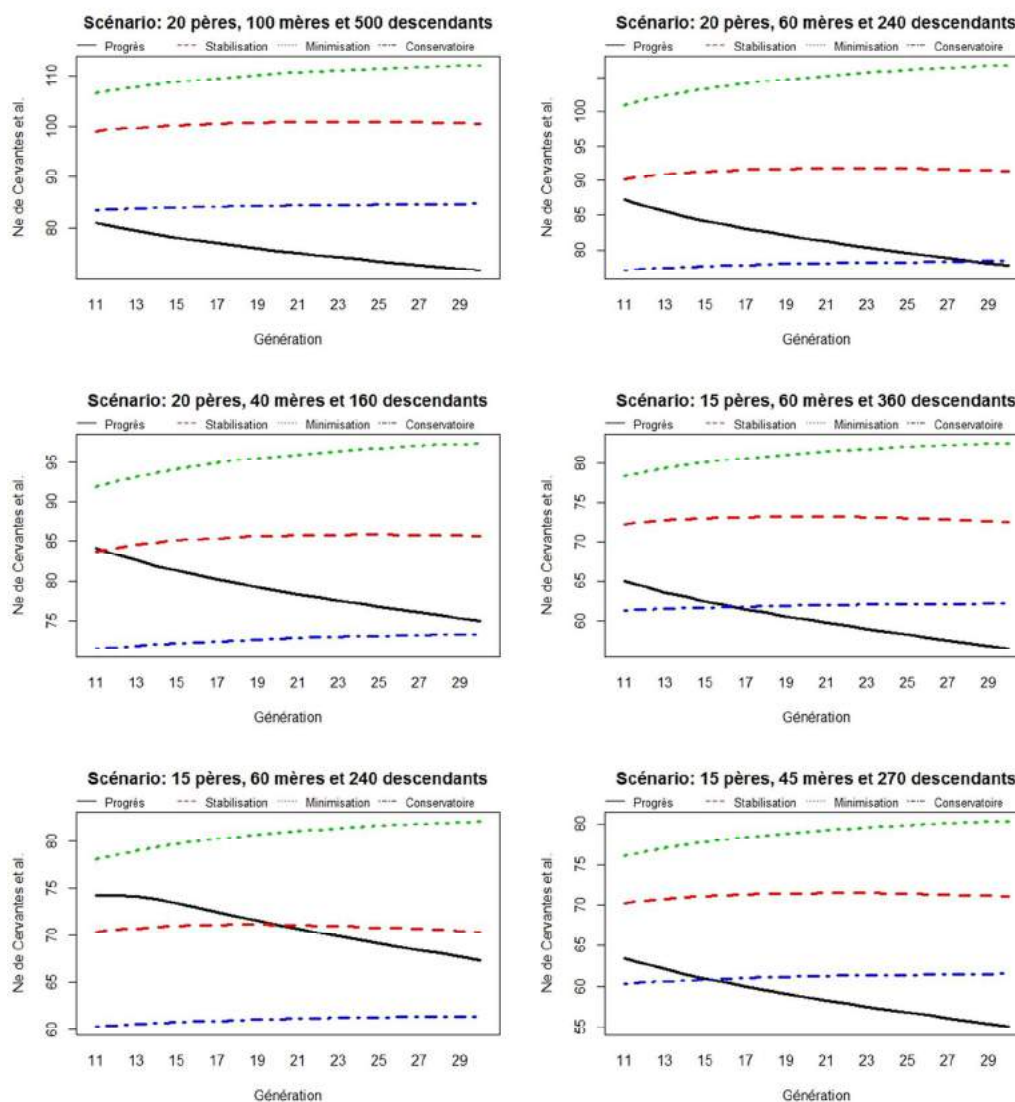


Figure 2 : Evolution de la taille efficace de Cervantes et al. (2011) : Comparaisons de méthodes de gestion intra-scénario.

LA TAILLE EFFICACE D'UNE POPULATION SOUS SÉLECTION DÉPEND AUTANT DU MODE DE GESTION QUE DU NOMBRE DE REPRODUCTEURS UTILISÉS

Alnahhas Nabeel¹, Bailliard Amélie¹, Chapuis Hervé², Boulay Maryse¹,
Vanbergue Estelle¹, Guémené Daniel¹

¹SYSAAF - Centre INRA Val de Loire, URA - 37380 Nouzilly,

²INRA - Centre INRA Toulouse, GenPhySE - 31326 Castanet Tolosan

Introduction

En France, les lignées génétiques destinées à la production de produits terminaux vendus sous le signe Label Rouge doivent être conformes au référentiel SYSAAF. Ce référentiel exige des seuils minimaux sur le nombre de reproducteurs utilisés et de descendants produits à chaque génération. Depuis 1994, ces seuils sont, pour les lignées Label à diffusion limitée (< 1,000,000 de terminaux/an), de 20 pères, de 100 mères et de 500 descendants. Aujourd'hui, le SYSAAF dispose d'outils de choix de reproducteurs et de réalisation de plans d'accouplement basés sur l'algorithme de recuit simulé. Théoriquement, ces outils permettent, au moyen et long terme, de concilier la réalisation de gain génétique et la conservation de la variabilité génétique. Donc, la question de la pertinence du maintien de ces seuils, dont le respect entraîne souvent des coûts importants au regard du marché concerné, se pose concrètement aujourd'hui.

Afin d'étudier la possibilité d'envisager une relaxation de ces seuils, une étude par simulation de l'effet de deux facteurs de variation de la variabilité génétique a été réalisée. Les deux facteurs sont :

- 1) L'effectif de reproducteurs retenus et de descendants produits par génération, et
- 2) La méthode de gestion de la variabilité génétique.

Matériels et Méthodes

Dans toutes les simulations, l'objectif principal était le poids vif des animaux ($h^2 = 0.4$) alors que l'index secondaire était le taux de ponte ($h^2 = 0.2$). Les corrélations génétique et résiduelle entre les deux caractères étaient fixées à -0.25.

Scénarios de seuils d'effectif simulés

Scénario	Pères	Mères	Descendants	Ne _D	Diff
1	20	100	500	66.6	-
2	20	60	240	60.0	-11%
3	20	40	160	53.3	-20%
4	15	60	360	48.0	-28%
5	15	60	240	48.0	-28%
6	15	45	270	45.0	-32%

Méthodes de choix de reproducteurs

1. Conservation des origines familiales (Conservatoire) : Les fils sont classés intra-famille de père alors que les filles sont classées intra-famille de mère. Le meilleur fils de chaque père et la meilleure fille de chaque mère sont sélectionnés.
2. Minimisation de la parenté moyenne par recuit simulé sans réalisation de progrès génétique (Minimisation).
3. La même que (b) mais, la pente de l'index principal est fixée à celle de la sélection conservatoire, l'index secondaire est stabilisé, la parenté moyenne est minimisée (Stabilisation).
4. Choix optimisé par recuit simulé : Ici, l'index principal est maximisé, l'index secondaire est stabilisé et la pente de parenté moyenne est fixée à la moitié de la pente de consanguinité quand on n'a aucune contrainte (PROGRES).

Indicateurs de variabilité génétique

A chaque génération, les indicateurs suivants ont été calculés et enregistrés :

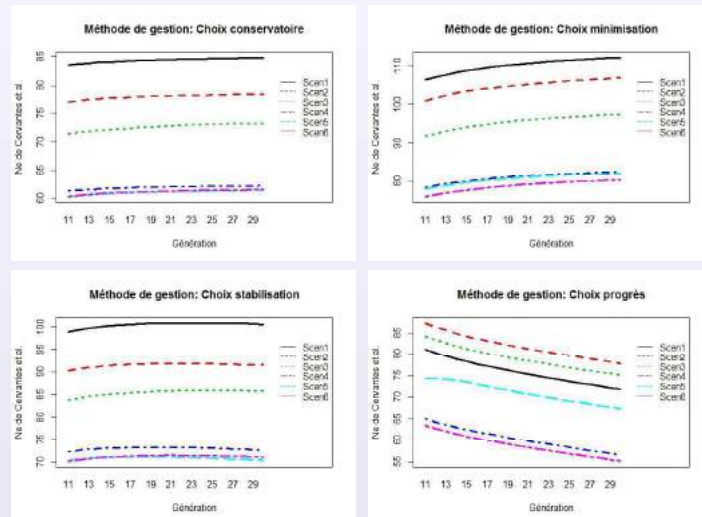
1. La taille efficace démographique (NeD) basée sur le sexe ratio et calculée selon (Falconer and Mackay, 1996).
2. La consanguinité moyenne (F).
3. La taille efficace selon Gutierrez et al. (2009) (NeG) basée sur l'augmentation de la consanguinité moyenne.
4. La parenté moyenne (C).
5. La taille efficace selon Cervantes et al. (2011) (NeC) basée sur l'augmentation de la parenté moyenne.

Analyse statistique

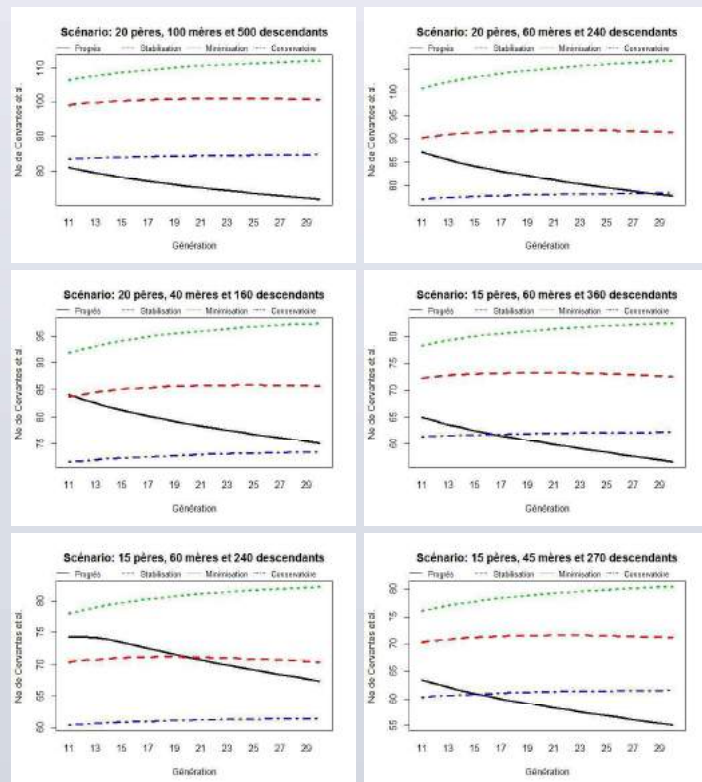
1. Régression linéaire des indicateurs de variabilité génétique sur l'année de naissance afin d'estimer le niveau initial (i.e. l'ordonné à l'origine) ainsi que l'évolution (i.e. la pente) de la variabilité génétique.
2. Les intervalles de confiance des pentes de régression ont ensuite été comparées :
 1. Inter-scénarios intra-méthode de choix : Effet du scénario,
 2. Intra-scénario inter-méthodes de choix : Effet de la méthode de sélection.

Résultats

Comparaisons de scénarios intra-méthode de gestion



Comparaisons de méthodes de gestion intra-scénario



Conclusion

En conclusion, quelle que soit la méthode de gestion de variabilité, une baisse d'effectif de reproducteurs entraîne une baisse du niveau initial de la variabilité génétique. Au moyen et long terme, les méthodes de gestion optimisées par recuit simulé permettent une meilleure conservation de la variabilité génétique quel que soit l'effectif des reproducteurs retenus

Références

- Cervantes I., Goyache F., Molina A., Valera M., Gutierrez J.P., 2011, J. Anim. Breed. Genet., (128), 56-63.
Falconer and Mackay, 1996. In: Introduction to Quantitative Genetics (Longman edit.) Pearson Prentice Hall, pp 65.
Gutiérrez J.P., Cervantes I., Goyache F., 2009, J. Anim. Breed. Genet., (126), 327-332.

CARACTERISATION GENETIQUE DES RACES LOCALES FRANÇAISES DE POULES : PROJET BIODIVA

Restoux Gwendal¹, Rognon Xavier¹, Vieaud Agathe¹, Guémené Daniel², Chiron Geoffrey³, Petitjean Florence⁴, Seigneurin François², Vasilescu Alexandre⁵ et Tixier-Boichard Michèle¹

¹ GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy En Josas, France,

² SYSAAF, Unité de Recherches Avicoles, Centre INRA Val de Loire, 37380 Nouzilly, France
³ ITAVI, 23 rue Jean Baldassini, 69364 Lyon Cedex 07, France

⁴ Centre de Sélection de Béchanne, Hameau de Béchanne, 01370 Saint-Etienne-Du-Bois, France

⁵ LABOGENA - Bat 224, Domaine de Vilvert, 78353 Jouy en Josas, France
gwendal.restoux@agroparistech.fr

RÉSUMÉ

Les faibles effectifs observés chez les races traditionnelles, locales et/ou anciennes posent la question de leur conservation *in-* ou *ex-situ*. La caractérisation de leur diversité génétique est un des déterminants essentiels de leur maintien et les analyses moléculaires s'avèrent être l'outil idéal pour cela. 22 races locales de poules ont donc été génotypées à raison de 60 individus par population en moyenne avec une puce à ADN haute densité (57K). 4 lignées commerciales témoin ont également été intégrées, soit un total de 26 populations et 1516 individus. La diversité intra-race est bonne, avec un niveau de consanguinité correct mais variable entre races (F moyen compris entre 3 et 28%), le niveau de consanguinité d'une race étant logiquement lié avec ses effectifs. Il existe également une grande diversité entre races ($F_{st}=0.25$), qui se différencient bien les unes des autres. De plus, les relations observées entre races sont cohérentes avec leurs histoires. La structuration génétique s'explique ensuite principalement par la conduite des élevages. L'usage des races (pondeuses, de chair, commerciales) affecte aussi leur structure génétique. Finalement, ces analyses, combinées à la description morphologique des races, pourraient permettre de détecter des zones du génome d'intérêt pour la sélection. En conclusion, les races locales françaises de poules présentent une grande diversité génétique, avec des spécificités, permettant de les distinguer très clairement les unes des autres. De plus leur gestion semble bien menée par les éleveurs et centres de sélection avec le maintien d'une diversité intra et inter-population relativement importante.

ABSTRACT

Characterization of genetic diversity of French local poultry breeds: BioDivA project

The small population sizes of French local breeds raise the question of their *in-* or *ex-situ* conservation. For that goal the characterization of their genetic diversity with molecular tools appears as a preliminary key step. 22 local breeds along with 4 control widespread lines with an average of 60 individuals per breed were genotyped using a 57K DNA SNP chip leading to a total sample made of 26 breeds and 1516 individuals. Within breed genetic diversity was good but variable among them (mean F comprised between 3 and 28%), inbreeding coefficients being related to the population sizes. Among breed diversity was large ($F_{st}=0.25$) allowing for a clear genetic identification of breeds. Relationships among breeds figured out their history (origin, breeders) or usage (broilers, layers...). Finally combining these genetic analyses with morphological data could help detecting genomic region of interest in a selection perspective. To conclude, French local breeds appeared to be largely diversified genetically and morphologically making them a good example of a successful management by both breeders and selection centers. Nevertheless much attention should be paid for their long term conservation.

INTRODUCTION

Les races anciennes françaises constituent un patrimoine unique qui est malheureusement mis à mal devant la concurrence de lignées commerciales. Leur conservation passe donc par la reconnaissance d'un statut permettant la valorisation des produits. Une première étape serait donc la caractérisation du niveau de diversité actuel qui pourrait être suivi de la mise en place d'un programme de gestion idoine (aides via la PRM-A, mise en cryobanque...). C'est dans ce cadre que s'inscrit le projet BioDivA consistant en l'étude génétique d'une vingtaine de populations françaises.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Echantillonnage

Une liste de 22 races anciennes (Tableau 1) a été établie à la suite d'une enquête préliminaire conduite pour identifier les races bénéficiant d'un programme de gestion ou de relance et qui étaient susceptibles de candidater au dispositif 'Protection des Races Menacées'. L'objectif était d'étudier 60 animaux par race afin d'estimer précisément l'effectif génétique de chacune. L'échantillonnage des animaux a été réalisé sur la base des informations généalogiques lorsqu'elles étaient disponibles, de façon à représenter le plus grand nombre de familles différentes. Ce fut le cas des 18 races dont le troupeau pépinière est maintenu au Centre de Sélection de Béchanne. En l'absence d'informations généalogiques, deux situations se sont présentées : échantillonnage en fonction de la variété de couleur ou de la stabilité de la présence de la race dans l'élevage. Ainsi, la race Marans a été échantillonnée de façon à représenter 8 variétés de couleur, avec un effectif variant de 4 à 33 individus par variété issus de 7 éleveurs (Tableau 1). Pour les races Hergnies, Poule de Contres et Le Mans, l'échantillonnage a concerné les élevages ayant des animaux depuis plusieurs années et annonçant leur souhait de continuer, en tenant compte des échanges entre éleveurs pour éviter de prélever des animaux trop apparentés. Ainsi, les 60 animaux de la race HER proviennent de 6 éleveurs, les 42 animaux de la race CON proviennent de 3 éleveurs et les 30 animaux de la race MAN proviennent de 2 éleveurs (Tableau 1). Un Accord de Transfert de Matériel biologique (ATM) a été signé par l'UMR GABI avec chaque association de race, ou avec des éleveurs individuels. Une prise de sang individuelle a été réalisée au Centre de Sélection de Béchanne pour 18 races et chez les éleveurs pour les 4 autres races. L'ADN a été extrait par le Centre de Ressources Biologiques de la plateforme @BRIDGe de l'INRA de Jouy-en-Josas. Quatre populations commerciales ont été ajoutées à titre de témoin : une pondeuse à œufs bruns Hendrix Genetics, une lignée label de la SASSO et deux lignées pures de poulets de chair (Ross et Cobb). Les

échantillons des lignées Ross et Cobb provenaient de la collection d'ADN constituée en 1998 dans le cadre du projet européen AvianDiv, avec des animaux le moins apparentés possible.

1.2. Génomique

Le génomage par la puce Illumina Infinium 60K spécifique du poulet a été réalisé par la plateforme de génomage Labogena. Au total 1517 animaux ont été génomés pour 57636 marqueurs SNP. Dans le cas de la pondeuse commerciale et de la lignée label, des données de génomage déjà acquises avec la même puce sur des animaux non apparentés ont été fournies gracieusement au projet BiodivA par la société Hendrix Genetics, avec un accord spécifique de transfert de données, et par la société SASSO, dans le cadre d'un projet de génomage de la génération parentale d'un dispositif de détection de QTL conduit en collaboration avec l'URA de l'INRA de Tours.

1.2. Analyses

Les données génomiques ont été analysées en utilisant le logiciel Plink 1.9 (Chang et al., 2015). Dans un premier temps des filtres ont été appliqués afin de nettoyer le jeu de données, ainsi tous les individus et tous les SNP présentant plus de 10% de données manquantes ont été éliminés (15 individus et 1486 SNP). Les marqueurs avec des fréquences de l'allèle minoritaire inférieures à 1% ont également été supprimés (2904 SNP). La race Grise du Vercors (61 individus) et un individu de la race Barbezieux ont été éliminés pour des problèmes d'identification. Au final le jeu de données se composait de 1440 individus et 53246 SNP avec taux de génomage moyen de 99,4%.

Sur le jeu de données ainsi obtenu, les fréquences de l'allèle minoritaire (MAF), l'hétérozygotie observée (H_o), la proportion d'allèles fixés et le coefficient de consanguinité ont été estimés. Ce dernier a été estimé soit en utilisant les fréquences alléliques de la population totale (F_1) soit celles au sein des races (F_2) de manière similaires aux F-statistiques (Wright, 1965) avec les F_{it} et F_{is} respectivement plus sensibles à la structuration inter- ou intra-race. Les graphiques ont été réalisés sous R (R Core Team, 2016) avec le package « ggplot2 » (Wickham, 2009). Des arbres non-racinés obtenus par Neighbor-Joining (package APE, Paradis *et al.*, 2005 ; Popescu *et al.*, 2012) ont été calculés à partir d'une matrice d'identité par état (distance de Hamming) pour la population totale et la race Marans. La couleur du plumage ou les éleveurs y ont ensuite été ajoutés.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

La diversité génétique au sein des races est globalement bonne quelque soit la métrique considérée (figure 1), avec des MAF de 21,1% en moyenne (écart-type = 3,0%), des proportions d'allèles fixés de 16,5% ($EC = 9,4\%$) et une hétérozygotie

moyenne de 32,5% (EC = 2,3%). Le coefficient de consanguinité moyen par race est de 27,8% pour F1 (EC = 8,7%) et 3,0% pour F2 (EC = 6,0%). La diversité des races anciennes est comparable voir supérieure à celle des races «commerciales» pour Ho malgré leurs effectifs plus restreints ($t=-2.689$, $ddl=1438$, $p=7.2.10^{-3}$).

Cependant il existe des variations entre populations probablement imputables à des pratiques de gestion différentes (figure 1). Par exemple les races MAR et BGB22 présentent toutes deux des niveaux de consanguinité F1 élevés alors que seule la race MAR présente un fort niveau de F2. Dans le cas de la population BGB22 le noyau initial de sélection étant très réduit et unique, beaucoup de diversité a été perdue par dérive génétique ce qui est confirmé par la forte proportion d'allèles fixés. Cependant la diversité génétique restante est bien gérée par les accouplements permettant de conserver un niveau d'hétérozygotie, Ho, élevé. La diversité au sein de la race MAR est répartie entre plusieurs éleveurs (tableau 1 et figure 2) ce qui permet de la conserver malgré un Ho modéré (i.e. chaque éleveur pouvant fixer par hasard des allèles différents), ce qui est confirmé par des MAF plus élevés et moins d'allèles fixés sur l'ensemble du génome. L'estimateur de consanguinité F2 est particulièrement sensible à la structuration intra-race ce qui explique sa valeur élevée dans le cas d'une structuration de la population en sous-groupes (effet Wahlund). Ceci met en évidence l'efficacité d'une gestion de la diversité à différentes échelles (entre races, intra-races et inter-éleveurs) pour le maintien d'une diversité globale importante.

La diversité inter-race est élevée ce qui se manifeste par une différenciation génétique marquée (F_{st} moyen = 0,25) permettant de retrouver une structure génétique correcte à l'aide des marqueurs (Figure 2-A). Ceci permet de retracer en partie l'histoire des populations ainsi que leurs usages. Ainsi les lignées BGB11 et BGB22, qui dérivent l'une de l'autre, se regroupent dans un clade relativement homogène de même que les races GAT et BOU et les races CHA et CNF issues de régions proches (Centre et Massif Central). Cependant la structuration selon de grandes régions géographiques ne peut être retrouvée sur l'ensemble des races (non montré ici). L'usage des races et donc leurs aptitudes permettent également

d'observer des proximités génétiques. Par exemple, les lignées commerciales de poulet de chair, SASSO, COB et ROSS se rassemblent en un clade, de même pour les pondeuses à œufs bruns notamment les MAR et les HG qui se regroupent également.

Finalement la race MAR a permis de mettre en évidence la structuration selon la couleur au sein d'une même population (Figure 2-B). Les couleurs forment des groupes relativement homogènes au moins pour certains d'entre-eux. La variété MNC (Marans noire cuivrée) se retrouve à deux endroits distincts. Ceci s'explique par l'éleveur en charge de chacun des groupes, engendrant une structure génétique bien plus forte que le phénotype couleur (Figure 2-B 2-C). En effet, les 3 variétés de l'éleveur 3 sont isolées des autres variétés de Marans mais également bien dissociées entre elles. Ceci confirme que le maintien d'un phénotype peut s'effectuer à partir d'une base génétique différente et avec des modalités différentes, notamment selon le degré d'échange qui est pratiqué entre les éleveurs.

CONCLUSION

En conclusion cette étude aura permis de caractériser la diversité et l'originalité des races de poules anciennes. Ceci constitue une étape préliminaire essentielle à la mise en place de programmes de préservation. Cet état des lieux associé à la reconstruction de l'histoire de ces races peut permettre d'orienter le choix pour le dépôt de semences à la cryobanque nationale. La stratégie de conservation repose actuellement sur le maintien *in situ* d'une diversité génétique importante, ce qui passe par une gestion des accouplements raisonnée localement mais également à l'échelle du réseau d'éleveurs d'une même race. Ceci est d'autant plus vrai que ces races sont en effectifs limités ce qui les rend plus vulnérables à la dérive génétique. Les niveaux de diversité actuels sont très corrects montrant un effort et une efficacité de la gestion actuelle de la diversité génétique par les éleveurs. Finalement la forte discrimination observée entre les races pourrait permettre de détecter des zones d'intérêt dans les génomes mais aussi le développement d'outils moléculaires de contrôle de traçabilité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chang CC, Chow CC, Tellier LCAM, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ (2015) Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience*, 4:7.
- Paradis, E., Claude, J. and Strimmer, K. (2004) APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20, 289–290.
- Popescu, A.-A., Huber, K. T. and Paradis, E. (2012) ape 3.0: new tools for distance based phylogenetics and evolutionary analysis in R. *Bioinformatics*, 28, 1536-1537.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- H. Wickham. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2009.
- Wright, S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to systems of mating.

Tableau 1. Echantillonnage

RACES	Effectif génotypé	Détenteur des animaux
Alsacienne (ALS)	34	Association des Eleveurs de Race Poule d'Alsace, AERPA, représentée par Gilbert Schmitt
Barbezieux (BAR)	60	Association pour la sauvegarde de la Poule de Barbezieux, ASPOULBA, représentée par Gilbert Marchand
Bourbonnaise (BOU)	58	Comité interprofessionnel du poulet Bourbonnais, CIPB, représenté par François Périchon
Bresse Gauloise Blanche (BGB11)	60	Centre de sélection de Béchanne, représenté par Albert Thiévon
Bresse Gauloise Blanche à crête pâle (BGB22)	60	Centre de sélection de Béchanne, représenté par Albert Thiévon
Charollaise (CHA)	56	Centre de sélection de Béchanne, représenté par Albert Thiévon
Contres (CON)	42	Eleveurs Jacques Berger, Eric Nadan, Philippe Vasseau
Coucou de Rennes (CDR)	57	Association des producteurs de Coucou de Rennes, représentée par Paul Renault
Cou-Nu du Forez (CNF)	59	Centre de sélection de Béchanne, représenté par Albert Thiévon
Gasconne (GAS)	60	Association la Poule Gasconne, représentée par Jean-Paul SERRES
Gâtinaise (GAT)	58	Le Parc Naturel Régional du Gâtinais français, représenté par Jean-Jacques Boussaingault
Gauloise Grise (GG)	60	Centre de sélection de Béchanne, représenté par Albert Thiévon
Gauloise Noire (GN)	58	Centre de sélection de Béchanne, représenté par Albert Thiévon
Géline de Touraine (GDT)	60	Syndicat Interprofessionnel de la Géline de Touraine, puis Centre de Sélection de Béchanne
Gournay (GOU)	58	Club pour la sauvegarde des Races Avicoles Normandes, CRAN, représenté par Bruno Lomenède
Grise du Vercors (GDV)	61	Association Ouantia Grise du Vercors, représentée par Evelyne Tezier
Hergnies (HER)	60	Eleveurs Reinhold Adolphi, Damien David, Roland Delvigne, Franck De Sousa, Bernard Dupas, Jean-Luc Malpoux
Houdan (HOU)	58	Centre de sélection de Béchanne, représenté par Albert Thiévon
Le Mans (MAN)	30	Eleveurs Gwénaél L'huissier, Raymond Tertrin
Marans (MAR)	118	Eleveurs Jacques Beneteau, Laurent Galliot, Couvoir du Pin S.A, représenté par Alain Gauguier, Eric Mandon, Daniel Mulon, Georges Riga, Dominique Tourneur
Merlerault (MER)	38	Centre de sélection de Béchanne, représenté par Albert Thiévon
Noire du Berry (NDB)	62	Le Club Français de la Poule Noire du Berry, représenté par Francis Lasne
Pondeuses Œufs bruns (HG)	58	Société Hendrix Genetics
Lignée Label (SASSO)	96	Société SASSO
Lignée Cobb (COBB)	46	Collection AvianDiv, échantillons fournis par la société Cobb
Lignée Ross (ROSS)	50	Collection AvianDiv, échantillons fournis par la société Ross

Figure 1. Mesures de diversité au sein des races (Coefficients de consanguinité moyen, F1 et F2 ; Proportion d'allèles fixés au sein de chaque race ; Hétérozygotie moyenne observée, Ho ; Fréquence moyenne de l'allèle minoritaire, MAF)

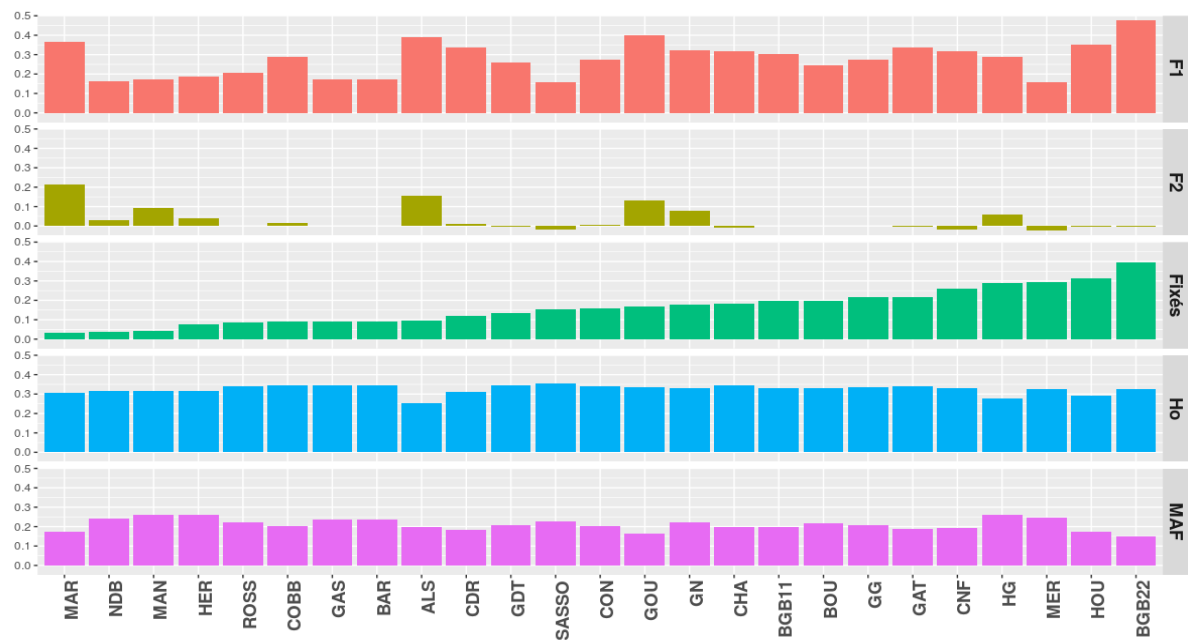
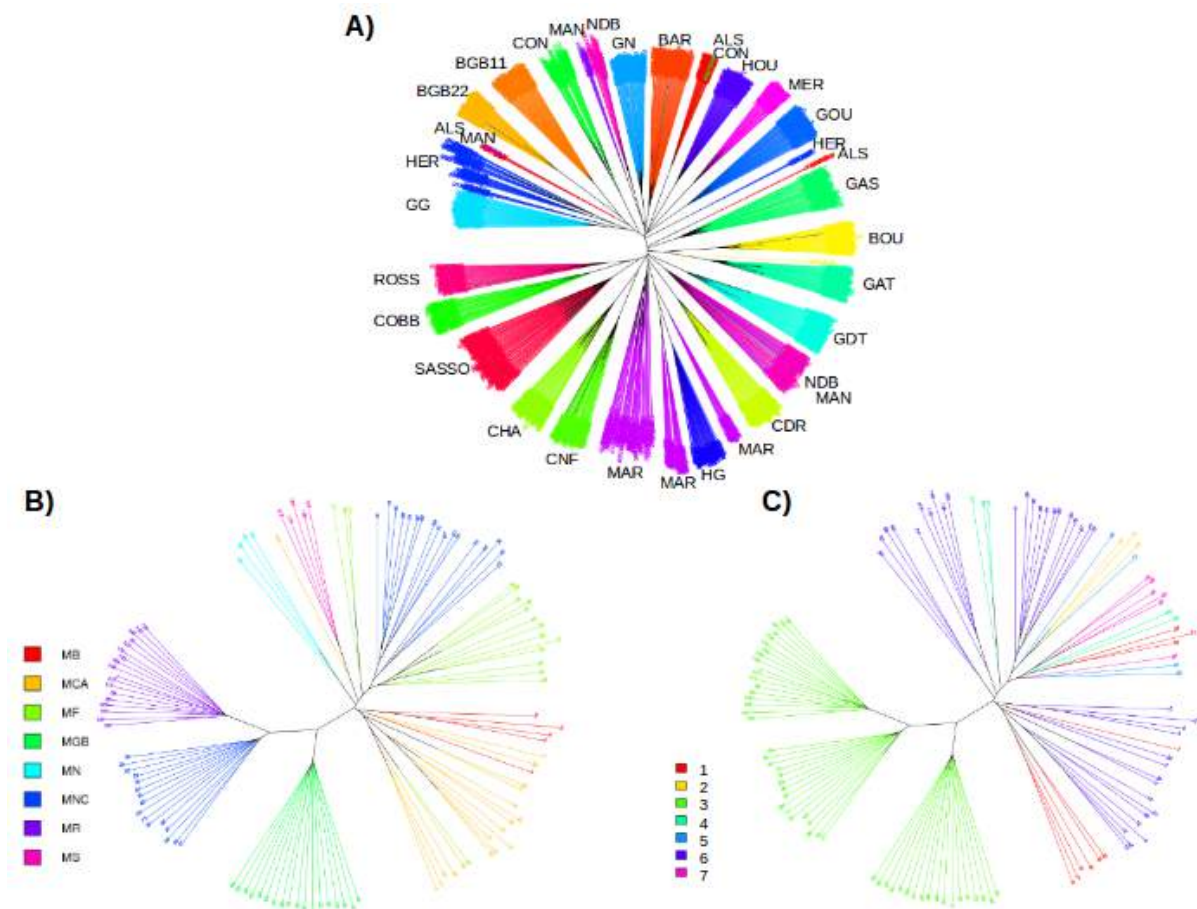


Figure 2. Structure génétique de l'ensemble des races (A) et des variétés de couleurs et des éleveurs chez la Marans (B et C respectivement).



IDENTIFICATION ET EVALUATION DES CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES ET DE PRODUCTION DES VARIETES DE PINTADES LOCALES (NUMIDEA MELEAGRIS) ELEVEES AU NORD-OUEST DU BENIN : LE POINT DE VUE DES PRODUCTEURS

C. A. A. M. Chrysostome¹; B. Fandohan; W. T. Koura¹; V. P. Houndonougbo; J. T. C. Codjia¹

¹*Faculté des Sciences Agronomique, Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou, Benin*
cchrysostome@gmail.com

RÉSUMÉ

Une étude a été menée afin d'identifier et caractériser les différentes variétés de pintades élevées au nord-ouest du Bénin en se basant sur les connaissances endogènes des variétés, les points de vue des éleveurs sur ces variétés. 98 éleveurs ont été enquêtés. Au cours de cette étude, les paramètres morphologiques et phénotypiques de 405 pintades ont été mesurés et observés. L'âge de ces pintades variait entre six (6) et douze (12) mois. Les analyses statistiques ont porté sur les fréquences d'apparition des variétés, l'analyse discriminante pas à pas des caractéristiques morphologiques des variétés, l'analyse univariée des caractéristiques morphologiques des variétés identifiées et la perception des communautés locales sur les caractéristiques des différentes variétés. Sept variétés de pintades ont été identifiées : la variété Bonaparte (Pied : 30,47%), la variété Grise (23,83%), la variété Isabelle (27,52%), la variété Panachée (2,95%), la variété Lavande (Cendre 6,63%), la variété Noire (5,41%) et la variété Blanche comportant : les Albinos (2,46%), la variété Chamoise (0,74%). L'analyse discriminante pas à pas a révélé que les caractéristiques morphologiques comme la longueur de la jambe, l'envergure, le poids et la longueur du corps sont les caractéristiques les plus discriminantes des variétés de pintades mesurées. Il ressort de l'analyse univariée des caractéristiques morphologiques des pintades une différence significative au seuil de 5% entre les variétés étudiées. La variété Blanche et Pied présentent les plus grandes masses corporelles alors que la variété Noire a la plus grande envergure. Les variétés présentant des valeurs élevées pour l'envergure (Noire, Pied, Blanche) présentent aussi une plus grande masse corporelle mais des jambes et des longueurs du corps les plus courtes. Selon les perceptions des éleveurs, la variété Grise présente une rusticité relativement élevée alors que les autres variétés sont de rusticité moyenne. La variété Blanche est la moins rustique. Les variétés Blanche et Noire font l'objet d'une demande relativement élevée alors que la variété Pied est faiblement demandée par les consommateurs. Du point de vue de la ponte, les variétés Panachée, Isabelle et Grise présentent les meilleures performances alors que les variétés Pied, et Blanche présentent les plus faibles performances.

ABSTRACT

A study was carried out to identify and characterize the different varieties of guinea fowl raised in northwest of Benin. The study based on the endogenous knowledge of the varieties and the breeders perceptions on these varieties. 98 breeders were surveyed. The morphological and phenotypic parameters of 405 guinea fowl were measured and observed. The age of these guinea fowl varied between six (6) and twelve (12) months. Statistical analyzes included frequency of occurrence of varieties, stepwise discriminant analysis of the morphological characteristics of varieties, univariate analysis of the morphological characteristics of the varieties identified, and the perception of local communities on the characteristics of the different varieties. Seven varieties of guinea fowl were identified: the Bonaparte (Pied: 30.47%), the Grey (23.83%), the Isabelle (27.52%), the Variegated (2.95% The Lavender (Ash 6.63%), the Black (5.41%) and the white comprising: the Albino (2.46%), the Chamois (0.74%). Discriminant analysis revealed that morphological characteristics such as leg length, wingspan, and weight and body length are the most discriminating characteristics of the guinea fowl breeds measured. The univariate analysis of the morphological characteristics of the guinea fowl showed a significant difference at the 5% threshold between the breeds studied. The White and Pied races exhibit the greatest body weight while the Black race has the largest wingspan. Breeding with high wingspan values (Black, Pied, White) also have greater body weight but shorter legs and body lengths. According to breeder's perceptions, the Grey breeding has a relatively high rusticity while the other races were relatively rustic of average. The White race appear being the less rustic one. The White and Black races are subject to a relatively high demand while the Pied breed is poorly demanded by consumers. From the point of view of spawning, the breeds variegated, Isabelle and Grey have the best performances while the Pied and white breeds have the lowest performances.

INTRODUCTION

L'aviculture familiale, très répandue au Bénin, permet de couvrir une partie des besoins alimentaires de la famille et, dans certains cas, de dégager quelques revenus monétaires par la commercialisation de la production « excédentaire » sur les marchés locaux. Elle joue un rôle important dans l'amélioration des conditions de vie des paysans et dans la réduction de la pauvreté. Outre ces fonctions nutritionnelle et économique, l'aviculture joue aussi un rôle socio culturel.

La production traditionnelle ne couvre pas les besoins des populations. Il conviendrait donc d'améliorer les performances de ces volailles locales et d'étudier leurs potentialités de production afin d'envisager une exploitation rationnelle et économique. Il serait judicieux de diversifier les espèces élevées.

La pintade qui fait partie de la liste des espèces aviaires en danger d'extinction (FAO, 2000), est appréciée pour sa chair plus savoureuse que celle du poulet, et pour ses œufs. Les travaux sur les variétés sont rares. L'une des études réalisées est celle de Chrysostome (1995) au Bénin pour l'identification des différentes variétés de pintades (grise, lilas, isabelle, chamoise, albinos, panachée et noire). D'autres études ont mis en exergue les potentialités de ponte et la qualité des œufs des différentes variétés de pintade (Sonaiya 1997 et Houndonougbo *et al.*, 2014). Peu d'études ont été réalisées sur les caractéristiques de ces variétés.

L'objectif de cette étude est d'identifier et d'évaluer selon le point de vue des connaissances endogènes des producteurs, les caractéristiques phénotypiques et de production des variétés de pintades locales (*Numidea meleagris*) élevées au Nord-Ouest du Bénin.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Présentation de la zone d'étude et échantillonnage

L'étude a été menée au nord-ouest du Bénin qui jouit d'un climat tropical semi humide du type soudano-guinéen caractérisé par une saison pluvieuse et une saison sèche qui est influencée par un vent très chaud le jour et froid la nuit, très sec chargé de poussière (le harmattan). S'appuyant sur les normes de caractérisation recommandées par la FAO (2008) pour le poulet l'étude a privilégié la prise en compte de l'opinion des éleveurs sur les variétés de pintades élevées, leurs performances, leur utilité et utilisation, les caractéristiques phénotypiques, le mode de reproduction et le prix

de chacune de ces variétés suivant l'âge et la période de l'année. Pour cette enquête, l'échantillonnage a été effectué à deux niveaux : le choix des villages et celui des enquêtés. Les villages retenus devaient être éloignés l'un de l'autre, et dans chaque village, il fallait avoir un nombre important d'éleveurs de poules locales. 98 éleveurs sont enquêtés dans cinq arrondissements. Ils devaient posséder une vingtaine de pintades pour être retenus dans l'étude.

1.2. Collecte et traitement des données

Les entretiens avec les éleveurs nous ont permis de recueillir des renseignements sur :

- Les objectifs de production des pintades,
- La provenance des pintades,
- Les différentes variétés de pintades élevées et les critères de différenciation,
- Les préférences des éleveurs concernant les variétés,
- Les variétés de pintades résistantes aux maladies,
- Les facteurs environnementaux qui affectent la productivité et les dispositions pour y remédier,
- Les prix de vente des différentes variétés de pintades,
- Les variétés de pintades les plus demandées et les plus facilement vendues,
- Les critères de choix des pintades destinés à la vente et la classification des différents acheteurs de pintades.

Les observations ont été faites sur un échantillon de 405 pintades au total. Cet échantillon est largement représentatif pour cette étude puisque selon les normes de caractérisation (FAO, 2008) il faut environ 100 poules et 30 coqs pour une étude de caractérisation phénotypique des populations animales. Chaque pintade a été observée, photographiée et décrite. La mesure du poids et les mesures corporelles ont été réalisées sur des pintades adultes d'au moins 12 mois. Les mesures corporelles suivantes ont été réalisées : longueur du bréchet, envergure, longueur de la jambe, longueur du corps, longueur du tarse, tour de poitrine, diamètre de tarse. Les données phénotypiques ont porté sur la couleur du plumage, du bec, de la peau, des tarsi, et des yeux, l'existence ou pas de spot sur les plumes. Les paramètres de productivité (nombre d'œufs pondus, nombre de cycles annuels) ont été notés chez les pintades sur la base des dires des éleveurs.

La statistique descriptive a été utilisée, une analyse discriminante pas à pas, une analyse uni variée et une AFC ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS version 9.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Coloration du plumage

Une race est un ensemble d'animaux d'une même espèce présentant entre eux des caractères morphologiques et physiologiques héréditaires communs. Une variété est une fraction d'animaux d'une espèce ou d'une race que des traitements particuliers de sélection ont permis de distinguer des autres animaux de l'espèce ou de la race par un petit nombre de caractères dont l'énumération définit le modèle.

Ainsi pour le couvoir "la Pintadière", il existe 3 races de pintades, soit : la pintade noire, la pintade à poitrine blanche, la pintade domestique ou commune dont le nom latin est "Numida Méléagris". Elle est la souche la plus domestiquée dans le monde. Mais selon Le Coz-Douin (1992), les pintades sont classées en genres et espèces distincts pouvant se subdiviser en variétés, le tout au sein d'une même famille les numididae. Cette famille comprend les 4 genres cités ci haut (Agelaster, Acryllium, Guitera Numida) et le genre Phasidus.

Suivant le coloris du plumage, on distingue plusieurs variétés de pintades : la variété grise, la variété lilas, la variété isabelle, la variété chamoise improprement appelée blanche, la variété albinos, les variétés panachées (Le Coz (1992)). En 1995 Chrysostome a recensé toutes ces différentes variétés au Bénin et la grise était la plus commune. Pour différencier les pintades, l'éleveur se base sur la couleur du plumage. D'après les éleveurs, la pintade grise ressemble à la pintade sauvage. La pintade grise pourrait donc être la pintade sauvage domestiquée.

Sept variétés de pintades ont été identifiées : la variété Bonaparte (Pied : 30,47%), la variété grise (23,83%), la variété Isabelle (27,52%), la variété Panachée (2,95%), la variété Lavande (cendre 6,63%), la variété Noire (5,41%) et la variété Blanche comportant : les Albinos (2,46%) et la variété Chamoise (0,74%).

L'étude a révélé que la variété Grise est la variété la plus répandue. Ceci peut s'expliquer par le fait que la pintade provient de différentes couleurs avec des variétés bariolées ou pures. Chacune de ces différentes couleurs proviennent de la combinaison d'un petit nombre de gènes différents. La couleur

d'origine grise est génétiquement dominante par rapport à tout autre couleur d'origine unique. (Smith, 2005). L'hypothèse que la pintade Grise serait la pintade sauvage domestiquée pourrait aussi expliquer le grand nombre d'éleveurs de pintades grises. L'élevage de pintade débutant par la couvaison d'œufs et la majorité des œufs de pintade provenant de la pintade Grise, il semble logique que la pintade Grise soit la plus répandue. Ceci amène à noter que les différentes variétés observées sont issues de la pintade Grise suite à des mutations génétiques et se sont affirmées. Le tableau 1 résume les caractéristiques de couleur observées sur les pattes, la peau, les yeux, et le bec chez les différentes variétés de pintades observées.

Caractéristiques morphologiques

L'analyse discriminante pas à pas a révélé que les caractéristiques morphologiques comme la longueur de la jambe, l'envergure, le poids et la longueur du corps sont les caractéristiques les plus discriminantes des variétés de pintades mesurées (Tableau 2). Cette analyse a également souligné un faible pouvoir discriminant de la longueur des tarses. Les autres caractéristiques morphologiques ne sont pas discriminantes.

CONCLUSION

L'étude a permis de mettre en évidence les caractéristiques et les potentialités de chacune des sept variétés de pintade identifiées. Les objectifs de production de la pintade varient suivant la variété de pintade. Avec la classification sur les connaissances endogènes de producteurs des différentes variétés de pintade on peut proposer une subdivision des variétés suivant la spéculation de production : œufs, viande, et spéculation œufs-viande.

Selon les perceptions des éleveurs, la variété Grise présente une rusticité relativement élevée alors que les autres variétés sont de rusticité moyenne. La variété Blanche est la moins rustique. Les variétés Blanche et Noire connaissent une demande relativement élevée alors que la variété Bonaparte (Pied) est faiblement demandée par les consommateurs. Du point de vue de la ponte, les variétés Panachée, Isabelle et Grise présentent les meilleures performances alors que les variétés Bonaparte (Pied) et Blanche présentent les plus faibles performances.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Chrysostome A.A. C., 1995. Méthode de développement de l'élevage au Bénin. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, France.

Couvoir la Pintadière www.pintade.ca/pintade.html du 27 mars 2008

Houndonougbo P. V.; Chrysostome A.A. C.; Houndonougbo M.F.; Hedi A.; Bindelle J.; Gengler N. Evaluation de la qualité externe et interne des oeufs de cinq variétés de pintades locales élevées au Bénin. Science de la vie, de la terre et agronomie REV. CAMES - VOL.02 NUM.02. 2014 * ISSN 2424-7235

Le Coz-Douin J., 1992. L'élevage de la pintade. Edition Point Vétérinaire. Maison Alfort, 252p.

Sonaiya E.B., 1997. African network on rural poultry development. Progress Report, November 1988 to June 1995. Proceeding ANRPD workshop, Addis Ababa, Ethiopia pp 134-143.

FAO. 2000. L'état de la biodiversité de l'agriculture dans le secteur de l'élevage Section F Rome. 119-141p.

FAO. 2008. L'état des ressources zoogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture dans le monde ; édité par Barbara Rischkowsky et Dafydd Pilling. Rome. 577p

Tableau 1. Caractéristiques de couleur observées sur les pattes, la peau, les yeux, et le bec chez les différentes variétés de pintades étudiées.

Variétés	Couleur			
	Patte	Peau	Yeux	Bec
Grise	noire	rose sombre	noire	noir
Pied	rouges	peau jaune	cendre foncé	rouge
Albinos	marrons	violette	marron	orange
Isabelle	pattes orange	peau rose claire	cendre clair	rose
Noire	noires	noire	marron	noir
Panachée	roses	jaune	cendre clair	rouge
Cendre	orange	rose claire	noir	rose
Chamoise	roses	rose	claire	rose clair

Tableau 2. Analyse discriminante pas à pas des caractéristiques morphologiques des variétés

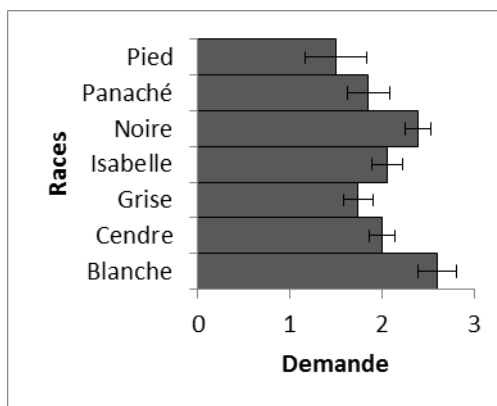
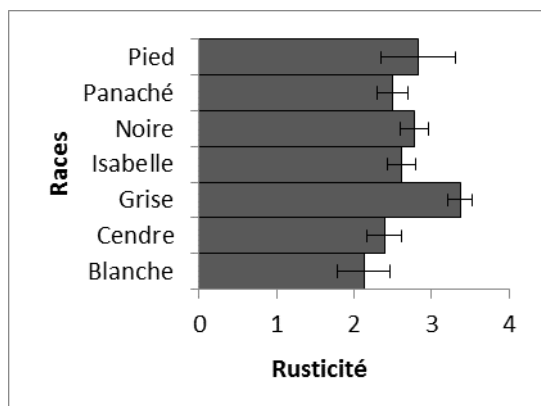
Pas	Entrée	R-Square Partiel	F Value	Pr F	Wilks' Lambda
1	Longueur Jambe	0,16	9,2	<,0001	0,84
2	Envergure	0,14	7,57	<,0001	0,73
3	Poids	0,14	7,75	<,0001	0,57
4	Longueur corps	0,06	3,10	<,0001	0,54

Tableau 4 Coefficient de variation (%) des caractéristiques morphologiques des variétés

Variétés	Envergure (Cm)	Tour de poitrine (Cm)	Longueur corps (Cm)	Longueur tarse (Cm)	Longueur jambe (Cm)	Poids (Kg)
Bonaparte	8,61	16,25	8,07	23,33	33,58	40,02
Blanche	4,01	21,04	6,00	10,33	18,06	53,50
Cendre	11,06	20,06	13,66	12,23	52,13	39,93
Noire	5,21	18,01	6,49	19,35	35,06	28,07
Isabelle	10,36	13,73	9,61	28,23	20,79	24,69
Panaché	17,38	10,68	3,83	7,96	2,18	17,40
Grise	11,23	14,86	6,43	25,69	46,99	24,74

Tableau 5. Coefficient de variation (%) des caractéristiques des variétés telles que perçues par les communautés locales

Variétés	Rusticité	Demande	Ponte	Poids	Prix
Blanche	61,03	8,08	27,81	27	25,1
Cendre	38,49	7	36,02	24,87	20,9
Grise	24,92	9,2	29,11	26,09	32,85
Isabelle	29,86	8,25	20,91	11,65	32,23
Noire	30,58	5,86	19,92	25	20,92
Panachée	30,04	12,43	20,99	0	26,69
Bonaparte	41,34	22,67	0	18,89	40,98



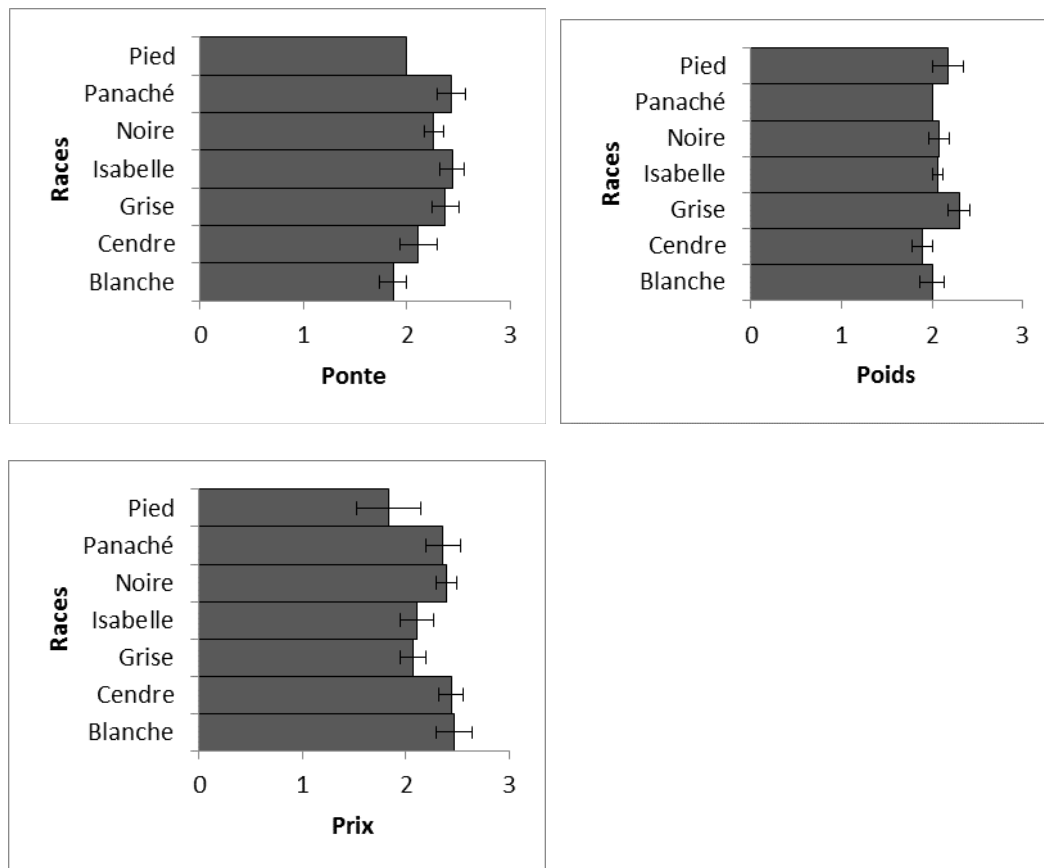


Figure 1. Perception des communautés locales sur les caractéristiques des différentes variétés

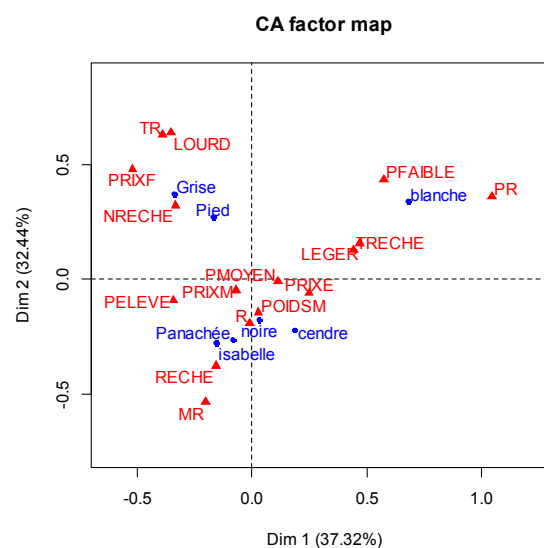


Figure 2. Résultat de l'AFC exécutée sur les caractéristiques des variétés telles que perçues par les communautés locales. Légende: PR : Peu résistante; MR: Moyennement résistante; R: Résistante; TR: Très Résistante; NRECHE: Peu demandé; RECHE: moyennement demandé; TRECHE: Très demandé; PFAIBLE: Faible ponte; PMOYEN: Ponte moyenne; PELEVE: Ponte élevée; LEGER: Poids faible; POIDSM: Masse corporelle moyen; LOURD: Masse corporelle élevée; PRIXF: Faible prix; PRIXM: Prix moyen; PRIXE: Prix élevé.

GENES IMPLIQUES DANS L'ETABLISSEMENT DE LA STEATOSE HEPATIQUE CHEZ LES CANARDS DE BARBARIE, PEKIN ET MULARD

Tavernier Annabelle¹, Ricaud Karine¹, Bernadet Marie-Dominique², Davail Stéphane¹,
Gontier Karine¹

¹UMR UPPA INRA 1419 NuMÉa - IUT De Mont de Marsan 371 Rue du Ruisseau – 40000
MONT DE MARSAN,

²INRA UEFG - 1076 Route de Haut Mauco -40280 BENQUET
karine.gontier@univ-pau.fr

RÉSUMÉ

L'objectif de notre étude était d'identifier les mécanismes de régulation du captage lipidique périphérique et hépatique chez le mulard et ses deux génotypes parentaux : le Pékin et le Barbarie en situation de gavage ou en alimentation *ad libitum*. Nous nous sommes principalement intéressés à l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et plus particulièrement ceux impliquant un retour des lipides au foie. Nous avons démontré une surexpression des gènes des enzymes de la lipogenèse dans le foie des individus gavés (Fatty Acid Synthase/*FAS* et Diacylglycerol O-Acyltransférase 2/*DGAT2*), associée à une diminution d'expression des gènes liés à l'exportation des lipides (Apolipoprotéine B/*ApoB* et Microsomal Triglycerides Transfer Protein/*MTTP*). Dans le muscle, l'expression des gènes de la lipogenèse est également augmentée en gavage quel que soit le type génétique. Concernant l'incorporation des acides gras, nous avons montré une augmentation hépatique de l'expression de Fatty Acid Binding Protein 4 (*FABP4*) chez les trois types génétiques en fin gavage, augmentation nettement plus élevée chez le mulard suggérant un retour au foie des acides gras accru. L'étude des récepteurs aux lipoprotéines démontre une augmentation importante de l'expression du récepteur aux Very Low Density Lipoprotein (*VLDLR*) dans le foie des canards mulard gavés supposant un retour au foie plus important. Ces résultats, pris dans leur ensemble, confirment la variabilité de réponse au gavage observée sur la zootechnie et les capacités des différents types génétiques à stocker les lipides dans le foie. L'accumulation des triglycérides dans le foie est grandement amplifiée chez le canard mulard par la diminution de l'expression des gènes impliqués dans la formation des lipoprotéines, l'augmentation de celles des gènes codant les enzymes de la lipogenèse mais aussi, et surtout, en favorisant le retour des lipides au foie par l'augmentation de l'expression des récepteurs aux lipoprotéines.

ABSTRACT

Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks

Our main objectives were to determine genes involved in the regulation of lipid uptake at hepatic and peripheral levels in mule ducks and its parents: Pekin and Muscovy ducks fed *ad libitum* or overfed. We have shown a hepatic overexpression of Fatty Acid Synthase (*FAS*) and Di-acyl Glycerol Acyl Transferase 2 (*DGAT2*) in overfed individuals. This increase in lipogenesis genes is associated with a decrease of those of lipoprotein formation, especially Apolipoprotein B (*ApoB*) and Microsomal Triglyceride Transfer Protein (*MTTP*) leading to lipid accumulation in liver. In muscle, expression of genes involved in lipogenesis is also increased whatever the genetic types. Regarding lipids re-uptake, Fatty Acid Binding Protein 4 (*FABP4*) is overexpressed in liver, especially in mule ducks, supposing a better hepatic lipid re-uptake. Furthermore, Very Low Density Lipoprotein Receptor (*VLDLR*) are overexpressed in liver of mule ducks at the end of the overfeeding period. This phenomenon puts light on a mechanism unknown until today. In fact, mule can incorporate more lipids in liver than the two other genotypes leading to an intensified hepatic steatosis. To conclude, our results confirmed the genotype variability to overfeeding.

INTRODUCTION

Chez les palmipèdes, la stéatose hépatique (ou foie gras) est induite par une surcharge alimentaire ou gavage. Le développement du foie gras résulte d'une forte activité de lipogenèse hépatique (Saadoun and Leclercq, 1986), les lipides néosynthétisés sous forme de triglycérides (TG) s'accumulent et entraînent ainsi une forte stéatose hépatique (Hermier et al., 1991). Cependant, en fonction des espèces utilisées, on observe une sensibilité métabolique différente au gavage, supposant un déterminisme génétique. Cette différence de performance en réponse au gavage pourrait être le résultat d'une différence de régulation de la balance synthèse/exportation des TG au niveau des tissus. Chez le Pékin, l'exportation des TG via la formation des VLDL (Very Low Density Lipoprotein) est plus active ; ainsi que l'expression de protéines de transport des acides gras (AG) telles que la A-FABP (Adipocyte Fatty Acid Binding Protein ou FABP4) ceci permettant un engraissement périphérique augmenté (Saez et al., 2009). De plus, l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme catabolisant la dégradation des TG au niveau périphérique, est augmentée chez le Pékin en fin de gavage, permettant un stockage périphérique des lipides accru (André et al., 2007). Il est déjà connu que certains gènes (Fatty Acid Synthase, Stearoyl CoA Desaturase SCD1 et Di-Acyl Glycerol Acyl Transferase) impliqués dans la lipogenèse sont plus exprimés dans le foie des canards Pékin et Barbarie gavés que dans celui d'animaux nourris à volonté (Héroult et al., 2010). Cependant, une hypothèse supplémentaire de l'accumulation des TG dans le foie est le possible retour des lipides au foie, contribuant à la mise en place de la stéatose. De plus, connaissant la capacité de ces espèces migratoires à la stéatose, nous avons décidé de cibler nos recherches sur les transporteurs impliqués dans la migration chez les oiseaux. En effet, des études ont démontré des changements d'expression chez les transporteurs d'acides gras (FABP4 et Fatty Acid Transporter/Cluster of Differentiation 36 FAT/CD36) durant la migration (McFarlan et al., 2009; Weber, 2009). Au vu de ces précédentes observations, nous pouvons donc nous demander si ces transporteurs pourraient intervenir pendant le développement du foie gras chez les canards gavés. Dans cette étude, nous avons analysé les effets du génotype et du gavage sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides particulièrement à la fin du gavage.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

Elevage. Six lots de 48 canards mâles (288 animaux) Pékin (*Anas platyrhynchos*), Barbarie (*Cairina moschata*), et mulard issus du couvoir Grimaud (Roussay, France) ont été élevés dans des conditions naturelles de température et de lumière à l'unité expérimentale (UEPFG) de l'INRA Artiguères, Benquet, France. Chaque lot a été réparti en 6 loges. Tous les animaux ont été nourris avec le même régime de démarrage (EM : 2752 kcal/kg ; protéines brutes : 17,5%) et de croissance (EM : 2803kcal/kg ; protéines brutes : 15%). La moitié des lots (lots témoins) a été nourrie *ad libitum* depuis l'éclosion jusqu'à la quatorzième semaine. L'autre moitié, destinée au gavage, a été nourrie *ad libitum* de l'éclosion à la huitième semaine, puis a suivi un rationnement horaire (préparation au gavage). Le gavage (26% maïs sec grain entier, 36% farine de maïs, 38% eau), 2 repas par jour, s'est étalé sur 12 jours à partir de la douzième semaine pour les lots concernés. **Prélèvements et abattage.** Les canards des différentes modalités ont été abattus 3h après le repas par électronarcose et exsanguination à la station expérimentale (UEPFG INRA Artiguères, Benquet, France) à la semaine 14 correspondant au point « fin gavage » (Point 3). Après dissection anatomique, le foie et le *pectoralis major* ont été pesés puis un échantillon a été prélevé puis rapidement congelé à l'azote liquide. L'ensemble des échantillons a été conservé à -80°C jusqu'à l'analyse.

1.2. Analyses

Isolement des ARNs et PCR quantitative. Les ARNs totaux ont été isolés à partir des tissus congelés suivant la méthode du TRIZOL (Invitrogen/Life technologies) et les indications du fournisseur. Après dosage au Nanovue® Plus (GE Healthcare), les ADNc ont été synthétisés par transcription inverse en utilisant la reverse transcriptase Superscript III (Life technologies). Les ADNc ont ensuite été quantifiés grâce à une qPCR utilisant le BIOMARK (Fluidigm gene expression array) et avec l'utilisation de primers spécifiques synthétisés par Life Technologies et correspondants aux gènes d'intérêt comme la Fatty Acid Binding Protein (*FABP4*), la Fatty Acid Synthase (*FAS*), la Di-Glyceride Acyl Transferase (*DGAT2*), l'Apolipoprotéine B (*ApoB*), la Microsomal Triglycerides Transfer Protein (*MTTP*) et le récepteur aux Very Low Density Lipoprotein (*VLDLR*) et au gène de référence : l'actine B. Les résultats ont ensuite été analysés grâce au logiciel « Fluidigm Real-time PCR analysis » (Fluidigm corporation v4.1.3). Le gène de référence utilisé est le gène de l'Actine B. L'expression des gènes d'intérêt a été rapportée à celle de l'actine B utilisée comme référence par le calcul de $2^{-\Delta\Delta CT}$ avec comme standard le canard Pékin avant gavage (Livak and Schmittgen, 2001). **Analyse statistique.** Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. Une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test de Tukey a été réalisée grâce au logiciel Prism

(GraphPad Prism software). Les valeurs de $P < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Au point 3, correspondant à la fin gavage, nous observons deux effets sur l'expression relative des gènes étudiés, un effet du gavage et un effet du type génétique résumés dans le Tableau 1.

Dans le foie, le gavage augmente l'expression relative de la *FAS* chez le canard Pékin et de *DGAT2* dans tous les types génétiques. Cette observation est à mettre en relation avec le pourcentage en lipides hépatiques augmenté (résultats non présentés). En effet, *DGAT2* a déjà été décrite comme une enzyme clé de l'accumulation des lipides dans le foie. Chez des souris qui surexpriment ce gène, une accumulation de lipides importante a été observée (Monetti et al., 2007). De façon inverse, l'inactivation de ce gène conduit à la réduction du pourcentage en lipides du foie (Cheol et al., 2007). Dans notre cas, *DGAT2* est induit de manière plus importante que *FAS*, ce qui pourrait placer la protéine comme enzyme clé de l'accumulation lipidique dans le foie, cette observation ayant déjà été faite par Hérault et al. (Hérault et al., 2010). De plus, l'expression relative de *DGAT2* et *FAS* sont les plus fortes chez le canard Pékin en comparaison des deux autres types génétiques. Concernant l'exportation des lipides, *ApoB* est régulée négativement chez les individus gavés. Le canard Pékin surexprime *ApoB* et *MTTP* en comparaison des canards mulard et de Barbarie. Cette observation est à mettre en relation avec la capacité du canard Pékin à promouvoir l'exportation des triglycérides (TG) par la formation de lipoprotéines conduisant à un foie plus petit (Baeza et al., 2005). Concernant le recaptage des lipides, nous montrons une importante surexpression de *FABP4* et *VLDLR* dans le foie gras des canards mulards. Cet effet est plus faible chez les deux autres types génétiques. Cette importante régulation positive de ces deux gènes met en lumière un mécanisme physiologique jusqu'alors non démontré. En effet, cette observation suggère un possible recaptage des lipides au niveau hépatique en fin de gavage chez le canard mulard. L'accumulation des TG en fin de gavage serait donc

non seulement le résultat d'une lipogenèse augmentée mais aussi le reflet d'un recaptage accru des lipides circulants. Enfin, l'expression du facteur de transcription *PPARG* est largement augmentée chez tous les individus gavés. Ce facteur est d'ores et déjà connu pour réguler l'adipogenèse ainsi que l'accumulation des lipides (Ahmadian et al., 2013; Wang et al., 2008). De plus, ce facteur est également décrit comme surexprimé dans des modèles animaux obèses et diabétiques (Rogue et al., 2010) et pourrait être responsable de l'augmentation d'expression de *FABP4* (Memon et al., 2000).

Dans le muscle, *FAS* et *DGAT2* sont régulés positivement sous l'effet du gavage chez les trois types génétiques mais dans une moindre mesure que dans le foie. Cette observation est en accord avec celle précédemment décrite par Saez et al (Saez et al., 2009). Cependant, une surexpression des gènes impliqués dans la formation des lipoprotéines est observée chez les individus gavés pouvant mener à une plus grande exportation des lipides à partir du muscle. Ces phénomènes peuvent être reliés au pourcentage en lipides plus faible du muscle en comparaison du foie (résultats non présentés). Enfin, le recaptage est illustré au niveau du muscle par une augmentation d'expression chez les canards mulards gavés en comparaison des individus maigres.

CONCLUSION

En conclusion, la stéatose hépatique est le résultat de plusieurs mécanismes (Figure 1). Tout d'abord, même si le canard Pékin présente les valeurs les plus hautes concernant l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse (*FAS* et *DGAT2*), il démontre également les valeurs les plus hautes pour *ApoB* et *MTTP* qui participent à la formation des lipoprotéines, ce phénomène menant à un pourcentage réduit en lipides dans le foie des canards Pékin. De plus, nous avons démontré une importante augmentation de l'expression relative de *FABP4* et *VLDLR* à la fin de la période de gavage chez les canards mulards. Ces nouvelles données nous permettent de comprendre un mécanisme inconnu jusqu'à aujourd'hui. En effet, à côté d'un métabolisme lipogénique accru et d'un manque d'exportation des lipides, le canard mulard pourrait incorporer plus de lipides dans le foie que les deux autres types génétiques. Cependant, cette étude mérite de plus amples investigations notamment en étudiant les quantités et activités protéiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

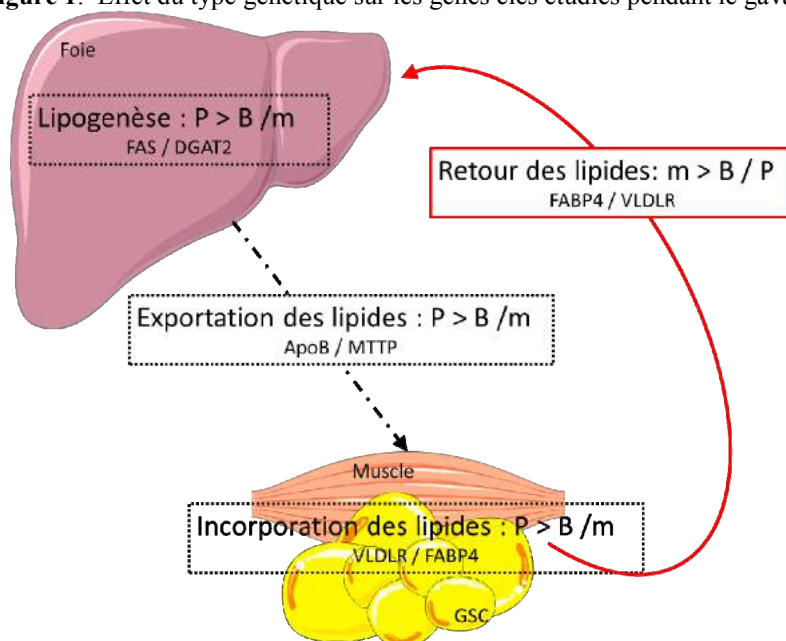
- Ahmadian, M., Suh, J.M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A.R., Downes, M., Evans, R.M., 2013. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 19, 557–566. doi:10.1038/nm.3159
- André, J.M., Guy, G., Gontier-Lattonelle, K., Bernadet, M.D., Davail, B., Hoo-Paris, R., Davail, S., 2007. Influence of lipoprotein-lipase activity on plasma triacylglycerol concentration and lipid storage in three genotypes of ducks. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 148, 899–902.

- doi:10.1016/j.cbpa.2007.09.006
- Baeza, E., Rideau, N., Chartrin, P., Davail, S., Mourot, J., Guy, G., Bernadet, M.D., Juin, H., Meteau, K., Hermier, D., Avicoles, S.D.R., 2005. Canards de Barbarie, Pékin et leurs hybrides : aptitude à l'engraissement.
- Cheol, S.C., Savage, D.B., Kulkarni, A., Xing, X.Y., Liu, Z.X., Morino, K., Kim, S., Distefano, A., Samuel, V.T., Neschen, S., Zhang, D., Wang, A., Zhang, X.M., Kahn, M., Cline, G.W., Pandey, S.K., Geisler, J.G., Bhanot, S., Monia, B.P., Shulman, G.I., 2007. Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 282, 22678–22688. doi:10.1074/jbc.M704213200
- Hérault, F., Saez, G., Robert, E., Al Mohammad, a, Davail, S., Chartrin, P., Baéza, E., Diot, C., 2010. Liver gene expression in relation to hepatic steatosis and lipid secretion in two duck species. *Anim. Genet.* 41, 12–20. doi:10.1111/j.1365-2052.2009.01959.x
- Hermier, D., Saadoun, A., Salichon, M., Sellier, N., Rousselot, D., 1991. Plasma Lipoproteins and Liver Lipids in Two Breeds of Geese with Different Susceptibility to Hepatic Steatosis : Changes Induced by Development and Force-Feeding 26, 331–339.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
- McFarlan, J.T., Bonen, A., Guglielmo, C.G., 2009. Seasonal upregulation of fatty acid transporters in flight muscles of migratory white-throated sparrows (*Zonotrichia albicollis*). *J. Exp. Biol.* 212, 2934–40. doi:10.1242/jeb.031682
- Memon, R.A., Tecott, L.H., Nonogaki, K., Beigneux, A., Moser, A.H., Grunfeld, C., Feingold, R., Feingold, K.R., 2000. Up-Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Acid Expression in the Liver in Murine Obesity : Troglitazone Induces Expression of PPARG -Responsive Adipose Tissue-Specific Genes in the Liver of Obese Diabetic Mice *. *Endocrinology* 141, 4021–4031. doi:10.1210/en.141.11.4021
- Monetti, M., Levin, M.C., Watt, M.J., Sajan, M.P., Marmor, S., Hubbard, B.K., Stevens, R.D., Bain, J.R., Newgard, C.B., Farese, R. V., Hevener, A.L., Farese, R. V., 2007. Dissociation of Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice Overexpressing DGAT in the Liver. *Cell Metab.* 6, 69–78. doi:10.1016/j.cmet.2007.05.005
- Rogue, A., Spire, C., Brun, M., Claude, N., Guillouzo, A., 2010. Gene Expression Changes Induced by PPAR Gamma Agonists in Animal and Human Liver. *PPAR Res.* 2010, 325183. doi:10.1155/2010/325183
- Saadoun, A., Leclercq, B., 1986. In Vivo Lipogenesis of Genetically Lean and Fat Chickens : Effects of Nutritional State and Dietary Fat. *J. Nutr.* 428–435.
- Saez, G., Davail, S., Gentès, G., Hocquette, J.F., Jourdan, T., Degraze, P., Baéza, E., 2009. Gene expression and protein content in relation to intramuscular fat content in Muscovy and Pekin ducks. *Poult. Sci.* 88, 2382–91. doi:10.3382/ps.2009-00208
- Wang, Y., Mu, Y., Li, H., Ding, N., Wang, Q., Wang, S., Wang, N., 2008. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Gene: A Key Regulator of Adipocyte Differentiation in Chickens. *Poult. Sci.* 87, 226–232. doi:10.3382/ps.2007-00329
- Weber, J.-M., 2009. The physiology of long-distance migration: extending the limits of endurance metabolism. *J. Exp. Biol.* 212, 593–7. doi:10.1242/jeb.015024

Tableau 1. Effet du type génétique et du gavage sur l'expression relative des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dans le foie et le muscle des canards Barbarie (B), Pékin (P) et mulard (m) au point 3. (n=6, moyenne $\pm$ SEM) *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, NS=pas d'effet statistique. La barre (/) signifie que les deux types génétiques ne sont pas statistiquement différent l'un de l'autre, > signifie que l'un est supérieur à l'autre.

Point 3		Barbarie		Pékin		mulard		Effets	
Tissus	Gènes	Maigres	Gavés	Maigres	Gavés	Maigres	Gavés	Gavage	Type Génétique
Foie									
Lipogenèse	FAS	5,55 $\pm$ 1,21	10,56 $\pm$ 2,00	3,71 $\pm$ 0,54	12,40 $\pm$ 1,87	2,20 $\pm$ 0,49	2,89 $\pm$ 0,78	P ***	P / B > m ***
	DGAT2	0,004 $\pm$ 0,001	0,084 $\pm$ 0,024	0,006 $\pm$ 0,001	0,364 $\pm$ 0,065	0,003 $\pm$ 0,0008	0,150 $\pm$ 0,041	B / P / m **	P > B / m ***
Formation lipoprotéines	ApoB	0,96 $\pm$ 0,12	0,46 $\pm$ 0,11	1,68 $\pm$ 0,16	0,87 $\pm$ 0,13	1,61 $\pm$ 0,29	0,41 $\pm$ 0,05	B / P / m **	P > B / m *
	MTTP	0,77 $\pm$ 0,07	0,73 $\pm$ 0,13	1,16 $\pm$ 0,13	1,54 $\pm$ 0,23	2,28 $\pm$ 0,36	1,25 $\pm$ 0,21	m *	P > B *
Transport AG	FABP4	0,89 $\pm$ 0,20	23,40 $\pm$ 7,04	1,38 $\pm$ 0,29	9,42 $\pm$ 3,27	2,39 $\pm$ 1,16	229,4 $\pm$ 74,44	B / P / m *	m > B / P **
Récepteur lipoprotéines	VLDLR	1,12 $\pm$ 0,38	1,17 $\pm$ 0,28	1,52 $\pm$ 0,27	1,62 $\pm$ 0,11	1,18 $\pm$ 0,13	3,55 $\pm$ 1,27	m **	m > B **
Facteurs transcription	PPARG	0,94 $\pm$ 0,12	1,73 $\pm$ 0,27	1,34 $\pm$ 0,13	3,41 $\pm$ 0,56	0,79 $\pm$ 0,18	2,41 $\pm$ 0,33	B / P / m *	P > B *
Muscle									
Lipogenèse	FAS	2,14 $\pm$ 0,38	22,77 $\pm$ 7,30	2,73 $\pm$ 0,67	33,88 $\pm$ 7,35	3,81 $\pm$ 1,36	11,88 $\pm$ 1,91	B / P / m *	P > m **
	DGAT2	0,72 $\pm$ 0,16	3,71 $\pm$ 0,87	3,12 $\pm$ 0,51	17,9 $\pm$ 3,38	2,50 $\pm$ 0,29	7,98 $\pm$ 1,44	B / P / m **	P > m > B **
Formation lipoprotéines	ApoB	0,64 $\pm$ 0,20	1,44 $\pm$ 0,50	1,43 $\pm$ 0,48	3,82 $\pm$ 0,61	2,02 $\pm$ 0,85	5,45 $\pm$ 0,48	P / m *	P / m > B *
	MTTP	0,48 $\pm$ 0,14	5,96 $\pm$ 2,23	2,51 $\pm$ 0,90	12,86 $\pm$ 2,88	2,46 $\pm$ 0,86	9,10 $\pm$ 1,26	B / P / m *	NS
Transport AG	FABP4	1,04 $\pm$ 0,18	1,76 $\pm$ 0,50	1,82 $\pm$ 0,49	3,43 $\pm$ 1,66	1,40 $\pm$ 0,57	6,51 $\pm$ 1,93	m *	m > B *
Récepteur lipoprotéines	VLDLR	0,30 $\pm$ 0,07	0,48 $\pm$ 0,10	1,26 $\pm$ 0,26	0,83 $\pm$ 0,20	0,66 $\pm$ 0,18	0,75 $\pm$ 0,20	NS	NS

Figure 1. Effet du type génétique sur les gènes clés étudiés pendant le gavage.



GENES IMPLIQUES DANS L'ETABLISSEMENT DE LA STEATOSE HEPATIQUE CHEZ LES CANARDS DE BARBARIE, PEKIN ET MULARD

Tavernier Annabelle¹, Ricaud Karine¹, Bernadet Marie-Dominique², Davail Stéphane¹, Gontier Karine¹

¹ UMR UPPA INRA 1419 NuMÉA, 371 Rue du Ruisseau 40000 Mont de Marsan

² INRA UEPPG, 1076 Route de Haut Maucq 40280 Benquet

annabelle.tavernier@univ-pau.fr

Objectifs:

Etudier les profils d'expression des marqueurs moléculaires impliqués dans le métabolisme lipidique en fonction du régime et du génotype.

Introduction:

Variabilité génétique au gavage



♂ Barbarie

- Lipogenèse hépatique +++
- Hydrolyse périphérique des TGs faible
- Poids de foie élevé, forte aptitude au gavage



♀ Pékin

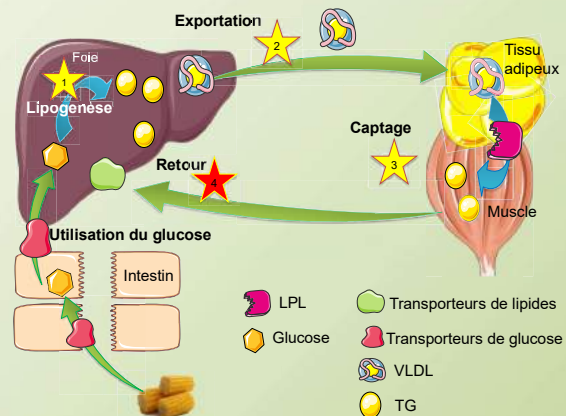
- Lipogenèse musculaire +++
- Captage lipidique périphérique +++
- Engraissement périphérique favorisé, faible aptitude au gavage



mulard

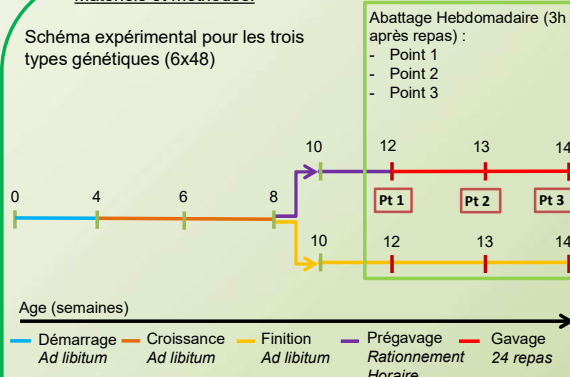
(Baéza et al. 2005, Davail et al. 2003)

Stéatose hépatique



Matériels et méthodes:

Schéma expérimental pour les trois types génétiques (6x48)



Prélèvement du foie et du muscle (*Pectoralis major*). Extraction et isolation des ARN, transcription inverse puis analyse en PCR Quantitative par Fluidigm (Biomark) avec comme gène de référence l'ActinB.

Une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test de Tukey a été réalisée grâce au logiciel Prism. Les valeurs de $p < 0,05$ étaient considérées comme statistiquement significatives.

Résultats:

Effet gavage: expression ■ > ■ > ■ Effet génotype: a > b

		Lipogenèse hépatique			
		FAS		DGAT2	
Génotype		Point 2	Point 3	Point 2	Point 3
		NG	G	NG	G
Barbarie			a		b
Pékin			a		a
mulard			b		b

FAS : peu de différence chez le mulard, or foie gras plus gros et gras
→ Surexpression plus précoce?

DGAT2 : gène clé de la synthèse des lipides car plus régulé

		Exportation des lipides à partir du foie			
		ApoB		MTTP	
Génotype		Point 2	Point 3	Point 2	Point 3
		NG	G	NG	G
Barbarie				b	b
Pékin				a	a
mulard					

Diminution de l'expression d'ApoB et MTTP chez les gavés → Stéatose

Exception : Pékin, augmentation de l'exportation → Défavorable à la formation du foie gras

		Captage périphérique des lipides			
		FABP4 Muscle		FABP4 GSC	
Génotype		Point 2	Point 3	Point 2	Point 3
		NG	G	NG	G
Barbarie			b	b	
Pékin				a	
mulard			a	b	

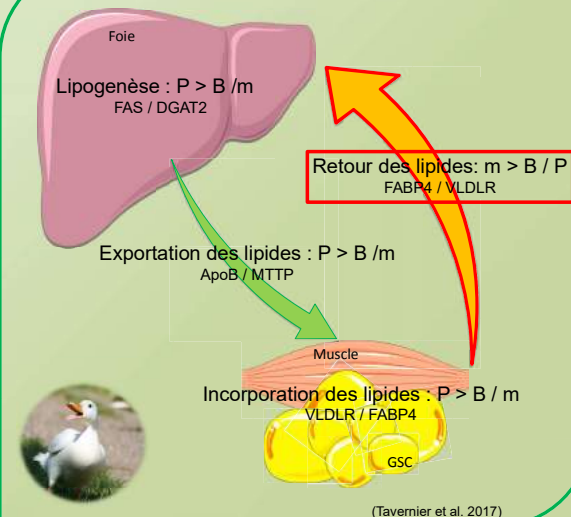
Captage périphérique amélioré chez le Pékin (GSC) et le mulard (Muscle)

		Retour hépatique des lipides			
		FABP4		VLDLR	
Génotype		Point 2	Point 3	Point 2	Point 3
		NG	G	NG	G
Barbarie			b		b
Pékin			b		
mulard			a		a

Augmentation considérable de l'expression de FABP4 chez le mulard, associé à une augmentation de VLDLR

→ Retour des lipides au foie beaucoup plus important
→ Foie gras

Conclusion:



(Tavernier et al. 2017)

Références : Tavernier A. et al., 2017. Mol. Cell. Biochem. 424 (1), 147-161.

Baéza E. et al., 2005. INRA Prod. Anim. 18 (2), 131-141.

Davail S. et al., 2003. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 135 (4), 707-715

UNE NOUVELLE FACETTE DU GENOME DE POULE : LES GENES “LONGS NON-CODANTS”

Muret Kévin¹, Klopp Christophe², Wucher Valentin³, Esquerré Diane^{4,5}, Legeai Fabrice⁶, Lecerf Frédéric¹, Désert Colette¹, Boutin Morgane¹, Jehl Frédéric¹, Acloque Hervé⁵, Giuffra Elisabetta⁷, Djebali Sarah⁵, Foissac Sylvain⁵, Derrien Thomas³, Lagarrigue Sandrine¹

¹INRA/AGROCAMPUS OUEST UMR PEGASE – 65, rue de St-Brieuc - 35000 RENNES,

²INRA SIGENAE - 24, chemin de Borderouge-Auzeville - 31320 CASTANET-TOLOSAN,

³CNRS/UNIV. RENNES 1 UMR IGDR - 2, avenue du Pr. Léon Bernard - 35000 RENNES,

⁴INRA GENOTOL - 24, chemin de Borderouge-Auzeville - 31320 CASTANET-TOLOSAN,

⁵INRA GENPHYSE/UNIV. DE TOULOUSE - 24, chemin de Borderouge-Auzeville - 31326 CASTANET-TOLOSAN,

⁶INRA/AGROCAMPUS OUEST UMR IGEPP - Domaine de la Motte – 35653 LE RHEU,

⁷INRA GABI/AGROPARISTECH/UNIV. PARIS SACLAY - Domaine de Vilvert - 78352 JOUY-EN-JOSAS

sandrine.lagarrigue@agrocampus-ouest.fr

RÉSUMÉ

De récents travaux effectués chez l'homme et des organismes modèles ont montré l'existence massive d'un nouveau type de gènes : des gènes transcrits en longs ARN (≥ 200 nt) mais ne codant pas de protéine – ces gènes sont appelés gènes à ARN longs non-codants (ARNlnc). Ces ARNlnc sont une composante majeure du transcriptome et seule une petite fraction de ces ARNlnc est décrite aujourd'hui dans les bases de données publiques. Nos travaux sur les ARNlnc de poule ont permis de montrer que le séquençage de transcrits (RNA-Seq) sur plusieurs réplicats biologiques de deux tissus (foie et tissu adipeux) permet de prédire un catalogue d'ARNlnc plus exhaustif pour les tissus considérés que ce qui est proposé dans les bases de données. Nous avons pu confirmer également que les caractéristiques des ARNlnc de poule sont similaires à celles décrites chez la souris ou chez l'Homme (transcrits plus courts, moins d'exons, séquences moins conservées entre les espèces, expression plus tissu spécifique et moins importante que les ARN codant pour des protéines (ARNm)). Nous mettons également en lumière un couple d'ARNlnc et ARNm (DHCR24) adjacent sur le génome et en position divergente dont l'expression est fortement corrélée et dont la position est conservée chez l'Homme suggérant un mécanisme de régulation commun via un promoteur dit « bi-directionnel » qui serait impliqué dans la synthèse du cholestérol.

ABSTRACT

A new side of the chicken genome: Long noncoding RNAs

Recent works in humans and model organisms have shown a massive new type of genes: genes transcribed into long RNAs (≥ 200 nt) but not coding for proteins - these genes are called long noncoding RNA genes (lncRNA). These lncRNAs are a major component of the transcriptome and only a small fraction of them is described in public databases. Our study conducted on chicken shows that transcriptomic sequencing (RNA-Seq) on multiple biological replicates of two tissues (liver and adipose tissue) allows us to predict a lncRNA catalog for these two tissues more exhaustive than lncRNAs catalog available in public databases. We also confirm that chicken lncRNA features are similar to those of human and murine lncRNAs described in the literature (shorter transcripts, less exons, sequences less conserved across species, more tissue-specific expression and lower expression than protein coding RNAs (mRNA)). In conclusion, we provide a comprehensive lncRNA repertoire in the chicken liver and adipose tissue and we highlight a new lncRNA-mRNA pair in divergent position in the chicken genome (as in the human genome), highly co-expressed suggesting a common regulation mechanism through a bidirectional promoter and probably involved in cholesterol metabolism.

INTRODUCTION

Les transcrits de type « longs non-codants » (ARNlnc) font depuis quelques années l'objet de très nombreuses publications au sein de la communauté scientifique. L'avènement des nouvelles technologies de séquençage haut débit (RNA-seq) a permis l'identification de ces nouveaux ARN qui physiquement sont très semblables aux transcrits de type « messenger » (ARNm) [i.e. coiffés, polyadénylés et épissés pour la majorité] mais qui n'ont pas de potentiel codant, c'est-à-dire, qui ne codent pas des protéines. Les régions génomiques portant ces gènes ont longtemps été considérées comme de « l'ADN poubelle », sans aucune entité ou fonction biologique connue, mais à ce jour, le nombre de gènes de type « non-codant » dépassent le nombre de gènes de type « codant une protéine » chez l'Homme (Derrien et al., 2012). Cet engouement nouveau pour ce nouveau type d'ARN est dû au fait qu'ils sont associés, pour la majorité des ARNlnc décrits à ce jour, à des mécanismes de régulation de l'expression d'autres gènes (codant ou non) (Mercer et al., 2009 ; Schmitz et al., 2016). Les premiers catalogues d'ARNlnc humains et murins référencés sur GENCODE (Harrow et al., 2012) datent de 2009 et 2011 (Ørom et al., 2010 ; Derrien et al., 2012). Cette année, avec le nouvel assemblage du génome de la poule (Gallus5), on a vu apparaître les premiers ARNlnc chez la poule dans les bases de données publiques [i.e. en janvier sur le site bio-informatique américain NCBI ; en octobre sur le site européen Ensembl]. Il est important de souligner que ces ARNlnc sont prédits à partir de données expérimentales (séquençage des transcrits d'un tissu) sur la base de règles qui peuvent diverger d'un outil de prédiction à l'autre. Aussi, il peut y avoir de grandes différences entre ces deux catalogues d'ARNlnc prédits qui n'ont fait, à ce jour, l'objet d'aucune publication. Dans ce contexte, nous avons construit un catalogue d'ARNlnc (Muret et al., 2017) à partir de données de séquençage de transcrits de deux tissus (le foie et le tissu adipeux) en utilisant un outil de prédiction FEELnc qui est plus performant que ceux utilisés traditionnellement (Wucher et al., 2016). Nous avons comparé ces ARNlnc avec les bases de données publiques (NCBI et Ensembl) et les avons caractérisés en termes de structure (séquences, localisation génomique) et d'expression. Profitant d'un dispositif unique constitué de 16 répliquats biologiques par tissu, nous avons également étudié la co-expression entre couples de gènes adjacents codant un ARNlnc pour l'un et un ARNm pour l'autre. Nous avons ainsi identifié un couple fort intéressant impliquant un gène codant une enzyme du cholestérol (*DHCR24*) et un ARNlnc susceptible de partager un promoteur bidirectionnel avec le gène *DHCR24*.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Collecte des échantillons, extraction et séquençage des ARN

16 poulets de chair ont été sacrifiés à l'âge de 9 semaines et leur foie et tissu adipeux abdominal ont été extraits, plongés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Les ARN totaux ont été extraits selon les instructions du fabricant (RNeasy® Mini Kit, QIAGEN) à partir de 30 et 100 mg de foie et tissu adipeux. Ces ARN ont été quantifiés sur spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000. 16 et 8 échantillons de foie et tissu adipeux ont été séquencés sur HiSeq 2000 (RNA-Seq ; lectures de 2x100 bases paires et orientées) et 8 échantillons supplémentaires de tissu adipeux ont été séquencés sur HiSeq 3000 (lectures 2x150 bases paires et orientées). 3,3 Md de lectures ont été obtenus sur les 32 échantillons (111 M et 92 M en moyenne pour les foies et les tissus adipeux).

1.2. Prétraitement informatique

3 Md de lectures ont été alignées sur le génome de référence Gallus4 via l'outil STAR (v2.4.0i) et les duplicats de PCR ont été supprimés pour chaque échantillon avec l'outil rmdup (v0.1.19). L'ensemble des données a été concaténé par l'outil merge (v1.1) puis la modélisation de nouveaux gènes a été effectuée via le logiciel Cufflinks (v2.2.1) en utilisant l'annotation des gènes d'Ensembl (v.82) comme référence. La quantification de l'expression des gènes a été faite à partir du logiciel featureCounts (v1.4.5-p1) sans considération des lectures dites « multi-alignées » sur les fichiers issus de l'alignement. 2,4 Md de lectures ont été considérées sur les 32 échantillons (88 M et 63 M en moyenne pour chaque échantillon de foie et de tissu adipeux).

1.3. Prédiction des ARNlnc

Les ARNlnc ont été prédits par FEELnc (v23.11.2015) (Wucher et al., 2016). Cet outil permet de générer un score de « potentiel codant » pour chaque ARN à partir de caractéristiques qui permettent de discriminer les ARN non-codants des ARN codant (i.e. taille d'ARN, couverture du cadre de lecture maximal, fréquence en « mots » de 1, 2, 3, 6, 9 et 12 lettres) à partir de deux sets d'entraînement : les annotations NONCODE (v.5) pour les ARNlnc et Ensembl (v.78) pour les ARNm. FEELnc permet également de classer les ARNlnc en fonction du gène codant le plus proche. Cet outil, récemment mis au point par T. Derrien, a montré de meilleures performances que les autres outils utilisés massivement depuis quelques années (cf. <http://biorxiv.org/content/early/2016/07/18/064436>).

1.4. Comparaison de nos ARNlnc avec les ARNlnc poulets des bases de données NCBI et Ensembl

Les ARNlnc prédits ont été recherchés dans les nouvelles annotations et génome de la poule de 2016 (i.e. ARNlnc et ARNm d'Ensembl v.86 et du NCBI v.103) via l'outil d'alignement local de séquences Blastn (v.2.4.0+). Il a été choisi de conserver les options par défaut et de ne garder que le meilleur résultat de chaque recherche.

1.5. Conservation des ARNlnc poulet chez l'Homme

La conservation de la séquence entre espèces a été testée contre les ARNlnc humains (GRCh38 ; v.83) avec l'outil Blastn (v.2.4.0+) en adaptant les options pour des séquences éloignées (i.e. taille de mot minimum (7), 50% de couverture de la requête et 70% d'identité).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Identification et classification des ARNlnc

L'annotation du génome du poulet (v.82) recense 17939 transcrits et 17105 gènes dont 15508 codent pour des protéines. La modélisation de nouveaux gènes à partir des séquences des transcrits des 16 foies et 16 tissus adipeux et l'annotation par l'outil FEELnc de ces nouveaux modèles a permis de définir 2193 nouveaux gènes de type « long non-codant » dont 1670 sont exprimés de façon robuste [i.e. exprimés dans au moins un des deux tissus et dans la majorité des échantillons (10 sur 16)]. Ces ARNlnc sont pour la plupart d'entre eux des ARNlnc de type « intergéniques » (89%), c'est-à-dire localisés entre des gènes connus. Cette classification est évidemment dépendante de l'annotation du génome (ici, v.82). Parmi ces ARNlnc intergéniques, on distingue 3 sous-classes d'ARNlnc définies par rapport au gène le plus proche sur le génome (Fig. 1) : les ARNlnc intergéniques de type « même brin » 48%, de type « convergent » 15% et de type « divergent » 26%. Les 11% d'ARNlnc restant sont des ARNlnc de type « géniques », c'est-à-dire qu'ils sont situés au même locus qu'un autre gène mais en position anti-sens.

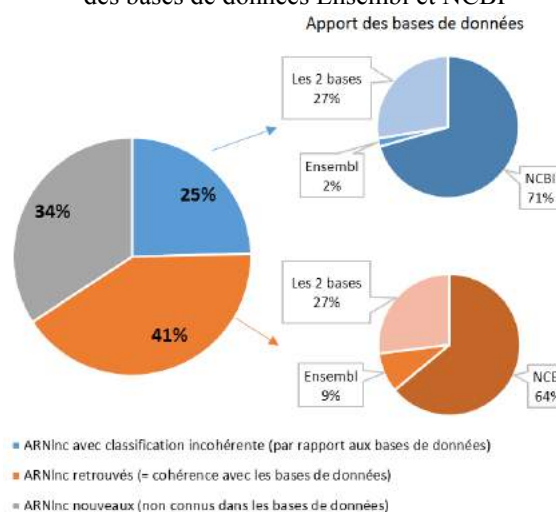
Figure 1. Classification et illustration des ARNlnc (●) en fonction des gènes codant proches (●).

ARNlnc intergéniques [89%]			ARNlnc géniques [11%]
Même brin	Convergent	Divergent	Anti-sens
			
801	255	437	177

2.2. Les ARNlnc en regard des nouveaux ARNlnc des bases de données NCBI et Ensembl.

Nous avons comparé notre catalogue d'ARNlnc avec les deux catalogues disponibles chez le poulet dans les deux bases de données internationales (les 8184 ARNlnc du NCBI - v.103 et les 7841 ARNlnc de Ensembl - v.86). 34% de nos ARNlnc ne sont pas présents dans ces catalogues. Concernant les 66% restant, nous montrons que deux tiers *versus* un tiers de nos ARNlnc correspondent à des ARNlnc *versus* ARNm référencés sur au moins une des bases de données (Fig. 2). La portion différentielle entre ces différents catalogues est due aux différentes stratégies d'annotation des ARN et il est impossible aujourd'hui de définir la part de vérité parmi ce set d'ARN.

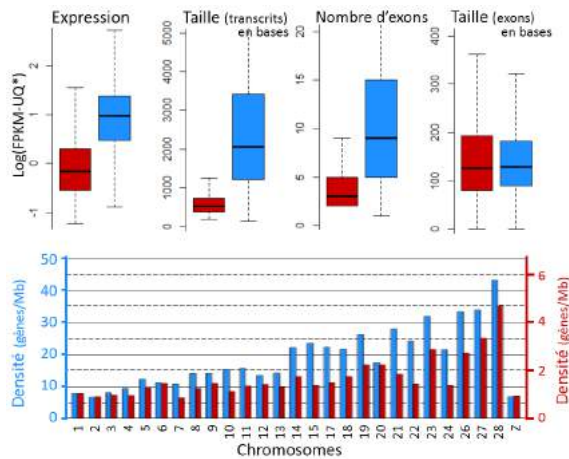
Figure 2. Comparaison de nos ARNlnc avec ceux des bases de données Ensembl et NCBI



2.3. Caractérisation des ARNlnc de la poule (Fig. 3)

Comme déjà observé chez l'Homme, nous montrons également que les gènes de type « long non-codant » ont une expression tissulaire plus faible que celle des gènes codant pour des protéines (en moyenne 10 fois moins) et ont une expression plus tissu spécifique (24% *versus* 3%). Au niveau structural, les ARNlnc sont plus courts et possèdent moins d'exons que les ARNm, alors que la taille des exons ne varie pas. Les ARNlnc ne sont pas localisés préférentiellement sur certains chromosomes et leur densité chromosomique est corrélée à celle des ARNm ($r=0,91$).

Figure 3. Caractéristiques des ARNlnc (●) par rapport aux ARNm d'Ensembl v.85 (●). *FPKM-UQ est une quantification normalisée reflétant le niveau d'expression des gènes.



2.4. Conservation des ARNlnc

Comme présenté dans plusieurs publications sur la conservation des ARNlnc entre les espèces, nous confirmons que nos ARNlnc sont très peu conservés en séquence entre l'Homme et le poulet (2 ARNlnc d'après nos critères). En revanche, nous avons retrouvé 64% de nos ARNlnc entourés de 2 gènes orthologues et codants qui co-localisent de la même manière chez l'Homme (*i.e.* succession de trois gènes adjacents conservés au niveau positionnel dans les deux génomes). Cette conservation positionnelle des ARNlnc suggère un rôle potentiel de ces gènes « longs non-codants » à cette position donnée.

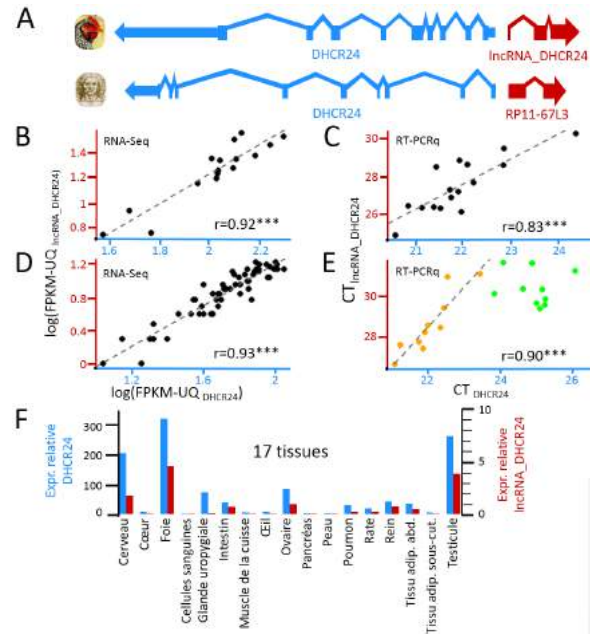
2.5. ARNlnc divergents et coexpression

Parmi les ARNlnc conservés, nous avons pu mettre en évidence que les ARNlnc de type « divergent » et proches sur le génome (<1000 bases) ont une expression plus fortement corrélée avec celle du gène codant le plus proche que les ARNlnc de type « divergent » distants (22% *versus* 13%; test de Fisher, p -valeur=3,7.10⁻²).

L'expression de l'ARNlnc « *lncRNA_DHCR24* », par exemple, est fortement corrélée ($r=0,92$) à celle du gène codant *DHCR24*, enzyme clé du métabolisme du cholestérol (Fig. 4b). Ces deux gènes sont très proches (environ 200 bases), et ils sont retrouvés dans cette même disposition chez la souris, chez l'Homme et d'autres espèces (Fig. 4a). Ce qui laisse penser que cette configuration n'est pas anodine et une étude plus approfondie de ce couple permettrait peut-être de montrer le potentiel rôle régulateur du *lncRNA_DHCR24* dans le métabolisme des lipides. Nous avons validé cette co-expression par une autre technique (la RT-PCRq, Fig. 4c) que le séquençage ($r=0,83$) et ce, dans différents dispositifs de poules ($r=0,93$ pour 50 animaux adultes de 31 semaines (Fig. 4d), $r=0,90$ pour de jeunes animaux de 9 semaines (Fig. 4e)). Cette corrélation est également vraie à travers les tissus (Fig. 4f).

Figure 4. Caractérisation du *lncRNA_DHCR24* (●) avec son gène le plus proche en position divergente et codant l'enzyme *DHCR24* (●). (A) Illustration des modèles de gènes chez la poule et chez l'Homme. (B)

et (C) expression des deux gènes dans les 16 foies de poule (RNA-Seq et validation en RT-PCRq). (D) Idem chez des animaux adultes (RNA-Seq). (E) Idem chez de jeunes animaux (RT-PCRq) avec deux régimes (● : nourri ; ● : à jeun). (F) Expression des deux gènes à travers différents tissus.



CONCLUSION

La modélisation et la classification des ARN à partir du séquençage des transcrits de 16 réplicats biologiques nous a permis de constituer et caractériser un premier répertoire de gènes « longs non-codants » du foie et du tissu adipeux chez le poulet. Leurs caractéristiques sont similaires à ce qui est à ce jour connu dans d'autres espèces. Des cas intéressants de gènes en position divergente dans le génome et avec des expressions corrélées ont été mis en évidence et mériteront de plus amples analyses. Ces premiers travaux sur une espèce d'élevage (Muret et al., 2017) s'inscrivent dans un programme de plus grande envergure FR-AgENCODE, porté par l'INRA, dont l'objectif est d'améliorer l'annotation fonctionnelle des génomes de quatre espèces d'élevage : le porc, le bovin, la chèvre et la poule.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Derrien T., Johnson R., Bussotti G., Tanzer A., Djebali S., Tilgner H., et al. 2012. *Genome Res.*, (22), 1775-89
- Harrow J., Frankish A., Gonzalez J.M., Tapanari E., Diekhans M., Kokocinski F., et al. 2012. *Genome Res.* (22), 1760-74
- Mercer T.R., Dinger M.E., Mattick J.S.. 2009. *Nat. Rev. Genet.*, (10), 155-9
- Muret K., Klopp C., Wucher V., Esquerré D., Legeai F., Lecerf F., et al. 2017. *Genet. Sel. Evol.*, (49).
- Ørom U.A., Derrien T., Beringer M., Gumireddy K., Gardini A., Bussotti G., et al. 2010. *Cell*, (143), 46-58
- Schmitz S.U., Grote P., Herrmann B.G.. 2016. *Cell Mol Life Sci.* (73), 2491-509
- Wucher V., Legeai F., Hedan B., Rizk G., Lagoutte L., Leeb T., et al. 2016. *Nucleic Acids Res.*

EFFET DU NANISME LIE AU SEXE (DWARF) SUR L'EXPRESSION DES GENES DU FOIE CHEZ LA POULE

Tatiana Zerjal¹, Gilles Monneret^{1,2}, Marco Moroldo¹, Jean-Luc Coville¹, Michèle Tixier-Boichard¹, Andrea Rau¹, Grégory Nuel² and Florence Jaffrézic¹

¹ GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

² UPMC, LPMA, 5 Place Jussieu, 75005 Paris, France

tatiana.zerjal@inra.fr

RÉSUMÉ

Le nanisme lié au sexe (SLD), correspondant au locus "dwarf" (dw), est la conséquence de mutations dans le gène du récepteur de l'hormone de croissance (GHR), localisé sur le chromosome Z. Dans la population expérimentale White Leghorn utilisée dans cette étude, le nanisme est dû à une « perte de fonction » du gène GHR. Elle entraîne une réduction significative de la taille du corps chez les femelles hémizygotes (30%) et les mâles homozygotes (40%). Les poules naines sont utilisées commercialement dans les lignées maternelles de poulet de chair du fait de leur moindre coût d'élevage. Elles sont aussi un modèle intéressant pour la compréhension des mécanismes de contrôle de l'expression des gènes par l'hormone de croissance ainsi que l'étude de caractères complexes comme les dépenses d'énergie ou la résistance à la chaleur. Dans cette étude, nous avons étudié le transcriptome du foie sur 24 poules SDL et 24 sœurs et demi-sœurs normales obtenues par croisement d'un coq hétérozygote "Dw+/dw" avec 12 femelles Leghorn normales. Les résultats montrent que la mutation du nanisme « dw » induit des changements importants dans l'expression d'un grand nombre de gènes dans le foie. Ainsi, plus de 5000 gènes différentiellement exprimés (DE) ont été identifiés (p-value ajustée <0.05), dont 2219 avec un « log fold change » ≤ |0.2|. Des analyses fonctionnelles à partir des gènes DE dans le foie ont mis en évidence des altérations significatives du métabolisme lipidique et protéique, du transport moléculaire, de la croissance et la prolifération cellulaire.

ABSTRACT

The sex-linked dwarfism (SLD), corresponding to the genomic locus « dwarf » (dw) is due to mutations in the Growth Hormone Receptor (GHR) gene on chromosome Z. In the experimental Leghorn population used in this study the dwarf condition is due to a mutation causing a loss of function of the GHR gene. This mutation is characterized by a significant reduction of body size in hemizygous females (30%) and homozygous males (40%). In addition to its commercial use in the broiler dam lines to improve production efficiency, the SLD mutation is also an interesting model to unravel regulatory pathways depending on GH and to investigate complex traits such as energy expenditure and heat resistance. In this study, we analyzed the liver transcriptome from 24 SLD and 24 wild type birds of 12 weeks of age obtained by crossing a heterozygous "dw" Leghorn cock with 12 females of an inbred Leghorn line to obtain wild type and dwarf sib and half-sib hens. Differential expression analysis revealed that the sex-linked Dwarf mutation produces dramatic changes in liver gene expression. In total more than 5000 differentially expressed (DE) genes were identified (adjusted p-value <0.05), 2219 of which had a log fold-change ≤ |0.2|. Functional analyses of sex-linked Dwarf-induced DE genes indicate an alteration of lipid and amino acid metabolism, molecular transport and cellular growth and proliferation.

INTRODUCTION

L'hormone de croissance (GH) exerce des effets pléiotropes sur la croissance et le métabolisme par le récepteur de l'hormone de croissance (GHR). Une altération du récepteur GH est associée à un état de résistance à l'hormone de croissance et à une réduction significative de la taille corporelle. La mutation du nanisme DW est connue de longue date pour ses effets phénotypiques et physiologiques sur plusieurs espèces animales. Chez le poulet elle a pu être identifiée sur le plan moléculaire grâce au clonage du gène du récepteur de l'hormone de croissance (GHR) en 1991 (Burnside et al. 1991). Chez le poulet on parle de nanisme lié au sexe (Sex-linked dwarfisms, SLD), car le gène GHR est localisé sur le chromosome Z. A ce jour trois mutations différentes ont été identifiées dans des lignées non apparentées, qui correspondent toutes à une mutation de type « perte de fonction » du gène qui entraîne une absence de liaison fonctionnelle entre l'hormone de croissance (GH) et son récepteur GHR (Tixier- Boichard 2000). Les poules naines sont utilisées commercialement dans les lignées maternelles de poulet de chair du fait de leur moindre coût d'élevage. Elles sont aussi un modèle intéressant pour la compréhension des mécanismes de contrôle de l'expression des gènes par GH ainsi que l'étude de caractères complexes comme les dépenses d'énergie ou la résistance à la chaleur, pour lesquelles les poulets SLD diffèrent par rapport à ceux de taille normale. Dans la population expérimentale White Leghorn utilisée dans cette étude, le nanisme est dû à la présence d'une mutation de type « faux-sens » dans la séquence codante du domaine extracellulaire du récepteur (Duriez et al. 1993) qui empêche l'interaction GH-GHR. Elle entraîne une réduction de la taille du corps chez les femelles hémizygotés (30%) et les mâles homozygotes (40%) et des altérations endocriniennes très importantes comme la réduction de la concentration plasmatique de l'IGF-I et du Tri-iodothyronine (T3) circulantes.

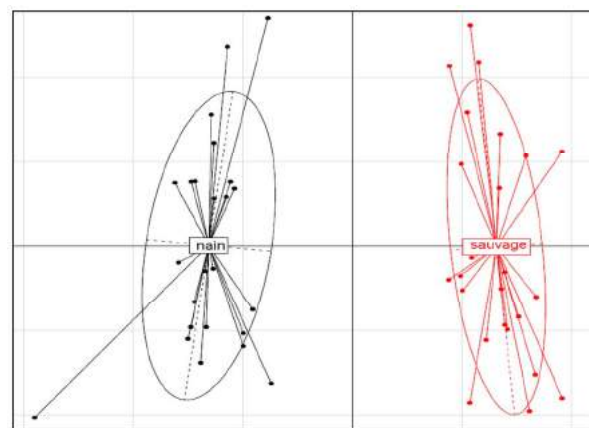
Les diverses actions physiologiques de l'hormone de croissance passent par des changements dans la transcription génétique. Cette étude vise à identifier dans le foie les gènes sous le contrôle de GH et de mieux caractériser les voies de signalisation affectées par l'hormone de croissance.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux, échantillonnage et extraction d'ARN

Dans cette étude, nous avons créé une population de poules Leghorn par croisement d'un coq hétérozygote "Dw+/dw" avec 12 femelles Leghorn normales pour obtenir des sœurs et demi-sœurs normales et naines (figure 1).

Figure 1 : ACP des mesures de poids corporel et longueur de tarse



L'ACP à partir des données de poids corporel et longueur de tarse à 12 semaines de vie permet de bien séparer les animaux nains des animaux de taille normale (sauvage).

Sur 24 poules naines et 24 poules de taille normale, nous avons prélevé le foie à l'âge de 12 semaines de vie. Les ARN totaux ont été extraits en utilisant le RNeasy Mini Kit (Qiagen) suivant les instructions du fabricant. Les ARNs ont été quantifiés par spectrophotométrie (NanoDrop) et leur qualité a été vérifiée à l'aide du bioanalyser Agilent 2100. L'analyse transcriptomique a été réalisée par puce Agilent 8x60K.

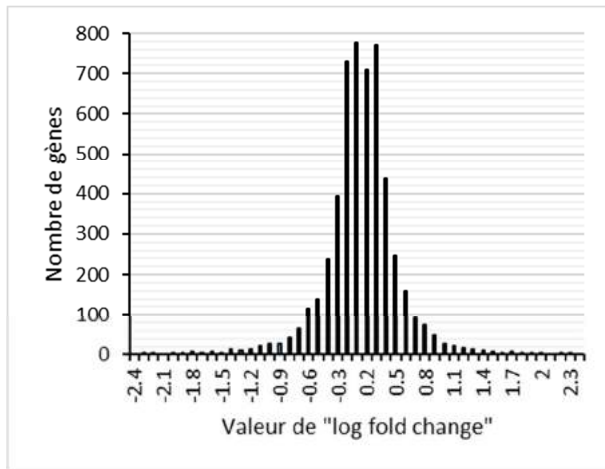
1.2. Analyses différentielle et fonctionnelle

Les données brutes ont été normalisées par transformation log2 et centrées par puce. La détection de gènes différentiellement exprimés entre les deux génotypes a été réalisée avec le package Limma (Bioconductor) du logiciel R (*R Core Team* (2013)). La correction pour les tests multiples a été effectuée avec la procédure Benjamini-Hochberg (Benjamini et Hochberg 1995) pour contrôler le taux de faux positifs (FDR) à 5%. L'analyse fonctionnelle a été obtenue avec Ingenuity Pathway Analysis (IPA) et l'outil Cytoscape ClueGo.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

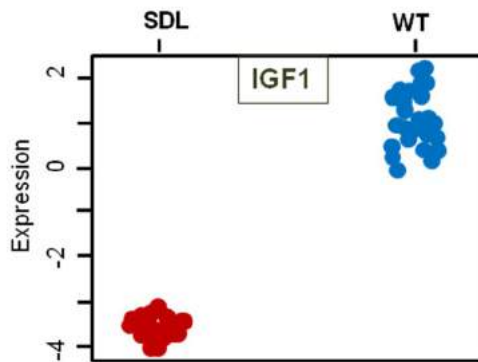
Cette étude a révélé que la mutation du nanisme « dw » induit des changements importants dans l'expression d'un grand nombre de gènes dans le foie. 5353 gènes différentiellement exprimés (DE) ont été identifiés (p-value ajustée <0.05), dont 2219 sont caractérisés par un écart d'expression relativement faible (« log fold change » ≤ |0.2|) (Figure 2).

Figure 2 : graphique qui représente la distribution du nombre de gènes DE en fonction de la valeur de « log fold change »



Des suppressions/inhibitions d'expression significatives ont été observées chez les poules naines pour des gènes avec un rôle actif dans la croissance (62 gènes). En particulier, l'expression du gène IGF1 (Insulin-like Growth Factor-1), un facteur de croissance qui a un rôle clé dans la régulation de la prolifération, la différenciation et la croissance des tissus, est inhibée chez les poules naines (Figure 3).

Figure 3 : Graphique d'expression du gène *IGF1*

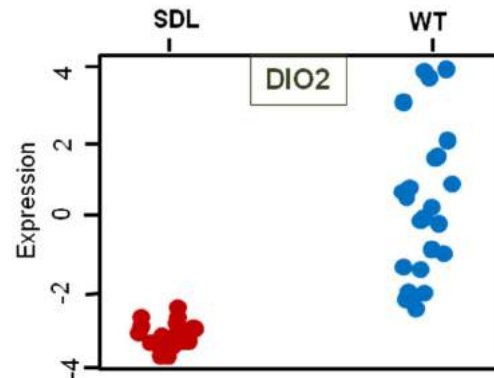


Chaque point représente l'expression d'un individu. En rouge sont représentées les poules naines (SLD), en bleu les poules de taille normale (WT)

Des altérations d'expression sont aussi observées pour de nombreux gènes liés à l'IGF1 comme, par exemple, les gènes IGF2, IGFBP-2, IGFBP-4 et IGF2 BP-3 qui mettent en évidence une altération de l'axe de signalisation GH/IGF. Si on considère que l'IGF1 est principalement produit dans le foie, l'inhibition d'expression de l'IGF1 est en cohérence avec la réduction significative de la concentration plasmatique de l'IGF-I observée auparavant chez les poules naines (Tixier-Boichard et al. 1989).

Un autre gène intéressant est le DIO2 (Iodothyronine Deiodinase Type II) lui aussi fortement inhibé chez les poules naines (Figure 4).

Figure 4 : Graphique d'expression du gène *DIO2*

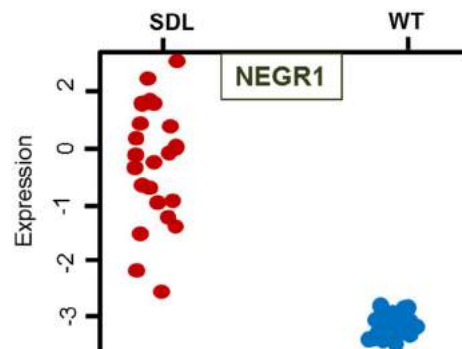


Chaque point représente l'expression d'un individu. En rouge sont représentées les poules naines (SLD), en bleu les poules de taille normale (WT)

La protéine codée par ce gène appartient à la famille de l'iodothyronine déiodinase. Elle catalyse la conversion de la thyroxine (T4) en l'hormone thyroïdienne T3. Ce gène est largement exprimé dans de nombreux tissus, et est considéré comme le responsable de la production « locale » de T3. Il a donc une influence importante sur l'action de l'hormone thyroïdienne dans les tissus. Chez les poules naines, l'inhibition d'expression de DIO2 indique une modification de l'activité de désiodinase et la conversion de T4 en T3, qui est cohérent avec la réduction de la T3 plasmatique déjà décrite chez les poules naines (Tixier-Boichard et al. 1989).

Dans les gènes surexprimés chez les poules naines, le gène NEGR1 (Neuronal Growth Regulator 1) représente un exemple particulièrement intéressant. Ce gène s'exprime surtout dans le système nerveux central où il semble exercer une fonction de régulation de l'architecture neuronale. Ce gène n'est pas exprimé chez les poules de taille normale mais il l'est chez les poules naines (Figure 5).

Figure 5 : Graphique d'expression du gène *NEGR1*



Chaque point représente l'expression d'un individu. En rouge sont représentées les poules naines (SLD), en bleu les poules de taille normale (WT).

Nous ne connaissons pas la fonction de ce gène dans le foie mais des études sur l'homme ont montré une expression au niveau de tissus adipeux et un rôle possible dans l'adipogenèse et dans le contrôle du poids corporel et de la prise alimentaire, des caractères qui diffèrent chez les poules naines par rapport aux poules de taille normale. Des études supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre le rôle de ce gène dans le foie.

Les exemples décrits ci-dessus sont des cas de forte expression différentielle identifiés dans cette étude. En revanche, la grande majorité des gènes différentiels identifiés sont caractérisés par un écart d'expression relativement faible (Figure 2). C'est le cas du gène STAT5B (Signal Transducer and Activator of Transcription 5B) qui est faiblement différentiellement exprimé (« fold change » = 1.2 et p-value ajustée < 0.001).

La protéine codée par ce gène est un membre de la famille STAT de facteurs de transcription et elle a un rôle de médiateur de la transduction du signal déclenché par l'hormone de croissance. C'est un facteur de transcription clé de la voie de signalisation de l'hormone de croissance et il contrôle un grand nombre de gènes, incluant l'IGF1. Il est intéressant de noter qu'une faible modification d'expression de ce gène entraîne de grandes modifications d'expression des gènes cibles.

Les analyses fonctionnelles ont révélé un enrichissement des processus métaboliques lipidiques (527 gènes, p-value ajustée < 0.001).

Plus précisément, le profil d'expression de ces gènes suggère une réduction de la synthèse des lipides dans le foie des poules naines liée à une réduction de la synthèse et de la concentration d'acides gras. Un enrichissement des processus liés au métabolisme glucidique (253 gènes, p-value ajustée < 0.001) et du métabolisme protéique (317 gènes, p-value ajustée < 0.001) a été aussi observé. Des altérations significatives du transport moléculaire, de la croissance et la prolifération cellulaire sont également présentes chez les poules naines.

CONCLUSION

La résistance à l'hormone de croissance affecte fortement le métabolisme et la croissance en altérant les voies de signalisation GH/IGF1/T3. L'expression de gènes clés de croissance tels que l'IGF1 et DIO2 est complètement réprimée dans les poules naines en accord avec les concentrations plasmatiques réduites de l'IGF1 et de T3 observées chez les poules naines.

Un grand nombre de gènes clés de la voie de signalisation GH sont modérément différentiellement exprimés, indiquant que même de petits changements pourraient conduire à de grands effets sur les gènes cibles.

Les poules naines sont un modèle intéressant pour la compréhension des mécanismes de contrôle de l'expression des gènes par l'hormone de croissance ainsi que l'étude de caractères complexes comme les dépenses d'énergie et le métabolisme lipidique pour lesquelles les poules SLD diffèrent par rapport à celles de taille normale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Benjamini Y., Hochberg Y. (1995) J. R. Stat. Soc. Ser. B. 289–300.
 Burnside J. 1991. Endocrinology, 128 : 3183-3192
 Duriez B. et al. 1993. Mol Endocrinol, 7:806.
 R Core Team 2013. URL <http://www.R-project.org/>.
 Tixier-Boichard M. 2000. INRA Prod. Anim. Numéro hors série : 55-61
 Tixier-Boichard M. et al. 1989. Genet. Sel. Evol, 21 : 217-234

ANALYSE DU METHYLOME CHEZ L'EMBRYON DE POULET PAR SEQUENÇAGE HAUT-DEBIT

Mersch Marjorie¹, Noirot Céline², Leroux Sophie¹, Esquerré Diane³, Gourichon David⁴, Lefort Gaëlle²,
Salin Gérard³, Djebali Sarah¹, Frésard Laure⁵, Foissac Sylvain¹, Pitel Frédérique¹

¹GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, ENVT, 31326 CASTANET-TOLOSAN ;

²INRA, UR875 MIAT, 31326 CASTANET-TOLOSAN ;

³INRA, GeT-PlaGe Genotoul, 31326 CASTANET-TOLOSAN ;

⁴INRA, PEAT, 37380 NOUZILLY ;

⁵Department of Pathology, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA

marjorie.mersch@inra.fr

RÉSUMÉ

L'étude des causes moléculaires des variations phénotypiques observées chez les espèces d'élevage passe généralement par l'analyse de la variabilité de la séquence d'ADN. Récemment, de nombreuses études décrivent le rôle important de l'environnement dans la régulation de l'expression des gènes, notamment via des phénomènes épigénétiques. Afin de caractériser une des marques épigénétiques chez le poulet, la méthylation de l'ADN, un dispositif de 8 embryons (4 mâles et 4 femelles) issus du croisement réciproque de deux lignées a été utilisé. À partir d'une technique d'analyse par séquençage à haut-débit des marques de méthylation, un pipeline d'analyse bioinformatique a été développé. Un taux de méthylation plus faible dans les régions promotrices que dans les régions géniques et intergéniques a été observé. Grâce aux données transcriptomiques également disponibles sur ces embryons, nous avons confirmé que le niveau d'expression des gènes est plus fort quand les régions promotrices sont peu méthylées, et inversement. La possible interaction du fond génétique ou du sexe avec le niveau de méthylation, et son lien avec les niveaux d'expression chez les 8 embryons est en cours d'analyse. Ces analyses vont être étendues dans le cadre du projet ANR ChickStress qui étudie la réponse du méthylome à des variations de température et à l'utilisation d'un aliment de faible valeur énergétique chez la poule.

ABSTRACT**Methylome analysis through high-throughput sequencing in chicken embryos**

Investigating the molecular causes of phenotypic variations observed in farmed species usually involves the study of the variability in the DNA sequence. Recently, many studies have described the important role of the environment in the regulation of gene expression, particularly through epigenetic mechanisms. In order to characterize one of these epigenetic marks in chicken, DNA methylation, we have used 8 embryos (4 males and 4 females) from the reciprocal cross of two lines. We developed a bioinformatic analysis pipeline to analyze methylation marks from high-throughput sequencing. We have observed a lower methylation rate in the promoter regions than within the genes and intergenic regions. Thanks to the transcriptomic data also available on these embryos, we have shown that the gene expression level was higher when the promoter regions were poorly methylated, and vice versa. The possible interaction of the genetic background or sex with the methylation level and the link with expression level in these 8 embryos is being analyzed. These analyses will be extended as part of the ANR ChickStress project, which studies the methylome response to changes in temperature and the use of a low-energy diet in chicken.

INTRODUCTION

Un des objectifs majeurs de la recherche en agronomie est d'étudier les causes moléculaires des variations phénotypiques observées dans les espèces d'élevage. Celles-ci sont dues à des facteurs génétiques et/ou environnementaux. L'étude des phénomènes épigénétiques potentiellement impliqués constitue aujourd'hui un moyen prometteur pour mieux comprendre ces effets. Il est maintenant clair que l'environnement module l'expression des gènes via ces phénomènes épigénétiques, participant ainsi à la plasticité phénotypique (Mazzio *et al.*, 2012).

La variation des phénotypes est induite, en partie, par des fluctuations dans la régulation de l'expression des gènes. Ceci permet de moduler l'activité des cellules d'un organisme en fonction de leur environnement. Parmi les acteurs de cette régulation, il existe des mécanismes qui n'affectent pas la séquence d'ADN mais qui peuvent être transmis par la mitose ou la méiose : ce sont les phénomènes épigénétiques (Feil et Fraga, 2011). Ces mécanismes sont matérialisés par des marques biochimiques, en partie réversibles, sur l'ADN ou sur les protéines qui le structurent : les histones. La méthylation de l'ADN constitue un des principaux mécanismes décrits à ce jour (Egger *et al.*, 2004). Il s'agit d'une modification chimique des cytosines (C) en 5-méthylcytosine par l'ajout d'un groupement méthyle (CH_3) qui affecte ainsi la régulation de l'expression des gènes, en modifiant notamment l'accessibilité de la chromatine de certains promoteurs (Deaton et Bird, 2011). Chez les Vertébrés, les 5-méthylcytosines sont majoritairement observées dans les dinucléotides CG. Ce processus est catalysé par une famille d'enzymes appelées les DNA méthyltransférases.

Le méthylome est défini comme l'ensemble des modifications de l'état de méthylation le long du génome (Feinberg, 2001). Sa caractérisation permet de faire le lien entre ces marques biochimiques et le niveau d'expression des gènes à l'échelle du génome et donc de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'expression des gènes. Son étude consiste en l'observation du taux de méthylation de chaque cytosine dans les dinucléotides CG. Ce taux de méthylation correspond à la proportion de cytosines méthylées à une position donnée, observée en général à partir d'un ensemble de molécules d'ADN provenant de plusieurs cellules.

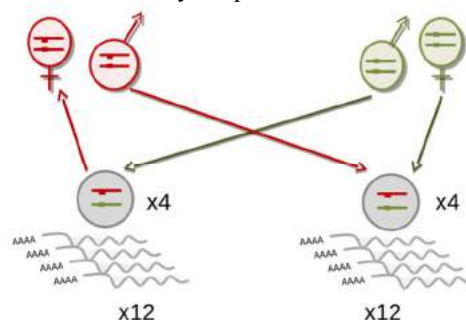
L'étude du méthylome est facilitée aujourd'hui par les nouvelles technologies de séquençage. L'objectif de cette étude est de caractériser le méthylome de l'embryon de poulet - stade pour lequel nous disposons également de données d'expression - et d'analyser les liens existant entre le taux de méthylation de l'ADN et le niveau d'expression des gènes le long du génome.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1 Dispositif d'étude

Les échantillons analysés sont issus d'un dispositif animal mis en place pour étudier l'empreinte génomique chez le poulet (Frésard *et al.*, 2014). Il s'agit d'un croisement réciproque de deux lignées de poule (4 parents) ayant produit 12 embryons (à 4,5 jours) avec 6 mâles et 6 femelles par sens de croisement (figure 1).

Figure 1. Croisement réciproque des deux lignées donnant 12 embryons par sens de croisement



Pour 8 embryons (4 mâles et 4 femelles) sur les 24, deux types de données sont produites, issues d'expériences de séquençage à haut-débit. Premièrement, des données produites par RNA-seq (séquençage du transcriptome) permettent d'attribuer à chaque gène un niveau d'expression dans chacun des embryons. Deuxièmement, des données produites par DNA-seq (séquençage du génome) identifient les variations au sein de la séquence d'ADN propre à chaque individu. Au cours de cette étude, une analyse complémentaire a été ajoutée : les motifs de méthylation ont été détectés par une technologie appelée *Whole Genome Bisulfite Sequencing* (WGBS).

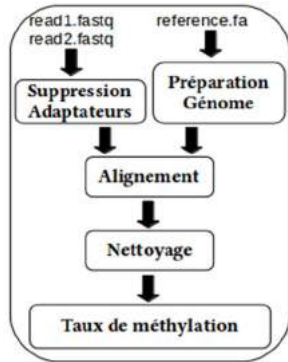
1.2 Séquençage WGBS

Nous avons utilisé les échantillons d'ADN produits pour le séquençage génomique classique. Le WGBS est une technique de séquençage qui repose sur un traitement chimique préalable de l'ADN génomique au bisulfite de sodium, permettant de distinguer les cytosines méthylées des autres (Krueger *et al.*, 2012). En effet, une cytosine méthylée n'est pas affectée par le traitement et reste une cytosine dans les lectures issues du séquençage, alors qu'une cytosine non méthylée est désaminée en uracile par le bisulfite de sodium, puis lue en tant que thymine lors du séquençage, après amplification. Cette conversion est détectée par séquençage haut-débit et apporte l'information de l'état de méthylation originel. Les données de séquence ont ensuite été analysées grâce à un pipeline (chaîne de traitement bioinformatique d'analyse des données de séquence).

1.3 Construction d'un pipeline

Le pipeline développé à l'aide de scripts Shell et R permet d'effectuer les analyses depuis le traitement initial des données de séquençage jusqu'aux analyses de méthylation (figure 2).

Figure 2. Schématisation des étapes du pipeline



La première étape du pipeline consiste à éliminer les parties non informatives des lectures, c'est-à-dire les adaptateurs moléculaires nécessaires au protocole expérimental lors du séquençage, avec le logiciel Trim Galore! (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore). Les séquences trop courtes à l'issue de cette étape sont éliminées. Un contrôle qualité est réalisé par l'outil FastQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_fastqc). Cela permet de vérifier que les séquences obtenues ont toutes les qualités requises. Sur des données génomiques non traitées au bisulfite chez la poule, on s'attend à un pourcentage de C et de G d'environ 20 % et de T et de A d'environ 30 % (Hillier *et al.*, 2004).

Les nombreuses lectures obtenues peuvent provenir de n'importe quelle partie du génome. Il faut donc aligner chaque lecture sur le génome de référence de l'espèce pour obtenir sa position. Le logiciel Bismark (Krueger *et al.*, 2011) est classiquement utilisé dans ce type d'analyse. Le génome de référence utilisé pour cette étude est la version 5 de *Gallus gallus* du navigateur de génome Ensembl. Les séquences alignées sont ensuite filtrées pour éliminer les duplicats PCR (dus à l'étape d'amplification PCR des fragments ADN avant séquençage) en utilisant l'option *rmdup* de SAMtools (Li *et al.*, 2009).

L'étape suivante consiste à calculer l'état de méthylation moyen de chaque position du génome portant une cytosine. Pour cela, le *package* R MethylKit (Akalın *et al.*, 2012) extrait toutes les positions de C dans les dinucléotides CG à partir des lectures. Le taux de méthylation d'un dinucléotide CG est la proportion de C observés dans les lectures alignées à la position correspondante, donnée par la formule : $C/(C+T)$.

Néanmoins, la variabilité de séquence due au polymorphisme individuel, c'est-à-dire à la présence de *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), peut fausser le calcul de méthylation. À partir des données génomiques non traitées (DNA-seq), l'outil GATK

(*Genome Analysis Toolkit*; DePristo *et al.*, 2011) identifie les positions pour lesquelles le taux de méthylation n'est pas fiable. Ces positions sont ensuite éliminées des positions détectées précédemment.

Les taux de méthylation à chaque position sont obtenus sur les 2 brins (sens et antisens). De nombreuses études ont montré que la méthylation est symétrique chez les Vertébrés (Reik *et al.*, 2011), ainsi nous additionnons les informations de méthylation (couverture de la position et nombre de C et de T en cette position) entre les deux brins afin d'obtenir un taux de méthylation en une position CG.

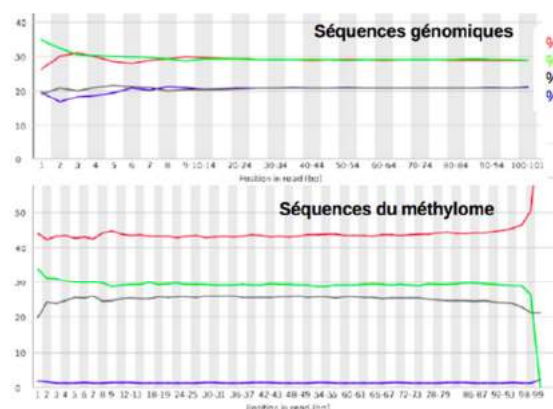
Afin de comparer le niveau de méthylation entre les embryons, une étape préliminaire de normalisation est nécessaire. En effet, il s'agit de compenser les variations expérimentales du nombre total de lectures produites par embryon (profondeur de séquençage). Cette étape est réalisée dans le *package* MethylKit. Ensuite, seules les positions communes à tous les embryons sont retenues.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1 Caractéristiques des données obtenues

Les résultats présentés sont une moyenne entre les 8 embryons. Le nombre de lectures varie de 134 millions à 198 millions par échantillon, pour une moyenne de 161 millions de lectures par embryon. Ces variations, dues en particulier à la quantité d'ADN de départ et à l'efficacité de l'amplification, sont corrigées par la normalisation. Après filtre Trim Galore!, il reste 156 millions de lectures par embryon. Lorsque le traitement au bisulfite a bien fonctionné, la proportion de C doit diminuer au profit de celle de T. Sur la figure 3, T augmente à plus de 40 % et C diminue à 1 %. Cela signifie que le traitement au bisulfite a correctement remplacé les C non méthylés par des T et que la majorité des C présents dans le génome sont non méthylés.

Figure 3. Visualisation de la composition en bases des lectures d'un embryon par FastQC en fonction de la position le long du génome, sur des séquences génomiques et sur des séquences du méthylome.



À l'issue de l'étape d'alignement, 71,6 % des lectures sont alignées en une position unique, soit environ 112 millions de lectures. Puis vient la suppression des duplicats de PCR au cours de laquelle 15 % de lectures sont éliminées (95 millions de lectures au final).

Un contrôle interne est réalisé pour confirmer la fiabilité du traitement au bisulfite. Hors dinucléotides CG, les cytosines sont non méthylées et sont donc transformées en T après traitement au bisulfite. Sur les embryons, 99,33 % des C hors CG sont converties.

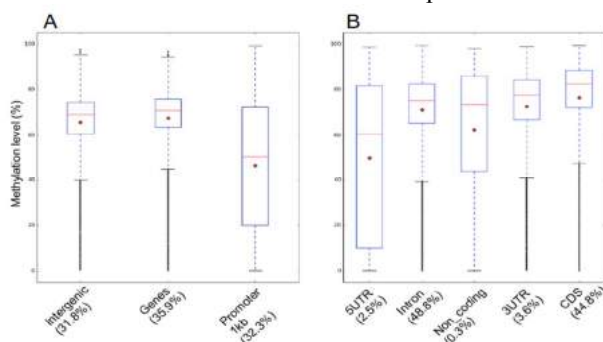
Après toutes ces étapes de traitement, le nombre de positions détectées est de 20,5 millions (sens et antisens) sur les 22 millions que compte le génome de référence. Une fois l'information des brins sens et antisens ramenée aux dinucléotides, 12,5 millions de positions CG avec un taux de méthylation associé sont détectées. La moyenne de méthylation sur tout le génome est d'environ 66,5 %.

Une fois la normalisation réalisée, il s'agit d'obtenir exactement les mêmes positions génomiques pour tous les embryons, chaque embryon ayant un taux de méthylation spécifique. Le nombre de SNP détectés par GATK sur l'ensemble du génome est de 9,7 millions. Après élimination des SNP correspondant à des positions retenues pour l'analyse de méthylation, 5,7 millions de CG sont analysables sur l'ensemble des embryons.

2.1 Caractéristiques fonctionnelles du méthylome

Les données obtenues permettent d'analyser la variation des taux de méthylation en fonction des régions du génome. Celui-ci est découpé en plusieurs régions fonctionnelles : promotrices, régulatrices, codantes ou non, intergéniques (annotation *Ensembl*, http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Info/Index). Il faut rechercher les positions de C au sein de ces régions afin d'associer un taux de méthylation à une région génomique particulière. La distribution du taux de méthylation en fonction de l'annotation est représentée sur la figure 4.

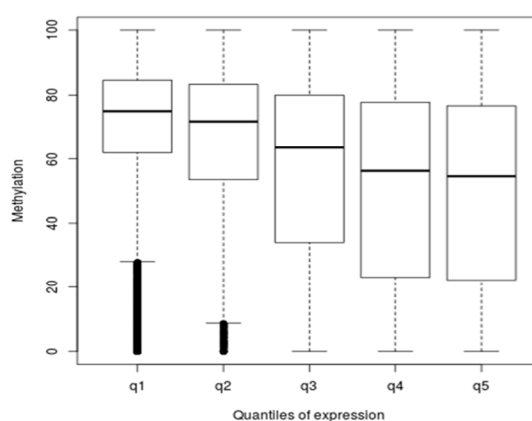
Figure 4. Distribution du taux de méthylation de chaque position en fonction du type de régions observées le long du génome. La région promotrice est arbitrairement définie comme étant 1kb en amont du site de début de transcription.



Sur la figure 4A, les taux de méthylation détectés sont répartis dans trois régions distinctes : 32,3 % des positions sont dans les régions promotrices, qui ont un taux de méthylation plus faible que les deux autres régions. Les différences de méthylation observées en fonction de la nature de la région génomique sont statistiquement significatives ($p = 2.10^{-16}$, test de Kruskal-Wallis). De plus, au sein des régions géniques (figure 4B) la répartition des taux est variable (analyses statistiques en cours). Dans les régions codantes, le taux de méthylation est le plus élevé. Il faut noter que la répartition dans les régions promotrices est très hétérogène (figure 4A : boxplot des régions promotrices de 20 % à 70 % de méthylation) au contraire des deux autres régions (figure 4A : boxplot de 60 % à 75 % de méthylation). Cette distribution particulière est liée à la quantité importante de promoteurs avec de faibles taux de méthylation (0-10%) ou de forts taux de méthylation (90-100%). Ce taux de méthylation plus faible dans les promoteurs est retrouvé dans le foie, le muscle et le poumon de poule (Li *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015). Plusieurs études ont montré que les régions peu méthylées sont généralement dans les promoteurs chez les mammifères (voir Suzuki et Bird, 2008). Le promoteur, en amont du gène, est la région à partir de laquelle s'effectue l'initiation de la transcription de l'ADN en ARN.

Pour relier ce taux de méthylation au niveau d'expression des gènes, nous avons utilisé les données issues de RNA-seq (transcriptome) des mêmes échantillons.

Figure 5. Distribution du score de méthylation dans les promoteurs en fonction de quantiles d'expression des gènes.



Sur la figure 5, le niveau d'expression est divisé en 5 quantiles, le 1^{er} quantile représentant le niveau d'expression le plus faible tandis que le 5^e quantile représente le niveau d'expression le plus fort. Lorsque le promoteur est fortement méthylé, le niveau d'expression des gènes est globalement faible et inversement ($p = 2.10^{-16}$, test de Kruskal-Wallis), ce qui confirme notamment des résultats obtenus chez le

poulet : Li *et al.* ont démontré une corrélation négative entre la méthylation de l'ADN dans les régions promotrices et l'expression des ARN messagers sur des tissus pulmonaires prélevés chez le poulet (Li *et al.*, 2015). Cela suggère un rôle de régulation transcriptionnelle de la méthylation de l'ADN (Jaenisch et Bird, 2003), en particulier via les propriétés d'ouverture de la chromatine liées aux îlots CpG non méthylés (Deaton et Bird, 2011).

Un des objectifs de ce travail est également d'évaluer s'il existe des différences de méthylation selon le sexe de l'embryon ou encore selon le sens de croisement. Le réglage des critères les plus pertinents pour l'analyse statistique (ampleur de la différence, p-valeur associée à un test statistique...) est actuellement en cours.

CONCLUSION

La conception, le développement et l'application d'un pipeline bioinformatique nous a permis de caractériser la méthylation de l'ADN génomique chez l'embryon de poulet. Les données générées par séquençage haut-débit rendent un tel pipeline très utile pour l'analyse biologique. En effet, ce pipeline d'analyses sera adapté dans le cadre du projet ANR ChickStress qui étudie la réponse du méthylome à des variations de température et à l'utilisation d'un aliment de faible valeur énergétique chez la poule. Dans ce projet, la technologie utilisée analyse une sous-représentation du génome et non plus le génome entier. Ainsi, cet outil pourra analyser des données issues de deux types de séquençage, pour les programmes en cours chez la poule mais également pour d'autres espèces. D'autres analyses complémentaires sont en cours, notamment sur la question du lien entre la méthylation différentielle et l'expression différentielle.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akalin, A.; Kormaksson, M.; Li, S.; Garrett-Bakelman, F.; Figueroa, M.; Melnick, A.; Mason, C. *Genome Biol.* **2012**, *13*, R87.
- Deaton, A. M.; Bird, A. P. *Genes & Development* **2001**, *25*, 1010–1022.
- DePristo, M. A.; Banks, E.; Poplin, R.; Garimella, K. V.; Maguire, J. R.; Hartl, C.; Philippakis, A. A.; del Angel, G.; Rivas, M. A.; Hanna, M.; McKenna, A.; Fennell, T. J.; Kernysky, A. M.; Sivachenko, A. Y.; Cibulskis, K.; Gabriel, S. B.; Altshuler, D.; Daly, M. J. **2011**, *43*, 491–8.
- Egger, G.; Liang, G.; Aparicio, A.; Jones, P. A. *Nature* **2004**, *429*, 457–463.
- Feil, R.; Fraga, M. F. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 97–109.
- Feinberg, A. P. *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 9–10.
- Frésard, L.; Leroux, S.; Servin, B.; Gourichon, D.; Dehais, P.; San Cristobal, M.; Marsaud, N.; Vignoles, F.; Bed'hom, B.; Coville, J. L.; Hormozdiari, F.; Beaumont, C.; Zerjal, T.; Vignal, A.; Morisson, M.; Lagarrigue, S.; Pitel, F. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 3768–3782.
- Hillier, LDW; International Chicken Genome Sequencing Consortium. *Nature* **2004**, *432*, 695–716.
- Jaenisch, R.; Bird, A. *Nat. Genet.* **2003**, *33 Suppl*, 245–254.
- Krueger, F.; Andrews, S. R. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 1571–1572.
- Krueger, F.; Kreck, B.; Franke, A.; Andrews, S. R. *Nat Methods* **2012**, *9*, 145–151.
- Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079.
- Li, J.; Li, R.; Wang, Y.; Hu, X.; Zhao, Y.; Li, L.; Feng, C.; Gu, X.; Liang, F.; Lamont, S. J.; Hu, S.; Zhou, H.; Li, N. *BMC Genomics* **2015**, *16*, 1–13.
- Mazzio, E. A.; Soliman, K. F. A. *Epigenetics* **2012**, *7*, 119–130.
- Reik, W.; Dean, W.; Walter, J. *Epigenetics* **2001**, *293*, 1089–1094.
- Suzuki, M. M.; Bird, A. *Nature Reviews Genetics* **2008**, *9*, 465–476.
- Tate, P. H.; Bird, A. P. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1993**, *3*, 226–231.

IMPACT DES PRINCIPALES FUSARIOTOXINES, SEULE OU EN ASSOCIATION, SUR LES FONCTIONS TESTICULAIRES DU POULET DE CHAIR

Pascal FROMENT¹, Remy LE GUEVEL², Jean Paul METAYER³, Amandine MIKA⁴,
Jean Denis BAILLY⁵, Philippe GUERRE⁶, Angélique TRAVEL⁴

¹UMR PRC, Centre INRA Val de Loire, 37380 NOUZILLY, France,

²Structure Fédérative de Recherche BIOSIT Université de Rennes 1 F 3504,

³ARVALIS-Institut du Végétal, Station expérimentale, 91720 BOIGNEVILLE, France,

⁴ITAVI, Centre INRA Val de Loire, 37380 NOUZILLY, France,

⁵Université de Toulouse, INP, ENVT, Equipe Biosynthèse et toxicité des mycotoxines, UMR Toxalim, F-31076 TOULOUSE, France,

⁶Université de Toulouse, INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, F-31076 TOULOUSE, France
pascal.froment@inra.fr

RÉSUMÉ

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par certaines moisissures. La présence de ces contaminants dans les aliments destinés aux animaux est un problème majeur, car les mycotoxines peuvent avoir des effets néfastes variés sur leur santé, en impactant notamment certaines fonctions telle que la reproduction. L'objectif de notre démarche est d'évaluer l'impact des principales fusariotoxines, *in vivo* et *in vitro* sur les fonctions testiculaires du poulet de chair. Pour l'essai *in vivo*, 5 groupes de 12 poulets de chair (Ross PM3) ont reçu de la naissance à l'abattage (35 jours d'âge) les aliments suivants : un aliment témoin sain ou un des 4 aliments expérimentalement contaminés avec du déoxynivalénol (DON, 5mg/kg), des fumonisines (FBs, 20 mg/kg), de la zéaralénone (ZEA, 0,5 mg/kg) en contamination unique ou contenant les 3 mycotoxines. Les mycotoxines nécessaires aux expérimentations ont été obtenues par culture de souches fongiques toxigènes. L'analyse de la croissance et l'examen histologique du testicule ont montré que l'activité proliférative du testicule, est augmentée chez les animaux exposés aux FBs, en comparaison du groupe témoin. Par contre, aucune différence sur les marqueurs de mortalité cellulaire (activité caspase 3 et immunomarquage TUNEL), d'inflammation (IL6, IL1 β et IFN γ), ou de stress oxydatif (capacité antioxydante et activité de la catalase) n'a été révélée entre les lots. Des mycotoxines purifiées et diluées dans un solvant (DMSO) ont été testées sur des cultures testiculaires de poulets après 96h d'exposition. Les résultats ont confirmé les données *in vivo* montrant aucun effet à faible dose et un effet négatif des doses élevées (FB1: 100 nM ; ZEA : 30 μ M, DON 1 μ M). En conclusion, *in vitro*, seules des fortes doses peuvent conduire à des lésions testiculaires mais *in vivo* les doses maximales autorisées n'induisent pas d'effet négatif notable sur les testicules de poulets élevés jusqu'à 35j.

ABSTRACT

Impact of mycotoxins, on the testicular functions of broiler chickens.

Mycotoxins are secondary metabolites produced by molds. The presence of these contaminants in animal feed is a major problem because mycotoxins have various adverse effects on health, affecting in particular certain functions such as reproduction. The objective of our approach is to evaluate the impact of the main fusariotoxins, *in vivo* and *in vitro*, on the testicular functions of broiler chickens. For the *in vivo* test, 5 groups of 12 broilers (Ross PM3) received the control or experimentally contaminated diet from hatch to slaughter (35 days of age). The diets were contaminated in: deoxynivalenol (DON, 5 mg / kg), fumonisins (FBs, 20 mg / kg), zearalenone (ZEA, 0.5 mg / kg) in single contamination or containing the 3 mycotoxins. The mycotoxins required for the experiments were obtained by culturing toxigenic fungal strains.

Analysis of the testis growth and histological examination has shown that the proliferative activity of the testis is increased in animals exposed to FBs compared to the control group. On the other hand, no difference was found in markers of cell death (caspase 3 activity and TUNEL immunostaining), of inflammation (IL6, IL1 β and IFN γ), or in oxidative stress (antioxidant capacity and catalase activity). *In vitro* experiments using purified mycotoxins diluted in a solvent (DMSO) were tested on chicken testicular cell cultures after 96 h of exposure. The results confirmed the *in vivo* data showed no effect at low dose. However, high doses (FB1: 100 nM, ZEA: 30 μ M, DON 1 μ M) have an impact on cell viability.

In conclusion, *in vitro*, only high doses can lead to testicular lesions but *in vivo* the maximum concentrations acceptable did not induce any significant effect on the testes of 35 days-old chicken.

INTRODUCTION

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par certaines moisissures et sont présentes au niveau des céréales. Les contaminations d'aliments destinés aux animaux ou à l'Homme est un problème d'actualité, car celles-ci peuvent avoir des effets négatifs sur la santé des animaux et sur la santé humaine. En plus des effets que les mycotoxines peuvent avoir sur les organes tels que le foie, le muscle, les gonades peuvent être également impactées. Ainsi, le testicule qui est le lieu d'une prolifération et d'une différenciation cellulaire active est sensible aux molécules toxiques (Rouiller-Fabre et al., 2014). Lors d'expériences de toxicité à forte dose, réalisées chez le rat et le poulet, il a été montré que le déoxynivalénol (DON) pouvait diminuer la viabilité cellulaire, la prolifération et les interactions entre cellules (Diesing et al., 2011). Une autre étude chez le rat a décrit des lésions testiculaires conduisant à des anomalies morphologiques des cellules germinales (Sprando et al., 2005). Par ailleurs, la zéaralénone, comme le DON conduisent à une réduction du nombre de spermatozoïdes vivants (Yang et al., 2007 ; Kim et al., 2003).

Au cours de cette étude, nous avons réalisé une première analyse sur des cellules testiculaire de poulet *in vitro*, puis nous avons évalué les conséquences au niveau testiculaire d'une ingestion chronique de mycotoxines (exposition prolongée à de faibles doses). Plusieurs biomarqueurs de l'atteinte des fonctions testiculaires ont été mesurés tels que la mort cellulaire, la prolifération, la maturation, le stress oxydatif, la production de testostérone et l'atteinte au niveau des cellules germinales (Lambrot et al., 2006 ; Guibert et al., 2013).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Culture de tissu testiculaire (tubes séminifères)

Nous avons réalisé une culture de tubes séminifères de poulets âgés de 6 semaines (gonades encore immatures) mis en culture pendant 96 h en présence de doses croissantes de mycotoxines : zéaralénone (ZEA) de 0.3 µM à 30 µM ; fumonisine B1 (FUMO) de 10 nM à 1 µM ; et de deoxynivalénol (DON) de 0.1 µM à 10 µM. La méthode de culture a été adaptée des méthodologies développées chez les rongeurs (Foster, 1984; Gray, 1984; Staub et al., 2000). Les 3 mycotoxines purifiées proviennent de chez Sigma-Aldrich et ont été resuspendues dans un solvant. - de la FumonisinB1 (**FUMO**) (100 nM = 72,183 ng/ml). In vivo, « après gavage de poules pondeuses avec des doses de 2,0 mg/kg. D'après Depoire AG 2005, la concentration plasmatique maximale est de 28 à 103 ng/ml (. - de la zéaralénone (**ZEA**) (100nM = 9,6 ng/ml). In vivo, une administration a 0.30 mg / kg poids corporel

conduit à des teneurs plasmatiques de 1-100 ng/ml chez le poulet (De Baere et al., 2012)

- de la déoxynivalénol (**DON**) (10nM = 2,9632 ng/ml). In vivo, une administration de 5 mg kg⁻¹ DON, conduit à des concentrations plasmatiques chez le poulet de (DON) 1-4ng/ml (Broekaert et al., 2014 ; Ebrahim et al., 2014)

1.2. Animaux et aliments

Cinq groupes de poulets de souche Ross PM3 ont reçu 4 aliments expérimentaux (contenant soit 5 mg/kg de DON, soit 20 mg/kg de fumonisines (FUMO), soit 0,5 mg/kg de zéaralénone (ZEA), ou un aliment contenant simultanément les 3 mycotoxines) et un aliment exempt de mycotoxines. Les poulets ont eu accès à cette alimentation de 0 à 35 jours d'âge. L'aliment a été contaminé à l'aide de mycotoxines produites sur maïs à l'ENVIT (Jean Denis Bailly), et incorporées sous forme de poudre à l'aliment afin d'obtenir les concentrations choisies.

1.2. Prélèvements et préparation des échantillons testiculaires

A la fin de l'exposition, les animaux sont euthanasiés à l'aide d'un électrocuteur assommoir et saignés. Les testicules ont été prélevés et pesés immédiatement. Puis un testicule a été fixé dans du Bouin pour des analyses histologiques, alors que l'autre testicule a été congelé immédiatement et stocké à -80°C. Le testicule congelé a été broyé dans 500 µl de tampon phosphate (PBS, Phosphate buffered saline), à l'aide d'un ultraturax. La quantité de protéines du lysat testiculaire a été mesurée par la méthode de Lowry pour permettre de normaliser les dosages décrits ci-après.

1.3. Dosage ELISA

Les dosages par ELISA des protéines PCNA, proliferating cell nuclear antigen (CusaBio, sensibilité 0.78 ng/ml) et DAZL, Deleted in azoospermia-like (CusaBio, sensibilité 3.9 pg/ml, CV intra-assay CV%<8%, inter-assay CV%<10%) permettent d'évaluer la quantité de cellules qui prolifèrent et le nombre de cellules germinales primordiales, respectivement. L'analyse de la mortalité cellulaire a été réalisé à l'aide du marqueur de l'activité caspase 3 (Proméga) et la prolifération cellulaire a été analysée à l'aide de l'incorporation de BrDU suivi d'un marquage immunohistologique.

1.4. Analyses statistiques

Les moyennes +/- SEM ont été comparées par le test d'analyse de variance ANOVA.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1- Analyse *in vitro* d'une exposition des cellules testiculaires par des mycotoxines

Dans un premier temps, nous avons souhaité déterminer les conséquences d'une exposition des cellules testiculaires *in vitro* à des mycotoxines afin de déterminer les effets potentiels.

La structure des tubes séminifères en culture a été analysée à l'aide d'un marquage des filaments d'actine. A partir de la dose de 30µM de ZEA, de 1µM de FUMO et 10µM DON, une désorganisation du réseau cellulaire associée à une rétraction du tapis Sertolien a pu être observée. (Figure 1).

Cette désorganisation nette pour une exposition forte au DON et ZEA est associée à une baisse de la prolifération des cellules (mesurée par incorporation de BrDU), ainsi qu'à une augmentation de l'activité de la caspase 3 clivée qui est associé à la mort cellulaire (Figure 2).

2.2- Poids testiculaire et analyse histologique

Dans un deuxième temps, nous avons effectué des mesures sur les testicules de poulets qui ont été exposés à l'alimentant contaminé expérimentalement de 0 à 35 jours d'âge. Le poids moyen du testicule n'est pas affecté par les 4 aliments expérimentaux. Toutefois, en présence de FUMO le diamètre moyen des tubes séminifères est légèrement supérieur par rapport aux autres lots d'alimentation (Figure 3). A l'inverse, l'exposition avec les 3 mycotoxines conduit à une diminution du diamètre des tubes séminifères par comparaison avec le lot témoin (contrôle : $54,37 \pm 0,68\mu\text{m}$ vs DON+ZEA+FUMO : $44,82 \pm 0,73\mu\text{m}$; $p \leq 0.001$). L'analyse histologique n'a pas montré d'autre différence entre les 5 groupes de traitement.

2.3- Prolifération

Le dosage du marqueur de la prolifération (PCNA) est augmenté d'environ 4 fois en présence de FUMO ($p \leq 0.001$) et le marqueur de cellules germinales (DAZL) est augmenté de 30 fois ($p \leq 0.01$). Ces résultats semblent être contradictoires avec les données obtenus *in vitro*. Toutefois, la FUMO purifiée et administrée directement sur les cellules testiculaires peut conduire à un effet différent de ceux observé *in vivo* (dose plus faible, et production de métabolites secondaires *in vivo* possible).

Il est intéressant de préciser que sur des cellules hépatiques de rat, cellules du canal biliaires de poulet (après 41 jours d'exposition FUMO à 50 mg/kg soit 2,5X la dose utilisée dans notre étude) (Tessari et al., 2006), la mycotoxine FUMO présente des propriétés prolifératives (Figure 4).

L'analyse de la mortalité cellulaire à l'aide du marqueur de l'activité caspase 3 n'a pas montré de différence entre les lots traités et le lot témoin suggérant que les mycotoxines n'induisent pas de mortalité cellulaire.

L'analyse d'une autre activité du testicule importante qui est la production de stéroïdes n'a pas montré que les concentrations intra testiculaire en testostérone étaient affectées par les mycotoxines.

CONCLUSION

Les résultats décrits ci-dessus suggèrent que l'utilisation de mycotoxines purifiées sur des cultures testiculaires a un effet sur la viabilité cellulaire à forte concentration mais aucun effet n'a été mesuré à faible dose. Toutefois, *in vivo*, bien que les mycotoxines n'ont pas d'effet fort dans le testicule, il semblerait qu'une exposition avec de la FUMO conduirait à un effet positif sur la prolifération des cellules testiculaires et notamment sur les cellules germinales.

REMERCIEMENT

Nous remercions Frédéric Mercierand et toute l'équipe de l'animalerie de l'UPEAT de Nouzilly, Ce travail a été conduit dans le cadre du projet AAP CAS DAR n°1177 « MYCOVOL » et réalisé dans le cadre de l'UMT BIRD.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Broekaert N et al., J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2014 Nov 15;971:43-51)
- De Baere S et al., Anal Chim Acta. 2012 Dec 5;756:37-48
- Depoivre AG. Détermination de la fumonisine B1 chez le canard après exposition à de faibles doses. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2005, 64 p.
- Diesing AK, et al., Toxicol Lett. 2011 Jan 15;200(1-2):8-18.
- Ebrahim M et al., Arch Anim Nutr. 2014;68(5):412-22
- Foster P.M., 1984. Environ Health Perspect. (57):207-17.
- Gray T.J 1984. Food Chem Toxicol. 22(2):123-31.
- Guibert E et al., Environ Sci Pollut Res Int. 2013 May;20(5):2771-83
- Kim IH et al., Toxicol Lett. 2003 Mar 3;138(3):185-92
- Lambrot R et al., Biochimie. 2006 Nov;88(11):1831-5
- Rouiller-Fabre V et al., Ann Endocrinol (Paris). 2014 May;75(2):54-7
- Staub C. et al , 2000. Exp Cell Res. 260(1):85-95.
- Sprando RL et al., Food Chem Toxicol. 2005 Apr;43(4):623-35
- Tessari EN et al., Br Poult Sci. 2006 Jun;47(3):357-64
- Yang JY et al., Reprod Toxicol. 2007 Nov-Dec;24(3-4):381-7

Figure 1. Cellules testiculaires de poulet cultivées *in vitro* à confluence puis exposées à des concentrations croissantes de mycotoxines (Don (deoxynivalenol), Fumo (fumonisines B1), ZEA (zéaralénone)). Le cytosquelette des cellules est marqué par immunohistochimie (phalloïdine). * zone de la boîte de culture où il y a une absence de cellules dû à une mortalité cellulaire.

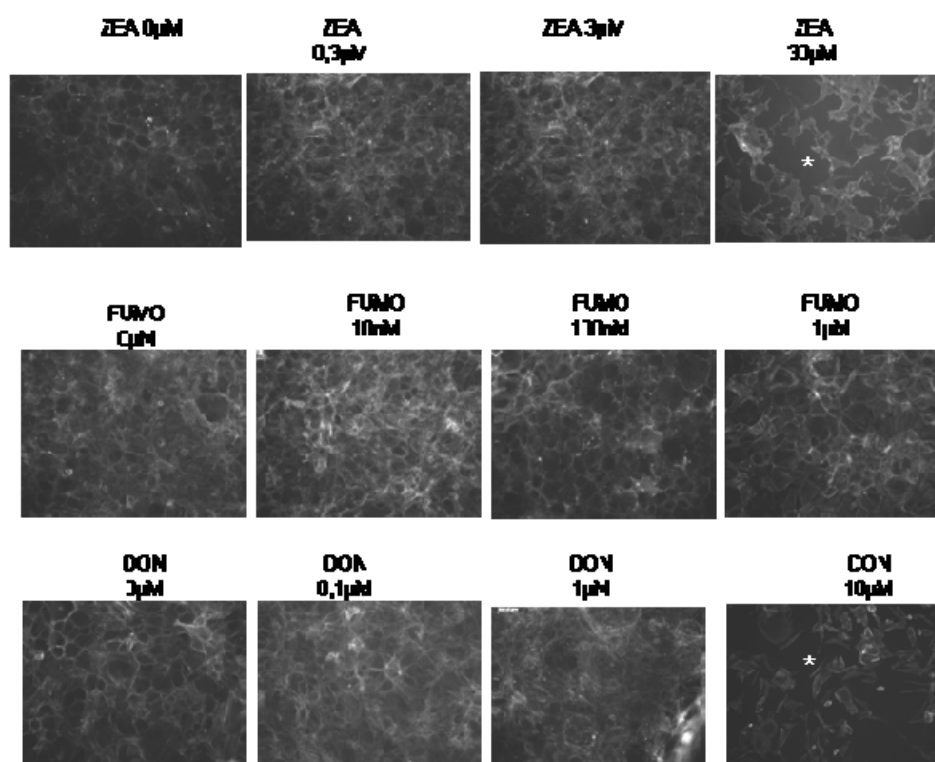


Figure 2. Mesure de la mortalité (panel Haut) et de la prolifération cellulaire (Panel Bas, pourcentage de cellules ayant incorporé de BrDU) sur une culture de cellules de Sertoli de poulet qui a été exposée avec des doses croissantes de mycotoxines (ZEA, DON, FUMO) pendant 96h. n=4. Moyenne $\pm$ SEM

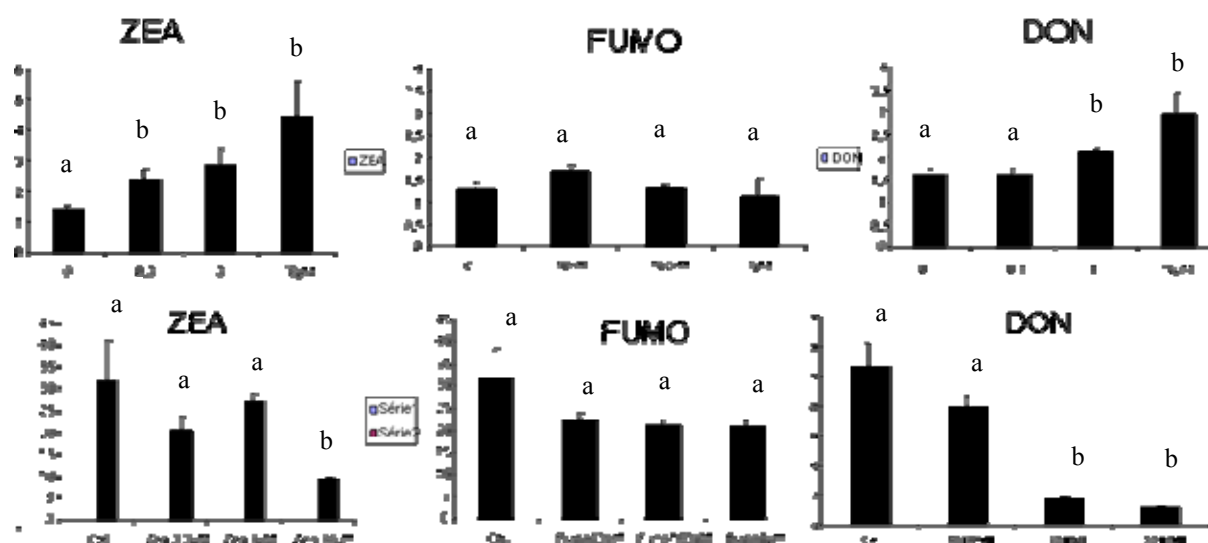


Figure 3. Diamètre des tubes séminifères chez le poulet (µm) Don (deoxynivalenol), Fumo (fumonisines), ZEA (zéaralénone), D+F+Z (deoxynivalenol, fumonisines, zéaralénone). Un minimum de 20 mesures par animal avec n=5/groupe. Moyenne $\pm$ SEM

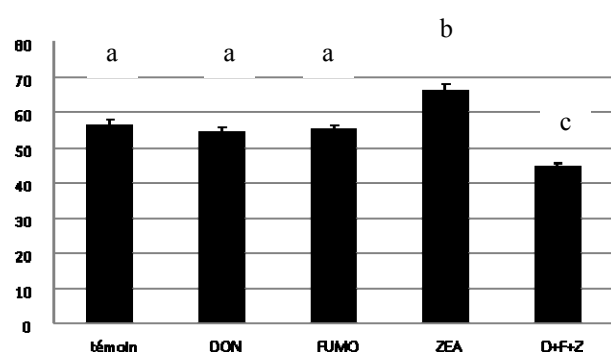
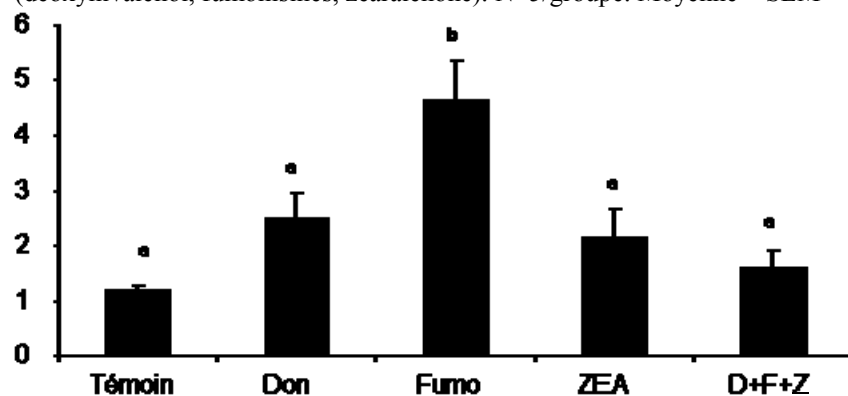


Figure 4. Concentration testiculaire du marqueur de prolifération (PCNA) dans le lysat testiculaire (ng/µg de protéines totales du lysat testiculaire). Don (deoxynivalenol), Fumo (fumonisines), ZEA (zéaralénone), D+F+Z (deoxynivalenol, fumonisines, zéaralénone). N=5/groupe. Moyenne $\pm$ SEM



**EVALUATION DU COMPORTEMENT ET DE LA CONSOMMATION
ALIMENTAIRES DU CANARD MULARD PENDANT LA PERIODE DE
CROISSANCE AVEC 40 CANARDS PAR DISTRIBUTEUR AUTOMATIQUE
D'ALIMENT**

**Cobo Emilie^{1*}, Lagüe Michel², Cornuez Alexis², Bernadet Marie-Dominique², Martin
Xavier², Ricard Edmond¹, Gilbert Hélène¹, Drouilhet Laurence¹**

¹UMR GenPhySE (INRA/INPT)- 24 chemin de Borde Rouge, Auzeville-Tolosane CS 52 627 -
31 326 CASTANET-TOLOSAN Cedex,

²UE PFG Domaine d'Artiguères - 1076, route de Haut-Mauco - 40 280 BENQUET

emilie.cobo@inra.fr

RÉSUMÉ

L'essor du phénotypage fin et à haut débit des animaux d'élevage est à l'origine du développement de nouveaux outils permettant d'obtenir des mesures innovantes notamment dans le domaine de l'alimentation. Pour décrire le comportement et la consommation alimentaires individuels de canards élevés en lot, un distributeur automatique de concentré (DAC), développé à l'INRA, est disponible pour la recherche sur l'Unité Expérimentale des Palmipèdes à Foie Gras à Artiguères. Afin d'optimiser l'utilisation de cet outil, un essai a été mené avec une densité de 40 canards par DAC, le double de ce qui avait été réalisé jusqu'ici. Ainsi, un lot de 157 canards mulards a été testé avec quatre distributeurs de 15 à 49 jours d'âge. Les analyses ont montré qu'avec cette densité les distributeurs ne sont jamais saturés en termes d'occupation, et que les canards conservent leur comportement alimentaire essentiellement diurne. Cette densité ne semble donc pas limitante pour la consommation et l'expression du comportement alimentaire des animaux. La fréquence des visites multiples était élevée en semaine 3 puis baissait fortement durant les quatre dernières semaines, atteignant moins de 2 % des visites. Les caractères de croissance et d'ingéré concordent avec la bibliographie à l'échelle du test, malgré l'augmentation de la densité par DAC. Testée sur le type génétique mulard, la possibilité d'accroître la densité de canards par distributeur doit également être confirmée chez les deux autres types génétiques, le canard de Barbarie et Pékin, de façon à optimiser les coûts de testage de l'ingéré chez le canard.

ABSTRACT

Assessment for feed intake and feeding behavior of mule ducks during growth with 40 ducks per single place electronic feeder

The rise of fine and high throughput phenotyping of livestock stimulates the development of new tools for innovative measures, in particular for feeding. To describe the feeding behavior and individual feed intake of group-housed ducks, a single place electronic feeder (SEF), developed at INRA, is available for research. In order to optimize the use of this tool, a test was carried out with a total of 40 ducks per DAC, doubling the density compared with previous tests. A group of 157 mule ducks was conducted with four SEF from 15 to 49 days of age. The analyses showed that, with this number of ducks using the SEF, the occupation time was never saturated. Very few feeding events were observed at night. This density is not limiting for the feed intake and expression of feeding behavior of the animals. The frequency of multiple visits was high in week 3 (17%), but rapidly decreased during the last four weeks, to reach less than 2 % of the feed consumed. The growth and feed intake characteristics were in accordance with the literature at the test level, despite the increased density. Tested on mule genetic type, the possibility of increasing density of ducks per SEF should also be confirmed for the two parental genetic types, the Muscovy and Pekin ducks, to optimize the phenotyping costs of feeding in ducks.

INTRODUCTION

Pour un développement durable des productions animales, des outils de phénotypage fin et à haut débit voient le jour dans les différentes filières d'élevage ces dernières années (Phocas *et al.*, 2014a). Cet essor est une nécessité pour accroître l'efficacité des productions animales notamment dans le domaine de l'alimentation (Phocas *et al.*, 2014b). Ainsi en aviculture, plusieurs Distributeur Automatique de Concentré (DAC) ont été développés dans la recherche comme dans l'industrie en poulet de chair (Howie *et al.*, 2009) et en canard (Zhu *et al.*, 2016). A l'INRA, un DAC conçu pour les canards est disponible (SEACAP brevet n°1260972). Il permet d'obtenir des données fines, automatiques et individuelles de comportement et de consommation alimentaires de canards élevés en lot au sol, ainsi que de poids des animaux. Les trois types génétiques de canards d'élevage ayant fait l'objet d'une étude fine de leur comportement et de leur consommation alimentaires au distributeur (Cobo *et al.*, 2017), l'un des objectifs est de déterminer désormais le nombre maximal de canards pouvant être élevés par DAC sans modifier le comportement alimentaire des animaux. Jusqu'ici, les études mettaient en jeu 20 canards de Barbarie ou mulards et 25 canards Pékin par DAC (Cobo *et al.*, 2017). Avec 20 canards mulards, le temps d'occupation maximum d'un DAC a été estimé à presque sept heures par jour. L'essai présenté ici comptait le double d'animaux par DAC avec un lot de 157 canards mulards élevés sur quatre distributeurs, soit presque 40 canards mulards par DAC.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

Un lot de 157 canards mulards a été conduit au DAC sur l'Unité Expérimentale des Palmipèdes à Foie Gras (UEPFG). Ces canards de type commerciaux comprenaient uniquement des mâles.

1.2. Conduite et logement

Le dispositif original qui permet de peser les consommations des animaux (Basso *et al.*, 2014) a été modifié en ajoutant deux portes en plexiglass à l'entrée du DAC qui se ferment automatiquement quand un animal se trouve dans le DAC. Ce système de portes limite l'accès de plusieurs canards simultanément à la mangeoire. Une balance pesant l'animal en continu à l'intérieur du dispositif a été

ajoutée. C'est ce modèle de DAC qui a été utilisé pour ce test.

Réceptionnés à l'âge de un jour, débécqués et vaccinés, les canetons ont été installés dans une loge unique équipée des quatre distributeurs. Jusqu'à l'âge de 15 jours, les canetons ont été habitués au dispositif en ayant libre accès à la mangeoire dans un premier temps puis en faisant fonctionner les portes à l'entrée du couloir de chaque DAC. Entre temps, à l'âge de 11 jours, chaque caneton a été identifié à l'aide d'une puce électronique placée à la base du cou permettant l'identification individuelle automatique à chaque visite. A partir du 15^{ème} jour d'âge et ce jusqu'à la 7^{ème} semaine révolue (50 jours d'âge), les mesures ont été collectées automatiquement pour l'ensemble des animaux. L'essai comptait un effectif de 40 canards mulards par DAC. La densité par m² se situait dans les densités recommandées par la réglementation, avec 0,45 canard mulard par m².

Au cours de la phase de croissance, les animaux ont été alimentés avec un aliment de démarrage jusqu'à 28 jours d'âge, puis avec un aliment croissance et finition jusqu'à sept semaines. Tout au long du test, une couche de copeaux au sol était renouvelée tous les jours. Les animaux ont été soumis à un éclairage continu pendant les cinq premiers jours. Par la suite, la durée d'éclairement a été diminuée d'une heure tous les trois à cinq jours de façon à obtenir un éclairage de 16 heures dans la journée à l'âge de quatre semaines. Le bâtiment était préchauffé à 28°C avant l'arrivée des canetons, puis la température était abaissée de 2°C tous les trois jours jusqu'à atteindre une température ambiante de 22°C. Pour le reste du test, la température ambiante était maintenue de façon à ce qu'elle ne passe pas en dessous de 10°C. Au cours des tests, pour limiter les conséquences du piquage, l'ensemble des canards mulards a été débécqué une fois en fin de semaine 5.

1.3. Caractères enregistrés

A chaque visite le logiciel DaaMiC, embarqué sur le mini-ordinateur de chaque DAC, enregistre la date et l'heure d'entrée et de sortie, le numéro de puce de l'animal et les poids de la mangeoire et de l'animal. Seules les visites avec un seul canard dans le DAC et dont la consommation est supérieure à 2 g ont été conservées pour les calculs, les visites multiples pour lesquelles plusieurs canards étaient détectés dans le DAC ont été écartées. Les visites sans identifiant et dont le poids animal montre que plus d'un canard est présent dans le DAC ont été également supprimées pour les analyses. A partir de ces données brutes, de nouvelles variables ont été calculées pour chaque canard à l'échelle de la journée, de la semaine et de l'ensemble du test. Ainsi, les moyennes des quantités consommées par visite, des durées des visites et des intervalles entre visites, et le nombre de visites pour chaque jour de test ont été estimées. La durée des intervalles entre visites a été calculée comme la

différence entre l'heure de fin de la visite précédente et l'heure de début de la visite suivante pour un canard, quel que soit le DAC visité. La vitesse d'ingestion a été obtenue à l'échelle de la visite et moyennée pour chaque jour de test. Les poids moyens des canards ont également été estimés pour chaque jour de contrôle. Pour ces six caractères, des moyennes par semaine et pour la durée du test ont été calculées pour chaque canard, ainsi que des gains moyens quotidiens (GMQ) et des indices de consommation (IC).

1.4. Analyses statistiques

Les caractères non normalement distribués ont été transformés par un log et aucune donnée aberrante au-delà de quatre écart-types de la moyenne n'a dû être éliminée des analyses.

Pour évaluer l'évolution de chaque variable en fonction des semaines, un modèle linéaire mixte a été appliqué, incluant l'effet fixe de la semaine de test et la répétition de l'animal en effet aléatoire (proc mixed, SAS, 2008). Les moindres carrés moyens sont rapportés pour l'effet semaine (Tableau 1).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

La Figure 1 présente la fréquence des visites multiples de 14 à 49 jours d'âge tous distributeurs confondus. Cette fréquence est élevée jusqu'à la quatrième semaine d'âge puis baisse drastiquement et tend à se stabiliser jusqu'à la fin de l'essai sans jamais néanmoins atteindre zéro. De 14 à 28 jours d'âge, la fréquence des visites multiples est divisée par six passant de 205 à 32 visites multiples quotidiennes en quinze jours. A partir de la quatrième semaine, elles se maintiennent en moyenne aux alentours de 13 visites multiples par jour, soit environ trois par DAC. Malgré l'arrêt d'un DAC à la 42^{ème} journée à cause d'une panne matérielle, il semblerait que les canards se soient répartis sur les trois DAC restant sans pour autant augmenter fortement les visites multiples.

Sur la Figure 2 est représenté le pourcentage d'aliment consommé en fonction du type de visite. Trois types de visite sont distingués : les visites simples avec un seul canard dans le DAC, les visites multiples pour lesquelles les consommations ne sont pas attribuables puisque plusieurs canards sont détectés dans le DAC pendant la visite, et les visites non identifiées pour lesquelles la puce de l'animal n'est pas lue à l'intérieur du DAC. Le pourcentage d'aliment consommé en visites multiples s'élève à près de 17 % en semaine 3, soit plus de 37 kg sur la semaine. Il diminue ensuite rapidement pour laisser place aux visites simples, qui représentent en semaine 7 plus de 94 % de la consommation totale. Etant donné l'importance des visites multiples en semaine

3, seules les données des semaines 4 à 7 ont été utilisées pour le reste des résultats présentés.

Avec 157 canards mulards élevés sur quatre DAC jusqu'en début de semaine 7, le temps d'occupation moyen des DAC par jour est de l'ordre de 5,4 h par jour. Le temps d'occupation maximum des DAC s'élève à 9 heures par jour avec quatre distributeurs, et à 8,7 h avec trois DAC qui sont utilisés plus équitablement. Avec une densité de 40 canards par DAC, les distributeurs ne sont donc pas saturés. Cette densité n'est pas limitante pour la consommation.

Sur une journée, 98 % du temps d'occupation des distributeurs est réalisé entre 6 et 22 heures, avec utilisation de chaque distributeur de façon pratiquement équitable. Cette période correspond également à 99 % de l'aliment consommé sur une journée. Comme chez la majorité des animaux d'élevage, en journée, deux pics de repas sont observés, un le matin et l'autre le soir moins marqué dans notre cas en raison de la présence des portes qui limite peut-être la compétition et répartit de façon plus homogène les repas sur la journée. Les canards n'avaient pas d'activité alimentaire en phase nocturne (Figure 3).

De l'âge de 21 à 49 jours, un canard mulard a consommé en moyenne 4,745 kg d'aliment. A l'échelle de la semaine, les consommations totales, journalières et par visite ont augmenté significativement au cours de l'essai. La consommation par visite a plus que doublé entre les semaines 4 et 7, avec des durées qui ont diminué de 10 s, passant de 87 à 77 s ($P < 0,0001$) entraînant ainsi un doublement de la vitesse d'ingestion, qui passe de 13 à 32 g ingérés par minute ($P < 0,0001$). Cette augmentation de la vitesse d'ingestion est liée à la physiologie des animaux en phase de croissance. Les animaux jeunes sont décrits comme faisant plus de petits repas. Avec l'âge, le nombre de repas diminue et l'ingéré et la vitesse d'ingestion augmentent par repas du fait de l'amélioration de la capacité d'ingestion elle-même liée au développement du système digestif. En moyenne, sur le test, le canard mulard a mangé 26,7 g d'aliment par visite pour une durée de 1,3 min, ce qui lui confère une vitesse d'ingestion de 21,2 g/min. Le nombre de visites au distributeur est stable durant les deux premières semaines, puis augmente légèrement en semaine 6, pour diminuer de deux visites par jour en dernière semaine. Cette élévation en semaine 6 peut s'expliquer par une modification du comportement des animaux due au débecquage en fin de semaine précédente. Le nombre de visites au distributeur est stable durant les deux premières semaines et diminue d'une visite en semaine 7. L'augmentation de ce caractère en semaine 6 peut s'expliquer par un comportement plus exploratoire suite au débecquage en fin de semaine 5. La durée des intervalles entre visites est en moyenne de 3,66 h à l'échelle du test. Cette durée est maximale en semaine 7 (de l'ordre de 4,3 h), ce qui est cohérent avec le nombre et la durée

des visites diminués. Le gain moyen quotidien est maximum en semaine 4 avant de diminuer la semaine suivante de $-13,42$ g/j et d'augmenter à nouveau légèrement en dernière semaine de $+7,60$ g/j. L'indice de consommation augmente au fil des semaines, passant de $1,47$ à $2,80$ kg ingérés par kg de gain de poids entre la première et la dernière semaine de test ($P < 0,0001$).

CONCLUSION

Ces résultats indiquent la possibilité d'augmenter jusqu'à 40 le nombre de canards mulards par DAC. Les distributeurs ne sont jamais saturés, aucun report de consommation alimentaire la nuit n'est observé en raison d'une compétition trop importante pour l'accès au distributeur durant la journée. L'impact sur le

comportement et la consommation alimentaires des canards mulards au DAC est donc à priori limité dans cette nouvelle configuration. La comparaison avec les résultats obtenus sur les essais suivants mettant en jeu 20 canards mulards par DAC devra tenir compte des origines génétiques des animaux pour caractériser l'impact des densités sur le comportement alimentaire. Le fait d'optimiser l'effectif de canards par DAC permettra de mettre en œuvre des essais à plus grandes échelles avec des effectifs plus importants, tout en limitant l'investissement financier que représentent ces outils de phénotypage. Chaque type génétique de canard ayant un comportement qui lui est propre, il serait également intéressant d'évaluer le nombre de canards maximum pouvant être élevés par DAC pour les deux espèces parentales, canard de Barbarie et Pékin.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cobo E., Lagüe M., Cornuez A., Bernadet M.-D., Martin X., Ricard E., Gilbert H., 2017. 12^{èmes} JRA-PFG.
 Howie J. A., Tolkamp B. J., Avendano S., Kyriazakis I., 2009. *Applied Animal Behaviour Science*, 116:101-109.
 Phocas F., Agabriel J., Dupont-Nivet M., Geurden I., Médale F., Mignon-Grasteau S., Gilbert H., Dourmad J.-Y., 2014 a. *INRA Prod. Anim.*, 27 (3), 235-248.
 Phocas F., Bobe J., Bodin L., Charley B., Dourmad J.-Y., Friggens N.C., Hocquette J.-F., Le Bail P.-Y., Le Bihan Duval E., Mormède P., Quéré P., Schelcheri F., 2014 b. *INRA Prod. Anim.*, 27 (3), 181-194.
 Zhu F., Hao J.-P., Cheng Y., Hu S.-Q., Hou Z.-C., 2016. In "The Proceedings of WPC2016 – Abstracts, September 5-9, Beijing, China", S5-0044, p490.

Figure 1. Nombre de visites multiples enregistrées chaque jour de 14 à 49 jours d'âge, cumulées sur les quatre DAC.

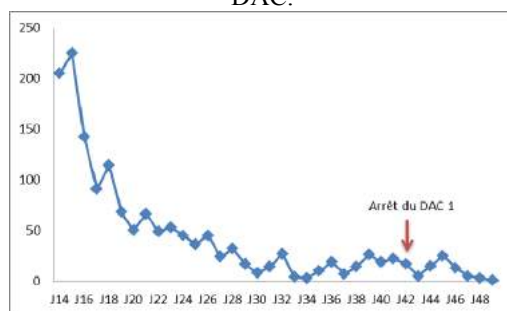


Figure 2. Evolution entre 3 et 7 semaines d'âge de la part d'aliment consommé lors de visites simples, multiples ou non-identifiées.

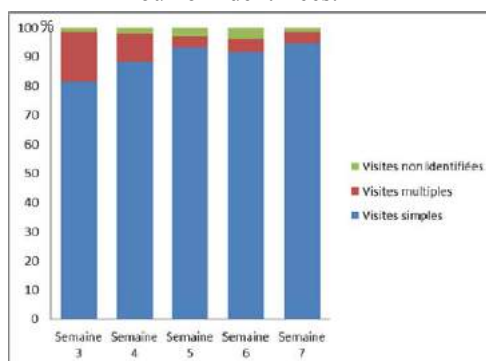


Figure 3. Temps d'occupation (en h) et consommation d'aliment (en kg) par DAC (N=4) cumulés pour tous les canards (N=157) au cours d'une journée moyenne.

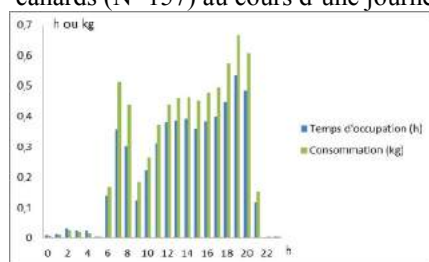


Tableau 1. Caractéristiques de comportement et consommation alimentaires de canards mulards (N = 157) entre 21 et 49 jours d'âge à l'échelle des semaines et du test.

Variable	Unité	Semaine 4 LSMeans	Semaine 5 LSMeans	Semaine 6 LSMeans	Semaine 7 LSMeans	Test Moyenne
Consommation totale	g	861 ^a	970 ^b	1274 ^c	1572 ^d	4745
Consommation journalière	g/j	125,6 ^a	137,8 ^b	182,7 ^c	225,4 ^d	170,8
Consommation par visite	g	18,9 ^a	21,0 ^a	24,9 ^b	41,0 ^c	26,7
Durée journalière des visites	s/j	568 ^c	446 ^a	496 ^b	421 ^a	492
Durées des visites	s	87 ^d	64 ^a	69 ^b	77 ^c	78
Nombre de visites par jour		6,66 ^b	6,60 ^b	7,34 ^c	5,51 ^a	6,75
Durée des intervalles entre visites	s	12325 ^{ab}	12881 ^b	11667 ^a	15532 ^c	13207
Vitesse d'ingestion	g/min	12,97 ^a	19,78 ^b	21,84 ^c	32,09 ^d	21,22
Gain moyen quotidien	g/j	85,68 ^c	71,96 ^a	73,44 ^a	81,04 ^b	75,97
Indice de consommation		1,47 ^a	1,92 ^b	2,49 ^c	2,80 ^d	2,26

Les moyennes des moindres carrés (LSMeans) de l'effet de la semaine ont été estimées par un modèle linéaire mixte prenant en compte l'effet fixe de la semaine de test et la répétition de l'animal en effet aléatoire. Dans une ligne, les valeurs avec différents exposants (^{a, b, c, d}) ont été trouvées significativement différentes ($P < 0.05$) pour l'effet de la semaine.

ÉVALUATION DU COMPORTEMENT ET DE LA CONSOMMATION ALIMENTAIRES DU CANARD MULARD PENDANT LA PÉRIODE DE CROISSANCE AVEC 40 CANARDS PAR DISTRIBUTEUR AUTOMATIQUE D'ALIMENT

COBO Emilie^{1*}, LAGÜE Michel², CORNUÉZ Alexis², BERNADET Marie-Dominique², MARTIN Xavier², RICARD Edmond¹, GILBERT Hélène¹, DROUILHET Laurence¹

CONTEXTE ET OBJECTIF

- Essor du phénotypage animal fin et à haut débit
- Protocoles de génétique à grande échelle

Optimisation de l'utilisation du DAC Palmipèdes par le canard mulard pour limiter les coûts expérimentaux et se rapprocher des conditions d'élevage en passant de 20 à 40 canards/DAC

DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

UE PFG



157 canards mulards en un seul lot
Période d'habituation : 15 premiers jours
Enregistrements : de 2 à 7 semaines d'âge révolues
NOUVEAUTÉ : 40 canards/DAC soit le double qu'habituellement

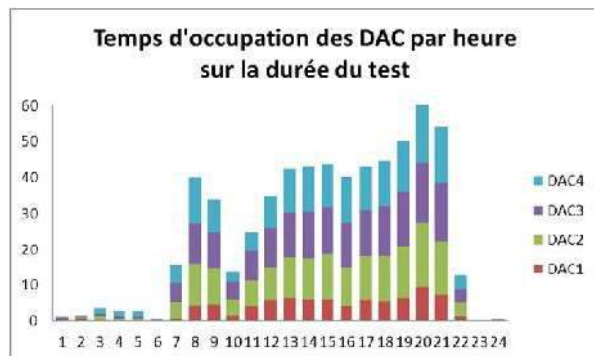
- 1 bâtiment d'élevage dédié aux essais DAC
- 4 DAC identiques
- 1 technicien référent

Equipe MODGEN et CATI SICPA

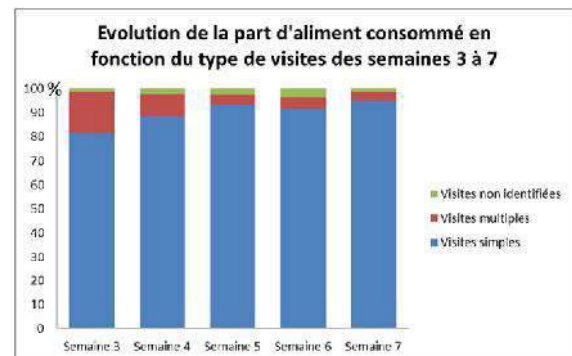
Des logiciels pour

- ✓ Aider au suivi des essais
- ✓ Générer des alertes
- ✓ Récolter et stocker les données brutes
- ✓ Archiver les protocoles
- ✓ Analyser les données

UTILISATION DES DAC PAR LES CANARDS DE 3 À 7 SEMAINES D'ÂGE



Temps d'occupation moyen : 5,4 h/jour/DAC
Temps d'occupation maximum d'un DAC: 9 h/jour
Sur une journée, de 6 à 22 h :
- 98 % du temps d'occupation
- 99 % de l'aliment consommé



% d'aliment consommé sans possibilité d'attribution d'identifiant (visites multiples et non identifiées) diminue fortement en semaine 5.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pas de saturation des DAC et pas de report de consommation la nuit dû à une compétition plus importante.

Impact limité, *a priori*, sur le comportement et la consommation alimentaires des canards mulards.

➡ Estimation de la densité optimale par DAC pour les canards de Barbarie et Pékin.

VALIDATION D'UN DISTRIBUTEUR AUTOMATIQUE D'ALIMENT COMME OUTIL DE PHENOTYPAGE DE LA CROISSANCE, DU COMPORTEMENT ET DE LA CONSOMMATION ALIMENTAIRES INDIVIDUELS DE CANARDS ELEVES EN LOT

**Cobo Emilie^{1*}, Lagüe Michel², Cornuez Alexis², Bernadet Marie-Dominique², Martin
Xavier², Heirman Thierry³, Bompa Jean-François¹, Laperruque François¹, Ricard
Edmond¹, Gilbert Hélène¹**

¹ UMR GenPhySE (INRA/INPT) – 24 chemin de Borde Rouge, Auzeville-Tolosane CS 52 627
- 31 326 CASTANET-TOLOSAN Cedex,

² UE PFG - Domaine d'Artiguères 1076, route de Haut-Mauco - 40 280 BENQUET

³ UMR GABI 1313 - Domaine de Vilvert - 78352 JOUY-EN-JOSAS Cedex

emilie.cobo@inra.fr

RÉSUMÉ

L'élevage de précision constitue un enjeu majeur pour les recherches en productions animales. Avec son coût économique important, l'alimentation fait l'objet de nombreuses études pour décrire le comportement et la consommation alimentaires des volailles dans des conditions proches de celles des élevages de production. Un distributeur automatique de concentré (DAC) est disponible pour mesurer précisément les quantités ingérées et le comportement alimentaire de canards élevés en lot. Pour évaluer l'effet de cet outil sur les performances de croissance et d'ingéré, deux lots de canards de chacun des trois types génétiques d'élevage ont été conduits en parallèle au DAC et à la mangeoire linéaire. Les données collectées ont été analysées de 5 à 7 semaines d'âge pour les deux modes d'alimentation, avec des lots de 25 à 64 animaux par combinaison type génétique x alimentation. A l'échelle de la semaine et du test, le gain moyen quotidien individuel, la consommation alimentaire et l'indice de consommation par lot ont été comparés entre DAC et témoin par type génétique. Le dispositif DAC ne montre pas d'effet significative sur la croissance des animaux. Les consommations alimentaires sont similaires entre les deux modes d'alimentation, sauf pour le canard de Barbarie pour lequel environ 12% des données sont perdues au DAC en raison de visites de plusieurs canards à la fois, pour lesquelles la consommation n'est donc pas attribuable. Ce point est en cours de résolution par modification de l'accès au dispositif. Au-delà des données de performances qui confirment que l'élevage des canards au DAC n'a pas d'influence majeure sur leurs performances, cet outil permet également l'obtention automatisée de données innovantes sur le comportement alimentaire des animaux.

ABSTRACT

Validation of an automatic feeder tool to measure individual growth, feed intake and feeding behavior of group-housed ducks

Precision breeding is a major research topic in animal productions. With a significant economic feed cost, numerous studies finely describe the feeding behavior and feed intake of poultry in conditions close to those of production farms. A single place electronic feeder (SEF) is available to measure accurately intake and feeding behavior of group-housed ducks. To assess the effect of this tool on growth and intake performance, two groups of ducks of the three genetic types were raised in parallel with a SEF and a linear conventional feeder. Data were analyzed from 5 to 7 weeks of age for the two feeding conditions. During the test and weekly, individual average daily gain, group feed intake and feed conversion ratio were compared between SEF and control conditions for each genetic type. Overall, the SEF did not affect the growth performance of the animals. Feed intake was similar between the two conditions, expect for Muscovy ducks which data suffered from the highly gregarious behavior of these animals leading to 12% of lost visits due to multiple identifications, for which consumption is not attributable. This limit is currently dealt with the modification of the access to the SEF. In addition to the growth traits that indicate no impact of raising ducks with SEF, this tool also provides automated data on the feeding behavior of animals.

INTRODUCTION

Relativement aux autres coûts d'élevage, l'alimentation des animaux est le poste le plus important (Riffard *et al.*, 2011). Dans les filières avicoles, elle représente jusqu'à 70 % des coûts de production (Waller, 2007). L'évaluation du comportement et de la consommation alimentaires des animaux de rente est indispensable pour mieux maîtriser ces coûts. Ainsi, pour répondre à des questions scientifiques émergentes liées à ces enjeux de production, un distributeur automatique de concentré (DAC, brevet n°1260972) adapté aux canards a été mis en place en collaboration entre l'UMR GenPhySE et l'Unité Expérimentale des Palmipèdes à Foie Gras (UEPFG). Cet outil de recherche permet une mesure individuelle du comportement et de la consommation alimentaires de canards élevés en lot au sol, dans des conditions proches de celles des élevages de production.

Le dispositif a été adapté aux trois principaux types génétiques de canard d'élevage dans le but d'obtenir des données exploitables de 28 à 50 jours d'âge après une phase d'adaptation (Basso *et al.*, 2014). Un phénotypage fin du comportement et de la consommation alimentaires de canards de Barbarie, Pékin et mulards a été réalisé au cours de l'année 2015. Les premiers résultats obtenus ont fourni des données sur les performances de croissance, des quantités ingérées individuelles et les comportements de l'hybride mulard et de ses deux origines parentales (Cobo *et al.*, 2017). Dans cette nouvelle étude, la confrontation de données collectées au DAC et à la mangeoire linéaire sur des canards apparentés a permis d'évaluer l'impact du dispositif DAC sur les performances zootechniques de croissance et d'ingéré.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

Au cours de l'année 2015, les trois types génétiques se sont succédés avec conduite simultanée de lots en DAC et de lots dits témoins, élevés à la mangeoire linéaire. En février, 66 canards et 106 canes de Barbarie, issus de la lignée expérimentale INRA 666, ont été élevés en sexes séparés au DAC et à la mangeoire linéaire en quatre lots distincts. Plus précisément, 41 mâles et 42 femelles ont été conduits au DAC à côté de 25 mâles et 64 femelles à la mangeoire linéaire. A partir du mois de mars, les deux sexes des deux lignées expérimentales Pékin (INRA 37S et 444) ont été testés, sexes mélangés, avec les deux modes d'alimentation. Ainsi, le lot au DAC comprenant 35 mâles et 65 femelles a été comparé au lot témoin comptant 36 mâles et 64 femelles. Dans chacun des deux lots et pour chaque sexe, les effectifs entre les deux lignées expérimentales étaient répartis

équitablement. En septembre, seuls les mâles mulards ont été testés pour la comparaison. Sur 80 canards mulards, une moitié des animaux a été élevée au DAC et l'autre moitié à la mangeoire linéaire.

1.2. Conduite et logement

Les animaux de chaque type génétique étaient issus d'un lot d'éclosion unique. Les canards de Barbarie et Pékin ont éclos dans le couvoir de l'UEPFG où ils ont été vaccinés. Les canards mulards ont été réceptionnés, débécqués et vaccinés, à l'âge de un jour sur l'UEPFG. Pour les trois types génétiques, lots DAC et témoins étaient logés dans la même aile d'un bâtiment d'élevage, seul le mode d'alimentation différait.

A l'âge de un jour, les canetons ont été répartis dans leur lot respectif et élevés en groupe au sol. Le nombre d'animaux par DAC était sensiblement différent en fonction des types génétiques, de l'ordre de 20 canards ou canes de Barbarie, 25 canards et canes Pékin et 20 canards mulards. Le temps d'occupation maximum par DAC calculé et le comportement du canard Pékin observé sur des tests au préalable ont permis cette légère augmentation du nombre de canards Pékin par DAC en limitant l'impact sur leur comportement alimentaire. La densité au m² était légèrement différente entre les trois types génétiques. Elle s'élevait à 1,6 canard de Barbarie, 2 canards Pékin et 0,9 canard mulard par m². Pour les lots témoins, une seule mangeoire linéaire était disponible par lot et la densité au m² par type génétique était égale à celle des lots au DAC.

Le dispositif original qui permet de peser les consommations des animaux (Basso *et al.*, 2014) a été modifié en ajoutant deux portes en plexiglass à l'entrée du DAC qui se ferment automatiquement quand un animal se trouve dans le DAC. Ce système de portes limite l'accès de plusieurs canards à la mangeoire. Une balance, pesant l'animal en continu à l'intérieur du dispositif, a été ajoutée. C'est ce modèle de DAC qui a été utilisé pour les tests des trois types génétiques. Le logiciel DaaMiC, embarqué sur le mini-ordinateur de chaque DAC, assure le suivi des essais via l'envoi d'alertes et la visualisation des données (tableau des visites, courbe du cumul des consommations journalières, etc.). Une interface Web met également à disposition, de façon plus détaillée, des résultats liés à un animal, à un lot, à une expérimentation ou à un distributeur, et génère des alertes sur le fonctionnement des DAC ou sur la consommation des animaux qui est un indicateur de leur état sanitaire. Un dernier logiciel, SI Expérimentation, assure l'archivage des protocoles et le stockage des données brutes.

Les animaux des deux lots ont été installés dans leur loge avec libre accès à la mangeoire de 1 à 15 jours d'âge. Cette période d'adaptation est indispensable notamment pour les lots au DAC. A 11 jours d'âge, chaque canard des lots DAC a été équipé d'une puce électronique à la base du cou permettant

l'identification individuelle automatique à chaque visite. A partir du 15^{ème} jour d'âge et ce jusqu'à la 7^{ème} semaine révolue (50 jours d'âge), les mesures sur les deux types de lot ont été collectées automatiquement pour les individus au DAC et manuellement pour les animaux témoins.

Les animaux ont été alimentés avec un aliment de démarrage jusqu'à 28 jours d'âge, puis avec un aliment de croissance et finition jusqu'à sept semaines. Les mêmes aliments (composition et granulométrie) ont été utilisés pour les deux types de lots des trois essais. Tout au long du test, une couche de copeaux au sol était renouvelée tous les jours. Tous les lots ont été soumis à un éclairage continu pendant les cinq premiers jours. Par la suite, la durée d'éclairement a été diminuée d'une heure tous les trois à cinq jours de façon à obtenir un éclairage de 16 heures dans la journée à l'âge de quatre semaines. Le bâtiment était préchauffé à 28°C avant l'arrivée des canetons, puis la température était abaissée de 2°C tous les trois jours jusqu'à atteindre une température ambiante de 22°C. A partir de 30 jours d'âge, la température ambiante était maintenue de façon à ce qu'elle ne passe pas en dessous de 10°C en période hivernale. Au cours des tests, pour limiter les conséquences du piquage, canards de Barbarie et canards mulards ont été débécqués une fois à l'âge de 42 jours.

1.3. Caractères enregistrés

Dans les lots témoins, chaque individu était pesé toutes les semaines et les quantités d'aliment distribué et refusé ont également été relevées au même rythme. Ainsi, les quantités ingérées par loge, et le gain moyen quotidien (GMQ) de chaque loge et de chaque animal ont été calculés à la semaine et pour le test. Ces deux variables ont également permis l'estimation de l'indice de consommation (IC).

Pour les lots au DAC, le logiciel DaaMiC embarqué sur le mini-ordinateur de chaque DAC, enregistrait la date et l'heure d'entrée et de sortie, le numéro de puce de l'animal et les poids de la mangeoire et de l'animal à chaque visite. Seules les visites avec un seul canard dans le DAC dont la consommation est supérieure à 2 g ont été conservées pour les calculs. Les visites multiples pour lesquelles plusieurs canards étaient détectés dans le DAC ont été écartées. Les visites non identifiées ont également été retirées des analyses. A partir de ces données brutes, de nouvelles variables sont calculées pour chaque canard à différentes échelles. Seules les moyennes de consommation alimentaire, des poids des animaux, des GMQ et des IC peuvent être comparées à la semaine et au test à celles des lots témoins.

Les données au DAC étant difficilement exploitables avant l'âge de 28 jours chez le canard de Barbarie du fait d'une part trop importante de visites multiples dont les consommations ne sont pas attribuables (Cobo *et al.*, 2017), seuls les résultats portant sur les semaines d'enregistrement 5 à 7 (28 à 50 jours d'âge)

sont présentés ici. Il est cependant vraisemblable que les ingérés des canards de Barbarie sont globalement sous-estimés au DAC.

1.4. Analyses statistiques

Consommations, GMQ et IC ont été calculés à l'échelle de la semaine et du test pour les deux lots des trois types génétiques. Dans le cas des types génétiques Barbarie et Pékin, les données obtenues sur les deux sexes ont été utilisées pour les analyses. Les consommations ayant été enregistrées collectivement à la mangeoire linéaire, le nombre d'unités statistiques est limité, donc aucun test statistique n'a été appliqué sur les consommations alimentaires ou les IC. Pour les mêmes raisons, l'effet sexe n'a pas pu être testé et les résultats sur l'ingéré comparent des canards mulards mâles à des canards de Barbarie et Pékin sexes mélangés. Seul le GMQ a fait l'objet d'une comparaison statistique entre sexes car quel que soit le mode d'alimentation, les pesées individuelles ont été collectées.

Seule une comparaison entre lots DAC et témoins intra-type génétique est présentée, l'objectif étant d'évaluer l'impact du dispositif DAC sur la vitesse de croissance, la consommation et le comportement alimentaires pour chacun des trois types génétiques étudiés. Les poids des canards ont été comparés grâce à un modèle linéaire mixte incluant les effets fixes du jour de pesée (quatre niveaux), du lot (deux niveaux), du sexe (deux niveaux) et de leur interaction, et la répétition de l'animal sur les quatre jours de pesée en effet aléatoire (proc mixed SAS, 2008) pour les types génétiques Barbarie et Pékin. Le même modèle a été utilisé pour l'hybride mulard en excluant l'effet fixe du sexe, seuls les mâles ayant été testés.

A l'échelle de la semaine, le GMQ a été comparé en appliquant un modèle linéaire mixte incluant les effets fixes de la semaine de test (trois niveaux), du lot (deux niveaux), du sexe (deux niveaux) et de leur interaction, et la répétition de l'animal sur les trois semaines de mesure en effet aléatoire (proc mixed, SAS, 2008) pour les types génétiques Barbarie et Pékin. Ce même modèle a été utilisé sans tenir compte de l'effet sexe pour le type génétique mulard, un seul sexe (mâle) ayant été testé. Les moindres carrés moyens sont rapportés pour l'interaction lot x semaine de test à l'échelle de la semaine (Tableau 1).

Pour confronter le GMQ des canards élevés au DAC vs mangeoire linéaire à l'échelle du test, un modèle linéaire simple avec effets du lot (deux niveaux) pour les trois types génétiques et du sexe (deux niveaux) pour les types génétiques Barbarie et Pékin a été testé (proc GLM, SAS, 2008).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Grâce aux pesées individuelles, la croissance entre les lots DAC vs témoin a pu être confrontée (Figure 1). Comme attendu, le type génétique Barbarie est caractérisé par un dimorphisme sexuel marqué ($P <$

0,0001). Par contre, aucune différence significative n'est observée entre les lots DAC vs témoin de chaque sexe, malgré des poids légèrement supérieurs chez les animaux témoins. Pour le type génétique Pékin, les lots mâle vs femelle et DAC vs témoin sont homogènes (pas d'effet sexe, lot ni lot*sexe). Le dispositif DAC n'a pas d'influence sur la courbe de croissance de l'hybride mulard, qui atteint un poids de 3,5 kg à 50 jours d'âge quel que soit le mode d'alimentation.

A l'échelle de la semaine, consommation journalière et IC par lot ont été calculés. De manière générale, les consommations journalières ont tendance à augmenter au cours des semaines (Figure 2a). Cette augmentation est plus marquée dans les lots témoins des types génétiques Barbarie et mulard. Il en est de même pour les IC qui ont tendance à s'accroître au cours des semaines pour les deux lots des trois types génétiques (Figure 2b). Quelle que soit la semaine considérée, la consommation journalière est plus faible et l'IC plus élevé chez les canards de Barbarie élevés au DAC plutôt qu'à la mangeoire linéaire. La consommation journalière au DAC est sans doute sous-estimée du fait des visites multiples dont la consommation représente de 9 à 38 % des ingérés (Cobo *et al.*, 2017). Chez le type génétique Pékin, l'IC est relativement stable en semaine 5 et 6 puis s'élève fortement en semaine 7 pour les deux lots. De la semaine 5 à 6, l'IC augmente de + 0,29 point dans le lot DAC et de 0,41 point dans le lot témoin. De la semaine 6 à 7, l'accroissement entre lot DAC et témoin est sensiblement égal, de l'ordre de + 1,8 point. Chez le canard mulard, l'IC est plus élevé en semaine 5 à la mangeoire linéaire. Cette tendance s'inverse en fin d'essai avec des canards qui sont plus efficaces au DAC peut-être à cause de modifications de la compétition dans le temps entre les systèmes d'alimentation.

Le tableau 1 présente les GMQ des deux lots des trois types génétiques pour les trois semaines de test (semaine 5 à 7). Sauf pour l'hybride mulard, les GMQ des lots DAC et témoin suivent une même tendance avec peu d'évolution entre les semaines 5 et 6 puis une forte diminution de la vitesse de croissance en semaine 7, plus marquée chez les animaux conduits à la mangeoire linéaire. En semaine 7 au DAC, le GMQ du type génétique Barbarie est supérieur de + 23,36 g/j par rapport à la mangeoire linéaire et de +9,10 g/j chez type génétique Pékin. Chez l'hybride mulard, lots DAC et témoin présentent des évolutions de GMQ opposées au fil des semaines. En semaine 5, le GMQ est significativement supérieur au DAC de +

8,14 g/j, en semaine 6 il devient plus élevé à la mangeoire linéaire de + 9,49 g/j, puis redevient plus favorable au DAC en semaine 7 avec + 5,08 g/j. Cette inversion en semaine 5 pourrait s'expliquer par une plus forte baisse d'ingestion des animaux au DAC suite au débécage, indiquant potentiellement une plus grande sensibilité au traitement, en interaction avec l'appareil de mesure.

A l'échelle du test, entre lot DAC et témoin, la consommation totale est supérieure à la mangeoire linéaire pour les types génétiques Barbarie et mulard respectivement de + 1245 g/j et + 304 g/j (Figure 3a). Cet important écart de consommation entre les lots DAC et témoin chez le type génétique Barbarie peut s'expliquer par les visites multiples qui sous-estiment la consommation au cours de l'essai, comme expliqué précédemment (Cobo *et al.*, 2017). Pour le type génétique Pékin, la consommation totale est supérieure de + 468 g au DAC. Canes et canards Pékin ont tendance à légèrement plus consommer au DAC contrairement aux canards mulards. Le test statistique montre que l'interaction lot*sexe pour les types génétiques Barbarie et Pékin et l'effet lot pour le type génétique mulard n'a pas d'influence sur le GMQ intra type génétique (Figure 3b). Le dispositif DAC n'a donc pas d'effet sur la croissance des animaux à l'échelle du test.

CONCLUSION

En plus d'obtenir des mesures fines et automatiques de comportement et de consommation alimentaires, le dispositif DAC permet de mesurer des performances en croissance proches des performances de croissance et d'ingéré obtenues sur des lots élevés à la mangeoire linéaire. Le dispositif constitue donc un réel atout pour le suivi des animaux d'élevage. La difficulté de l'enregistrement complet des données sur les animaux de Barbarie est en cours de résolution pour que le DAC canard, dans cette version avec portes et pesée automatique des animaux, devienne un dispositif complet qui offre aux différents utilisateurs des outils d'aide au suivi des essais tout en assurant la collecte et le stockage des données brutes.

Merci à l'UEPFG pour son soutien financier et au groupe de travail DAC pour sa collaboration.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Basso B., Lagüe M., Guy G., Ricard E., Marie-Etancelin C., 2014. J. Anim. Sci. 92 : 1-8.
 Cobo E., Lagüe M., Cornuez A., Bernadet M.-D., Martin X., Ricard E., Gilbert H., 2017. 12^{èmes} JRA-PFG.
 Riffard C., Gallot S., Magdelaine P., 2011. Rapport technique, ITAVI, 57 p.
 Waller A., 2007. Poultry International, 46 : 12-15.

Figure 1. Courbes de croissance en fonction du mode d'alimentation (DAC ou témoin) et du sexe pour les types génétiques Barbarie (a), Pékin (b) et mulard (c) de 28 à 50 jours d'âge.

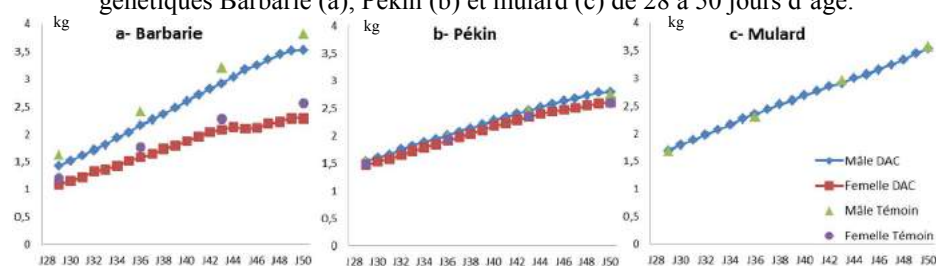


Figure 2. Consommation journalière en g/j (a) par type génétique et par mode d'alimentation. Indice de consommation (b) par semaine pour des lots DAC et témoin par type génétique de 5 à 7 semaines.

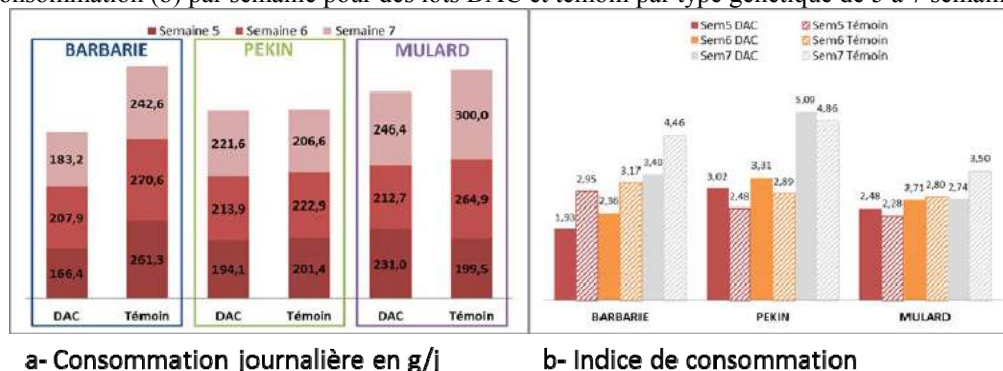
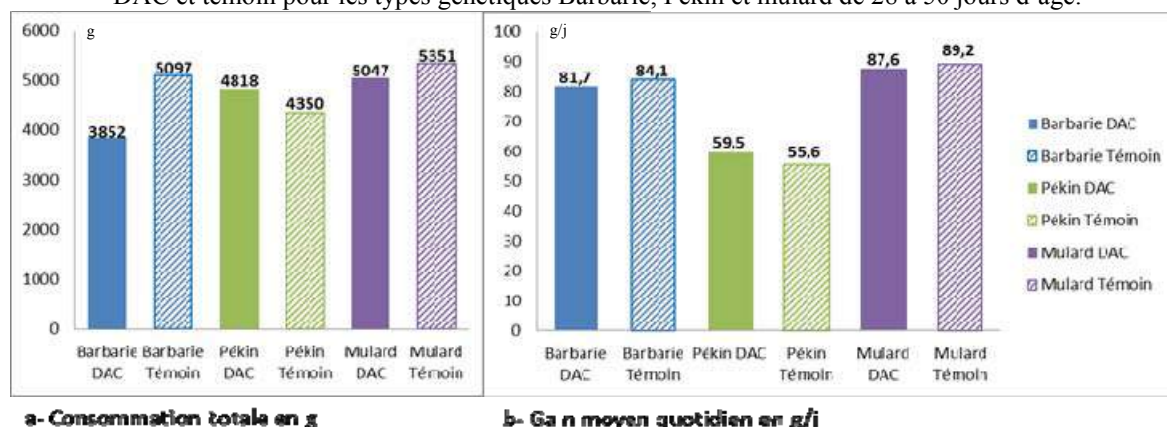


Tableau 1. Evolution du gain moyen quotidien en g/j en fonction du mode d'alimentation (DAC vs témoin) intra type génétique de 28 à 50 jours d'âge.

	Semaine 5		Semaine 6		Semaine 7	
	DAC	Témoin	DAC	Témoin	DAC	Témoin
Barbarie	86,35 ^c	95,22 ^d	93,37 ^d	93,18 ^d	74,83 ^b	63,97 ^a
Pékin	65,71 ^c	66,32 ^c	65,15 ^c	62,39 ^c	47,26 ^b	37,69 ^a
Mulard	95,63 ^c	87,49 ^{ab}	84,99 ^a	94,48 ^c	90,77 ^{bc}	85,69 ^a

*Moindres carrés moyens obtenus à partir d'un modèle linéaire mixte incluant les effets fixes de la semaine de test, du lot et de leur interaction, et la répétition de l'animal sur les trois semaines de test en effet aléatoire. L'effet semaine de test est significatif à 5% (sauf pour le mulard) et l'interaction est significative à moins de 5% pour chacun des types génétiques. Les lettres différant intra ligne correspondent à des différences significatives à 5% entre moindres carrés moyens.

Figure 3. Consommation totale par loge en g (a, N = 1 (Pékin, mulard) ou 2 (Barbarie) loges par combinaison type génétique x mode d'alimentation) et GMQ en g/j (b, N = 25 à 64 canards par combinaison) pour les lots DAC et témoin pour les types génétiques Barbarie, Pékin et mulard de 28 à 50 jours d'âge.



a- Consommation totale en g
L'effet lot intra type génétique n'est pas significatif à 5% d'après une analyse de variance simple comprenant l'effet du lot et du sexe pour les types génétiques Barbarie et Pékin et réciproquement l'effet de lot pour le type génétique mulard.

VALIDATION D'UN DISTRIBUTEUR AUTOMATIQUE D'ALIMENT COMME OUTIL DE PHÉNOTYPAGE DE LA CROISSANCE, DU COMPORTEMENT ET DE LA CONSOMMATION ALIMENTAIRES INDIVIDUELS DE CANARDS ÉLEVÉS EN LOT

COBO Emilie^{1*}, LAGÜE Michel², CORNUEZ Alexis², BERNADET Marie-Dominique², MARTIN Xavier², HEIRMAN Thierry³, BOMPA Jean-François¹, LAPERRUQUE François¹, RICARD Edmond¹, GILBERT Hélène¹

CONTEXTE & OBJECTIF

- ❖ Enjeu majeur de l'alimentation en productions animales
- ❖ Émergence de l'élevage de précision

Développement du DAC Palmipèdes

Validation de cet outil de phénotypage innovant par la comparaison des performances zootechniques des lots témoins élevés à la mangeoire linéaire (ML) aux lots DAC

DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

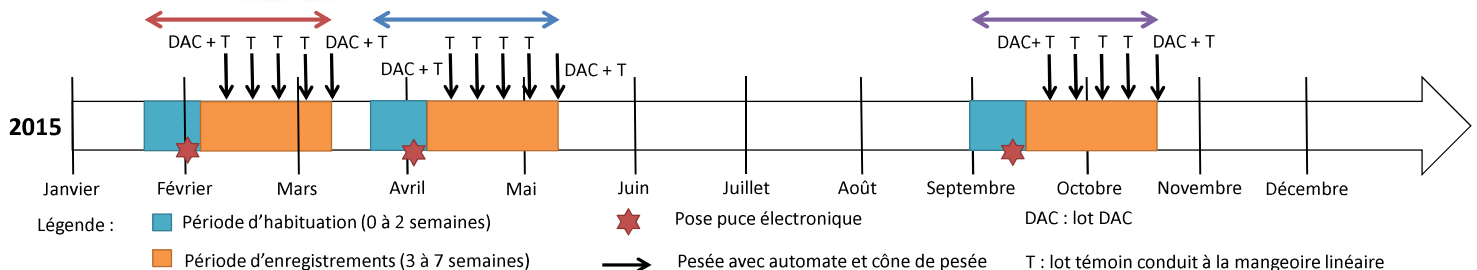
ML : 25 et 64 ♀
DAC : 41 et 42 ♀
20 canards/DAC
Sexes séparés



ML : 36 et 64 ♀
DAC : 35 et 65 ♀
25 canards/DAC
Sexes mélangé

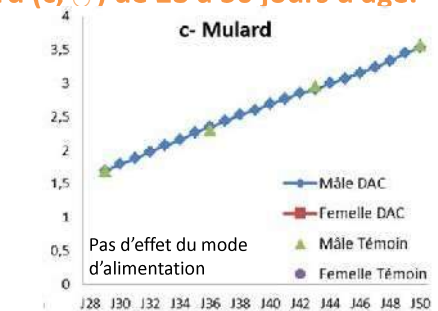
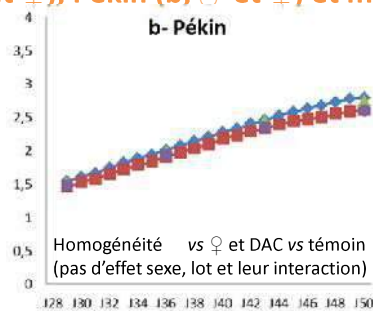
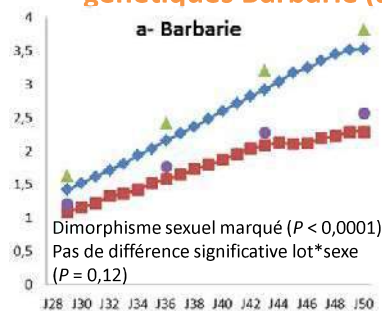


ML : 40
DAC : 40
20 canards/DAC
Pas de femelle



MANGEOIRE LINÉAIRE VS DAC

Courbes de croissance en fonction du mode d'alimentation (DAC ou témoin) et du sexe pour les types génétiques Barbarie (a, ♂ et ♀), Pékin (b, ♂ et ♀) et mulard (c, ♂) de 28 à 50 jours d'âge.

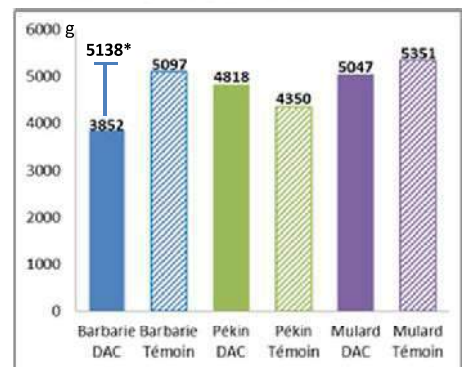


Consommation totale par loge en g pour les lots DAC et témoin et les types génétiques Barbarie (♂ et ♀), Pékin (♂ et ♀) et mulard (♂) de 28 à 50 jours d'âge.

BARBARIE : conso DAC < conso témoin => plus de 25 % de l'aliment consommé en visites multiples en semaine 4 (plusieurs canards dans le DAC) sous estimation la consommation

PEKIN : conso DAC > conso témoin

MULARD : conso DAC < conso témoin



* En comptabilisant les visites multiples

LE DAC, UN OUTIL DE PHÉNOTYPAGE PROMETTEUR

- ✓ Performances de croissance et d'ingéré proches quel que soit le mode d'alimentation.
- ✓ Obtention de mesures fines et automatiques du comportement et de la consommation alimentaires.

Perspectives

Obtention de données exploitables chez le jeune canard de Barbarie
Développement du mode rationné au DAC

COMPARAISON DU COMPORTEMENT ALIMENTAIRE DES TROIS TYPES GENETIQUES DE CANARD D'ELEVAGE GRACE A UN DISTRIBUTEUR AUTOMATIQUE D'ALIMENT PENDANT LA PHASE DE CROISSANCE

Cobo Emilie^{1*}, Lagüe Michel², Cornuez Alexis², Bernadet Marie-Dominique², Martin Xavier², Ricard Edmond¹, Gilbert Hélène¹

¹ UMR GenPhySE (INRA/INPT) – 24 chemin de Borde Rouge, Auzeville-Tolosane CS 52 627 - 31 326 CASTANET-TOLOSAN Cedex,

² UE PFG - Domaine d'Artiguères, 1076 route de Haut-Mauco - 40 280 BENQUET

Emilie.Cobo@inra.fr

RÉSUMÉ

Depuis l'obtention des premières mesures individuelles du comportement et de la consommation alimentaires de canards de Barbarie et mulards élevés en lot au distributeur automatique de concentré (DAC), aucune mesure n'avait été récoltée sur le canard Pékin. La conduite successive des trois types génétiques de canard d'élevage a permis de comparer leurs performances zootechniques et leur comportement alimentaire. Quarante et un canards de Barbarie, 35 canards Pékin et 40 canards mulards ont été élevés au DAC. Les données brutes ont été analysées pour chacun des trois types génétiques à l'échelle du test entre 28 et 49 jours d'âge et de la semaine après élimination des visites multiples et non identifiées. Sur l'ensemble du test, tous les caractères de croissance ou de comportement alimentaire diffèrent entre les trois types génétiques. En général, l'hybride mulard est caractérisé par un comportement proche de celui du canard Pékin et par des performances se rapprochant du canard de Barbarie. Le canard mulard est caractérisé par un gain moyen quotidien et un indice de consommation compris entre ceux de ses deux types génétiques parentaux. Comme le canard Pékin, le canard mulard consomme deux fois moins lors de visites qui sont trois fois plus courtes que chez le canard de Barbarie. Ainsi, leur vitesse d'ingestion est trois fois plus élevée. Canards Pékin et mulards visitent deux fois plus le DAC que le canard de Barbarie. Des ajustements sont en cours pour limiter les visites multiples au DAC voire augmenter l'effectif par DAC pour permettre des enregistrements dès l'âge de trois semaines.

ABSTRACT

Comparison of feeding behavior of the three duck genetic types using single place electronic feeders during growth

Since the first individual measurements of feeding behavior and feed intake of group-housed Muscovy drakes and mule ducks using single place electronic feeders (SEF), no measure is available on the Peking duck. A consecutive rearing of three duck genetic types was used to compare their growth performance and feeding traits. Forty-one Muscovy drakes, 35 Peking ducks and 40 mule ducks were rearing with the SEF and the data were analyzed for each genetic type during the test from day 28 to day 49 of age, and weekly, after eliminating of multiple and unidentified visits. At the test level, growth and feeding behavior differed between the three genetic types. The mule duck had intermediate average daily gain and feed conversion ratio compared to the two parental species. The hybrid mule was characterized by feeding behavior close to the Peking duck, and production performance approaching the Muscovy duck. Similar to the Peking duck, mule duck consumed twice as the Muscovy duck, during visits that were three times shorter. Thus, their feeding rate was three times higher. Peking and mule ducks visited twice more the SEF than Muscovy ducks. Tests are underway to limit multiple visits to the SEF to record feeding behavior from three weeks of age.

INTRODUCTION

Le phénotypage de précision a pris une place prépondérante en recherche sur les productions animales. Dans un contexte de recherche de rentabilité des élevages, un des enjeux est de décrire finement les facteurs de production, notamment l'alimentation (Chastand-Maillard S. & Saint-Dizier M., 2016).

La description fine du comportement alimentaire du canard est accessible grâce à un outil de phénotypage appelé DAC (Distributeur Automatique de Concentré, brevet n° 1260972). Cet outil a été développé en collaboration entre l'UMR GenPhySE et l'Unité Expérimentale des Palmipèdes à Foie Gras (UEPFG). Ce système de mesures permet d'obtenir des enregistrements quantitatifs individuels du comportement et de la consommation alimentaires à différentes échelles de temps, avec enregistrement simultané du poids des animaux, pour des canards élevés en groupe dans des conditions proches de celles des élevages de production.

Pour approfondir nos connaissances sur le comportement alimentaire des canards d'élevage, les trois principaux types génétiques, à savoir le canard de Barbarie, le canard Pékin et le canard mulard ont fait l'objet d'études pendant la phase de croissance à l'aide du DAC. Cela a permis la comparaison de leur comportement et de leur consommation alimentaires pour la première fois à l'aide de cet outil qui réalise des mesures individuelles de canards élevés en lot au sol.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

Trois lots d'animaux se sont succédés au cours de l'année 2015. En janvier, le comportement alimentaire de 41 canards de Barbarie, issus de la lignée expérimentale INRA 666, a été évalué. A partir du mois de mars, 35 canards Pékin, issus équitablement des deux lignées expérimentales INRA37S et INRA 444, ont été testés au DAC. Enfin, 40 canards mulards commerciaux ont été élevés au DAC à la fin du mois d'août. Au total, 116 animaux ont été conduits au DAC jusqu'à l'âge de sept semaines pour décrire et comprendre leur comportement alimentaire.

1.2. Conduite et logement

Pour chacun des trois types génétiques, les canards étaient issus d'un lot d'éclosion unique. Les canards de Barbarie et Pékin ont éclos dans le couvoir de l'UEPFG, où ils ont été vaccinés. Les canards mulards, débécqués et vaccinés, ont été réceptionnés à l'UEPFG à l'âge d'un jour. Canards de Barbarie, Pékin et mulards ont été ensuite soumis à la même

conduite et logés dans la même aile d'un bâtiment d'élevage pour homogénéiser un maximum de facteurs dans la comparaison entre types génétiques. A partir de l'âge de un jour, les canetons ont été élevés en groupe au sol dans une loge unique équipée de DAC. Pour les lots de canards de Barbarie et mulards, deux DAC étaient accessibles avec environ 20 canards/DAC. Pour le lot de canards Pékin, quatre DAC étaient mis à disposition des animaux car ils étaient élevés avec des canes ayant le même âge (sœurs), conduisant à un nombre d'animaux par DAC légèrement supérieur, avec 25 canards/DAC. Le temps d'occupation maximum par DAC s'élevait à peine à plus de six heures et le comportement du canard Pékin observé sur des tests au préalable ne comptant que très peu de visites multiples ont permis cette légère augmentation du nombre de canards Pékin/DAC sans modification de leur comportement alimentaire. La densité au m² était légèrement différente entre les trois types génétiques mais se situait largement dans les recommandations d'élevage. Elle s'élevait à 1,6 canards de Barbarie, 2 canards Pékin et 0,9 canards mulards par m². Seules les données des mâles ont été retenues dans cette analyse.

Le dispositif original qui permet de peser les consommations des animaux (Basso *et al.*, 2014) a été modifié en ajoutant deux portes en plexiglass à l'entrée du DAC, qui se ferment automatiquement quand un animal se trouve dans le DAC. Ce système de portes limite l'accès de plusieurs canards simultanément à la mangeoire. Ce phénomène de visites multiples, dont la consommation n'est pas attribuable à un canard unique, est fortement marqué chez le canard de Barbarie du fait de son comportement très grégaire. Une balance, pesant l'animal en continu à l'intérieur du dispositif a été ajoutée par rapport au modèle original. C'est ce même modèle modifié qui a été utilisé pour les tests des trois types génétiques.

Pour permettre aux animaux de s'habituer au dispositif, les canetons avaient libre accès aux distributeurs de 1 à 15 jours d'âge. Cette phase d'adaptation est primordiale pour la qualité des données récoltées au cours du test. La première semaine, les portes restaient ouvertes de façon à ce que les animaux s'habituent à entrer dans le couloir du DAC pour accéder à la mangeoire. Puis, la deuxième semaine était organisée de façon à ce que les animaux comprennent le fonctionnement des portes. Entre temps, à 11 jours d'âge, chaque canard a été équipé d'une puce électronique à la base du cou permettant l'identification individuelle automatique à chaque visite. A partir du 15^{ème} jour d'âge et jusqu'à la 7^{ème} semaine révolue (49 jours d'âge), chaque visite était enregistrée et l'ensemble des enregistrements était stocké.

Au cours de la phase de croissance, les animaux ont été alimentés avec un aliment de démarrage jusqu'à 28 jours d'âge, puis avec un aliment croissance et

finition jusqu'à sept semaines. Les mêmes aliments (composition et granulométrie) ont été utilisés pour les trois essais. Tout au long du test, une couche de copeaux au sol était renouvelée tous les jours. Les canards des trois types génétiques ont été soumis à un éclairage continu pendant les cinq premiers jours. Par la suite, la durée d'éclairement a été diminuée d'une heure tous les trois à cinq jours de façon à obtenir un éclairage de 16 heures dans la journée à l'âge de quatre semaines. Le bâtiment était préchauffé à 28°C avant l'arrivée des canetons, puis la température était abaissée de 2°C tous les trois jours jusqu'à atteindre une température ambiante de 22°C. Pour le reste du test, la température ambiante était maintenue de façon à ce qu'elle ne passe pas en dessous de 10°C en période hivernale pour le matériel électronique et informatique des DAC.

1.3. Caractères enregistrés

Grâce au logiciel DaaMiC embarqué sur le mini-ordinateur de chaque DAC, la date et l'heure d'entrée et de sortie, le numéro de puce de l'animal et les poids de la mangeoire et de l'animal ont été enregistrés à chaque visite. Seules les visites avec un seul canard dans le DAC et dont la consommation est supérieure à 2 g du fait de la précision de la balance ont été conservées pour les calculs. Les visites multiples pour lesquelles plusieurs canards étaient détectés dans le DAC ont été écartées. Les visites sans identifiant et dont le poids animal montre qu'au moins un canard est dans le DAC mais dont la puce n'est pas lue, ont été également supprimées pour les analyses. A partir de ces données brutes, de nouvelles variables ont été calculées pour chaque canard à l'échelle de la journée, de la semaine et de l'ensemble du test. Ainsi, les moyennes des quantités consommées par visite, des durées des visites et des intervalles entre visites et le nombre de visites pour chaque jour de test ont été estimées. La durée des intervalles entre visites, quel que soit le DAC, a été calculée comme la différence entre l'heure de fin de la visite précédente et l'heure de début de la visite suivante. La vitesse d'ingestion a été obtenue à l'échelle de la visite et moyennée pour chaque jour de test. Les poids moyens des canards ont également été estimés pour chaque jour de contrôle. Pour ces six caractères, des moyennes par semaine et pour la durée du test ont été calculées pour chaque canard, ainsi que des gains moyens quotidiens (GMQ) et des indices de consommation (IC).

L'exploration préliminaire des données enregistrées sur les canards de Barbarie ainsi que des données issues d'un précédent essai (Cobo *et al.*, 2015) a soulevé la difficulté d'utiliser les données enregistrées en début de test du fait d'un nombre important de visites multiples. Malgré la présence des portes à l'entrée du couloir du DAC, en semaine 4, plus de 25 % de l'aliment était encore consommé au cours de visites multiples chez le canard de Barbarie. Ce phénomène est faible chez les deux autres types

génétiques. Les semaines 3 et 4 ont donc été écartées de la comparaison, l'analyse portant finalement sur les semaines d'enregistrement 5 à 7 (28 à 49 jours d'âge) où les pertes de données liées à ce comportement sont réduites. Il est cependant vraisemblable que les ingérés des canards de Barbarie sont globalement sous-estimés (Figure 1).

Au cours des tests, pour limiter les conséquences du piquage, canards de Barbarie et canards mulards ont été débécqués, ayant entraîné notamment chez le canard de Barbarie une baisse de l'ingéré sur deux jours.

1.4. Analyses statistiques

Les caractères non normalement distribués ont été transformés par un log et les données aberrantes au-delà de quatre écart-types de la moyenne ont été éliminées des analyses.

Pour comparer les comportements alimentaires des trois types génétiques à l'échelle du test, un modèle linéaire simple avec un effet du type génétique de l'animal (trois niveaux) sur le caractère a été testé (proc GLM, SAS, 2008). A l'échelle de la semaine, un modèle linéaire mixte a été appliqué, incluant les effets fixes de la semaine de test (trois niveaux), du type génétique (trois niveaux) et de leur interaction, et la répétition de l'animal sur les trois semaines de mesure en effet aléatoire (proc mixed, SAS, 2008). Les moindres carrés moyens sont rapportés pour les effets type génétique à l'échelle du test (Tableau 1) et pour l'interaction type génétique x semaine de test à l'échelle de la semaine (Tableau 2).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Le tableau 1 présente les caractéristiques de croissance, de comportement et de consommation alimentaires des canards de Barbarie, Pékin et mulards entre 28 et 49 jours d'âge.

En début de test, les canards de Barbaries sont significativement plus légers que les canards mulards de 16 % alors qu'en fin de test, les canards de Barbarie ont rattrapé leur retard avec des poids vifs qui ne sont plus significativement différents de ceux des canards mulards. Baeza *et al.* (2015) ont observé la même tendance entre 4 et 6 semaines d'âge. Comme attendu, les canards Pékin sont significativement plus légers que les canards de Barbarie et mulards à l'âge de 49 jours. Les GMQ sont significativement différents entre les trois types génétiques, avec + 42,30 g/j et + 16,83 g/j entre les canards de Barbarie et respectivement les canards Pékin et les canards mulards. Ces derniers ont un GMQ supérieur de 25,47 g/j par rapport aux canards Pékin.

La consommation totale à l'échelle du test est significativement différente entre le canard de Barbarie et le canard Pékin, alors qu'elle ne l'est pas

entre le canard mulard et ses deux espèces parentales. La consommation par visite, la durée des visites, le nombre de visites, la durée des intervalles entre visites et la vitesse d'ingestion des canards de Barbarie sont significativement différents des deux autres types génétiques. Il semble donc que l'hybride mulard ait un comportement alimentaire plus proche de celui du canard Pékin, voie maternelle. Par rapport aux canards de Barbarie, canards Pékin et mulards consomment moins par visite, respectivement -29,8 et -32,0 g, et restent trois fois moins longtemps au DAC ce qui leur confère des vitesses d'ingestion trois fois plus élevées. Ils visitent aussi deux fois plus souvent le DAC, avec des intervalles entre visites plus courts. Néanmoins, le canard mulard se distingue du canard Pékin par un IC significativement moins élevé, dont la valeur est située entre celles de ses deux origines parentales. L'IC des canards de Barbarie semble légèrement sous-estimé du fait de la suppression, pour les analyses, des consommations en visites multiples pendant lesquelles les canards ayant consommés présentent une consommation sous-estimée dans le calcul de l'IC. A contrario, l'IC des canards Pékin est élevé par rapport à ce qui est rapporté dans la bibliographie (Brun *et al.*, 2005). Ce peut être un effet du test de deux lignées expérimentales INRA, dont une a un phénotype très léger et n'a jamais fait l'objet de sélection sur les caractères de production.

Dans le Tableau 2 est présentée l'évolution des caractéristiques du comportement et de la consommation alimentaires des trois types génétiques par semaine pendant les 3 dernières semaines de test.

Au cours des semaines, les canards de Barbarie ont les GMQ les plus élevés, et qui augmentent légèrement, passant de 102,90 à 112,30 g/j. Les canards des deux autres types génétiques sont caractérisés par des GMQ relativement stables entre les semaines 5 et 7.

A l'échelle de la semaine, les consommations totale, journalière et par visite ont tendance à augmenter tout au long du test sauf pour les canards mulards en semaine 6 dont l'ingéré baisse légèrement, probablement à cause du débecquage. Les durées des visites sont stables sauf chez le canard de Barbarie pour lequel elles ont tendance à diminuer. Les canards

Pékin et mulards visitent de moins en moins le DAC au cours des semaines alors qu'aucune différence significative n'est notée chez le canard de Barbarie. Avec des visites moins nombreuses qui se raccourcissent, les intervalles entre visites augmentent en dernière semaine jusqu'à atteindre plus de 23000 secondes soit six heures chez le canard de Barbarie, près de 14370 secondes soit quatre heures chez le canard Pékin et 11511 secondes soit trois heures chez le canard mulard. La consommation augmentant au cours des semaines et la durée des visites diminuant, la vitesse d'ingestion des canards de Barbarie double entre les semaines 5 et 7. Elle s'accroît fortement chez le canard Pékin alors qu'elle fluctue chez le canard mulard, certainement en raison de l'épointage du bec en semaine 6. Canard de Barbarie et mulard sont caractérisés par des IC relativement proches sauf en semaine 5, avec un IC meilleur (mais vraisemblablement sous-estimé) pour le canard de Barbarie. Le canard Pékin présente les IC les plus élevés au cours des semaines car il s'agit de lignées expérimentales n'ayant pas été sélectionnées sur des critères alimentaires.

CONCLUSION

Grâce au DAC, le comportement et la consommation alimentaires des trois types génétiques ont pu être comparés dans des conditions assez semblables aux pratiques d'élevage. L'hybride mulard est caractérisé par des performances proches de celles du canard de Barbarie (voie paternelle) et par un comportement alimentaire se rapprochant de celui du canard Pékin (voie maternelle). Ces critères alimentaires, obtenus pendant la phase de croissance, pourront également être comparés aux résultats collectés lors de la phase de préparation au gavage, dont les enregistrements sont en cours de développement sur le DAC. Une réflexion est engagée pour limiter les visites multiples et augmenter les effectifs par DAC (Cobo *et al.*, 2017).

Remerciements à l'UEPFG pour sa technicité et son soutien financier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Baeza E., Rideau N., Chartrin P., Davail S., Hoo-Paris R., Mourot J., Guy G., Bernadet M.-D., Juin H., Météau K., Hermier D., 2005. INRA Prod. Anim. 18(2) : 131-141.
- Basso B., Lagüe M., Guy G., Ricard E., Marie-Etancelin C., 2014. J. Anim. Sci. 92 : 1-8.
- Brun J.-M., Richard M.-M., Marie-Etancelin C., Rouvier R., Larzul C., 2005. INRA Prod. Anim. 18 (5) : 295-308
- Chastand-Maillard S., Saint-Dizier M., 2016. Elevage de précision, France Agricole, 253 p.
- Cobo E., Gilbert H., Lagüe M., Laverze J.-B., Ricard E., Cornuez A., Martin X., Drouilhet L., Marie-Etancelin C., 2015. 11^{èmes} JRA-PFG, 1240 p.
- Cobo E., Lagüe M., Cornuez A., Bernadet M.-D., Martin X., Ricard E., Gilbert H., Drouilhet L., 2015. 12^{èmes} JRA-PFG.
- Drouilhet L., Basso B., Bernadet M.-D., Cornuez A., Bodin L., David I., Gilbert H., Marie-Etancelin C., 2014. J. Anim. Sci. 92 : 4287-4296.

Figure 1. Pourcentage moyen d'aliment consommé pendant les visites multiples au cours du test (S 4= semaine 4) pour les trois types génétiques (Barbarie, Pékin et mulard).

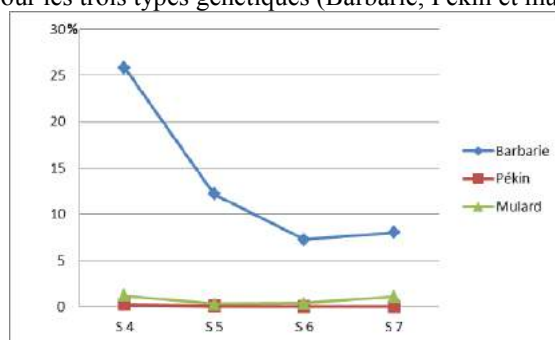


Tableau 1. Caractéristiques du comportement et de la consommation alimentaires des canards de Barbarie (n=41), Pékin (N=35) et mulards (N=40) entre 28 et 49 jours d'âge.

Caractère	Unité	Barbarie		Pékin		Mulard	
		LSMean	SE	LSMean	SE	LSMean	SE
Poids vif en début de test (28 jours)	g	1419 ^a	36	1549 ^b	39	1695 ^c	37
Poids vif en fin de test (49 jours)	g	3594 ^b	64	2792 ^a	69	3447 ^b	65
Gain moyen quotidien	g/j	104,46 ^c	1,64	62,16 ^a	1,78	87,63 ^b	1,66
Consommation totale	g	4922 ^b	115	4435 ^a	124	4746 ^{ab}	124
Consommation journalière	g/j	241,9 ^b	5,0	211,4 ^a	5,4	231,1 ^b	5,0
Consommation par visite	g	58,8 ^b	1,8	29,0 ^a	2,0	26,8 ^a	1,8
Durée journalière des visites	s/j	1953 ^b	56	626 ^a	61	632 ^a	57
Durée des visites	s	482 ^b	15	84 ^a	17	73 ^a	16
Nombre de visites par jour		4,2 ^a	0,3	8,3 ^b	0,3	9,0 ^b	0,3
Durée des intervalles entre visites	s	20604 ^b	541	11089 ^a	585	9875 ^a	547
Vitesse d'ingestion	g/min	7,98 ^a	0,69	21,23 ^b	0,73	22,60 ^b	0,69
Indice de consommation		2,32 ^a	0,03	3,41 ^c	0,03	2,64 ^b	0,03

Signification de l'effet type génétique dans une analyse de variance comprenant l'effet du type génétique uniquement ($p < 0,002$). Les valeurs rapportées sont les moindres carrés moyens (LSMean) et les erreurs standards (SE) associées. Les lettres différant intra ligne correspondent à des différences significatives à 5 % entre moindres carrés moyens pour la variable testée.

Tableau 2. Evolution des caractéristiques du comportement (moindre carrés moyens) et consommation alimentaires des canards de Barbarie (N=41), Pékin (N=35) et mulards (N=40) pour les trois semaines de test entre 28 et 49 jours d'âge.

Caractère	Unité	Semaine 5			Semaine 6			Semaine 7		
		Barbarie	Pékin	Mulard	Barbarie	Pékin	Mulard	Barbarie	Pékin	Mulard
Consommation totale	g	1324 ^a	1378 ^{ab}	1616 ^{bcd}	1780 ^{de}	1492 ^{abc}	1466 ^{abc}	1869 ^e	1565 ^{abcd}	1681 ^{cde}
Consommation journalière	g/j	193,1 ^a	196,9 ^a	230,9 ^{bc}	258,1 ^{cd}	213,8 ^{ab}	220,2 ^{ab}	265,0 ^d	223,6 ^{ab}	241,7 ^{bcd}
Consommation par visite	g	48,98 ^{cd}	22,93 ^a	21,70 ^a	57,94 ^d	28,86 ^{ab}	29,79 ^{ab}	72,44 ^e	39,71 ^{bc}	32,58 ^{ab}
Durée journalière des visites	s/j	2382 ^d	719 ^a	709 ^a	1981 ^c	599 ^a	450 ^a	1462 ^b	560 ^a	730 ^a
Durée des visites	s	615 ^c	83 ^a	66 ^a	444 ^b	78 ^a	61 ^a	398 ^b	95 ^a	94 ^a
Nombre de visites par jour		4,15 ^a	9,65 ^{cd}	11,18 ^d	4,71 ^a	8,46 ^{bc}	7,80 ^{bc}	3,80 ^a	6,69 ^b	8,10 ^{bc}
Durée des intervalles entre visites	s	21117 ^{de}	9152 ^{ab}	7833 ^a	19042 ^d	11041 ^{abc}	11705 ^{bc}	23099 ^e	14373 ^c	11511 ^{bc}
Vitesse d'ingestion	g/min	5,23 ^a	17,11 ^c	20,68 ^{cd}	8,57 ^{ab}	22,70 ^{de}	30,07 ^f	11,85 ^b	25,59 ^{ef}	21,70 ^{cde}
Gain moyen quotidien	g/j	102,90 ^{cd}	67,17 ^a	95,63 ^{bc}	110,70 ^d	65,78 ^a	84,99 ^b	112,30 ^d	53,62 ^a	90,77 ^{bc}
Indice de consommation		1,88 ^a	2,98 ^{cd}	2,42 ^b	2,34 ^b	3,29 ^d	2,61 ^b	2,41 ^b	4,28 ^e	2,68 ^{bc}

Moindres carrés moyens obtenus à partir d'un modèle linéaire mixte incluant les effets fixes de la semaine de test, du type génétique et de leur interaction, et la répétition de l'animal sur les trois semaines de test en effet aléatoire. Les lettres différant intra ligne correspondent à des différences significatives à 5 % entre moindres carrés moyens pour la variable testée.

COMPARAISON DU COMPORTEMENT ALIMENTAIRE DES TROIS TYPES GÉNÉTIQUES DE CANARD D'ÉLEVAGE GRÂCE À UN DISTRIBUTEUR AUTOMATIQUE D'ALIMENT PENDANT LA PHASE DE CROISSANCE

COBO Emilie^{1*}, LAGÜE Michel², CORNUEZ Alexis², BERNADET Marie-Dominique², MARTIN Xavier², RICARD Edmond¹, GILBERT Hélène¹

CONTEXTE

- ❖ Enjeu de l'alimentation en productions animales
- ❖ Essor du phénotypage animal

Compétences en élevage, informatique & automatisme et statistiques



DAC Palmipèdes (brevet n° 1260972)

OBJECTIF ET DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

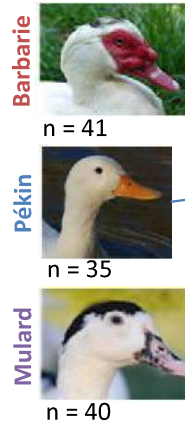
Objectif



Animaux

Planning

Comparaison de l'ingéré et du comportement alimentaire des 3 espèces d'élevage élevées en groupe au sol grâce au DAC



- ✓ Période d'**habitude** pendant les 15 premiers jours de vie
- ✓ **Enregistrements** de 2 à 7 semaines d'âge révolues

CANARDS DE BARBARIE, PÉKIN ET MULARDS : SIMILITUDES OU DIFFÉRENCES ?

Différences de comportement et de consommation alimentaires à l'échelle du test (28 à 49 jours) entre le canard mulard et ses deux espèces parentales

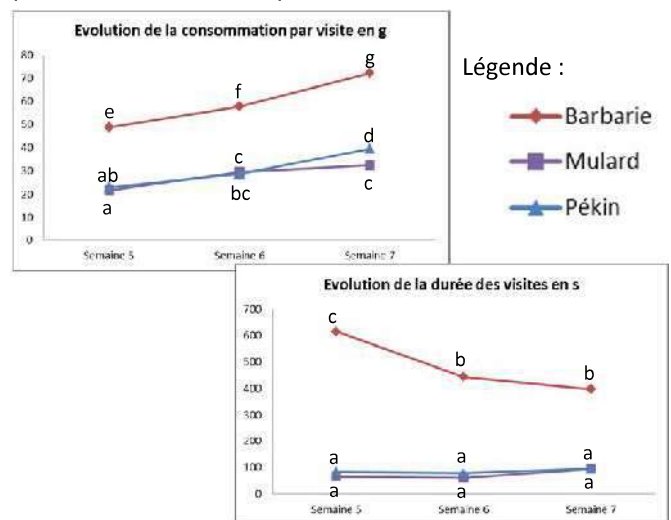
Entre Barbarie et Pékin, différence significative ($P < 0,0001$) pour toutes les variables présentées. La flèche indique le sens de la différence.

*** : Canard mulard significativement différent à $P < 0,001$.

	BARBARIE	PÉKIN
Poids vif en fin de test (49 j)	↗	***
Consommation par visite	***	↘
Durée journalière des visites	***	↘
Durée des visites	***	↘
Nombre de visites par jour	***	↗
Durée des intervalles entre visites	***	↘
Vitesse d'ingestion	***	↗

Evolutions à l'échelle de la semaine (semaines 5 à 7)

Différences significatives à 5 % entre moindres carrés moyens pour les lettres différant par variable testée.



CONCLUSION : Pour les caractéristiques de comportement et consommation alimentaires,



- Performances proches de celles du **canard de Barbarie** (voie paternelle)
- Comportement alimentaire se rapprochant du **canard Pékin** (voie maternelle)



Offrez du
FOIE GRAS
ON S'EN SOUVIENDRA !



Pour plus d'informations sur la tradition culturelle et gastronomique du Foie Gras :
www.leblogdufoiegras.com / www.lefoiegras.fr

Un Oeuf chaque jour... En forme toujours !*

Grâce à ses qualités nutritionnelles,
l'Oeuf est un aliment d'exception

L'Oeuf offre des protéines de qualité pour
un prix très abordable

En cuisine, l'Oeuf fait merveille dans
de nombreuses recettes salées ou sucrées



Pour en savoir plus sur l'Oeuf, connectons-nous sur www.leblogdeloeuf.com

Le CNPO est l'Interprofession de l'Oeuf qui représente chacun des maillons de la filière Oeuf, des accoueurs aux transformateurs en passant par les éleveurs, il regroupe huit organisations. Le CNPO a été reconnu par les pouvoirs publics le 12 mars 1996. Il est chargé de contribuer au développement et à la prospérité des différentes branches de la filière ponte.

*sauf contre indication



Comité National pour
la Promotion de l'Oeuf



Delacon.
performing nature