

ACCLIMATATION EMBRYONNAIRE A LA CHALEUR : QUELS SONT LES MECANISMES MOLECULAIRES MODIFIES CHEZ LE POULET DE CHAIR EN FINITION?

Loyau T.¹, Hennequet-Antier C.¹, Métayer-Coustard S.¹, Leduc M.¹, Crochet S.¹,
Cailleau-Audouin E.¹, Sannier M.¹, Berri C.¹, Duclos M.J.¹, Tesseraud S.¹,
Couroussé N.¹, Chartrin P.¹, Praud C.¹, Everaert N.², Rideau N.¹, Mignon-Grasteau S.¹,
Moroldo M.³, Lecardonnel J.³, Martin P.⁴, Coustham V.¹, Lagarrigue S.^{5,6}, Yahav S.⁷, Collin A.¹

¹ INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France

² University of Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Animal Science Unit, Gembloux, Belgium

³ INRA, CRB GADIE, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

⁴ INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, Plateforme de
Microgénomique Iso Cell Express (ICE), F-78350 Jouy-en-Josas, France

⁵ INRA, UMR1348 Pegase, F-35590 Saint-Gilles, France

⁶ Agrocampus Ouest, UMR1348 Pegase, F-35000 Rennes, France

⁷ Institute of Animal Science, The Volcani Center, Bet Dagan P.O. Box 6, 50250, Israel

Anne.Collin@tours.inra.fr

RÉSUMÉ

La chaleur affecte la physiologie du poulet de chair et impacte négativement les performances de croissance et le bien-être animal. Les manipulations thermiques (MT) des œufs pendant l'incubation consistent à augmenter cycliquement la température de l'incubateur à 39,5°C et l'hygrométrie (HR) à 65% des jours 7 à 16 de l'embryogenèse. Ces MT améliorent la thermotolérance des poulets à long terme par rapport aux témoins incubés en continu à 37,8°C et 56% HR, sans altérer la qualité de leur viande. Notre objectif est de déterminer les effets des MT sur l'expression des gènes dans le muscle, ce dernier étant fortement générateur de chaleur. Pour ce faire, des poulets de chair issus ou non de MT sont élevés dans des conditions classiques d'élevage jusqu'à 34 jours, puis soumis à un coup de chaleur de 5h à 32°C, ou maintenus à 21°C. Nos résultats suggèrent que les poulets MT présentent une moindre stimulation de leur métabolisme énergétique. Par qPCR nous montrons ainsi que l'expression du facteur de transcription PGC-1 α , régulateur majeur de l'activité mitochondriale, est diminuée chez les MT par rapport aux témoins à 21°C. Par ailleurs, l'acclimation embryonnaire semble limiter les effets du coup de chaleur en finition sur l'expression d'enzymes impliquées dans la β -oxydation des acides gras et la chaîne respiratoire mitochondriale. L'acclimation embryonnaire amplifie considérablement la réponse ultérieure au coup de chaleur, ce qui se traduit par un nombre de gènes différentiellement exprimés 6 fois plus important chez les MT que chez les témoins dans l'analyse du transcriptome musculaire. Les gènes différentiels issus de la comparaison des poulets MT soumis au chaud et des poulets MT maintenus à 21°C sont impliqués dans la régulation du métabolisme, la vascularisation, la réponse au stress et les mécanismes épigénétiques. Ces modifications pourraient expliquer la meilleure capacité d'adaptation des poulets MT à la chaleur.

ABSTRACT

Embryo heat acclimation: what molecular mechanisms are modified in broilers at slaughter age?

Heat exposure affects the physiology, performance and welfare in broiler chickens. Thermal manipulations (TM) of eggs during incubation consists in increasing the temperature of incubators cyclically to 39.5°C and 65% RH from day 7 to 16 of embryogenesis. These TM improve long-term thermotolerance of broilers chickens as compared to controls incubated continuously at 37.8°C and 56% RH, without altering meat quality. The aim of our work was to investigate the effects of TM on gene expression in breast muscle, this tissue being highly involved in heat production. Broiler chickens from TM and control groups were reared under usual conditions until d34 when they were either exposed to a heat challenge for 5h at 32°C or maintained at 21°C. Our results suggest that TM chickens present a lower stimulation of their energy metabolism. We showed by qPCR that the muscle expression of the transcription factor PGC-1 α , a major regulator of mitochondrial activity, was decreased by TM as compared to controls at 21°C. Moreover, TM may have limited the effects of the heat challenge at slaughter age on other enzymes involved in β -oxydation and the respiratory chain. TM greatly increased the response to heat challenge as compared to controls as shown by the results of transcriptomic analysis in muscle tissue. Differentially expressed genes specific of the comparison of TM chickens exposed to heat and TM maintained at 21°C were involved in metabolic regulation, vascularisation, stress response and epigenetic mechanisms. These modifications might explain the better adaptive capacity of MT chickens to heat exposure.

INTRODUCTION

Le dernier rapport du Groupement Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC) prévoit une augmentation de la température moyenne de la Terre de 3,7°C à l'horizon 2050 et une augmentation des phénomènes bioclimatiques extrêmes (IPCC, 2014). Or les souches génétiques utilisées dans la filière chair au niveau mondial sont très sensibles à la chaleur. Lors de fortes chaleurs, ou dans les pays tropicaux, une diminution des performances de croissance, une diminution du bien-être, une augmentation de la morbidité et de la mortalité sont observées, et dégradent les performances économiques pour l'éleveur. Dans ce contexte, il convient d'améliorer la résilience des poulets consécutivement à un coup de chaleur sans affecter les performances de croissance.

Différentes études ont montré que les manipulations thermiques pendant l'embryogenèse (MT) permettent d'augmenter la capacité des poulets de chair à tolérer un coup de chaleur (Loyau et al., 2014a). Ces MT consistent à augmenter de façon cyclique la température des incubateurs à 39,5°C et une humidité relative de 65% des jours 7 à 16 de l'embryogenèse.

L'utilisation de ces conditions d'incubation réduit de 50% la mortalité des mâles pendant un coup de chaleur à 35°C pendant 5h en période de finition (Piestun et al., 2008). Cette équipe de recherche a également montré que ces MT n'affectent pas l'éclosabilité ni le poids vif et améliorent les rendements en muscle pectoral de poulets élevés jusqu'à 70 jours (Piestun et al., 2013). Dans notre laboratoire, nous avons montré que ces conditions n'avaient pas d'effet sur la qualité de la viande et peu d'effet sur la croissance (-1.4% de poids vif) et réduisaient l'adiposité abdominale (Loyau et al., 2013). Cette technique diminue également la température corporelle des animaux et la consommation d'O₂ des embryons (Piestun et al., 2009, 2013). Ces données suggèrent que les MT entraînent une diminution du métabolisme énergétique pouvant aboutir *in fine* à la réduction de la production de chaleur. L'objectif de notre étude est ainsi de déterminer les effets à long terme des MT pendant l'incubation sur la physiologie et l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et la production de chaleur.

1. MATERIELS ET METHODES

Plan expérimental : 1000 œufs de souche Cobb 500 sont incubés en deux expériences successives selon un dispositif pedigree ; 501 œufs sont incubés dans des conditions témoins (37,8°C et 56% HR) et 499 œufs subissent des manipulations thermiques (39,5°C et 65% HR 12h/24) des jours 7 à 16 d'incubation. A l'éclosion, les poussins sont placés en parquets au sol.

A J34, la moitié des animaux de chaque lot subit un coup de chaleur à 32°C pendant 5h et des prélèvements sanguins sont réalisés. Les poulets sont donc répartis en quatre lots : poulets témoins élevés à la thermoneutralité (T) ou soumis à un challenge thermique à J34 (TCh), et poulets ayant subi des manipulations thermiques pendant l'embryogenèse puis élevés à la thermoneutralité (MT) ou soumis à un challenge thermique à J34 (MTCh).

Les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes triiodothyronine T₃ et thyroxine T₄ sont mesurées par dosage radio-immunologique (Darras et al., 1996) chez tous les mâles.

L'expression des gènes du muscle pectoral est mesurée par RT-qPCR sur 8 poulets mâles par traitement à J34. Nous avons choisi de mesurer l'expression de ces gènes sur les 8 animaux ayant les températures internes les plus élevées chez les T et TCh et sur les 8 animaux ayant les températures les moins élevées chez les MT et MTCh parmi des échantillonnages de 9 à 11 animaux. La normalisation de l'expression des gènes a été faite via geNorm (Vandesompele et al., 2002) en utilisant l'ARNr 18S, le cytochrome b et la bêta-actine comme gènes de référence. La phosphorylation de la protéine AMPK a été mesurée par Western blot

Une analyse de l'expression des gènes sans a priori par analyse transcriptomique a également été réalisée sur les mêmes animaux. Nous avons utilisé une puce génomique « poulet » (8 x 60K, Agilent Technologies) selon un design en dye-swap à 4 comparaisons sur 8 poulets par traitement. Une validation des expressions différentielles a été réalisée par RT-PCR dans chaque comparaison. Les données physiologiques et de RT-PCR sont analysées statistiquement selon le programme GLM de SAS avec comme modèle le traitement d'incubation (MT ou C) et un traitement « coup de chaleur (intra incubation) ». La normalisation des données de transcriptomique est réalisée à l'aide de la fonction Loess du package Limma sur R et ces données sont analysées selon un test-t où les p values sont corrigées selon la méthode de Benjamini-Hochberg.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Dans nos conditions expérimentales, les manipulations thermiques embryonnaires diminuent significativement la concentration plasmatique en T₃ (1,76 ± 0,03 ng/mL pour les T vs 1,66 ± 0,04 chez les MT, *P* < 0,05) et augmentent celle en T₄ (5,96 ± 0,22 ng/mL pour les T vs 6,70 ± 0,24 pour les MT, *P* < 0,01) à J28. L'hormone thyroïdienne T₃ est connue pour stimuler la production de chaleur et le métabolisme énergétique (Collin et al., 2009), et la diminution de T₃ observée chez les MT est concordante avec les températures cloacales plus faibles de ces animaux à cet âge. Cependant, à J34, nous n'observons plus d'effet de l'acclimatation

embryonnaire sur la concentration plasmatique en T_3 , mais seulement sa diminution induite par le coup de chaleur.

Pour caractériser plus finement le métabolisme thyroïdien et énergétique des poulets MT, nous avons étudié les voies de régulation de l'utilisation énergétique dans des tissus majeurs pour la régulation de la production de chaleur et de la composition corporelle. A J34, malgré l'absence d'effet des manipulations thermiques embryonnaires sur la T_3 circulante, ce traitement tend à diminuer les expressions des déiodinases DIO3 (régulant la conversion de la T_3 en T_2 et de la T_4 en rT_3) et DIO2 (régulant la conversion de la T_4 en T_3) à 21°C ($P < 0.1$) dans le muscle pectoral. Ceci pourrait refléter une diminution globale de la production et de la dégradation des hormones thyroïdiennes au niveau périphérique pour réguler la production de chaleur.

Par qPCR nous montrons que l'expression musculaire du facteur de transcription PGC-1 α , régulateur majeur de l'activité mitochondriale, est diminuée chez les MT par rapport aux témoins à 21°C, de même que l'expression de la citrate synthase (CS) musculaire, enzyme clé du cycle de Krebs au niveau mitochondrial (Tableau 1). Par ailleurs, l'expression de la β -hydroxyacyl CoA déshydrogénase (HAD) et de la sous-unité 4 de la cytochrome oxydase (COX4), deux enzymes mitochondriales impliquées respectivement dans l'oxydation des acides gras et la respiration mitochondriale, n'est pas modifiée chez les MT (à 21 et 32°C) alors qu'elle est augmentée au chaud chez les contrôles. Ces données suggèrent que les poulets MT ayant une faible température interne présentent des changements métaboliques mitochondriaux pouvant aboutir à limiter la production de chaleur métabolique au niveau musculaire (Loyau et al., 2014b).

De plus l'expression de l'hexokinase HK1, enzyme limitante de la glycolyse, est diminuée chez les MT à 21°C par rapport aux T. Ces données suggèrent que les poulets MT ayant une faible température interne présentent une moindre entrée du glucose dans la glycolyse dans le muscle pectoral. Dans une étude précédente, nous montrions que la glycémie des MTCh était supérieure à celle des MT et des T (Loyau et al., 2013). Concomitamment, une augmentation de l'activation de la protéine AMPK musculaire est observée chez les animaux MTCh. Associée à l'augmentation de la glycémie, cette phosphorylation pourrait représenter un signal induisant le transport de glucose vers la cellule musculaire en réponse à l'augmentation de la glycémie plasmatique. Il se peut également que ce signal résulte d'un besoin accru en production d'énergie chez ces animaux lors du challenge thermique.

En définitive, par cette approche ciblée, nous montrons que le métabolisme des hormones thyroïdiennes et le métabolisme énergétique au niveau

du muscle pectoral sont modifiés. Ces changements métaboliques sur le long terme pourraient potentiellement induire une limitation de la production de chaleur métabolique chez les poulets ayant subi des manipulations thermiques pendant l'embryogenèse.

Par l'analyse sans *a priori* du transcriptome musculaire nous mettons en évidence que lors du coup de chaleur à J34, le nombre de gènes différentiellement exprimés en réponse au coup de chaleur est 6 fois plus important chez les poulets MT que chez les témoins (Figure 1). Ceci peut être le signe d'une réaction physiologique et métabolique plus importante ou plus rapide à la chaleur chez les MT par rapport aux témoins dans l'objectif de répondre aux effets délétères de l'exposition aiguë à la chaleur. Nous montrons également que les gènes exprimés différentiellement au chaud chez les MT jouent principalement un rôle dans la régulation du métabolisme, la vascularisation, la réponse au stress et la mise en place de mécanismes épigénétiques. Des modifications épigénétiques induites par les MT au niveau des gènes pourraient altérer la transcription des gènes permettant une meilleure adaptation des animaux à la chaleur via une modification du métabolisme énergétique. Une modification de la vascularisation au niveau périphérique (dans le muscle pectoral par exemple) pourrait permettre d'améliorer la dissipation de chaleur lors d'augmentations de température. Ces MT sembleraient également limiter le stress et ainsi conférer une meilleure capacité d'adaptation à la chaleur.

CONCLUSION

En conclusion, notre étude a permis d'évaluer les conséquences de manipulations thermiques embryonnaires sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes et le métabolisme énergétique, par une approche ciblée, et de façon globale par une étude du transcriptome musculaire. Nous montrons que les manipulations thermiques embryonnaires modifient à long terme le métabolisme des hormones thyroïdiennes et que ceci intervient de façon concomitante avec des régulations d'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme énergétique ou modifie la réponse d'expression lors d'un coup de chaleur. Un résultat important de notre étude est la démonstration d'une amplification de la réponse à la chaleur des animaux MT qui se traduit par un nombre de gènes dont l'expression est modifiée par le challenge thermique. Au vu des différents résultats, notre étude met à jour plusieurs mécanismes endocriniens et moléculaires qui pourraient être impliqués dans la meilleure capacité d'adaptation à la chaleur des poulets MT caractérisés par une température interne basse.

Ces résultats combinés avec ceux de la littérature ouvrent des perspectives d'études à venir sur la recherche de mécanismes de type épigénétique potentiellement impliqués dans ces modifications d'expression de gènes. Au-delà de la compréhension des mécanismes, nos travaux se poursuivent dans le cadre d'une étude plus large qui vise d'une part à étudier la faisabilité de mettre en place dans les couvoirs les techniques d'acclimatation embryonnaire mais aussi d'autre part à évaluer l'intérêt pour la filière et la durabilité de telles innovations.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce au soutien de l'Agence Nationale de la Recherche, Projet «Jeunes Chercheuses et Jeunes Chercheurs», ANR-09-JCJC-0015-01 THERMOCHICK. Les auteurs tiennent également à remercier T. Bordeau, E. Godet, M. Couty, L. Bouyer, M. Leduc (INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France), F. Mercierand, J. Delaveau, C. Rat, J.-M. Brigant, O. Callut, N. Sellier, ainsi que les membres de l'unité expérimentale PEAT (INRA, UE1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, F-37380 Nouzilly, France) qui ont contribué à cette étude. T. Loyau était financé dans le cadre de cette étude par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour son doctorat et par l'ANR.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Collin A., Joubert R., Swennen Q., Damon M., Métayer Coustard S., Skiba-Cassy S., Everaert N., Buyse J.,
2. Tesseraud S., 2009. In "Thyroid Hormones: Functions, Related Diseases and Uses". Francis S. Kuehn and Mauris P. Lozada, Novascience (Ed). N.Y. (USA), 93-107.
3. Darras V.M., Kotanen S.P., Geris K.L., Berghman L.R., Kuhn E.R., 1996. Gen. Comp. Endocrinol., (104), 203-212.
4. Gross W.B., Siegel H.S. 1983. Avian Dis., (27), 972-997.
5. IPCC, 2014. In "Climate change 2014, Synthesis report". http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR_AR5_LONGERREPORT.pdf.
6. Piestun Y., Shinder D., Ruzal M., Halevy O., Brake J., Yahav S., 2008. Poult. Sci., (87), 1516-152.
7. Piestun Y., Halevy O., Yahav S., 2009. Poult. Sci., (88), 2677-2688.
8. Piestun Y., Druyan S., Brake C., Yahav S., 2013. Poult. Sci., 92(5), 1155-1163.
9. Loyau T., Berri C., Bedrani L., Métayer-Coustard S., Praud C., Duclos M.J., Tesseraud S., Rideau N., Everaert N., Yahav S., Mignon-Grasteau S., Collin A., 2013. J. Anim. Sci., (91), 3674-3685.
10. Loyau T., Bedrani L., Berri C., Métayer-Coustard S., Praud C., Coustham V., Mignon-Grasteau S., Duclos M.J., Tesseraud S., Rideau N., Hennequet-Antier C., Everaert N., Yahav S., and Collin A., 2014a. Animal, (14), 1-10.
11. Loyau T., Métayer-Coustard S., Berri C., Chartrin P., Praud C., Hennequet-Antier C., Rideau N., Couroussé N., Mignon-Grasteau S., Everaert N., Duclos M.J., Yahav S., Collin A., 2014b. PLoS ONE, (9), e105339.
12. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., 2002. Genome Biol. 3(7).

Figure 1. Diagramme de Venn obtenu pour l'étude du transcriptome musculaire : poulets témoins élevés à la thermoneutralité (T), poulets témoins ayant reçu un coup de chaleur à J34 (TCh), poulets soumis à une

manipulation thermique embryonnaire et élevés à la thermoneutralité (MT), poulets soumis à une manipulation thermique embryonnaire et ayant reçu un coup de chaleur à J34 (MTCh).

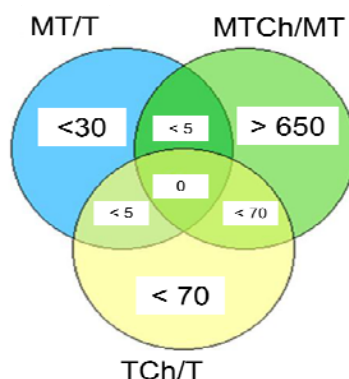


Tableau 1. Effet des manipulations thermiques embryonnaires sur l'expression ARNm des gènes impliqués dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes et le métabolisme énergétique dans le muscle pectoral à J34 : poulets témoins élevés à la thermoneutralité (T), poulets témoins ayant reçu un coup de chaleur à J34 (TCh), poulets soumis à une manipulation thermique embryonnaire et élevés à la thermoneutralité (MT), poulets soumis à une manipulation thermique embryonnaire et ayant reçu un coup de chaleur à J34 (MTCh).

	T (21°)	TCh (32°)	MT (21°C)	MTCh (32°C)	Effet incubation	Effet coup de chaleur (Incubation)
Métabolisme des hormones thyroïdiennes						
D2	2.14±0.43A	0.97±0.16B	0.93±0.05B	1.37±0.46AB	0.06	0.23
D3	1.04 ± 0.20	1.07 ± 0.25	0.55 ± 0.15	0.66 ± 0.17	0.02	0.92
Métabolisme énergétique						
PGC1α	2.31 ± 0.50a	1.21 ± 0.23ab	0.98 ± 0.10b	1.24 ± 0.16ab	0.04	0.07
PPARα	2.20±0.44	1.35±0.12	1.41±0.07	1.90±0.41	0.70	0.10
PPARδ	1.28±0.25	0.98±0.16	0.95±0.05	1.58±0.59	0.68	0.34
COX	2.17 ± 0.39a	0.15 ± 0.09b	1.50 ± 0.07ab	1.93 ± 0.31a	0.46	0.002
CS	1.28 ± 0.22 a	0.90 ± 0.07 ab	0.66 ± 0.05b	1.06 ± 0.17 ab	0.1689	0.0781
HAD	1.60 ± 0.26 a	0.74 ± 0.05 b	1.03 ± 0.10 ab	1.42 ± 0.26 ab	0.50	0.02
HK1	1.91 ± 0.34	1.41 ± 0.12	0.87 ± 0.09	1.40 ± 0.34	0.04	0.23
HK2	1.14±0.20	0.55±0.07	0.79±0.09	1.53±0.62	0.34	0.15
GLUT8	1.54±0.14A	1.10±0.19AB	0.92±0.07B	1.26±0.25AB	0.20	0.10
LDHA	2.12±0.51	1.30±0.08	1.40±0.07	1.46±0.14	0.30	0.11
ANT	1.44±0.28	0.77±0.09	0.92±0.09	1.49±0.60	0.78	0.20
mCPT1	1.57±0.39	0.77±0.09	1.15±0.04	1.61±0.27	0.40	0.04

a-b : différence significative entre lots à $P < 0,05$. A-B différence significative en lot à $P < 0,10$; D2 : déiodinase 2, D3 : déiodinase 3 ; PGC1α : Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor gamma coactivator 1α ; PPARα : Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor alpha ; PPARδ : Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor gamma ; COX : cytochrome oxydase ; CS : citrate synthase ; HAD : beta-hydroxyacyl-CoA déshydrogenase ; HK1 : hexokinase 1 ; HK2 : hexokinase 2 ; GLUT8 : transporteurs de glucose 8 ; LDHA : lactate déshydrogenase ; ANT : adénine nucléotide translocase ; mCPT1 : carnitine palmitoyl transférase musculaire ;