

**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, hémocrite, 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'hémocrite 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

génome 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 immune 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.

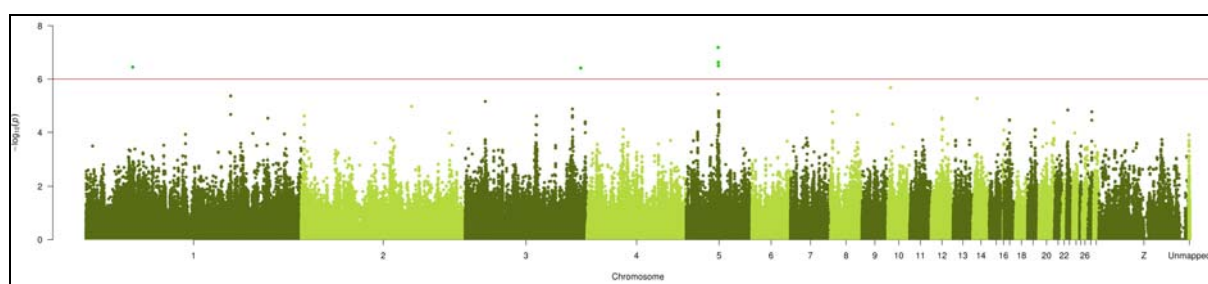


Figure 2. Réseau d'interaction de gènes candidats construit à l'aide d'Ingenuity Pathway Analysis. Ce réseau est centré sur les gènes LATS1 et LATS2, impliqués dans le renouvellement de l'épithélium intestinal.

