

DEVELOPPEMENT DE L'ASSIGNATION DE PARENTE POUR LA REPRODUCTION EN VOLIERE DE LA PERDRIX GRISE

Sophie Brard-Fudulea¹, Romuald Rouger¹, Serge Tricoire²

¹SYSAAF, INRAE, Centre Val-de-Loire, 37380 NOUZILLY

²Gen'Ethic, Z A La Barboire, 85500 CHAMBRETAUD

sophie.brard-fudulea@inrae.fr

RÉSUMÉ

La reproduction de la perdrix grise est aujourd'hui réalisée dans des cages où les animaux sont placés en couples. Ces conditions permettent d'enregistrer le pedigree sur lequel repose l'évaluation génétique des reproducteurs, ainsi que les plans d'accouplement permettant de gérer la consanguinité. Cependant l'usage de la cage est remis en cause à l'échelle européenne pour toutes les productions animales. Au-delà de ce contexte, dans le cas du gibier, l'élevage des animaux en volière permettrait de se placer dans des conditions plus proches de celles que connaîtront leurs descendants qui seront relâchés. Un outil moléculaire est cependant indispensable pour accéder au pedigree des animaux. L'objectif de cette étude est de mettre au point un panel d'assignation de parenté SNP de petite taille pour la perdrix grise. Trois-cent-soixante-dix-sept SNP identifiés précédemment dans des données de séquençage de type RAD-Seq ont été génotypés en technologie Kaspar sur 95 échantillons d'une lignée de perdrix grises. Il s'agissait de 41 descendants issus de 27 couples. Les échantillons et les marqueurs ont été filtrés sur leurs taux de données manquantes, sur l'équilibre d'Hardy-Weinberg, sur le nombre d'incompatibilités mendéliennes, et sur leur polymorphisme. Un test d'assignation de parenté a ensuite été réalisé sur le même jeu de données. À l'issue des filtres de qualité, la liste de marqueurs candidats pour le panel comptait 132 SNP. Après classement en fonction de la fréquence de leur allèle mineur (MAF), la MAF des 96 meilleurs SNP était comprise entre 0,15 et 0,5, et de 0,34 en moyenne. L'assignation de parenté réalisée avec tous les échantillons exploitables sur ce panel a permis d'assigner sans erreur les 29 perdrix dont les deux parents étaient présents dans le jeu de données. L'assignation d'un petit jeu de données a fonctionné avec le panel développé dans cette étude. Le génotypage sur cet outil de perdrix grises issues d'une reproduction en volières et de leurs parents est en cours pour un test de l'outil à plus grande échelle. Cette seconde assignation permettra aussi d'observer le résultat de la reproduction de perdrix grises élevées en groupe et non plus en couples.

ABSTRACT

Design of a parentage assignment panel for cage-free reproduction of grey partridge

In grey partridge French breeding program, pedigree recording relies on cages, where breeders mate as couples. To comply with social demands regarding animal welfare, breeding partridges in aviaries could be an alternative, but some issues need attention prior to switching to this system: reproduction efficiency, pedigree recording, and contribution of breeders to progeny. Forty-one grey partridge trios (sire-dam-progeny) were genotyped on a kaspar panel of 377 SNP, in order to design a small panel for parentage assignment. First SNPs and individuals were filtered on their call rate, then SNPs were filtered on Hardy-Weinberg equilibrium, Minor Allele Frequency and mendelian inconsistencies. Finally, the remaining SNPs were ranked according to their polymorphism to retain 96 markers. Parentage assignment performed with this set of markers on the trios gave results consistent with the pedigree. To assess if cage-free reproduction is feasible, four groups of grey partridges were then bred in four aviaries equipped with nests: two groups including 50 males and 50 females, and two groups including 35 males and 50 females. Meanwhile, other individuals from the same population were mated in cages. Eggs were collected and counted. This experiment was repeated for two years. Parents and progeny from a 50-50 aviary of the 2nd year of experiment were genotyped on the parentage assignment panel. Egg counting showed that the laying rate dropped drastically in aviaries compared to cages in the first year. Laying rate was slightly improved in the second year, but remained largely inferior to performances observed in cages. The rate of parentage assignment of the genotyped aviary was 92%, possibly because some parents and progenies had low call rates. Parentage assignment showed that only 42% of females and 50% of males contributed to the progeny. The contribution of parents was unbalanced: 1 to 6 progeny per male, and 1 to 8 progeny per female. The consequences on the breeding scheme of the lesser control of mating-plans in aviaries still need to be assessed. This study demonstrated that parentage assignment of grey partridges with a small SNP panel is possible, nevertheless work is still needed to improve the laying rate of this species when mated in aviaries.

INTRODUCTION

La perdrix grise en sélection est élevée en volière sur la majeure partie du schéma. L'utilisation de la cage est cependant nécessaire lors de la phase de reproduction, qui s'effectue en couples. La reproduction en cage permet de diriger les accouplements, et d'enregistrer le pedigree des animaux. L'information apportée par le pedigree est utilisée pour l'évaluation génétique des animaux, et pour la gestion de la diversité au sein de la population. L'usage de la cage est cependant remis en cause par la société à l'échelle européenne, pour des raisons de bien-être animal (ECI(2018)000004). L'arrêt de la cage pour la perdrix grise nécessite au préalable de s'assurer que la reproduction en volière est possible, et de disposer d'un outil génomique d'un coût abordable permettant de reconstituer a posteriori le pedigree. L'objectif de cette étude était d'une part de mettre au point un panel d'assignation SNP pour la perdrix grise, et d'autre part de vérifier si la reproduction de la perdrix grise en volière est possible.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Mise au point du panel

Pour la phase de mise au point du panel, 95 individus ont été génotypés sur 377 SNP en technologie KASPAR par la plateforme INRAE Clermont Gentyane. Les perdrix grises choisies pour le génotypage étaient des trios père-mère-descendant : 41 descendants issus de 27 couples. Les données brutes de génotypage ont été analysées avec le logiciel Fluidigm® SNP Genotyping Analysis pour l'étape de clustering. Les individus et les SNP ont été soumis à une série de filtres afin de construire le panel de 96 SNP, en utilisant le logiciel Plink (Chang et al., 2015). La première étape a consisté à éliminer les individus et les SNPs inexploitable, c'est-à-dire présentant plus de 20% de données manquantes. Les taux de données manquantes par individu et par SNP ont ensuite été recalculés, et seuls les individus et les SNP présentant respectivement moins de 10% et 5% de données manquantes ont été conservés. Les marqueurs au-delà du seuil pour l'équilibre d'Hardy-Weinberg (P -value < 0.00001) ont été écartés, ainsi que les SNP les moins polymorphes ($MAF < 0.05$). Le nombre d'incompatibilités mendéliennes a ensuite été calculé, afin de filtrer les SNP sur ce critère. A l'issue de ces tris, les SNP toujours candidats pour le panel d'assignation ont été classés en fonction de leur niveau de polymorphisme, et seuls les 96 meilleurs marqueurs ont été conservés. La liste de SNP retenue a été testée pour une assignation de parenté sur le petit échantillon ayant servi à choisir les SNP, en assignation par exclusion avec le logiciel APIS (Griot et al. 2019).

1.2 Reproduction des perdrix grises en volière

Des perdrix grises ont été élevées en volière pendant la phase de reproduction avec les modalités suivantes : 4 volières ont été utilisées, deux volières avaient un *sex-ratio* équilibré (50 mâles et 50 femelles), et deux volières avaient un *sex-ratio* déséquilibré (35 mâles et 50 femelles). Chaque volière était équipée de pondoirs et d'une zone de caillebotis. En parallèle, des animaux de la même population étaient élevés en couples placés en cages dans le cadre du schéma de sélection habituel. Ce dispositif a été utilisé deux années. Sur la période de ponte, les œufs ont été comptés, et leur lieu de ponte a été enregistré.

1.3 Assignation de parenté d'une volière et observation du succès reproducteur

Dans une volière de *sex-ratio* équilibré de la deuxième année d'expérimentation, les reproducteurs ont été prélevés, ainsi que les perdreaux éclos sur les 10 jours suivant le pic de ponte, soit 64 descendants. Quatre-vingt-quinze parents ont été génotypés sur une première plaque dès le prélèvement réalisé lors de la mise en volière. Une seconde plaque a été génotypée après les éclosions, composée des 64 descendants, des 5 parents non-passés sur la 1^{ère} plaque (avec un doublage des échantillons afin de minimiser le risque d'inexploitable compte-tenu du génotypage réalisé plusieurs mois après le prélèvement). Cette 2^{ème} plaque d'échantillons a été complétée avec 21 perdreaux issus d'autres volières. Le génotypage a été réalisé sur les 96 marqueurs du panel d'assignation par la plateforme INRAE Clermont Gentyane. Après avoir écarté les perdrix avec plus de 10% de données manquantes, et les SNP présentant plus de 5% de données manquantes, l'assignation de parenté par exclusion a été réalisée avec le logiciel APIS. La représentation des parents dans la descendance a été observée suite à cette assignation.

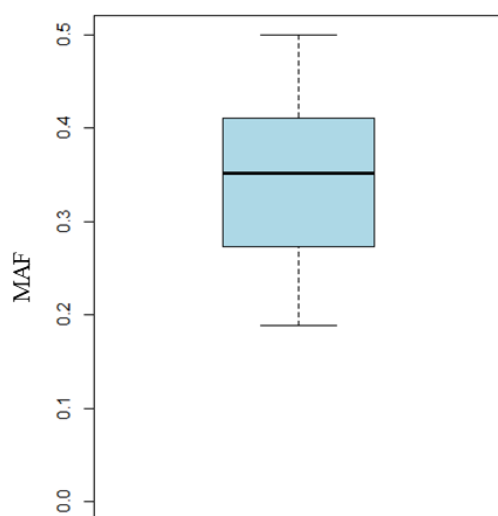
2. RESULTATS ET DISCUSSION

1.1. Mise au point du panel

Le premier filtre destiné à éliminer les données de génotypage inexploitable a conduit à supprimer 42 SNP et 3 individus. Après ce premier nettoyage, l'application des filtres habituels sur les données manquantes a conduit à éliminer 31 SNP et 12 individus. Le calcul de l'équilibre d'Hardy-Weinberg a été réalisé sur les 92 individus et les 335 marqueurs restants, et 57 SNP ont été supprimés sur ce critère. Les marqueurs les moins polymorphes ont été enlevés, réduisant la liste à 146 SNP. Les nombres d'incompatibilités mendéliennes ont ensuite été calculés. A noter qu'à ce stade de la démarche, un nombre important d'incompatibilités a été détecté dans deux trios, probablement causés par une erreur de traçabilité lors de l'insémination ou de l'éclosion. Les

relations de parenté dans ces deux trios n'ont donc pas été prises en compte pour le comptage des incompatibilités mendéliennes utilisé pour filtrer les SNP. Parmi les marqueurs, 132 présentaient 0 ou 1 incompatibilité mendélienne et ont pu être conservés. Les SNP restants ont ensuite été ordonnés en fonction de leur MAF pour choisir la liste des 96 marqueurs du panel. La localisation des SNP sur le génome n'étant pas connue, cette information n'a pas été utilisée dans le choix des marqueurs. La MAF des marqueurs retenus était comprise entre 0,19 et 0,50, avec une médiane à 0,35 (Figure 1).

Figure 1. Boxplot de la MAF (Minor Allele Frequency) des 96 SNP retenus pour le panel d'assignation de parenté de la perdrix grise



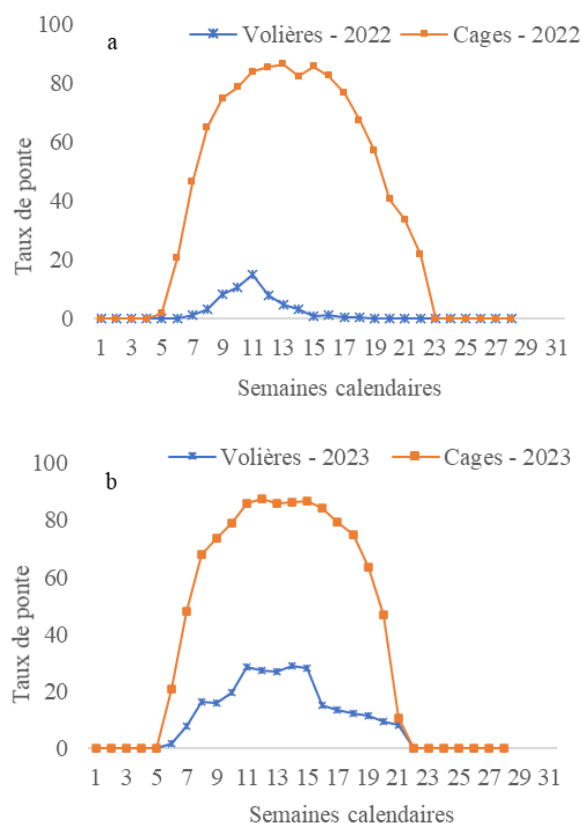
L'assignation de parenté a été testée sur les individus génotypés pour cette phase de développement du panel, en utilisant uniquement les échantillons présentant moins de 10% de données manquantes. Vingt-neuf des 31 descendants ont été assignés correctement. Les deux descendants non-assignés étaient attendus du fait des incohérences génotype-pedigree détectées dans la phase de conception du panel : au moins un de leurs vrais parents était absent des données d'assignation.

2.2 Reproduction des perdrix grises en volière

La Figure 2 (a) et (b) présente les taux de ponte observés en volières et en cages, sur la 1^{ère} et la 2^{ème} année d'expérimentation respectivement. Sur les deux années, la ponte en cage débute en semaine 6, le taux de ponte en cage au pic est compris entre 82 et 88% au pic (à partir de la semaine 11), et s'achève entre la semaine 22 et la semaine 23. En volière en 1^{ère} année, la ponte débute en semaine 7, avec un pic en semaine 11 à seulement 15%, suivi d'un arrêt de la ponte dès la semaine 15. En deuxième année d'expérimentation en volière, la ponte débute en semaine 6, et atteint le pic en semaine 11 à 29% de ponte. La ponte se maintient ensuite quelques semaines, avant de décroître à partir

de la semaine 17, et de s'achever en semaine 22. L'amélioration relative de la ponte en volière entre la 1^{ère} et la 2^{ème} année d'expérimentation peut s'expliquer par la pose d'anneaux aux becs afin de limiter les perturbations entre animaux. Malgré cela, le taux de ponte au pic reste de 2/3 inférieur en volière par rapport aux performances observées en cage.

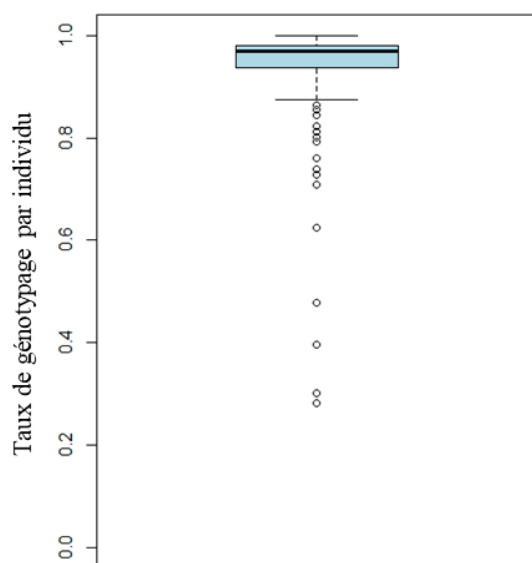
Figure 2. Taux de ponte comparés de perdrix grises élevées en cage ou en volière sur deux années d'expérimentation en 2022 (a) et en 2023 (b)



2.3 Assignation de parenté d'une volière

L'assignation de parenté réalisée sur les 62 perdreaux issus d'une volière de sex-ratio 50-50 de 2^{ème} année d'expérimentation a permis de proposer un pedigree pour 92 % des descendants. La non-assignation d'une partie des perdreaux pourrait être due au fait que 11 individus dont 9 parents présentent plus de 20% de données manquantes (Figure 3). Ces taux de données manquantes ou de qualité incertaine sont problématiques pour une assignation basée sur un très faible nombre de marqueurs. Pour une utilisation en routine, la sécurisation d'un génotypage de bonne qualité pour tous les parents serait nécessaire, d'une part en travaillant à l'amélioration des protocoles de collecte, transfert et traitement des échantillons, et d'autre part en prévoyant la possibilité d'effectuer de nouveaux prélèvements en cas de résultat de génotypage inexploitable.

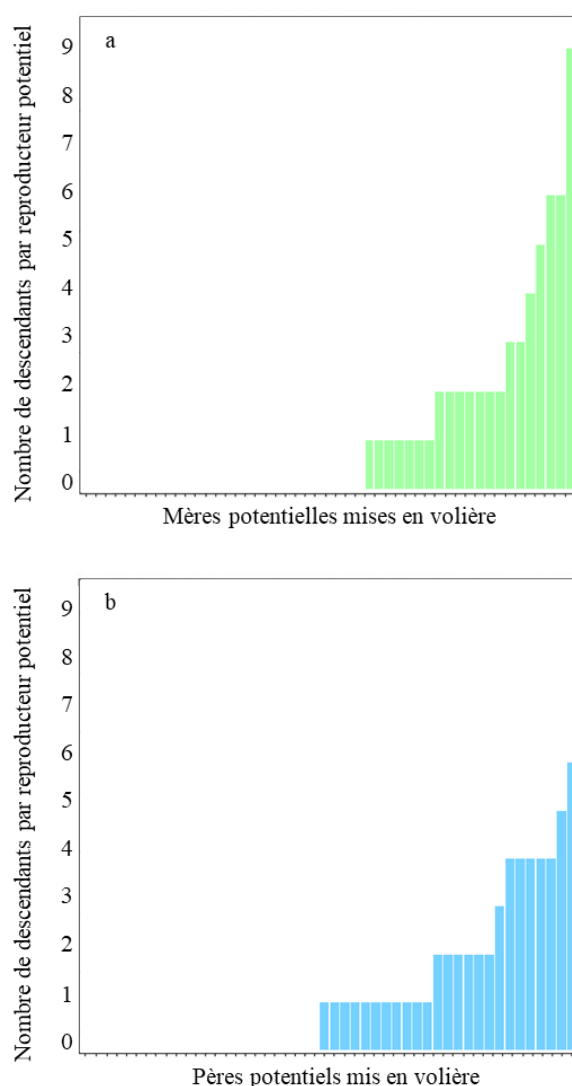
Figure 3. Taux de génotypage des perdrix grises élevées en volières génotypées sur le panel 96 SNP pour assignation de parenté



L'assignation réalisée sur les 21 perdreaux issus d'autres volières n'a pas proposé de pedigree, conformément au résultat attendu.

La Figure 4 présente les nombres de descendants par mère potentielle (a) et par père potentiel (b) présent dans la volière, les reproducteurs sont classés des moins représentés aux plus représentés. Chez les mâles, seuls 50% des reproducteurs potentiels ont effectivement des descendants après assignation. Le nombre de descendant par père varie entre 1 et 6. Le taux de représentation des reproductrices potentielles est moindre : 42% des femelles ont effectivement des descendants. Le nombre de descendants par femelle est compris entre 1 et 8. Ces résultats sont à interpréter en relation avec le faible taux de ponte observé en volière, une hypothèse serait qu'une partie des accouplements n'ont pu être observés dans la descendance en raison du taux de ponte très faible. Concernant le comportement reproducteur de la perdrix, 41 accouplements différents ont été observés *via* l'assignation des descendants, impliquant 25 mâles et 21 femelles : dans ces conditions d'élevage en volière, et malgré un *sex-ratio* équilibré, les accouplements n'ont pas été monogames, conformément à ce qui est attendu chez la perdrix grise en cas de proximité entre animaux dans la période de formation des couples (Jenkins 1961). Une expérimentation similaire réalisée chez la perdrix rouge (Brard-Fudulea et al. 2023), avait également donné lieu à cette observation d'accouplements polygames, avec cependant un taux de ponte au pic en volière un peu plus élevé que celui de la perdrix grise (environ 40 %).

Figure 4. Représentation des 50 mères potentielles (a) et des 50 pères potentiels (b) dans la descendance de la volière génotypée. Chaque trait vertical représente un reproducteur



CONCLUSION

Ces travaux ont permis le développement d'un panel d'assignation de parenté de petite taille pour la perdrix grise. Son utilisation sur une génération de perdrix reproduites en volières a permis d'atteindre 92% d'assignation, avec quelques génotypes de parents présentant des données manquantes. La reconstitution du pedigree de perdrix reproduites sans cage est donc possible. L'assignation des perdrix grises reproduites en volière a mis en évidence une contribution déséquilibrée des reproducteurs mâles et femelles, dont les conséquences sur la gestion de la diversité dans la lignée restent à évaluer. Le défi majeur restant à résoudre à l'issue de cette étude est celui du taux de ponte très faible en volière comparé à celui obtenu en cage.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la plateforme INRAE Clermont Gentyane pour la réalisation des génotypes. Ces travaux ont bénéficié d'un financement de la région Pays de la Loire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brard-Fudulea, S., Rouger, R., Tricoire, S. 2023. XII. European Symposium on Poultry Genetics, 8-10 November 2023, Hannover, Germany.
- Chang, C.C., Chow, C.C., Tellier, L.C., Vattikuti, S., Purcell, S.M., Lee, J.J., 2015. Gigascience 4. Volume 4, Issue 1, s13742–015–0047–8.
- ECI(2018)000004 : https://citizens-initiative.europa.eu/initiatives/details/2018/000004/end-cage-age_en
- Griot, R., Allal, F., Brard-Fudulea, S., Morvezen, R., Haffray, P., Phocas, F., Vandeputte, M., 2020. Mol Ecol Resour. 20(2):579-590.
- Jenkins, D., 1961. Ibis 103a, 155–188.