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

DAVID Sarah-Anne[1], PIEGU Benoît[2], HENNEQUET-ANTIER Christelle[1], BIGOT Yves[2], BORDEAU Thierry[1], CROCHET Sabine[1], COUROUSSE Nathalie[1], BEAUCLAIR Linda[2], COLLIN Anne[1], COUSTHAM Vincent[1]

[1]URA, INRA, 37380, Nouzilly, France
[2]PRC, 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 différentiellement 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 héritables (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 (Kanherkar 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 chairs 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 entrainant 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'embryogénèse (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'embryogénèse (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 a 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'embryogénèse. Dans notre modèle E0 correspond au 1er 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/topic/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. Mercerand 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.
Piestun 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'acclimatation embryonnaire à la chaleur

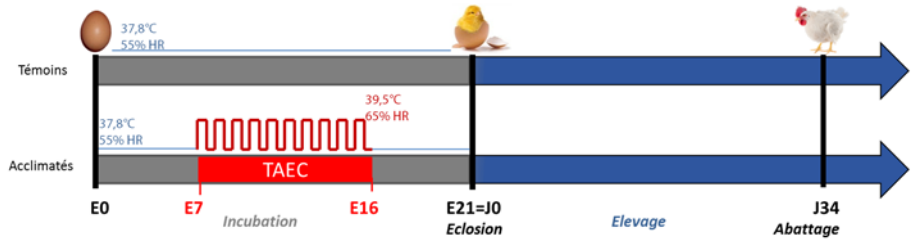


Figure 2. Validation des enrichissements par ChIP-qPCR aux loci de deux gènes contrôles : GAPDH, PAX5
A- Enrichissement relatif de H3K4me3 par rapport à l'input
B- Enrichissement relatif de H3K27me3 par rapport à l'input

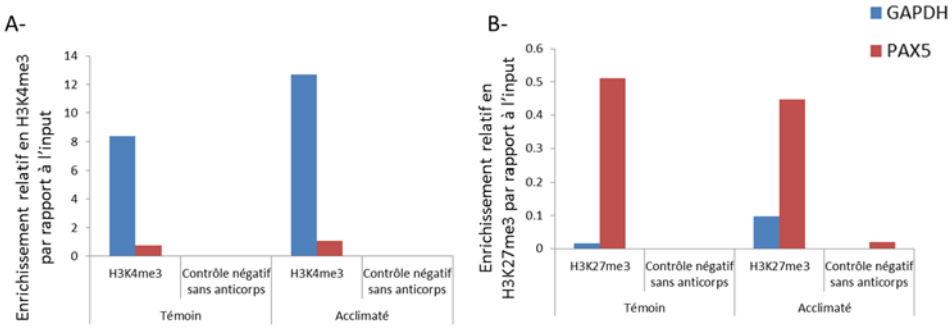


Tableau 1. Résumé du nombre de lectures obtenu par séquençage

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

