

ÉTUDE DES REPONSES MOLECULAIRES DES EMBRYONS DE POULET A L'EXPOSITION A LA CHALEUR DE LEUR MERE

**Karami Keyvan¹, Leroux Sophie¹, Sabban Jules², Cerutti Chloé¹, Devailly Guillaume¹,
Froissac Sylvain¹, Gourichon David³, Hubert Jean-Noël¹, Zerjal Tatiana⁴, Lagarrigue
Sandrine⁵, Pitel Frédérique¹**

¹*GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31326, CASTANET TOLOSAN*

²*GeT-PlaGe - Génome et Transcriptome - Plateforme Génomique, US1426 GET - INRAE,
31326, CASTANET-TOLOSAN*

³*PEAT, UE1295 - INRAE Centre Val de Loire, 37380, NOUZILLY*

⁴*GABI, UMR 1313, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350, JOUY-EN-
JOSAS*

⁵*PEGASE UMR 1348, INRAE, AGROCAMPUS OUEST, 35590 SAINT-GILLES
frederique.pitel@inrae.fr*

RÉSUMÉ

Le changement climatique et son impact sur le secteur agricole constituent l'un des défis les plus importants en matière d'adaptation, en particulier dans le domaine des productions animales. Pour comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la réponse des poules à l'exposition à la chaleur, l'objectif de cette étude est de comparer les profils de méthylation de l'ADN chez des descendants dont les mères ont été exposées ou non à un environnement soumis à une exposition à la chaleur. Tous les animaux ont été élevés à 22°C jusqu'à l'âge de 28 semaines. Entre 28 et 32 semaines, la moitié des poules ont été soumises à une température de 32°C. Les œufs ont été collectés entre 31 et 32 semaines. Des données de séquençage d'une représentation réduite du génome traitée au bisulfite de sodium, permettant d'analyser la méthylation des cytosines, ont été obtenues sur les cerveaux entiers de 22 embryons à l'âge de 13 jours, provenant de poules soumises ou non à une exposition à la chaleur. Nous avons détecté 289 cytosines différenciellement méthylées (DMC) entre les descendants de mères stressées par la chaleur et les témoins. Ces DMC sont associées à 357 gènes, qui jouent un rôle important dans des processus tels que le développement et la réponse cellulaire à un stimulus. Cette étude fournit des informations précieuses sur les mécanismes adaptatifs impliqués dans la réponse des embryons à l'exposition à la chaleur de leur mère : l'exposition thermique des poules peut entraîner des changements dans les profils de méthylation des descendants pendant le stade embryonnaire, ce qui peut influencer leur réponse à des expositions ultérieures à des vagues de chaleur.

ABSTRACT

Molecular responses of chicken embryos to thermal exposition in their mothers

Climate change and its impact on the agricultural sector represent one of the most important challenges in terms of adaptation, particularly in the field of animal production. To understand the molecular mechanisms underlying the response of hens to heat exposure, the aim of this study was to compare DNA methylation profiles in offspring whose mothers had or had not been exposed to a heat-stressed environment. All animals were reared at 22°C until 28 weeks of age. Between 28 and 32 weeks of age, half the hens were kept at 32°C. Eggs were collected between 31 and 32 weeks of age. Sequencing data from a reduced representation of the genome treated with sodium bisulfite, allowing analysis of cytosine methylation, were obtained on the whole brains of 22 embryos at 13 days of age, from both heat-stressed and non-heat-stressed hens. We detected 289 differentially methylated cytosines (DMC) between the offspring of heat-stressed mothers and controls. These DMCs are associated with 357 genes, which play an important role in processes such as development and cellular response to stimulus. This study provides valuable information on the adaptive mechanisms involved in the response of embryos to their mother's heat exposition: heat exposition in hens can lead to changes in the methylation profiles of offspring during the embryonic stage, which may influence their response to subsequent heatwave exposures.

INTRODUCTION

Le changement climatique représente un défi important pour les productions animales, en particulier pour la volaille, qui est une source majeure de protéines pour l'alimentation humaine. Avec l'augmentation des températures mondiales, les vagues de chaleur deviennent plus fréquentes et plus intenses, provoquant un stress thermique chez les animaux de rente, ayant un impact sur le bien-être, la santé et la production. Les poulets sont particulièrement sensibles au stress thermique en raison de leur morphologie (absence de glandes sudoripares, corps recouvert de plumes très isolantes) et de leur métabolisme élevé, qui produit de grandes quantités de chaleur interne. La réaction des poules souffrant de stress thermique est une réduction de l'ingestion d'aliments et, par conséquent, une réduction de la croissance et/ou de la qualité et de la quantité des œufs. L'amélioration de l'adaptation individuelle est cruciale pour accroître la capacité des animaux à répondre à l'exposition à la chaleur. Les mécanismes épigénétiques participent à l'établissement d'un lien entre les changements environnementaux et le génome des animaux, affectant l'expression des gènes. Le stress maternel peut provoquer des altérations épigénétiques chez les descendants, affectant leur phénotype (Santana et al., 2021). Des manipulations thermiques pendant l'embryogenèse des oiseaux ont été mises au point pour augmenter la tolérance à la chaleur après l'éclosion, ce qui se traduit par une tolérance thermique et une adaptabilité accrues chez les adultes (Piestun et al., 2008).

Pour comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la réponse des poules à l'exposition à la chaleur, cette étude réalise une comparaison des profils de méthylation de l'ADN (sur les cytosines des dinucléotides CpG) chez des descendants dont les mères ont été exposées ou non à un environnement exposé à la chaleur.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Dispositif animal

Des poules provenant d'une population expérimentale de pondeuses (R-) issue d'une sélection divergente pour l'efficacité alimentaire (Bordas et al., 1992) ont été utilisées (Figure 1). Tous les animaux ont été élevés dans des conditions standard (22°C, alimentation ad libitum) jusqu'à l'âge de 28 semaines, à l'unité expérimentale INRAE PEAT (Nouzilly). Entre 28 et 32 semaines, dans le groupe soumis à une exposition à la chaleur, les poules ont été soumises à une température de 32°C (augmentation de 2°C par heure pendant 5 heures). Les œufs de 2 poules soumises à l'exposition thermique, ainsi que ceux de 2 poules contrôles, sœurs des premières, ont été collectés entre 31 et 32 semaines et incubés pendant 13 jours.

1.2. Séquençage pour les analyses de méthylation

L'ADN du cerveau de 22 embryons : 10 témoins (CT) et 12 (dits HS pour *Heat Subjected*) issus respectivement des 2 poules contrôles et stressées) à 13 jours de développement, a été extrait avec le kit AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen).

Des données de séquençage d'une représentation réduite du génome traitée au bisulfite de sodium, permettant d'analyser la méthylation des cytosines, ont été obtenues grâce au kit Premium Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) (Diagenode). Le séquençage a été effectué sur la plateforme Genomeast de Strasbourg (<https://www.igbmc.fr/plateformes-technologiques/genomeast>) sur un séquenceur Illumina HiSeq 4000 en lectures "single-end" de 50 bases.

1.3. Analyses des données

Le pipeline nf-core/methylseq version 2.1.0 (<https://github.com/nf-core/methylseq>) a été utilisé pour l'analyse des données de séquence : nettoyage des lectures pour éliminer les séquences synthétiques (adaptateurs) issues de la préparation des bibliothèques, alignement sur le génome de la poule (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_01669_9485.2), filtres sur la qualité de l'alignement et la profondeur. Le package edgeR v3.28.1 (Chen et al., 2017) de Bioconductor a été utilisé pour détecter les sites CpGs différenciellement méthylés (DMC) et les régions différenciellement méthylées (DMR), entre le traitement thermique (Heat Subjected, HS) et les témoins (CT). Une DMR est définie comme une région d'au minimum 50 pb, contenant au moins 3 sites CpG dont au moins 50% sont différenciellement méthylés.

Les CpG chevauchants avec les polymorphismes de nucléotides simples (SNP) C->T ont été filtrés dans une étape de prétraitement pour éliminer la possibilité que les SNP C->T soient incorrectement considérés comme des changements de taux de méthylation. Une étape de détection des SNP a donc été réalisée en utilisant le logiciel gemBS v4.0 (Merkel et al., 2019). L'annotation des caractéristiques génomiques a été effectuée avec le package R GenomeFeatures (<https://forgemia.inra.fr/aurelien.brionne/GenomeFeatures>) avec une région promotrice définie par défaut en amont (3000 pb) et en aval (500 pb) du site de démarrage de la transcription (TSS). Un fichier GTF enrichi en gènes et associé à la dernière version du génome GRCg7b a été utilisé dans cette étude (Degalez et al, en révision).

L'analyse de l'enrichissement fonctionnel a été réalisée avec le package R ViSEAGO v1.14.0 (Brionne et al., 2019).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Le nombre de lectures obtenues est en moyenne de 20 millions par échantillon, pour un taux d'alignement de 64,84%, conformément à ce qui est attendu pour ce type de données (Doherty et Couldrey, 2014). Un total de 1 075 291 sites CpG ont été analysés (après le prétraitement éliminant notamment les positions polymorphes de type C->T), avec une profondeur moyenne de 18,34x.

Nous avons détecté 289 DMC et une région (DMR) entre les descendants de mères stressées par la chaleur et les témoins (Figure 2). Ces DMC sont associées à 357 gènes. Les DMC ont été annotées en fonction de leurs caractéristiques génétiques (codons, aval, exon, intron, promoteur, 3'UTR et 5'UTR). Environ 23 % des DMC sont situées dans les régions promotrices, 32 % dans les introns et 15 % dans les exons, répartition sensiblement similaire à la distribution de l'ensemble des CpG. La fraction des DMC située dans la région promotrice s'est avérée différente entre les cytosines hyper- (30,07%) et hypométhylées (15,53%) chez les HS par rapport aux CT, suggérant que les régions promotrices étaient plus sujettes à l'hyperméthylation en réponse à l'exposition thermique de la mère.

Les 357 gènes associés à au moins une DMC jouent un rôle important dans des processus tels que le développement et la réponse cellulaire à un stimulus. La DMR, située en début de chromosome 4, est associée à deux ARN longs non-codants, dont la fonction n'a pas encore été caractérisée (LOC121110553, LOC121110554).

Il a été rapporté que la manipulation thermique pendant l'embryogenèse avait peu ou pas d'effet sur la régulation de l'expression des gènes dans l'hypothalamus de cailles japonaises âgées de 35 jours en conditions normales, mais que lorsqu'elles étaient

exposées à un challenge thermique, on observait une augmentation du nombre de gènes différentiellement exprimés (Vitorino Carvalho et al., 2021). Cela suggère une "mémorisation" de l'environnement subi pendant le développement, offrant la possibilité d'une réponse à un challenge thermique ultérieur (Skinner, 2011). Ainsi, dans ce cas, le stade embryonnaire modifie le niveau de méthylation dans certaines régions, ce qui peut ne pas se traduire par des gènes exprimés de manière différentielle, mais ouvrir la possibilité d'une réponse à une exposition ultérieure à la chaleur.

CONCLUSION

Les résultats de la présente étude ont démontré que l'exposition à la chaleur des mères affectait la progéniture en modifiant les profils de méthylation de l'ADN à plusieurs endroits du génome. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour éliminer toute cause génétique à ces différences. En effet, même si nous avons supprimé les SNP observés sur les sites CpG, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse qu'une partie des DMC que nous avons détectés puisse être causée par des polymorphismes génétiques. Dans l'ensemble, cette étude fournit des informations précieuses sur les mécanismes impliqués dans la réponse des embryons de poules à l'exposition à la chaleur de leur mère. L'analyse future du transcriptome des mêmes embryons devrait apporter des éléments complémentaires intéressants.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Scott M.L., 1997. Poultry Sci., (58), 108-115
Wuttke W., 1976. In : Poultry Nutrition (fisher edit.) John Wiley and Sons, London, pp456.
Bordas et al., 1992. British Poultry Science, 33:741-754.
Brionne et al., 2019. BioData mining, 12(1), 1-13.
Vitorino Carvalho et al., 2021. BMC Genomics 22(1) 488
Chen et al., 2017. F1000Research, 6.
Degalez et al Enriched atlas of lncRNA and protein-coding genes for the GRCg7b chicken assembly and its functional annotation across 47 tissues. Scientific report, en revision
Doherty et Couldrey, 2014. Frontiers in genetics, 5, 126.
Merkel et al., 2019. Bioinformatics, 35(5):737-742
Piestun et al., 2008. Poultry Science, 87(8), 1516-1525
Santana et al., 2021. Scientific Reports, 11(1), 1-11
Skinner, 2011. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 93(1), 51-55.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'ensemble de l'équipe de PEAT – Financements : ANR ChickStress – Programme MOPGA - Région Occitanie – Département de Génétique Animale INRAE – Programme H2020 GEroNIMO

Figure 1. Dispositif animal

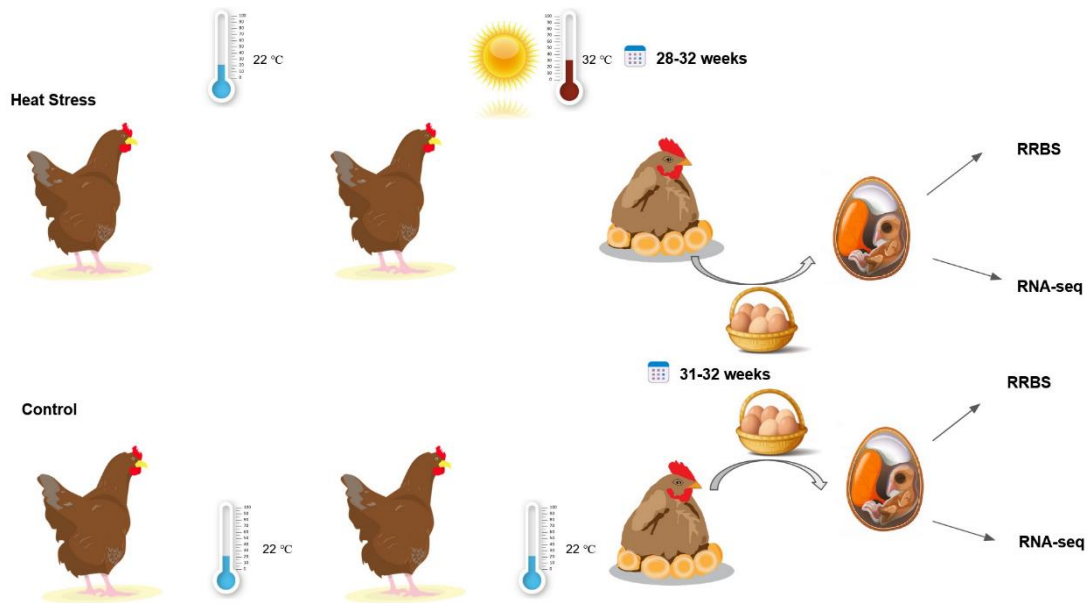


Figure 2. Manhattan plot de l'analyse de méthylation différentielle entre les groupes HS et CT. La ligne pointillée représente un $FDR \leq 0,05$ et la ligne continue représente un $FDR \leq 0,01$.

