

IDENTIFICATION DE GENES IMPLIQUES DANS LE CONTROLE DES FONCTIONS DIGESTIVES CHEZ LE POULET DE CHAIR

Amélie Juanchich¹, Christelle Hennequet-Antier¹, Cédric Cabau², Elisabeth Le Bihan-Duval¹, Michel J. Duclos¹, Sandrine Mignon-Grasteau¹, Agnès Narcy¹

¹URA, INRA, 37380, Nouzilly, France

²INRA, SIGENAE, GenPhySE, 31326, Castanet-Tolosan, France
amelie.juanchich@inra.fr

RÉSUMÉ

La durabilité de l'élevage avicole passe par la recherche de systèmes de production plus économes et autonomes en termes d'approvisionnement en matières premières pour l'alimentation animale. Ceci implique une meilleure prise en compte des caractères d'adaptation tels que l'efficacité digestive afin d'aller vers une plus forte utilisation de matières premières alternatives de qualité variable. L'objectif du projet ADIGEN était d'identifier des gènes impliqués dans la digestion en caractérisant le transcriptome de différents compartiments du tube digestif : la jonction entre proventricule et gésier, le gésier, la jonction gastro-duodénale, et le jéjunum. Les ARNs totaux des 4 tissus ont été séquencés sur HiSeq2500 (plateforme GeT-PlaGe, Toulouse) pour 6 individus issus d'un croisement F2 entre 2 lignées divergentes pour leur efficacité digestive (D+/D-). Les analyses bioinformatiques et biostatistiques des données RNA-seq ont mis en évidence un total de 11216 transcrits exprimés différemment entre les 4 tissus. Au total, 8 groupes de gènes présentant des profils d'expression très différents ont été identifiés. L'analyse fonctionnelle par « Gene Ontology » des classes de gènes montre un enrichissement significatif de la fonction immunitaire dans le jéjunum, et de l'activité transcriptionnelle et traductionnelle dans le gésier et le pyllore. Cette analyse nous permet de dresser un premier portrait moléculaire des différents compartiments du tractus digestif, qui servira de base pour les futures études sur le contrôle génétique ou physiologique de la réponse de l'animal aux variations alimentaires.

ABSTRACT

Functional genomics of the digestive function in broiler

The sustainability of poultry farming relies on the development of more efficient and autonomous production systems in terms of supply of raw materials for animal feed. This implies a better integration of adaptive traits in breeding programs, including digestive efficiency, in order to increase the use of various raw materials. The aim of the ADIGEN project was to improve the understanding of genes involved in digestive function by characterizing the transcriptome of different compartments of the digestive tract: the junction between proventriculus and gizzard, the gizzard, the gastroduodenal junction, and the jejunum. Total RNA from the 4 tissues were sequenced on HiSeq2500 (GeT-PlaGe facility, Toulouse) for six individuals from an F2 cross between two divergent lines for their digestive efficiency (D+ / D-). The bioinformatic and biostatistic analysis of RNA-seq data showed a total of 11216 differentially expressed transcripts between the 4 tissues. In total, eight groups of genes with markedly different expression profiles were identified. Functional analysis by "Gene Ontology" on gene groups showed a significant enrichment of immune function in the jejunum, and an enrichment of transcription and translation activity in the gizzard and the gastroduodenal junction. This analysis allows us to draw the first molecular portrait of the different compartments of the digestive tract, which will serve as a basis for future studies on the genetic and physiologic control of the response of the animal to feed variations.

INTRODUCTION

Alors que la sélection avicole a jusqu'ici privilégié des animaux très performants mais aussi très exigeants en ressources alimentaires de qualité et nécessitant un élevage dans un environnement optimisé, l'évolution vers des systèmes d'élevage limitant les intrants (notamment alimentaires) implique la recherche d'animaux résilients face à des conditions changeantes et parfois peu favorables. Ceci passe par une meilleure prise en compte dans les schémas de sélection avicoles de l'équilibre entre production et capacités d'adaptation des animaux, au travers de critères tels que l'efficacité digestive. L'identification des gènes et réseaux de gènes impliqués dans la fonction digestive est un prérequis à la compréhension de cette fonction biologique complexe. Elle peut faciliter sa prise en compte en sélection au travers de l'identification de marqueurs génétiques ou de biomarqueurs de l'efficacité alimentaire. Ceux-ci seront aussi utilisables pour l'évaluation de nouveaux systèmes d'élevage ou d'alimentation. L'objectif du projet ADIGEN (Améliorer la DIgestion par la GENétique) était donc d'identifier les gènes impliqués dans la digestion des poulets de chair en caractérisant le transcriptome de différents compartiments du tractus digestif : l'isthme et la jonction gastroduodénale (régulation de la motilité, activités de sécrétion et de trophicité du tractus digestif), le gésier (activité de broyage et prédigestion) et le jéjunum (site majeur d'absorption des nutriments). Le projet a approfondi la caractérisation de deux lignées de poulets sélectionnées de façon divergente sur leur capacité à digérer le blé (Mignon-Grasteau *et al.* 2004) et qui présentent des variations marquées de la morphologie et l'histologie au niveau de ces compartiments (Rideau *et al.* 2014).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Extraction ARNs et séquençage

Des poulets de chair issus d'un croisement de seconde génération entre 2 lignées de poulets bon digesteurs (D+) ou mauvais digesteurs (D-) ont été élevés au sol pendant 10 jours, puis en cages individuelles pour permettre la mesure de l'efficacité digestif au travers du critère d'EMAn (INRA UE PEAT, Tours). Les animaux grand-parentaux D+ et D- étaient issus de la 8^{ème} génération de sélection et présentaient des EMAn moyens de 3278 ($\pm$ 148) et 2455 ($\pm$ 533) kcal/kg de MS respectivement (Mignon-Grasteau *et al.* 2015). Tout au long de l'expérience, les oiseaux ont été nourris avec un régime contenant 52.5% de blé Rialto, 3110 kcal/kg MS et 21.1% de CP, similaire à celui utilisé lors de la sélection. Cette variété de blé a été choisie car elle est très dure et visqueuse,

et donc particulièrement difficile à digérer. Le bilan digestif a été réalisé entre 20 et 23 jours par collecte totale des fientes, selon le protocole décrit par Mignon-Grasteau *et al.* (2015). L'expression des gènes de 4 tissus clés de la fonction digestive a été étudiée : l'isthme et la jonction gastroduodénale pour leur fonctions de régulation de la motilité, des activités de sécrétion et de la trophicité du tractus digestif, le gésier pour son activité de broyage et pré-digestion et le jéjunum qui est le site majeur d'absorption des nutriments. Les 4 tissus d'intérêt ont été prélevés à l'issue du bilan digestif chez 3 individus sélectionnés sur la base de leur forte efficacité digestive (3 EMAn⁺, μ =3521 kcal/kg MS) et 3 pour leur faible efficacité digestive (EMAn⁺, μ =2610 kcal/kg MS). Les animaux ont été mis à jeun pendant 9h30 puis réalimentés pendant 2h30 avant les prélèvements. Les tissus ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Les ARNs totaux des 4 tissus ont été extraits avec le kit RNeasy Mini (QIAGEN). Les 24 échantillons d'ARNs ont été séquencés de façon appariée sur HiSeq2500 (plateforme GeT-PlaGe, Toulouse) en multiplexant 12 échantillons par ligne selon le protocole classique de séquençage Illumina.

1.2. Analyses bioinformatique et biostatistique

Les lectures ont été alignées sur la version 4 du génome du poulet (Gallgal4) avec l'outil TopHat2, les transcrits ont été assemblés avec Cufflinks puis quantifiés avec featureCounts. Les analyses biostatistiques des données RNA-seq sont basées sur une loi binomiale négative (paquet Bioconductor EdgeR) en contrôlant le taux de faux positifs à 0,1 par la correction Benjamini-Hochberg. Une classification hiérarchique des gènes différentiellement exprimés entre organes est construite sur la base d'une corrélation de Pearson et d'une distance d'agrégation du lien moyen. Une coupure modulaire de l'arbre hiérarchique (paquet Dynamic Tree Cut, Langfelder P. *et al.* 2007) permet de regrouper en classe les gènes présentant des profils d'expression similaires (figure 1).

1.3. Enrichissement fonctionnel

Les gènes exprimés différentiellement entre tissus ont été annotés grâce à l'outil g:Profiler pour l'ontologie « Processus Biologique » (Reimand *et al.* 2016). L'enrichissement des fonctions pour chaque classe de gènes a été déterminé grâce à un test exact de Fisher ($p < 0,01$), avec une correction de Benjamini-Hochberg ($p < 0,01$).

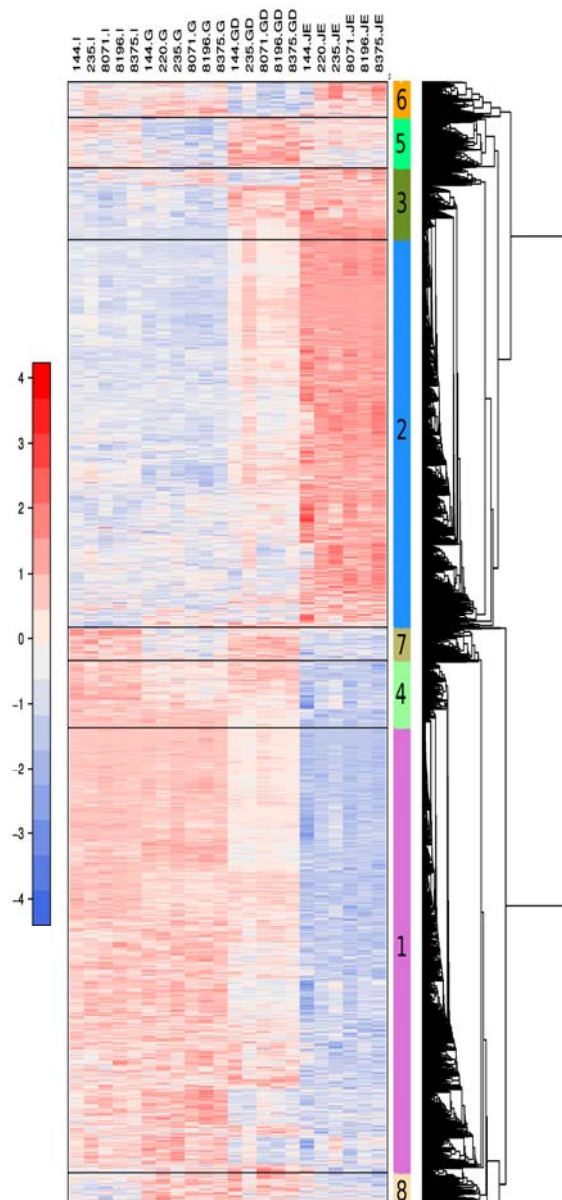
2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1. Profils d'expression des gènes du tractus digestif

Le séquençage des 24 échantillons sur HiSeq2500 a généré entre 5,2 et 10 millions de séquences par

échantillon. L'outil TopHat2 a permis d'aligner 89% des lectures sur la version Galgal4 du génome de poulet. Au total, 56469 transcrits ont été reconstruits grâce à l'outil Cufflinks puis quantifiés sur l'ensemble des 24 échantillons. Les analyses biostatistiques avec l'outil EdgeR ont mis en évidence un total de 11216 transcrits (représentant 9155 gènes) exprimés différemment entre les 4 tissus. Malgré la variabilité phénotypique des animaux, nous mettons en évidence un nombre important de gènes différemment exprimés entre les 4 tissus. Au total, 8 classes de gènes présentant des profils d'expression très différents ont été identifiés (figure 1).

Figure 1. Cluster-heatmap du profil d'expression des gènes du tube digestif dans l'isthme (I), le gésier (G), la jonction gastro-duodénale (GD) et le jéjunum (JE) pour 6 individus (144, 220, 235, 8071, 8196 et 8375)



Les plus grandes différences d'expression sont liées à l'expression des gènes dans le jéjunum (classes 1 et 2) qui représentent 73 % des transcrits différemment exprimés (i.e. 8170 sur 11216). Ce fort impact du jéjunum dans les résultats est cohérent avec les différences de fonctions entre les 4 tissus étudiés. En effet, la fonction principale du gésier est le broyage mécanique et la prédigestion des aliments et les jonctions en amont et en aval du gésier permettent une régulation du transit des aliments dans le gésier. A la différence des 3 autres compartiments, la principale fonction du jéjunum est l'absorption des nutriments. Ces différences de fonctions se traduisent donc par un nombre élevé de gènes différentiels dans le dispositif.

Parmi les 8 classes, nous avons également mis en évidence des signatures particulières de gènes dans les jonctions en amont et en aval du gésier. La classe 7 en particulier comprend 300 gènes surexprimés spécifiquement dans ces 2 compartiments.

2.2. Annotation et enrichissement fonctionnel

Les 9155 gènes exprimés différemment ont été annotés par « Gene Ontology » avec les étiquettes « Processus Biologique ». Sur les 9155 gènes exprimés différemment, 4906 possèdent au moins une étiquette fonctionnelle dans la base de données Ensembl 86. L'analyse fonctionnelle des 8 classes de gènes (figure 2) montre un enrichissement significatif de la fonction de défense de l'organisme (étiquettes « defense response », « immune response », « leukocyte cell-cell adhesion ») et l'absorption intestinale (étiquette « intestinal absorption ») dans le jéjunum (classe 2). De façon plus originale, un enrichissement de gènes impliqués dans la fonction de synthèse protéique (étiquette « ribonucleoprotein complex assembly » notamment) est observé dans le gésier et la jonction gastroduodénale par rapport aux autres compartiments étudiés (classe 8). Une très large majorité des protéines du complexe ribonucléoprotéique (protéines RPS et RPL respectivement de la petite ou de la grande sous-unité du ribosome) est présente dans cette classe, indiquant une activité de synthèse protéique importante dans le gésier et le pylore en comparaison à l'isthme et au jéjunum. Enfin, les gènes appartenant à la classe 7 (surexpression dans les jonctions) présentent un enrichissement dans le contrôle neuronal (étiquettes « synapse assembly » et « regulation of ion transport »). Parmi ces gènes, nous retrouvons des gènes tels que CPLX2 qui est impliqué dans la transduction des signaux neuronaux (McMahon *et al*, 1995) ainsi que des transporteurs d'ions tels que SCN3B, SLC26A5 ou CACNA1D. Ces observations sont en adéquation avec le fait que ces jonctions exercent un rôle spécifique dans le contrôle de la motilité gastrique (Duke, 1992 ; Hall et Duke, 2000).

CONCLUSION

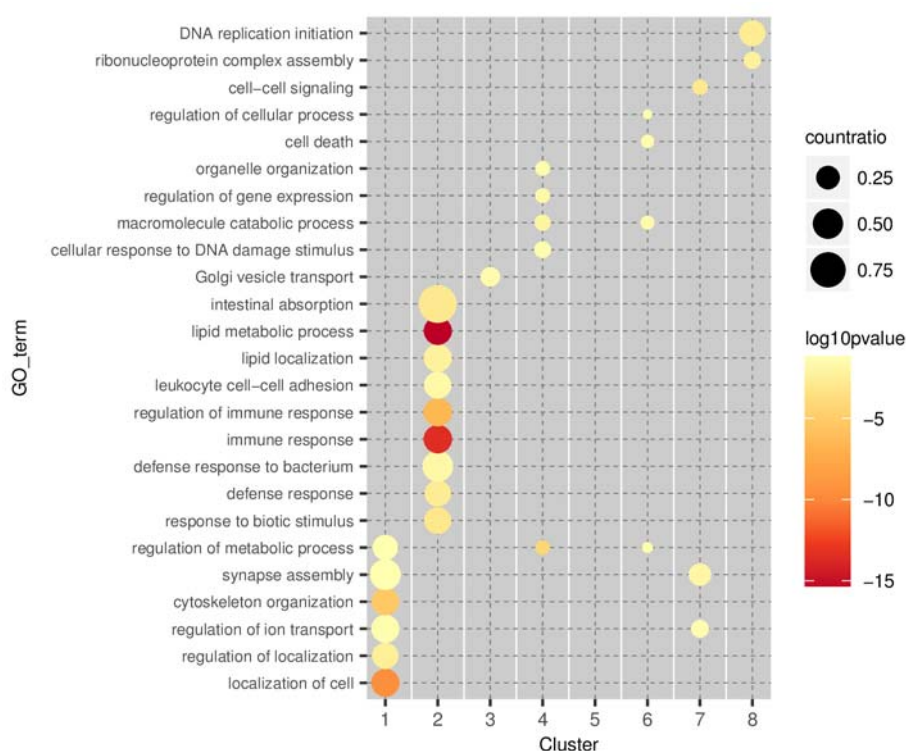
Cette analyse nous permet de dresser un premier portrait moléculaire des différents compartiments du tractus digestif. Il servira de ressource pour les futures études sur le contrôle génétique de l'efficacité digestive ou sur la régulation de ces fonctions par l'alimentation. Il ouvre des perspectives pour identifier des gènes clés impliqués dans le contrôle des fonctions digestives

chez le poulet, et faire émerger, à terme, de nouvelles stratégies d'élevage ou d'alimentation et proposer de nouveaux marqueurs de sélection dans une optique de maîtrise des intrants et des rejets en aviculture.

REMERCIEMENTS

Le projet ADIGEN a été financé par AGENAVI.

Figure 2. Enrichissement fonctionnel basé sur la « Gene Ontology »



Les numéros de classes (1 à 8) font référence aux classes d'expression des transcrits de la figure 1. La taille des ronds est proportionnelle au ratio de gènes présents dans la classe par rapport aux gènes possédant l'étiquette donnée. La colorisation reflète la significativité de l'enrichissement (p-value)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Duke GE, 1992. Poult.Sci., (71), 1-8
Hall AJ, et Duke GE. 2000. Poult. Sci., (79), 240-244
Langfelder P, Zhang B, Horvath S, 2007. Bioinformatics, (24), 719-720
McMahon HT, Missler M, Li C, Sudhof TC, 1995. Cell, (83), 111-119
Mignon-Grasteau S, Muley N, Bastianelli D, Gomez J, Peron A, Sellier N, Millet N, Besnard J, Hallouis JM, Carre B, 2004. Poult.Sci., (83), 860-867
Mignon-Grasteau S, Rideau N, Gabriel I, Chantry-Darmon C, Boscher M-Y, Sellier N, Chabault M, Le Bihan-Duval E, Narcy A, 2015. GSE, 47:74
Reimand J, Arak T, Adler P, Kolberg L, Reisberg S, Peterson H, Vilo J, 2016. Nucleic Acids Res., (44), 83-89
Rideau N, Godet E, Combémourel C, Chaudreau M, Carré B, Mignon-Grasteau S, 2014. Poult.Sci., (93), 1245-1250