

IMPACT D'UNE EXPOSITION EMBRYONNAIRE A LA CHALEUR SUR LE METHYLOME DU POULET DE CHAIR

**Coustham Vincent¹, Plenecassagnes Julien², Lejeune Clara¹, David Sarah-Anne¹,
Crochet Sabine¹, Loyau Thomas¹, Zerjal Tatiana³, Leroux Sophie², Esquerré Diane^{2,4},
Salin G  rald^{2,4}, Noirot C  line⁵, Pitel Fr  d  rique², Collin Anne¹**

¹INRA – UR83 Recherches Avicoles – 37380 NOUZILLY

²INRA – UMR1388 GenPhySE – 31326 CASTANET-TOLOSAN

³INRA – UMR1313 GABI – 78352 JOUY EN JOSAS

⁴INRA – GeT PlaGe Genotoul – 31326 CASTANET-TOLOSAN

⁵INRA - UR875 MIAT – 31326 CASTANET-TOLOSAN

vincent.coustham@tours.inra.fr

RÉSUMÉ

Il existe chez les animaux et l'Homme une mémoire de l'environnement embryonnaire (nutrition, stress, polluants...) qui peut influencer le métabolisme des individus à l'âge adulte. Cette mémoire de l'environnement précoce est expliquée en partie par des variations de l'état épigénétique des gènes, transmises au cours des divisions cellulaires au cours du développement et influençant la façon dont des gènes impliqués dans divers processus physiologiques et métaboliques s'expriment. La compréhension des mécanismes d'action de l'environnement précoce, notamment l'alimentation maternelle et les pratiques d'élevage pour les animaux de rente, représente une réelle opportunité pour améliorer la santé et le bien-être des animaux.

Le poulet, de par son développement embryonnaire dans l'œuf, est une espèce agronomique de choix pour manipuler directement l'environnement précoce et en étudier l'impact sur le devenir de l'animal. L'incubation des œufs est déterminante pour le développement du poussin, et différents paramètres d'incubation doivent être contrôlés. Dans un contexte de réchauffement climatique et d'augmentation de la production avicole dans les pays chauds, il est possible d'améliorer la résistance à la chaleur et le bien-être des poulets de chair en augmentant de manière cyclique la température d'incubation des œufs lors de l'embryogenèse. Cette manipulation thermique embryonnaire (MT) permet d'améliorer la thermotolérance des animaux à l'âge d'abattage sans impact négatif sur l'  closabilit  , la composition corporelle ni la qualité de la viande des animaux. La MT est associée à des changements d'expression de gènes qui perdurent durant le développement des animaux, suggérant des perturbations épigénétiques sous-jacentes. Dans cette communication, nous analysons l'impact de la MT sur la méthylation de l'ADN à l'échelle du génome.

ABSTRACT

Impact of embryonic heat exposure on broiler methylome

In both animals and Human, there is a memory of the embryonic environment (nutrition, stress, pollution ...) that may influence the metabolism of individuals in adulthood. This early environment memory is explained in part by changes in the epigenetic state of genes transmitted during cell division (i.e. development) and influence the expression of genes involved in various physiological and metabolic processes. Understanding the molecular mechanisms underlying early environmental exposures, including maternal nutrition and husbandry practices for livestock, provides an opportunity to improve animal health and welfare.

The chicken, by its embryonic development in the egg, is an agronomic species of choice to directly manipulate the early environment and study its impact on the future of the animal. The egg hatching period is crucial for the development of the chick, and various incubation parameters must be controlled. In a context of global warming and increase of poultry production in hot countries, it is possible to improve the heat resistance and the welfare of broilers by elevating cyclically the egg incubation temperature during embryogenesis. Embryonic thermal manipulation (TM) improves chicken thermotolerance at slaughter age without negative impact on hatchability, body composition or meat quality. TM is associated with changes in gene expression that persist during the development of animals, suggesting underlying epigenetic changes. In this communication, we analyse the impact of TM on DNA methylation across the genome.

INTRODUCTION

Le génome des eucaryotes répond de manière dynamique à des fluctuations de l'environnement. Des facteurs tels que l'alimentation, le comportement, le stress, les toxines et autres éléments modulent l'expression des gènes par des modifications épigénétiques. La méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des protéines histone (protéines autour desquelles s'entoure l'ADN) sont deux exemples de marques épigénétiques qui peuvent modifier l'expression des gènes sans altération de la séquence primaire de l'ADN. Ces marques sous influence de l'environnement peuvent être transmises au cours des divisions cellulaires et ainsi perturber l'expression des gènes à long terme. L'embryogenèse est une fenêtre critique de sensibilité à l'environnement, et les changements induits par l'environnement peuvent être amplifiés au cours du développement lors des divisions cellulaires. Parmi les exemples les mieux étudiés sont l'impact de la supplémentation du régime alimentaire maternel sur le phénotype des souris agouti (Feil et Fraga, 2011) et les différences épigénétiques persistantes chez l'Homme associées à l'exposition prénatale à la famine en Hollande lors de l'hiver 1944-45 (Heijmans *et al.*, 2008). Un autre exemple bien étudié est la vernalisation des plantes qui correspond à l'accélération de la floraison par une période de froid prolongé. Durant la vernalisation, des modifications de l'histone H3 vont réprimer à long terme l'expression du répresseur floral *FLC* permettant aux plantes de fleurir une fois les conditions propices réunies au printemps (Coustham *et al.*, 2012).

Les poulets de chair ont longtemps été sélectionnés sur des caractères de performance de croissance, avec des progrès significatifs dans la sélection génétique au cours des dernières décennies. Cependant, l'élévation considérable de la masse corporelle du poulet et de la croissance du muscle n'a pas été associée à une augmentation parallèle de certains organes viscéraux tels que le cœur et les poumons (Havenstein *et al.*, 2003). La conséquence d'une telle divergence est une diminution de la capacité à résister à des températures ambiantes extrêmes (Yahav et McMurtry, 2001). Notamment, les vagues de chaleur de 2003 en France ont entraîné la mort de plusieurs millions de poulets de chair. Pour améliorer la tolérance thermique et le bien-être des oiseaux sans nuire à leurs performances de croissance, une méthode d'exposition précoce à la chaleur lors de l'incubation des œufs a été développée (Piestun *et al.*, 2008). Le traitement de Manipulation Thermique (MT) au cours de l'embryogenèse consiste à incuber les œufs à une température de 39,5°C 12 heures par jour, par opposition à une incubation continue à 37,8°C dans des conditions standard d'incubation. La MT change plusieurs paramètres physiologiques, réduisant la température interne des poulets et améliorant leur tolérance thermique lors d'un coup de chaleur à l'âge d'abattage (32°C pendant

6h à 5 semaines d'âge) sans affecter significativement leurs performances (Piestun *et al.*, 2008; Loyau *et al.*, 2013).

Chez l'oiseau, le muscle est un tissu responsable d'une partie significative de la production de chaleur. Une étude du transcriptome de muscle a été réalisée chez des poulets de chair témoins et MT (voir la communication JRA2015 Loyau *et al.*, 2015). Ces travaux ont montré que la MT affecte durablement le niveau d'expression de gènes dans le muscle, certains impliqués dans le métabolisme énergétique. Ces différences d'expression persistantes peuvent être expliquées par des changements de l'épigénome embryonnaire qui se produiraient lors de la MT. Ces changements épigénétiques pourraient se perpétuer au cours de la vie du poulet permettant ainsi une réponse métabolique adéquate à d'autres expositions à la chaleur. Cette hypothèse est corroborée par des rapports récents suggérant que plusieurs marques épigénétiques sont altérées à la suite d'un traitement thermique post-natal lors de l'établissement de contrôle thermique dans le cerveau (Yossifoff *et al.*, 2008 ; Kisliouk *et al.*, 2009;2010).

Dans le cadre de cette communication, nous avons étudié l'implication d'une des modifications épigénétiques les mieux caractérisées, la méthylation de l'ADN, en réponse à la MT. Des échantillons de tissu musculaire ont été utilisés pour effectuer une analyse du méthylome, c'est-à-dire de la méthylation de l'ADN à l'échelle du génome. Les résultats préliminaires de cette étude, présentés ci-après, suggèrent que le traitement de MT altère la méthylation de l'ADN.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Préparation des ADN génomiques (ADNg)

Des échantillons de tissus musculaire (*P. major*) ont été prélevés 34 jours après éclosion sur 8 poulets mâles pour chaque traitement (témoins et MT, voir Figure 1). Environ 500mg d'ADN génomique ont été extraits en utilisant un tampon TNES-urée suivi d'une incubation dans une solution saturée en sels et lavage à l'éthanol. Le culot d'ADNg a été finalement repris dans un tampon Tris-EDTA.

1.2. Analyse globale de méthylation

La méthylation globale de l'ADN a été quantifiée par mesure des niveaux méthylation de 100ng d'ADNg provenant de 8 MT et 8 témoins dans un dosage colorimétrique de type ELISA (MethylFlash™ DNA Methylation Quantification, Epigentek).

1.3. Méthylome et analyses bioinformatiques

Un microgramme d'ADNg de 5 échantillons MT et 5 échantillons témoins (parmi les 8 échantillons initiaux pour chaque traitement) a été converti au bisulfite en

utilisant le kit NextFlex (BSC). Le séquençage de l'ADNg bisulfite a été réalisé par un séquenceur Illumina HiSeq2500 (plateforme INRA GeT-PlaGe) en mode paired-end 2x100bp en utilisant un kit TrueSeq V3. Les séquences produites ont été nettoyées à l'aide du logiciel Trim Galore! en version 0.3.1 (suppression des adaptateurs de séquençage et suppression des bases de qualité < 20). Les séquences nettoyées ont ensuite été alignées en utilisant l'outil Bismark version 0.10.0 (Krueger *et al.*, 2011) sur le génome de référence galGal4. Les cytosines différentiellement méthylées ont été comptées et quantifiées en utilisant l'outil MethylKit (Akalin *et al.*, 2012). Plusieurs outils bioinformatiques de quantification et de détection des cytosines méthylées ont été utilisés : eDMR, Bseq, DSS, MethylPipe et RADmeth (Dolzhenko *et al.*, 2014, Feng *et al.*, 2014, Hansen *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2013).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Afin de déterminer si la méthylation de l'ADN est altérée par le traitement de manipulation thermique embryonnaire, nous avons mesuré les niveaux globaux de méthylation de l'ADN par une approche quantitative de type ELISA basée sur l'utilisation d'anticorps anti-méthylcytosine. Cette expérience a permis de mettre en évidence une diminution du niveau global de méthylation de l'ADN chez les animaux MT par rapport aux témoins 34 jours après éclosion (Figure 2). Ce résultat, en accord avec notre hypothèse de travail, suggère que la MT est susceptible d'induire des modifications à l'échelle de l'épigénome qui pourraient influencer la façon dont les gènes s'expriment et/ou répondent à de futures expositions à la chaleur au cours du développement.

Nous avons ensuite réalisé une analyse par séquençage haut-débit de la méthylation de toutes les cytosines du génome. Pour cela, l'ADN génomique des animaux TM et témoins a été converti par un traitement bisulfite. Le traitement bisulfite permet de convertir les cytosines non méthylées en uracile. Les bases converties (U) sont lues en tant que thymine (T) après amplification par réaction PCR, alors que les cytosines méthylées sont lues en tant que cytosines (C). L'ADNg traité a été ensuite séquençé par le séquenceur haut-débit HiSeq2500 d'Illumina. Entre 150 et 200 millions de séquences de 100 paires de bases ont été obtenues pour chaque échantillon. Ainsi, chaque base du génome, dont la taille est estimée à 1,2Gb chez le poulet, a été séquençée en théorie de 12 à 16 fois pour chaque individu. Le contrôle de conversion bisulfite a été réalisé en séquençant un fragment d'ADN (vecteur pUC19) dépourvu de méthylation. Les résultats ont montré un fort taux de conversion pour tous les échantillons (>99% pour tous les échantillons), confirmant le parfait fonctionnement du traitement bisulfite.

Globalement, les niveaux de méthylation ne semblent pas différer entre les MT et témoins selon l'analyse

MethylKit (Figure 3). En fonction des espèces, la méthylation de l'ADN peut être retrouvée en contexte CpG (une cytosine suivie d'une guanine), en contexte CHG (où H= A, T ou C), ou encore en contexte CHH. Chez les animaux, hormis dans quelques tissus dont le cerveau, la méthylation est principalement retrouvée en contexte CpG. Nos résultats confirment ces données, avec un taux moyen de méthylation avoisinant 62% en contexte CpG chez les deux conditions (MT, témoins), alors que le taux moyen de méthylation est $\leq 1\%$ dans les autres contextes (Figure 3). Le taux de méthylation des CpG est légèrement supérieur à celui identifié dans le muscle *Longissimus dorsi* du mouton (50-55%, Couldrey *et al.*, 2014). De même, ce taux de méthylation est légèrement supérieur à ceux identifiés dans le cerveau et le foie de poulet (52,1 et 56% respectivement; Head *et al.*, 2014). Ces différences pourraient être expliquées par l'utilisation d'approches différentes dans ces deux études, respectivement par séquençage RRBS (ne considérant qu'une fraction du génome) et par LUMA (étude luminométrique de la méthylation de l'ADN globale). Par ailleurs, la diminution sensible mais significative du niveau de méthylation chez les animaux MT identifiée par notre approche préliminaire par dosage global (Figure 2) n'a pas pu être validée par notre approche systématique par séquençage. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le dosage quantitatif ELISA, lié à l'utilisation d'anticorps, est une méthode sujette à des biais expérimentaux. Cette discordance pourrait également être liée à un biais dans l'analyse bioinformatique, en cours de validation (voir ci-dessous).

La distribution des cytosines différentiellement méthylées en contexte CpG a été analysée via MethylKit (Figure 4). En éliminant les différentiels de méthylation inférieurs à 10% et ceux ayant une *q*-val supérieure à 0,001, un total de 34 069 CpGs apparaissent différentiellement méthylés sur les 19 222 519 analysées (soit 0,18%). Pour l'analyse fine de la distribution de ces différences de méthylation, nous avons pris en compte la répartition non homogène des CpG à travers le génome ainsi que la taille des régions analysées (Figure 4A). Les différences de méthylation ne sont pas concentrées dans les promoteurs des gènes (définis dans notre étude par les régions en amont des gènes jusqu'à -10Kb), mais souvent retrouvées à l'intérieur des gènes notamment dans les introns et en 3'UTR (la partie en aval du codon STOP non traduite; Figure 4B). La méthylation de l'ADN intragénique étant connue pour réguler l'élongation, l'épissage et la terminaison des transcrits (Choy *et al.*, 2009; Maunakea *et al.*, 2013; Ginno *et al.*, 2013), nos résultats suggèrent que la MT pourrait influencer la régulation des gènes en modifiant leurs niveaux d'expression mais aussi en modulant la nature des transcrits.

L'analyse des régions différentiellement méthylées est en cours. Pour cela, différents outils d'analyse sont

utilisés (voir section 1.3 du chapitre Matériels et Méthodes). Cependant, les premières analyses montrent que ces différents outils donnent des résultats variables. Pour discriminer les vrais positifs des faux positifs générés par les différentes analyses, les régions identifiées sont validées par une étude locale de la méthylation de l'ADN par séquençage Sanger sur produit PCR. Pour l'heure, les résultats obtenus par l'outil eDMR n'ont pas pu être validés par cette approche locale. D'autres validations sont en cours pour étudier les résultats produits par les autres outils.

CONCLUSION

La manipulation thermique embryonnaire permet la réorientation de programmes d'expression génique favorisant l'acclimatation des poulets de chair à la chaleur (Loyau *et al.*, 2014). Il semble aujourd'hui clair que ces changements d'expression peuvent être maintenus au cours du développement embryonnaire et post-embryonnaire grâce à des modifications épigénétiques, qui transmettent ainsi la « mémoire » de l'expression des gènes. En perspective de cette étude, outre la mise en évidence de différences de méthylation induites pas la MT, notre objectif est de valider l'identification de régions différentiellement méthylées identifiées par différents outils de bio-informatique. Diverses informations seront extraites,

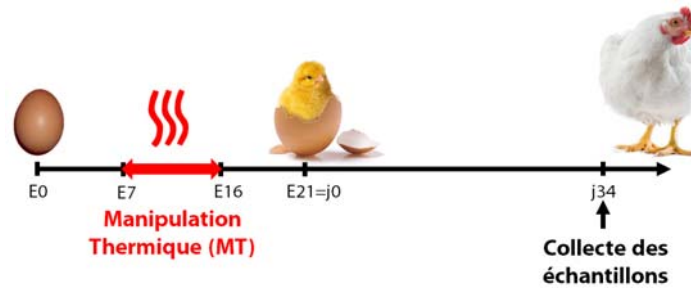
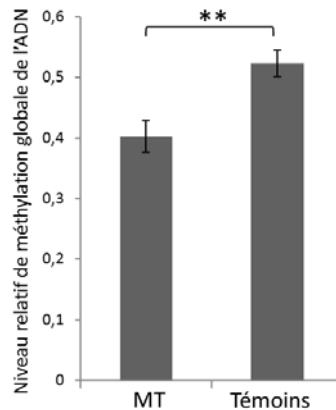
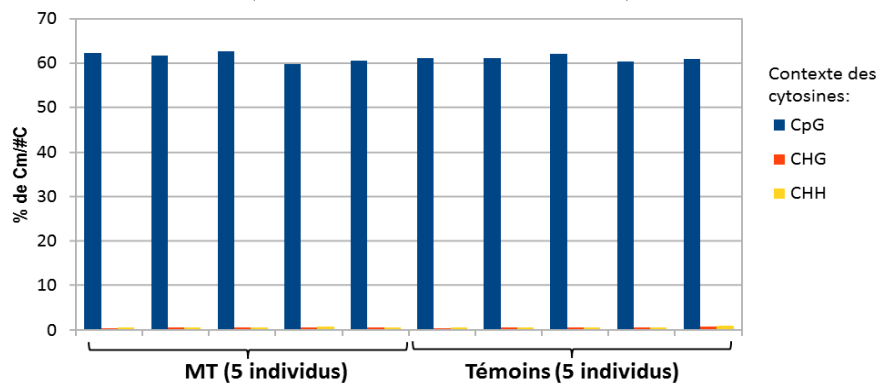
allant de la position de ces régions différentielles par rapport à la structure des gènes (promoteurs, îlots CpG,...) à la fonction des gènes potentiellement affectés. Une fois ces régions identifiées, ces résultats seront recoupés avec les données d'analyse du transcriptome de ces mêmes animaux afin d'étudier la corrélation entre changement d'expression et différences de méthylation de l'ADN (voir communication JRA2015 Loyau *et al.*, 2015). Ces travaux devraient ainsi révéler les mécanismes moléculaires permettant l'acclimatation embryonnaire à la chaleur. Par ailleurs, ces travaux devraient nous permettre d'identifier des marqueurs moléculaires d'exposition passée à la chaleur et/ou d'acclimatation à des températures élevées.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce au soutien de l'Agence Nationale de la Recherche, Projet « Jeunes Chercheuses et Jeunes Chercheurs » ANR-09-JCJC-0015-01 THERMOCHICK et du département PHASE de l'INRA, projet Crédit Incitatif « Epitherm » (2011). Les auteurs tiennent également à remercier F. Mercierand, J. Delaveau, C. Rat, J.-M. Brigant, O. Callut, N. Sellier, ainsi que les membres de l'unité expérimentale PEAT (INRA, UE1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, 37380 Nouzilly, France) pour leur contribution à cette étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Akalin, A., *et al.* (2012). *Genome Biol*, (13), R87.
2. Choy, J.K., *et al.* (2009). *Genome Biol* 10:R89.
3. Couldrey, C., *et al.* (2014). *PLoS One* 9(7):e101853.
4. Coustham, V., *et al.* (2012). *Science* 337(6094):584-587.
5. Dolzhenko, E. et A.D. Smith (2014). *BMC Bioinformatics*, (15), 215.
6. Feil, R. et M.F. Fraga (2011). *Nat Rev Genet* 13(2):97-109.
7. Feng, H., *et al.* (2014). *Nucleic Acids Res* (42), e69.
8. Ginno, P.A., *et al.* (2013). *Genome Res* (10):1590-600.
9. Hansen, K.D., *et al.* (2012). *Genome Biol*, (13), R83.
10. Havenstein, G. B., *et al.* (2003). *Poult Sci* 82(10):1500-1508.
11. Head, J. A., *et al.* (2014). *Mol Ecol Resour* 14(5):943-952.
12. Heijmans, B. T., *et al.* (2008). *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(44):17046-17049.
13. Kisliouk, T. et N. Meiri (2009). *Eur J Neurosci* 30(10):1909-1922.
14. Krueger, F. et S.R. Andrews (2011). *Bioinformatics*, (27):1571-2.
15. Li, S., *et al.* (2013). *BMC Bioinformatics*, (14 Suppl 5), S10.
16. Loyau, T., *et al.* (2014). *Animal*:1-10.
17. Loyau, T., *et al.* (2013). *J Anim Sci* 91(8):3674-3685.
18. Maunakea, A.K., *et al.* (2013). *Cell Res* 23:1256-1269.
19. Piastun, Y., *et al.* (2008). *Poult Sci* 87(8): 1516-1525.
20. Yahav, S. et J.P. McMurtry (2001). *Poult Sci* 80(12): 1662-1666.
21. Yossifoff, M., *et al.* (2008). *Eur J Neurosci* 28(11): 2267-2277.

Figure 1. Procédure expérimentale.**Figure 2.** Analyse des niveaux globaux de méthylation de l'ADN. Barre d'erreur: erreur standard.**Figure 3.** Pourcentages de méthylation des cytosines par individu et pour chaque contexte (CG, CHG et CHH où H=A,T ou C).**Figure 4.** A : Distribution des CpG analysées par région. B : Pourcentages des CpG présentant des différences de méthylation entre MT et témoins (différentiel >10%) par rapport au nombre total de CpG analysées pour chaque région (qval<0,001). prm: promoteurs (jusqu'à -10Kb en amont des gènes).