

IMPLICATION DES FONCTIONS DIGESTIVES ET DU MICROBIOTE DANS L'ETABLISSEMENT DES DIFFERENCES DE GLYCOGENE MUSCULAIRE ENTRE LIGNEES DIVERGENTES POUR LE PH ULTIME

**Bochereau Philippe¹, Berri Cécile¹, Maman Sarah², Narcy Agnès¹, Métayer-Coustard
Sonia¹, Raynaud Emilie¹, Cailleau-Audouin Estelle¹, Lardic Lionel¹, Gambier Eric¹, Le-
Bihan Duval Elisabeth¹**

¹BOA, INRAE, Université de Tours - 37380 NOUZILLY,

²SIGENAE, GenPhyse, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, F-31326, CASTANET
TOLOSAN,
philippe.bochereau@inrae.fr

RÉSUMÉ

La qualité de la viande de poulet mais aussi la robustesse du jeune animal sont influencées par le niveau des réserves en glycogène musculaire. Afin d'étudier le rôle du métabolisme digestif dans l'établissement de ce phénotype musculaire, nous avons effectué une comparaison de deux lignées divergentes de poulet pour le pH ultime (pHu) du filet, proxy des réserves en glycogène (n=15). Les mâles âgés de 4 semaines ont une teneur en glycogène du filet deux fois plus importante ($p = 4,2 \times 10^{-12}$) dans la lignée pHu- (à faible valeur de pHu) que dans la lignée pHu+ (à forte valeur de pHu). L'augmentation des réserves en glycogène (pHu-) est associée à un poids relatif du proventricule et du gésier ($p = 1,1 \times 10^{-5}$) plus élevé de même qu'à une meilleure digestibilité iléale apparente de l'azote ($p = 0,04$) et du calcium ($p = 0,03$). Concernant le microbiote caecal, sa diversité est comparable mais trois genres bactériens (*Lachnospira* ($p = 0,02$), *UCG-010 sp.* ($p = 0,03$), *Caprociproducens* ($p = 0,01$)) varient entre les lignées, les différences observées pouvant entraîner une sous-régulation de la fixation du carbone chez les procaryotes ($p = 0,05$) et du cycle du citrate ($p = 0,04$) dans la lignée pHu+. L'analyse par RNA-seq du jéjunum, site d'absorption des nutriments, a révélé 149 gènes différentiellement exprimés (DE) entre les lignées, dont plusieurs gènes liés à l'immunité, la réponse hormonale et aux rythmes circadiens qui sont moins exprimés chez les animaux pHu+. D'autres impliqués dans la migration et la prolifération cellulaire, et plus généralement la morphogenèse tissulaire, diffèrent également entre lignées. Parmi les gènes DE, plusieurs co-localisent avec des QTLs de pHu et des régions sous sélection identifiées dans les lignées, comme par exemple le gène GHRL codant pour la ghréline, une hormone impliquée dans la régulation de l'appétit.

ABSTRACT

Implication of digestive functions and microbiota in the establishment of muscle glycogen differences between divergent lines for ultimate pH

Both the quality of chicken meat and the robustness of the young chicks are influenced by the level of breast muscle glycogen reserves. In order to study the role of digestive metabolism in establishing this muscular phenotype, we compared two divergent chicken lines for the ultimate pH (pHu) of the breast meat, a proxy for glycogen reserves (n=15). Males aged 4 weeks had twice the breast muscle glycogen content ($p = 4,2 \times 10^{-12}$) in the pHu- line (low pHu) than in the pHu+ line (high pHu). The increase in glycogen reserves (pHu-) is associated with a higher relative weight of the proventriculus and gizzard ($p = 1,1 \times 10^{-5}$), as well as better apparent ileal digestibility of nitrogen ($p = 0,04$) and calcium ($p = 0,03$). The diversity of the cecal microbiota was comparable, but three bacterial genera (*Lachnospira* ($p = 0,02$), *UCG-010 sp.* ($p = 0,02$), *Caprociproducens* ($p = 0,03$)) varied between the lines. The differences observed could lead to down-regulation of carbon fixation in prokaryotes ($p = 0,05$) and of the citrate cycle ($p = 0,04$) in the pHu+ line. RNA-seq analysis of the jejunum, the site of nutrient absorption, revealed 149 genes differentially expressed (DE) between the lines, including several genes linked to immunity, hormonal response and circadian rhythms that are less expressed in pHu+ animals. Others involved in cell migration and proliferation, and more generally tissue morphogenesis, also differ between the lines. Among the DE genes, several co-localize with pHu-QTLs and regions under selection identified in the lines, such as the GHRL gene coding for ghrelin, a hormone regulating appetite.

INTRODUCTION

La consommation de viande de poulet a connu une augmentation continue depuis plusieurs décennies grâce à son faible coût de production, à l'absence d'interdits religieux et à ses qualités nutritionnelles. Pour faire face à cette demande, la filière a mis en place des stratégies de sélection et des pratiques d'élevage favorisant la vitesse de croissance et les rendements en filet des animaux. Ces progrès ont impacté la physiologie musculaire et conduit à l'apparition de plusieurs défauts de qualité. Certains sont liés au métabolisme des glucides et à des variations de pH de la viande avec des conséquences technologiques et sensorielles (Petracci et al., 2017). Chez le poulet, le pH ultime (pHu) de la viande est un déterminant clé de la qualité. Il s'agit d'un caractère héritable (h^2 comprise entre 0,3 et 0,5) et très fortement lié au niveau génétique à la teneur en glycogène musculaire estimée par le Potentiel Glycolytique ($r_g = -0,97$) (Le Bihan-Duval et al., 2008; Le Bihan-Duval et Berri, 2017).

Deux lignées de poulets divergentes pour la valeur du pH ultime du filet (dites pHu+ et pHu-) ont été sélectionnées à partir d'une population de base de poulet standard à croissance rapide, afin de mieux comprendre les mécanismes physiologiques et génétiques contrôlant les réserves en glycogène musculaire et les caractères associés. Les différentes études menées sur ce modèle animal original montrent qu'augmenter le pHu du filet par sélection impacte dans le même sens le pHu de la cuisse, améliore de nombreux critères de qualité du filet comme le pouvoir de rétention en eau, le rendement technologique et la tendreté du filet, mais augmente par ailleurs la fréquence du défaut musculaire White Striping, en lien peut-être avec un rendement en filet supérieur dans la lignée pHu+ (Alnahhas et al. 2014; 2015; 2016). Présentes dès l'éclosion, les différences de glycogène musculaire sont aussi associées à une variation de qualité du poussin. Ces disparités reflètent une modification profonde du métabolisme énergétique de ces animaux mais aussi celui des reproductrices dont les performances de ponte et la qualité des œufs sont affectées par la sélection (Métayer-Coustard et al. 2021; Bergeot et al., 2022; Erensoy et al. 2022).

L'analyse génomique des lignées divergentes a d'ores et déjà permis d'identifier plusieurs QTLs pour le pH ultime du filet ou de la cuisse contenant des gènes impliqués dans des glycogénoses chez l'homme et dont l'abondance (ou la fonctionnalité) au niveau musculaire pourrait fortement moduler le niveau des réserves en glycogène (Le Bihan-Duval et al. 2018). Plus généralement, les deux lignées présentent des différences dans les voies de production de l'énergie, principalement basée sur le métabolisme glucidique dans la lignée pHu-, ou faisant appel à l'activation de voies alternatives tel le catabolisme des acides aminés

et l'oxydation des acides gras dans le muscle de la lignée pHu+ (Beauclercq et al., 2016, 2017). De tels changements métaboliques pourraient contribuer à la moindre efficacité alimentaire de ces animaux (Berger et al. 2022).

Plusieurs études notamment chez l'homme et la souris ont suggéré un rôle du microbiote intestinal sur la détermination des réserves musculaires en glycogène. Ainsi, la suppression de la flore microbienne intestinale induit chez la souris une réduction significative des réserves en glycogène et de la capacité musculaire, phénomène réversible par la réintroduction naturelle de la flore microbienne (Nay et al., 2019). Chez le poulet et dans notre modèle de lignées divergentes plus spécifiquement, le rôle de la fonction digestive dans l'élaboration des réserves en glycogène n'avait pas encore été étudié. En ce qui concerne le microbiote intestinal, il est connu pour jouer un rôle essentiel dans la digestion chez le poulet, en absorbant les nutriments nécessaires, en décomposant les sucres et en produisant des vitamines importantes pour l'animal (Ditoe et al., 2022).

L'objectif de cette étude était de mieux comprendre les processus biologiques liés à la digestion, l'absorption, le transport et l'utilisation métabolique des nutriments associés à la variabilité des réserves en glycogène en tirant profit des lignées divergentes pHu+/pHu-. L'approche expérimentale a consisté en une analyse intégrée des transcrits musculaires (*Pectoralis major*) et digestifs (jéjunum) obtenus par RNAseq, conjointement avec l'évaluation des phénotypes digestifs (dont le microbiote), musculaires (dont la teneur en glycogène) et sanguins mesurés sur les mêmes animaux. Seul le volet intestinal est traité dans cet article.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et échantillonnage

L'étude a porté sur des mâles âgés de 4 semaines (15 par lignée) issus de la 15^{ème} génération de sélection, et élevés dans la même cellule à l'unité expérimentale INRAE PEAT (<https://doi.org/10.15454/1.5572326250887292E12>).

Ils ont été nourris *ad libitum* avec un régime conventionnel jusqu'à 20 jours, supplémenté de 21 à 29 jours avec 0,4 % de dioxyde de titane (TiO₂), marqueur indigestible. A 29 jours, les animaux ont été sacrifiés à l'état nourri afin de peser les organes, prélever les tissus, les contenus digestifs et le sang. Les tissus ont été congelés dans l'azote liquide puis stockés à -75°C. Le sang a servi à la préparation de plasma, également stockés à -75°C.

1.2. Calcul de la digestibilité iléale apparente du calcium, du phosphore et de l'azote

L'aliment et les contenus iléaux ont dans un premier temps été minéralisés. Les digestibilités iléales apparentes du calcium et du phosphore ont été déterminées à l'aide de la spectroscopie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP OES Thermo Scientific iCAP 7000, Courtabœuf, France ; méthode 990.08 ; AOAC International, 2006). Les digestibilités apparentes de calcium et de phosphore ont été déterminées en utilisant les niveaux de TiO_2 , conformément à la méthode de calcul décrite dans Rousseau et al. (2016). La digestibilité apparente de l'azote a été déterminée selon la méthode de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883).

1.3. Dosages plasmatiques et tissulaires

Les concentrations en triglycérides, acides gras non estérifiés, glucose, acide urique, haptoglobine et D-3-hydroxybutyrate, l'activité créatine kinase, le statut antioxydant total et le pH ont été déterminés dans le plasma. L'activité phosphatase alcaline a été mesurée dans le jéjunum. Les réserves en glycogène dans le muscle *in vivo* ont été estimées au travers de la mesure du potentiel glycolytique (PG) selon la formule suivante : $\text{PG} (\mu\text{mol d'équivalent lactate par gramme de muscle}) = 2 \times (\text{glucose total}) + (\text{lactate})$.

1.4. Analyses transcriptomiques, fonctionnelles et génétiques

Les ARN totaux ont été extraits du jéjunum (muqueuse + muscle lisse) et leur qualité vérifiée comme décrit précédemment (Beauclercq et al., 2017). Les ARN ont ensuite été séquencés en $2 \times 150\text{pb}$ (NovaSeq6000-A00318, GeT-PlaGe, Toulouse, France) et multiplexés selon le protocole de séquençage Illumina XP standard. Le pipeline Nextflow nf-core/rnaseq (Ewels et al., 2020) (Nextflow v.21.10.6, révision 3.5 nf-core/rnaseq) a été exécuté en utilisant la version 7b du génome de référence *Gallus gallus* et de la structure génique. Les outils STAR (v.2.6.1d) et Salmon (v.1.5.3) ont été utilisés pour l'alignement et la quantification des gènes et des transcrits. Les analyses statistiques des données de séquençage ont été réalisées avec DESeq2 (Varet et al., 2016) (v.1.7.3) dans l'interface Galaxy Migale afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés (DE) entre les deux lignées (P ajustée après correction de Benjamini-Hochberg < 0,05).

L'analyse fonctionnelle des gènes DE a été réalisée en utilisant le package ViSEAGO (Brionne et al., 2019). Les processus biologiques ont été considérés comme significatifs en cas de $P < 0,01$ calculée avec le test exact de Fisher. Les GO termes significatifs ont ensuite été regroupés en cluster grâce à une classification hiérarchique sur la base de la distance de similarité sémantique de Wang et du critère d'agrégation Ward.D2.

Les gènes DE au niveau du jéjunum ont été comparés aux QTL et régions sous sélection précédemment identifiées (Le Bihan-Duval et al., 2018) et repositionnées sur GalGal7.

1.5. Analyse du microbiote caecal

L'extraction de l'ADN 16S a été effectuée à l'aide du kit QIAamp® DNA Mini (réf. 51304, QIAGEN). Une amplification ciblée des régions variables V3 et V4 de l'ADN génomique purifiée a été effectuée avec le couple d'amorces F343 et R784. L'ADN a été séquencé et les séquences obtenues analysées avec le pipeline FROGS dans l'interface Galaxy Migale. Les séquences ont été regroupées en Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTU) qui ont été ensuite traitées en utilisant le processus FROGSFUNC qui les a positionnées dans un arbre phylogénétique de référence et calculé leurs abondances et celles des voies métaboliques associées.

2. RESULTATS

2.1. Caractérisation phénotypique des lignées

Le potentiel glycolytique, qui estime les réserves en glycogène *in vivo*, du muscle *Pectoralis major* étaient plus de deux fois plus élevées chez les pHu- que chez les pHu+ (229,8 $\mu\text{mol/g}$ vs 100,65 $\mu\text{mol/g}$, $p = 4,2 \times 10^{-12}$).

Les poulets des lignées pHu- et pHu+ ne présentaient pas de différence de poids vif ni de développement morphologique au niveau duodénal, jéjunal, iléal et caecal. En revanche, les poulets pHu- avaient un poids relatif de proventricule et gésier plus élevé (2,15% vs 1,67%, $p = 1,1 \times 10^{-5}$), qui s'accompagnait d'une meilleure digestibilité iléale apparente du calcium (43,1% vs 38,5%, $p = 0,03$) et de l'azote (87,1% vs 85,1%, $p = 0,04$), mais pas du phosphore, par rapport aux pHu+.

Au niveau plasmatique, aucune différence significative n'a été observée pour les molécules liées au métabolisme lipidique (D-3-Hydroxybutyrate, triglycérides, acides gras non estérifiés), des glucides (taux de glucose) et des protéines (acide urique, créatine kinase). Il en était de même pour l'équilibre acido-basique, les marqueurs de l'inflammation (haptoglobine) et le statut antioxydant total. Les niveaux de phosphatase alcaline intestinale, un marqueur de la santé digestive, étaient également similaires entre lignées dans le jéjunum.

2.2. Impact de la sélection sur l'expression des gènes au niveau jéjunale

L'analyse transcriptomique a révélé 149 gènes DE ($p < 0,05$) entre lignées au niveau jéjunale, avec 91 gènes surexprimés dans la lignée pHu- et 58 gènes

surexprimés dans la lignée pHu+. L'analyse fonctionnelle de ces gènes a permis d'identifier 6 clusters de gènes impliqués dans l'immunité, 3 dans la réponse à différents stimuli, 3 dans la morphogenèse et le développement tissulaire et 1 lié au comportement rythmique et circadien. Parmi les gènes DE, 20 sont localisés à proximité des QTL (+/- 2 Mb des SNP) et 12 au sein de régions sous sélection positive, préalablement identifiés comme étant impliqués dans le contrôle du pHu musculaire.

2.3. Impact de la sélection sur le microbiote caecal

Le microbiote cœcal des deux lignées présente des profils similaires en termes de diversité et de composition. Les espèces dominantes sont les Firmicutes (93,93%), les Bactéroïdes (3,60%), les Protéobactéries (2,40%) et les Actinobactéries (0,06%). Néanmoins, des différences significatives ont été observées au niveau des genres, avec une plus grande abondance de *Lachnospira* ($p = 0,02$) et d'*UCG-010 sp* ($p = 0,03$) dans la lignée pHu- et de *Caproiciproducens* ($p = 0,01$) dans la lignée pHu+. L'analyse fonctionnelle *in silico* du microbiote des lignées a révélé deux voies métaboliques susceptibles d'être affectées par ces modifications : la fixation du carbone chez les procaryotes (ko00720 ; 1,081% vs. 1,070%, $p = 0,05$) et le cycle du citrate (ko00020 ; 0,901% vs. 0,88%, $p = 0,035$), qui seraient suractivées dans le microbiote de la lignée pHu-.

3. DISCUSSION

Notre étude confirme que la sélection divergente sur le pHu du muscle du filet impacte bien sa teneur en glycogène, avec une différence entre lignées nettement plus élevée à la génération 15 ($\times 2,3$ dans la lignée pHu- par rapport à la pHu+) que celle observée à la génération 6 ($\times 1,3$), même si dans ce cas la mesure avait été réalisée à 5 jours post-éclosion (Métayer-Coustard et al., 2021) ou 6 semaines au lieu de 4 ici (Beauchercq et al., 2016). Nous observons que la teneur réduite en glycogène musculaire chez les pHu+ est associée à un moindre développement du proventricule et du gésier de ces animaux. Chez le poulet, il a été montré que des animaux bons digesteurs (D+) avaient un poids relatif de proventricule et gésier plus élevé que des mauvais digesteurs (D-) (De Verdal et al. 2010), favorisant la digestion chimique et mécanique des aliments dans cette partie haute du tractus digestif et l'accessibilité des nutriments aux enzymes digestives dans l'intestin. Les poulets pHu- présentent en effet des digestibilités iléales apparente de l'azote (+2,4%) et du calcium (+12%) supérieures par rapport aux pHu+. Aucune différence de développement de la partie inférieure du tractus gastro-intestinal (proportions de duodénum, jéjunum, iléon) n'a été observée entre les deux lignées. Des études histologiques sur la taille des villosités et des cryptes ainsi que le nombre de cellules à mucus au niveau

jéjunum sont en cours afin d'évaluer plus finement la fonctionnalité de l'intestin grêle, site majeur d'absorption des nutriments.

L'étude moléculaire, par RNA-seq, du jéjunum a d'ores et déjà montré des variations entre lignées de plusieurs voies liées à la migration, la prolifération cellulaire et plus généralement la morphogenèse tissulaire, mais aussi aux réponses immunitaire, hormonale et au rythme circadien qui seraient moins actives chez les animaux pHu+ par rapport aux pHu-. Le repositionnement des gènes DE dans les QTLs contrôlant le pH ultime du muscle ou les régions sous sélection a conduit à l'identification de plusieurs gènes candidats expressionnels et positionnels. Un exemple illustratif concerne le gène GHRL, surexprimé dans la lignée pHu-, et qui code pour le prépropeptide de la ghréline/obestatine. Bien que cette hormone agisse comme un stimulant de l'appétit chez les mammifères et induise la satiété chez les poulets, la GHRL est également reconnue pour favoriser la lipolyse (dégradation des lipides). Elle régule le réseau d'homéostasie énergétique en interagissant avec les glucocorticoïdes et l'insuline, contribue à des activités anti-inflammatoires, et joue un rôle de communication autocrine et paracrine (Murugesan et Nidamanuri 2022). Un autre exemple concerne les gènes BLB1 et BLB2, qui sont surexprimés dans les lignées pHu- et pHu+, respectivement. Ces gènes codent pour des protéines liées au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II, jouant un rôle dans l'immunité intestinale (Strand et al., 2013). Chez le poulet, BLB2 est généralement plus exprimé que BLB1. La surexpression de BLB1 chez les pHu- pourrait indiquer un rôle spécifique de ce dernier dans l'établissement de la réponse immunitaire plus efficace qui semble caractériser cette lignée. Le gène DLL4, surexprimé dans la lignée pHu-, pourrait réguler la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales intestinales par le biais de son action dans la voie de signalisation Notch. Des études chez la souris ont déjà démontré ce mécanisme (Pellegrinet et al., 2011 ; Nauman et Stanley, 2022).

Enfin, l'étude de la composition du microbiote caecal révèle que, bien que l'impact de la sélection sur le pHu du filet soit faible, elle pourrait avoir des répercussions fonctionnelles. Notamment *Lachnospira* et *UCG-010 sp.*, surabondants chez les pHu-, contribuent à l'immunité, la dégradation du fructose, la production de mucine et de lactate (Dimidi et al., 2017 ; Yang et al., 2021 ; Atzeni et al., 2022) alors que le genre *caproiciproducens*, producteur de caproate (acides gras à chaîne moyenne), est plus abondant dans la lignée pHu+. Globalement, les modifications observées indiqueraient une activation plus forte de la voie de fixation du carbone chez les procaryotes et du cycle du citrate chez les pHu-, qui jouent un rôle important dans

le métabolisme énergétique et la décomposition des molécules de carbone inorganique (Zarzycki et al., 2009 ; Belizário et al., 2018).

CONCLUSION

Cette étude est la première à s'intéresser au rôle de la fonction intestinale dans le contrôle des réserves en glycogène du muscle chez le poulet. Elle révèle plusieurs différences au niveau de l'anatomie du tractus digestif et de la digestibilité apparente des

aliments allant dans le sens d'une meilleure disponibilité en nutriments dans la lignée pHu-. L'analyse moléculaire au niveau jéjunale suggère aussi l'implication d'autres processus au niveau local ou plus central (réponse immunitaire, morphogenèse tissulaire, régulation de la prise alimentaire) qui pourraient moduler l'apport et/ou l'utilisation métabolique des aliments. L'analyse conjointe des régulations transcriptionnelles intestinales et musculaires devrait permettre de mieux évaluer l'implication de tels changements dans le contrôle des réserves en glycogène musculaire chez le poulet

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alnahhas, N. et al., 2014. *Journal of Animal Science*, 92(9), 3816-24
Alnahhas, N. et al., 2016. *Animal*, 11(2), 335-44
Alnahhas, N. et al., 2015. *Journal of Animal Science*, 93(9), 4524-31
Atzeni, A. et al., 2022. *Frontiers in Endocrinology*, 13(avril), 804455
Beauclercq, S. et al., 2017. *Scientific Reports*, 7(1), 6447
Beauclercq, S. et al., 2016. *Journal of Proteome Research*, 15(4), 1168-78
Belizário J. E. et al., 2018. *Mediators of Inflammation*, 2018, 1-12
Berger, Q. et al., 2022. *BMC Genomic Data*, 23(1), 18
Bihan-Duval, E. et al., 2018. *BMC Genomics*, 19(1), 294
Brionne, A. et al., 2019. *BioData Mining*, 12(1), 16
De Verdal, H. et al., 2010. *Poultry Science*, 89(9), 1955-61
Dimidi, E. et al., 2017. *Advances in Nutrition*, 8(3), 484-94
Ditoe, D. et al., 2022. *Poultry Science*, 101(5), 101786
Erensoy, K. et al., 2022. *Poultry Science*, 101(11), 102142
Ewels, P.A. et al., 2020. *Nature Biotechnology*, 38(3), 276-78
Kjeldahl, J. 1883. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*, 22(1), 366-82
Le Bihan-Duval E. et Berri C., 2017. In: *Poultry Quality Evaluation*. Woodhead Publishing Elsevier, p 199
Le Bihan-Duval, E. et al., 2008. *BMC Genetics*, 9(1), 53
Mangold, Otto. 1929. *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*, 117(1), 586-696
Bergeot. et al., 2022. <https://hal.inrae.fr/hal-03607918>
Métayer-Coustard, S. et al., 2021. *Frontiers in Physiology*, 12(mars), 643580
Murugesan, Shanmugam, et Anand Laxmi Nidamanuri. 2022. *World's Poultry Science Journal*, 78(4), 1021-36
Nauman, Mohd, et Pamela Stanley. 2022. *Biochemical Society Transactions*, 50(2), 689-701
Nay, K. et al., 2019. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 317(1), E158-71
Pellegrinet, L. et al., 2011. *Gastroenterology*, 140(4), 1230-1240.e7
Petracci M. et al., 2017. s. d. « Poultry Quality Evaluation. » *Woodhead Publishing Elsevier*, p 51
Rideau, N. et al., 2014. *Poultry Science*, 93(5), 1245-50
Strand, T. et al., 2013. *BMC Genetics*, 14(1), 29
Varet, H. et al., 2016. *PLOS ONE*, 11(6), e0157022
Yang, Bo. et al., 2021. *Foods*, 10(6), 1349
Zarzycki, J. et al., 2009. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21317-22