

LA CHERMINE DANS L'ALBUMEN : UN BIOMARQUEUR DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE AVIAIRE POUR LA SELECTION GENETIQUE ?

Bernardi Ophélie¹, Reverchon Maxime¹, Ramé Christelle², Dupont Joëlle²

¹SYSAAF – UMR BOA Syndicats des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français – 37380
NOUZILLY

²INRAe – UMR PRC Physiologie de la Reproduction et des Comportements – 37380
NOUZILLY
ophelie.bernardi@inrae.fr

RÉSUMÉ

La forte sélection génétique des souches de poules reproductrices ponte et chair a entraîné des différences de croissance et de métabolisme durant le développement embryonnaire des deux souches. De récentes recherches ont montré qu'une adipokine, nommée chémérine, semble jouer un rôle durant le développement embryonnaire. Dans cette étude, nous avons déterminé la concentration de chémérine dans le blanc d'œuf ou albumen durant la période de ponte de deux souches de poule, l'une ponte et l'autre chair. Par la suite, nous avons déterminé l'expression génique de la chémérine dans le tractus reproducteur de poules ponte et chair, notamment au niveau du magnum, et des annexes embryonnaires (membranes et fluides amniotiques et allantoïques) d'embryons de souche ponte et chair. Enfin, nous avons évalué le rôle de la chémérine durant le développement embryonnaire par injection *in ovo* d'anticorps anti-chémérine à J7 de l'embryogenèse.

Nous avons montré que les concentrations de chémérine sont variables durant la période de ponte et corrélées avec des performances de reproduction propres à la souche. De plus, l'expression génique et les concentrations de chémérine varient également durant le développement embryonnaire et entre les souches. Finalement, l'inhibition de la chémérine dans le blanc d'œuf au début du développement embryonnaire entraîne une mortalité embryonnaire dans les deux souches. Ainsi, la chémérine semble avoir un rôle important dans la fonction de reproduction aviaire.

ABSTRACT

Chemerin in egg albumen: a potential biomarker of embryo development in birds for genetic selection?

The intensive genetic selection of layer and broiler breeds has resulted in differences in growth and metabolism during the embryogenesis. Previous research has shown that an adipokine named chemerin was potentially involved in chicken embryo development. Here, we determined the concentration of chemerin in the egg white during the laying period of two breeds (layer and broiler). Next, we studied the gene expression of chemerin in the reproductive tract of layer and broiler hens, notably the magnum, and during the embryo development of annexes of layer and broiler embryos. Finally, we determined the role of chemerin during the embryogenesis by *in ovo* injection of anti-chemerin antibodies at the beginning of the embryo development. We showed that chemerin concentrations are variable during the period of laying and between breeds. Also, chemerin concentrations are correlated with some reproductive performances. Additionally, gene expression and chemerin concentrations are variable during the embryo development and between breeds. Finally, an inhibition of chemerin in egg white leads to embryo mortality in both embryos. Taken together, chemerin appears to have an important role in avian reproductive function.

INTRODUCTION

Le principal objectif des entreprises de sélection génétique aviaires est la production de poussins d'un jour viables et robustes afin de renouveler les reproducteurs et de fournir les produits commerciaux aux éleveurs. Cependant, la mortalité embryonnaire représente une problématique majeure pour la filière. Selon l'espèce aviaire, elle peut atteindre 40 % (données confidentielles SYSAAF). De ce fait, les schémas de sélection doivent se perfectionner afin de sélectionner les animaux ayant la meilleure valeur génétique pour la génération suivante. Par conséquent, de nouvelles perspectives sont nécessaires pour identifier de nouveaux outils utilisables en sélection génétique aviaire. La demande de la filière est la recherche de biomarqueur du développement embryonnaire et de la fertilité afin d'améliorer les performances de reproduction des animaux reproducteurs.

Dans notre étude, nous avons envisagé la chémérine en tant que potentiel biomarqueur du développement embryonnaire pour les raisons suivantes.

La chémérine ou RARRES2 (Retinoic Acid Receptor Responder 2) est une adipocytokine produite principalement par le foie et le tissu adipeux ayant un rôle dans le métabolisme, le système immunitaire et la fonction de reproduction (Mattern et al., 2014 ; Bernardi et al., 2021). Chez les espèces aviaires, le magnum est la partie du tractus reproducteur exprimant majoritairement la chémérine (Estienne et al., 2021, lieu de formation du blanc d'oeuf. A l'oviposition de l'oeuf, la chémérine est fortement présente dans l'albumen et au niveau des membranes vitellines interne et externe (Mann et al., 2007 et 2008 ; Estienne et al., 2021). Les concentrations de chémérine dans le blanc d'oeuf sont négativement corrélées aux taux de fertilité et fécondité des poules pondeuses expérimentales (Bernardi et al., 2022).

L'objectif est donc de (1) déterminer d'une part les variations de concentration de chémérine dans le blanc d'oeuf durant la période de ponte pour des souches de poules industrielles ponte et chair et (2) étudier le rôle de la chémérine durant le développement embryonnaire d'oeufs industriels de souche ponte et chair.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Protocoles expérimentaux

Expérience 1 : 100 poules reproductrices d'une souche ponte et chair ont été suivies durant 5 jours consécutifs de ponte à 3 moments précis de la période de ponte : avant et après le pic et avant la réforme des animaux. Malgré la différence de souche, les animaux ont été pris au même stade physiologie. Pour chaque oeuf pondue, l'oeuf ainsi que le jaune et le blanc ont été pesés indépendamment. Un échantillon d'albumen a

été collecté pour chaque oeuf collecté. Les données des performances de reproduction des animaux ont été calculées par les entreprises de sélection. Avant la réforme des animaux, 5 poules des deux souches ont été euthanasiées afin de récupérer le magnum de l'oviducte.

Expérience 2 : 100 oeufs embryonnés de souche ponte et chair poules reproductrices de souche ponte et chair ont été incubés selon les conditions conventionnelles de développement embryonnaire. Au jour 7, 14 et 18 du développement embryonnaire (ED), 10 oeufs incubés ont été prélevés afin de peser l'embryon et de récupérer les annexes embryonnaires (membranes et liquides).

Expérience 3 : 1200 oeufs fertiles de souche ponte et chair ont été injectés dans l'albumen par des anticorps anti-chémérine à 3 quantités différentes (0,01 µg ; 0,1 µg et 1 µg), PBS ou IgG au jour 7 de développement embryonnaire à la suite du mirage, éliminant les oeufs clairs. Du jour 7 à 14 de développement embryonnaire, le taux de mortalité embryonnaire a été réalisé par condition.

1.2. Dosage protéique

La concentration de chémérine dans le blanc d'oeuf et les liquides des annexes embryonnaires (allantoïque et amniotique) a été déterminée par un kit ELISA spécifique chémérine poulet (Bernardi et al., 2022).

1.3. Western-blot

Les échantillons de magnum ont été lysés à l'aide de l'Ultraturax dans un tampon de lyse (Tris 1 M (pH 7.4), NaCl 0.15 M, EDTA 1.3 mM, EGTA 1 mM, VO43-23 mM, NaF 0.1 M, NH2PO4 1%, Triton 0.5%). La concentration en protéine des lysats a été mesurée par BCA *protein assay* afin d'avoir au final 80 µg de protéine qui ont été dénaturées avec du tampon Laemmli buffer 5X pendant 5 min à 95°C.

Les protéines ont été chargées dans un gel d'électrophorèse (15% pour un poids de protéine <20kDa). Puis, elles ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été bloquées avec 5% de lait dans du TBS-Tween 20 pendant 30 min à température ambiante. Ensuite, les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire chémérine pendant une nuit à 4°C. Après rinçages, les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire anti-souris pendant 90 min à température ambiante. La protéine d'intérêt a été détectée avec G-box SynGene et le logiciel GeneSnap. Enfin, les protéines ont été quantifiées avec le logiciel GeneTools. Les résultats ont été exprimés en fonction de l'intensité du signal après normalisation avec l'ensemble de la quantité de protéines déposées

déterminées après coloration de la membrane au rouge ponceau.

1.4. RT-qPCR

Les ARNs totaux de 100 mg de tissus de magnum et de membranes embryonnaires (allantoïque et amniotique) ont été extraits par un kit (NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel, France). Les ADNc ont été générés par reverse transcription (RT). La qPCR (appareil Biorad, France) a été réalisée dans un mix de SYBR Green Supermix 1x, 250 nM spécifique chémérine poulet (Invitrogen by Life Technologies, France, Tableau 1) et 5 µL d'ADNc (dilué au 1/5^{ème}) pour un volume final de 20 µL. Le protocole de qPCR est le suivant : incubation de 2 min à 50 °C et une dénaturation de 10 min à 95 °C et 40 cycles (30 s à 95 °C, 30 s à 60 °C et 30 s à 72 °C). L'expression de l'ARNm a été normalisée par des gènes de référence (Tableau 1) par l'expression = Efficacité-Cq (quantification cycle).

1.5. Analyses statistiques

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. Les concentrations de chémérine dans le blanc d'œuf et les liquides embryonnaires ainsi que les expressions de chémérine dans les membranes des annexes embryonnaires ont été analysées au moyen de test Two-Ways ANOVA avec un effet génotype/souche (G), un effet temps (T). Un test t de Student a été réalisé pour comparer l'expression et l'abondance de la chémérine entre les magnums des différentes souches. Des corrélations de Pearson ont été déterminées entre les concentrations de chémérine dans le blanc d'œuf et les performances de reproduction. Le logiciel GraphPad Prism 6 a été utilisé pour réaliser les tests statistiques.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Chémérine dans le blanc d'œuf durant la période de ponte de 2 souches de poules et corrélations avec les performances de reproduction

La concentration de chémérine dans le blanc d'œuf varie au cours du temps durant la période de ponte en augmentant en fin de période de ponte ($T = 0,0008$). La seule différence significative de la concentration de chémérine dans le blanc d'œuf entre les souches est en fin de ponte avant la réforme des animaux. Les niveaux de chémérine dans l'albumen des œufs de poules de la souche ponte sont significativement plus élevés par rapport à ceux de la souche chair ($G = 0,0008$). De plus, nous observons une forte interaction

entre l'effet temps et l'effet génotype/souche ($G \times T < 0,0001$) (**Figure 1**).

Par la suite, nous avons recherché des corrélations entre la concentration de chémérine dans le blanc d'œuf et les performances de reproduction des différentes souches sur la période de ponte globale et à chaque semaine d'échantillonnage. Comme le montre le **Tableau 2.A**, les concentrations de chémérine dans l'albumen sont positivement corrélées avec le taux de fertilité des poules de la souche ponte avant le pic de ponte ($r = 0,26$ $p = 0,017$).

Cependant pour la souche chair, les concentrations de chémérine dans le blanc d'œuf sont négativement corrélées avec le taux de ponte à toutes les périodes ($r = -0,51$ $p < 0,0001$ sur la période de ponte globale ; $r = -0,49$ $p = 0,0001$ avant pic de ponte ; $r = -0,34$ $p = 0,012$ après pic de ponte et $r = -0,46$ $p = 0,0012$ avant la réforme des animaux). Des corrélations négatives sont également observées entre les niveaux de chémérine dans l'albumen et le taux de fertilité avant la réforme des animaux ($r = -0,31$ $p = 0,037$) et le taux d'éclosabilité sur la période de ponte globale ($r = -0,29$ $p = 0,0181$) (**Tableau 2.B**).

2.2. Chémérine dans le magnum de 2 souches de poules

L'expression du gène de la chémérine et l'abondance protéique de la chémérine ont été mesurées dans le magnum des tractus reproducteurs de poules de souche ponte et chair. Nous observons que l'expression du gène comme l'abondance de la protéine de chémérine sont plus importantes dans le magnum des poules de la souche ponte (**Figure 2**).

2.3. Chémérine au niveau des annexes embryonnaires durant le développement des embryons de 2 souches

Au niveau des membranes allantoïques et amniotiques, l'expression de la chémérine augmente durant le développement embryonnaire pour les deux souches d'embryons ($T = 0,0002$ et $T < 0,0001$). De même pour les deux membranes, un effet génotype est observé à ED14 avec une expression plus importante de la chémérine par les embryons ponte par rapport aux embryons de souche chair ($G = 0,0007$ et $G = 0,0001$) (**Figure 3.A et 3.B**).

Dans le fluide allantoïque, la concentration de chémérine ne varie pas durant le développement embryonnaire et entre les souches (**Figure 3.C**). Dans le fluide amniotique, la chémérine est sécrétée à partir de ED14 (14^{ème} jour embryonnaire) avec une concentration de chémérine plus importante dans les embryons de la souche ponte ($p < 0,0001$) (**Figure 3.D**).

2.4. Inhibition *in ovo* de la chémérine au début du développement embryonnaire pour 2 souches d'embryons

L'injection *in ovo* d'anticorps anti-chémérine au niveau de l'albumen des œufs fertiles de souche ponte et chair à ED7 du développement embryonnaire entraîne un accroissement de la mortalité embryonnaire de façon dose dépendante ($p < 0,0001$). Pour les œufs de souche ponte injectés, la mortalité embryonnaire significative apparaît dès la faible quantité d'anticorps ($0,01 \mu\text{g}$) ($p < 0,0001$) (**Figure 4.A**). Pour les embryons chair, la mortalité embryonnaire apparaît à partir de la quantité moyenne d'anticorps anti-chémérine ($0,1 \mu\text{g}$) ($p < 0,0001$) (**Figure 4.B**).

Il apparaît que cette adipo/hépatokine est présente à tous les étages de la fonction de reproduction : au niveau du magnum lors de la formation de l'albumen autour du jaune, dans le blanc d'œuf à l'oviposition et durant le développement embryonnaire d'œuf incubé. De plus, elle se retrouve associée à des paramètres de reproduction de façon différente entre les souches de poules étudiées, probablement dues à une fonction de reproduction différente. Il semble que la chémérine soit également importante durant le développement de l'embryon puisque son inhibition entraîne une forte mortalité embryonnaire pour les deux souches étudiées mais son rôle majeur reste encore à éclaircir. Il a déjà été montré son rôle anti-bactérien et pro-angiogénique durant le développement embryonnaire aviaire (Estienne et al., 2022). Chez les mammifères, il a été montré que la chémérine était produite par le placenta et que ses concentrations sériques étaient augmentées en fin de grossesse potentiellement impliquée (Kasher-Marion et al., 2014). De manière intéressante, le magnum, le blanc d'œuf mais également le fluide amniotique et les membranes embryonnaires de la souche ponte présentent une concentration et une expression de chémérine plus importantes par rapport à ceux de la lignée chair. Quant aux injections *in ovo*, les deux souches présentaient des taux de mortalité importants. Nous posons l'hypothèse que ces différences observées à chaque stade sont potentiellement dues à la forte sélection génétique faite sur les lignées reproductives, pour la production de viande pour la lignée chair et pour la production d'œuf et l'allongement de la période de ponte pour la lignée ponte.

CONCLUSION

L'ensemble de ses résultats suggère un rôle important de la chémérine dans la fonction de reproduction chez la poule. Cependant, il est nécessaire d'approfondir les recherches afin de mieux comprendre le rôle précis de la chémérine entre les deux souches et chez

d'autres espèces aviaires. La chémérine dans le blanc d'œuf se retrouve être associée à des critères de reproduction en fonction de la souche étudiée (positivement avec le taux de fertilité pour la souche ponte et négativement avec le taux de ponte, fertilité et éclosabilité) suggérant ainsi que la chémérine dans le blanc d'œuf pourrait être un outil pour sélectionner au mieux les animaux. Cependant, pour que ce biomarqueur puisse être inclus dans les schémas de sélection, il doit être héritable à la descendance, il est donc nécessaire d'analyser de la même manière les échantillons des descendants. Ces résultats renforcent donc le rôle de la chémérine durant le développement embryonnaire aviaire.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé en partie grâce aux entreprises de sélection adhérentes du SYSAAF (ISA – Hendrix Genetics, Hubbard – Aviagen et SASSO – Hendrix Genetics).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bernardi O., 2021. Mol Cell Endocrinol, (534) 111370
- Bernardi O., 2022. Front Physiol, (13) 1012212
- Estienne E., 2022. Sci Rep, (12) 8989
- Kasher-Meron M., 2014. Journal of Perinatal Medicine, (42), 371-378
- Mann K., 2007. Proteomics, (7), 3558-3568
- Mann K., 2008. Proteomics, (8), 2322-2332
- Mattern A., 2014. IUBMB Life, (2014), pp. 19-26

Tableau 1. Liste d’amorces (*Gallus gallus*) utilisées en qPCR. Les gènes de référence sont représentés en rouge.

Gène	Reverse	Forward
β-actine	5'-ACGGAACCACAGTTTATCATC-3'	5'-GTCCCAGTCTTCAACTATACC-3'
GAPDH	5'-TGCTGCCCAGAACATCATCC-3'	5'-ATCAGCAGCAGCCTTCACTACC-3'
EEF1a	5'-AGCAGACTTTGTGACCTTGCC-3'	5'-TGACATGAGACAGACGGTTGC-3'
Chémérine	5'-CGCGTGGTGAAGGATGTG-3'	5'-CGACTGCTCCCTAAAGAGGAACT-3'

Tableau 2. Tableau de corrélations entre les concentrations de chémérine dans le blanc d’œuf durant la période de ponte avec les performances de reproduction pour les poules de la souche ponte (A) et chair (B).

A.

r p value	Ponte	Fertilité	Eclosabilité
Période de ponte globale			
Avant pic de ponte		0,26 0,017	
Après pic de ponte			
Avant la réforme			

B.

r p value	Ponte	Fertilité	Eclosabilité
Période de ponte globale	-0,51 <0,0001		-0,29 0,0181
Avant pic de ponte	-0,49 0,0001		
Après pic de ponte	-0,34 0,012		
Avant la réforme	-0,46 0,0012	-0,31 0,037	

Figure 1. Concentration de chémérine dans le blanc d’œuf de poules de souche ponte et chair durant le période de ponte.

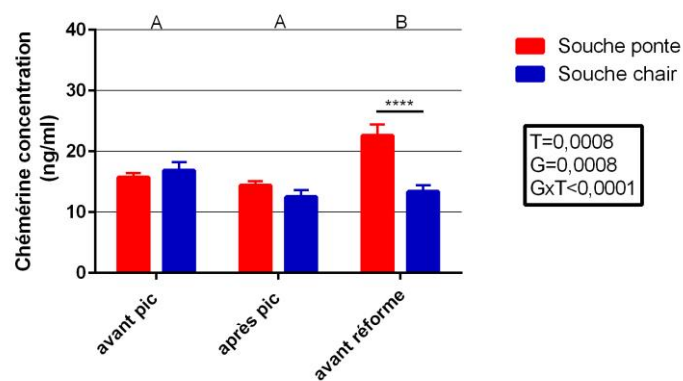


Figure 2. Expression génique et abondance de la chémérine dans le magnum d’oviducte de poule de souche ponte et chair par qPCR (A) et Western blot (B).

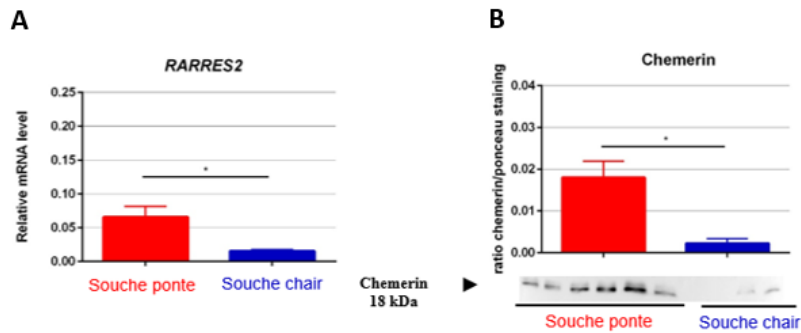


Figure 3. Expression génique et concentration de la chémérine dans les membranes (A-B) et fluides embryonnaires (C-D) des embryons de souche ponte et chair.

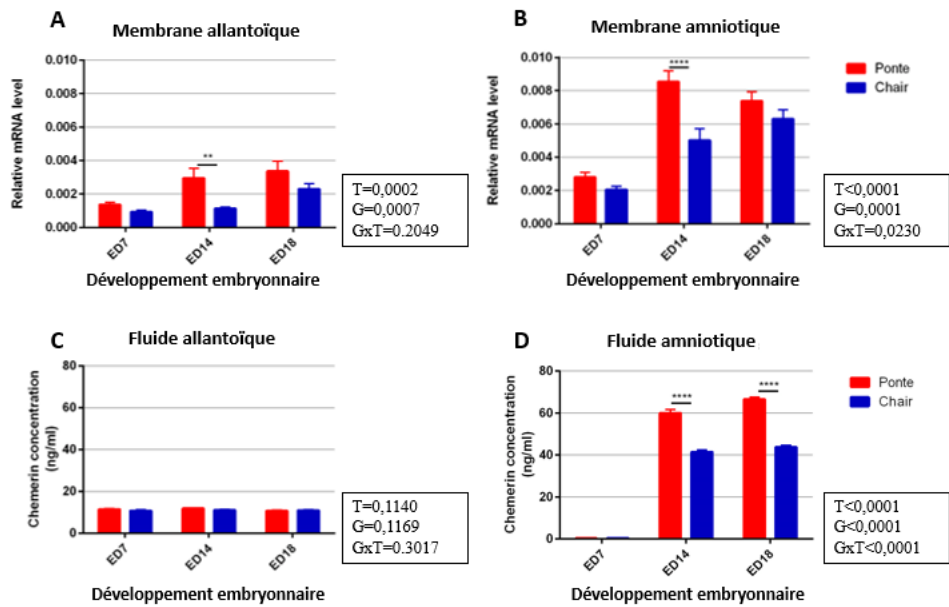


Figure 4. Taux de mortalité embryonnaire (%) entre ED7 et ED14 suite aux injection in ovo d’anticorps anti-chémérine dans les œufs de souche ponte (A) et chair (B).

