

**LA CHERMERINE : UN MARQUEUR POTENTIEL DE DEVELOPPEMENT
EMBRYONNAIRE ET D'ECLOSABILITE CHEZ LA POULE FAISANE
(*PHASIANUS COLCHICUS*) ?**

Estienne Anthony¹, Reverchon Maxime², Tricoire Serge³, Ramé Christelle¹, Froment Pascal¹, Dupont Joëlle¹

¹ CNRS, IFCE, INRAE, Université de Tours, PRC, Nouzilly,

² SYSAAF-Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français, Centre INRA Val de Loire, F-37380, Nouzilly,

³ Gibo Vendée, Chambretaud,
Joelle.dupont@inrae.fr

RÉSUMÉ

La chémérine est une hormone produite majoritairement par le tissu adipeux et le foie. Nous avons montré qu'elle est produite aussi localement dans le tractus reproducteur chez la poule, notamment au niveau du magnum, conduisant à son accumulation dans l'albumen des œufs. Nous avons aussi déterminé qu'elle était nécessaire au bon développement de l'embryon et à l'angiogenèse de la membrane chorio-allantoïque. Ce rôle majeur chez la poule suggère que la chémérine, largement conservée entre les espèces, pourrait être utilisée comme marqueur prédictif de la fertilité des œufs chez les gallinacés en général. Pour démontrer cela, nous avons utilisé un modèle proche de la poule : le faisane. Nous avons observé que la chémérine et ses trois récepteurs CMKLR1, GPR1 et CCRL2 s'exprimaient dans le tractus reproducteur des femelles. De plus, la chémérine est aussi produite de manière majoritaire dans le magnum et elle s'accumule dans l'albumen des œufs. Nous avons comparé ensuite deux lignées de faisans présentant différents paramètres de reproduction : les F11 et F22. Les F22 pondent plus d'œufs que les F11, mais présentent des taux de fertilité et d'éclosabilité significativement plus faibles. De plus, les F22 présentent une quantité significativement plus faible de chémérine dans leur magnum comparé aux F11 ($p < 0,01$), ainsi que des concentrations plus faibles en chémérine dans l'albumen des œufs ($p < 0,0001$). Enfin, nous avons observé une corrélation positive entre la concentration en chémérine dans l'albumen des œufs des F11 et le taux d'éclosion des œufs ($r = 0,5$; $p = 0,04$) ainsi qu'une corrélation négative entre la concentration en chémérine dans l'albumen des œufs des F22 et le taux d'œufs non fertilisés ($r = -0,37$; $p = 0,04$). Ces données mettent en évidence une conservation inter-espèce de la production de chémérine dans le magnum, son accumulation dans l'albumen des œufs et sa possible utilisation comme marqueur prédictif pour la détermination de la qualité des œufs en termes de fertilité.

ABSTRACT

Chemerin: a potential marker of fertility in pheasant (*Phasianus colchicus*)?

Chemerin is a hormone produced mainly by adipose tissue and liver. We have shown that it is locally produced in the reproductive tract in hens, particularly at the magnum level, leading to its accumulation in the egg albumen. We have also determined that it is necessary for the proper development of the embryo and the angiogenesis within the chorio-allantoic membrane. This major role in hens suggests that chemerin, widely conserved between species, could be used as a predictive marker of egg fertility in gallinacea in general. To demonstrate this, we used a model close to the hen: the pheasant. We have shown that chemerin and its three receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2 are expressed in the reproductive tract of females. In addition, chemerin is also produced predominantly in the magnum and accumulates in the egg albumen. We then compared two lines of pheasants with different reproductive characteristics: the F11 and F22. F22 lay more eggs than F11, but have significantly lower fertility and hatchability rates. In addition, F22 exhibits a significantly lower amount of chemerin in their magnum compared to F11 ($p < 0.01$), as well as lower chemerin concentrations in egg albumen ($p < 0.0001$). Finally, we observed a positive correlation between the chemerin concentration in the albumen of F11 eggs and the hatching rate of the eggs ($r^2 = 0.5$; $p = 0.04$) as well as a negative correlation between the chemerin concentration in the albumen of F22 eggs and the rate of unfertilized eggs ($r^2 = -0.37$; $p = 0.04$). These data demonstrate an interspecies conservation of chemerin production in the magnum, its accumulation in the egg albumen and its possible use as a predictive marker for determining the quality of eggs in term of fertility.

INTRODUCTION

Le foie et le tissu adipeux peuvent être considérés comme des organes endocriniens car ils sont capables de produire des hormones qui peuvent influencer des fonctions biologiques telles que la reproduction. La chémérine est l'une de ces hormones appelées adipo/hépatokine et est impliquée dans l'inflammation, l'angiogenèse, l'homéostasie, etc... Sa synthèse est assez ubiquitaire mais sa production locale peut varier selon l'organe ou le tissu considéré. La chémérine exerce ses principales fonctions biologiques en se liant à son principal récepteur couplé aux protéines G, le récepteur chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) (1) ainsi qu'à deux autres récepteurs qui sont GPR1 (récepteur couplé aux protéines G1) et CCRL2 (CC motif chemokine receptor like 2) (1).

Chez les oiseaux, peu de données sont disponibles sur le rôle de la chémérine dans le métabolisme et la reproduction (2). Chez les dindes, l'ARNm de la chémérine se trouve principalement dans le foie par rapport au cœur et aux muscles, tandis que les ARNm de CMKLR1 et GPR1 sont ubiquitaires (3). La chémérine, CMKLR1 et GPR1 de poulet, ont une identité d'acides aminés de 36 %, 56 % et 64 % avec la chémérine humaine et ses récepteurs, respectivement (4). Cette hormone est également impliquée dans la reproduction des oiseaux. En effet, chez le coq, notre laboratoire a déterminé qu'elle est produite au niveau local dans l'appareil reproducteur mâle, influence négativement la stéroïdogenèse testiculaire et la motilité des spermatozoïdes et altère la fertilité des œufs (5). Chez la femelle, il semble que les concentrations plasmatiques de chémérine soient négativement corrélées avec l'éclosabilité des œufs, suggérant un rôle potentiel de cette protéine sur le développement embryonnaire (6). Chez la dinde, la chémérine est exprimée par les cellules de la granulosa et augmente dans le follicule mature avant l'ovulation, influençant ainsi potentiellement le développement embryonnaire précoce (3). Enfin, nos derniers résultats chez le poulet ont démontré que la chémérine est sécrétée localement par le magnum de l'appareil reproducteur de la poule et s'accumule dans le blanc d'œuf où elle pourrait influencer positivement le développement de l'embryon en favorisant l'angiogenèse et les défenses antibactériennes (Estienne et al 2021 soumis). La similarité entre la chémérine du poulet (*Gallus gallus domesticus*) et celle du faisan (*Phasianus colchicus*), ces deux espèces appartenant à la famille des gallinacés, est très élevée avec 98% d'identité. Ayant développé des outils moléculaires (anticorps et protéines recombinantes) spécifiquement pour l'étude du poulet, nous avons pu mener des investigations similaires dans différentes lignées de faisans. En effet, nous avons profité du fait que le faisan est une espèce de gibier très élevée dans le monde et que sa sélection

fine par les élevages, en fonction de son comportement ou de ses capacités de reproduction, a conduit à l'apparition de différentes lignées aux caractéristiques spécifiques. De plus, même chez cette espèce, le métabolisme et la nutrition peuvent avoir une énorme influence sur la reproduction chez la femelle (7, 8). Nous avons à notre disposition deux lignées de faisans, présentant des capacités de reproduction différentes. Notre hypothèse est que la domestication et la sélection, basées sur les performances de reproduction, ont un impact sur l'expression de la chémérine et que cette protéine pourrait partiellement jouer un rôle dans le développement embryonnaire du faisan, comme chez la poule. Ainsi, le but de cette étude était d'étudier l'effet de la sélection domestique sur les paramètres de reproduction, liés à l'expression de la chémérine au sein de l'appareil reproducteur femelle, son accumulation dans les œufs et son effet sur le développement embryonnaire de ces deux lignées de faisans.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux. Trente poules faisanes de la lignée F11 et trente poules faisanes de la lignée F22 (*Phasianus colchicus*) de Gibo'Vendée (Chambretaud, France) ont été étudiées pendant la période de ponte en 2019 et 2020. Les animaux ont été élevés dans les installations d'élevage de Gibo'Vendée (Chambretaud, France) selon les conditions traditionnelles d'élevage : 14h de lumière par jour à l'arrivée, suivi d'une diminution progressive jusqu'à atteindre 8 h de lumière par jour au moment de la ponte (semaine 26), puis une augmentation jusqu'à atteindre 15 h de lumière par jour à la fin de l'étude (semaine 36). Toutes les données sur les paramètres de reproduction ont été enregistrées et fournies par l'éleveur (Gibo'Vendée, Chambretaud, France).

1.2. Échantillons biologiques. Pendant le pic de ponte, les œufs ont été collectés quotidiennement et stockés dans une pièce à 15-16 °C et 80-85% d'humidité pendant une semaine avant le prélèvement des échantillons. L'albumen (1ml) a été collecté et stocké à -20°C avant utilisation. Les échantillons biologiques ont été collectés lors de l'abattage des animaux en vue de la commercialisation de leur viande. Des échantillons de sang ont été collectés après l'abattage dans des tubes d'héparine et le plasma a été récupéré après centrifugation (5000 g pendant 10 min à 4°C) puis stocké à -20°C jusqu'à utilisation. Des échantillons du tractus reproducteur ont été prélevés (infundibulum, magnum, isthme, utérus et vagin) par dissection après abattage des animaux. Les échantillons ont été conservés à -80°C avant utilisation.

1.3. Mesure de l'expression des gènes du système chémérine dans le tractus reproducteur. L'ARN total a été extrait de l'infundibulum, du magnum, de l'isthme, de l'utérus et du vagin (6 animaux par stade) par homogénéisation de 100 mg de tissu dans le réactif tampon de lyse d'un kit d'extraction d'ARN total selon les recommandations du fabricant (NucleoSpin RNAMacherey-Nagel). L'ADNc a été obtenu par transcription inverse comme décrit par Mellouk et al., 2018 (6). L'expression de 4 gènes majeurs a été étudiée, la chémérine, CMKLR1, GPR1 et CCRL2. Les niveaux d'expression d'ARN messager ont été normalisés à trois gènes de référence (β -Actine, GAPDH et EEF1a). Pour chaque gène, l'abondance relative de transcription a été déterminée par le calcul de e^{-Ct} , puis l'expression relative du gène d'intérêt est rapportée à l'expression relative du gène de référence.

1.4. Mesure des quantités protéiques. Les tissus de l'infundibulum, du magnum, de l'isthme, de l'utérus et du vagin de 6 animaux de la lignée F11 et 12 échantillons de magnum des lignées F11 et F22 ont été lysés à l'aide d'un Ultraturax (Invitrogen™ by Life Technologies™, Villebon sur Yvette, France) dans un tampon de lyse préparé au laboratoire (Tris 1 M (pH 7.4), NaCl 0.15 M, EDTA 1.3 mM, EGTA 1 mM, VO43–23 mM, NaF 0.1 M, NH2PO41%, Triton 0.5%). Les protéines du lysat (80 μ g) ont été dénaturées avec du tampon Laemmli 5 X puis ont été chargées dans un gel d'électrophorèse en présence de sodium dodécylsulfate sur gel de polyacrylamide. Ensuite, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (0.45 μ m). Les membranes ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire approprié (anticorps monoclonal anti-chémérine de poule testé et décrit dans (6), dilution 1/1000 dans du tampon Tris-Phosphate Saline + 0.05% de Tween et 5% de lait en poudre). Ensuite, les membranes ont été incubées 90 min à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-mouse couplé à une Horse Radish Peroxydase (Interchim, UP756690, dilution 1/50000 dans du tampon Tris-Phosphate Saline + 0.05% de Tween et 5% de lait en poudre) afin que les protéines d'intérêt soient détectées par chemiluminescence (Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) avec une G-box SynGene (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) et le logiciel GeneSnap (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). Ensuite, les protéines ont été quantifiées avec le logiciel GeneTools. Les résultats sont exprimés sous forme de signal d'intensité en unités arbitraires après normalisation par rapport à une protéine ubiquitaire, la vinculine. Les quantités de chémérine dans le plasma sanguin (n = 60) ont également été obtenues en utilisant la technique de western blot.

1.4. Analyses statistiques. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ SEM avec un niveau de significativité inférieur à 0,05. Un test de Student a été utilisé pour comparer les groupes et un test One-Way ANOVA avec un post-test de Tukey pour la comparaison des différents tissus. Le logiciel GraphPad Prism 6 a été utilisé pour les tests.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les données morphométriques des faisans F11 (n=30) et F22 (n=30) et les mesures obtenues sur leurs œufs respectifs sont résumées dans la figure 1. Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les poids des femelles, des œufs, de l'albumen et du jaune, respectivement, entre les deux lignées (Figure 1A, B, C et D). Cependant, nous avons montré un nombre d'œufs par femelle significativement plus élevé pendant la période de ponte dans la lignée F22 par rapport à la lignée F11 (p=0,044) (Figure 1E). Concernant les paramètres de reproduction, nous avons trouvé un taux de fertilité (œufs fertiles/œufs incubés x100) (Figure 1F), un taux d'éclosabilité (œufs éclos/œufs fertiles x100) (Figure 1G) et taux d'œufs éclos/œufs incubés (Figure 1H) significativement plus élevés dans la lignée F11 par rapport à la lignée F22. Lorsque nous nous sommes concentrés sur la concentration de chémérine dans le plasma sanguin, nous n'avons trouvé aucune différence significative entre les deux lignées (données non présentées). Par analyse qPCR dans la lignée F11 uniquement, nous avons trouvé que la *chémérine* est exprimée par les différentes parties de l'appareil reproducteur chez les faisanes, sans variations significatives entre l'infundibulum, le magnum, l'isthme, l'utérus et le vagin dû à une grande hétérogénéité des résultats (Tableau 1). Des résultats similaires ont été obtenus pour CMKLR1 et CCRL2 (données non présentées). Cependant, les résultats ont montré une augmentation significative de l'expression de GPR1 dans l'utérus par rapport aux autres parties de l'appareil reproducteur (Tableau 1). Ensuite, nous avons comparé l'expression des mêmes gènes entre les magnums des lignées F11 et F22. Là encore, nous n'avons trouvé aucune différence d'expression entre les magnums F11 et F22 pour la chémérine, CMKLR1, GPR1 et CCRL2 (données non présentées). Cependant, en se concentrant sur l'expression de la protéine chémérine, l'analyse par western-blotting a mis en évidence une augmentation significative de la quantité de protéines dans le magnum par rapport aux autres parties de l'appareil reproducteur (Tableau 1). Nous avons décidé d'aller plus loin en comparant la quantité de protéines de chémérine dans le magnum des deux lignées et avons constaté que les poules faisanes F22 présentent significativement moins de chémérine dans leur magnum par rapport aux poules F11 (Tableau 2). Nous avons également obtenu un résultat similaire pour la quantité de chémérine dans

l'albumen des œufs des deux lignées avec une quantité de chémérine réduite dans l'albumen des œufs des poules faisanes F22 comparés aux poules faisanes F11 (Tableau 2). Enfin, nous avons observé des corrélations intéressantes entre la quantité de chémérine dans le plasma sanguin, dans l'albumen ou dans le magnum et les paramètres de reproduction obtenus chez les deux lignées. En effet, nous avons montré une corrélation négative entre la chémérine du plasma sanguin chez la lignée F11 et l'éclosabilité des œufs ($r=-0,48$, $p<0,05$) mais pas chez la lignée F22. Nous avons également observé une corrélation positive entre la chémérine de l'albumen chez la lignée F11 et le taux d'œufs éclos ($r=0,5$; $p<0,05$). En revanche, nous avons noté des corrélations négatives entre la chémérine de l'albumen de la lignée F22 et le taux d'œufs infertiles ($r=-0,37$; $p<0,05$).

L'implication de la chémérine dans la fonction de reproduction, tant chez le mâle que chez la femelle, est bien connue chez les mammifères (9). Mais jusqu'à présent, il existe peu de données sur son implication dans la reproduction des oiseaux. Notre laboratoire a déjà obtenu des résultats intéressants sur des espèces d'oiseaux d'intérêt agronomique (3,5,6). Chez la poule, les concentrations plasmatiques de chémérine sont négativement corrélées avec l'éclosabilité des œufs, suggérant un rôle potentiel de cette adipo/hépatokine sur l'œuf (6). Nous avons observé le même résultat dans notre présente étude chez la faisane avec une corrélation négative entre la chémérine plasmatique de la lignée F11 et l'éclosabilité des œufs ($r=-0,48$; $p<0,05$). Plus récemment, une étude a montré que chez la poule, la

chémérine est exprimée localement au sein du magnum (Estienne et al 2021 soumis). Le magnum est la région de l'oviducte aviaire où se produisent la synthèse et la sécrétion de l'albumen de l'œuf (10). La sécrétion a normalement lieu environ 0,6 à 4 heures après la ponte précédente, lorsque le jaune passe le long du magnum. Les données ont montré que la chémérine est également exprimée par le magnum lors de la sécrétion d'ovalbumine, s'accumule dans l'albumen de l'œuf et joue un rôle important lors du développement de l'embryon (Estienne et al 2021 soumis). Nos résultats obtenus chez le faisane indiquent que dans cette espèce également, la chémérine est produite de manière majoritaire par le magnum et s'accumule dans l'albumen. De plus, cette production locale au niveau du tractus est significativement plus importante dans la lignée F11 qui présente des paramètres de fertilité supérieurs à la lignée F22. Enfin, les corrélations obtenues entre la chémérine et les paramètres de fertilité dans ces deux lignées, et ceci malgré un faible nombre d'individus ($n=30$), renforcent l'hypothèse de l'implication de cette protéine dans le développement embryonnaire.

CONCLUSION

Comme la chémérine est bien conservée entre les espèces aviaires (2), nous émettons l'hypothèse que cette hormone, en raison de son énorme accumulation dans l'œuf, pourrait jouer un rôle crucial dans le développement de l'embryon et ainsi, pourrait être un marqueur de sélection dans les programmes d'élevage

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kennedy AJ, Davenport AP. International Union of Basic and Clinical Pharmacology CIII: Chemerin Receptors CMKLR1 (Chemerin1) and GPR1 (Chemerin2) Nomenclature, Pharmacology, and Function. *Pharmacol Rev*. 2018 Jan;70(1):174-196. doi: 10.1124/pr.116.013177. Epub 2017 Dec 26. PMID: 29279348; PMCID: PMC5744648.
- Bernardi O, Estienne A, Reverchon M, Bigot Y, Froment P, Dupont J. Adipokines in metabolic and reproductive functions in birds: An overview of current knowns and unknowns. *Mol Cell Endocrinol*. 2021 Aug 20;534:111370. doi: 10.1016/j.mce.2021.111370. Epub 2021 Jun 23. PMID: 34171419
- Diot M, Reverchon M, Rame C, Froment P, Brillard JP, Brière S, Levêque G, Guillaume D, Dupont J. Expression of adiponectin, chemerin and visfatin in plasma and different tissues during a laying season in turkeys. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015 Jul 31;13:81. doi: 10.1186/s12958-015-0081-5. PMID: 26228641; PMCID: PMC4521348.
- Estienne A, Ramé C, Ganier P, Chahnamian M, Barbe A, Grandhaye J, Dubois JP, Batailler M, Migaud M, Lecompte F, Adriaensen H, Froment P, Dupont J. Chemerin impairs food intake and body weight in chicken: Focus on hypothalamic neuropeptides gene expression and AMPK signaling pathway. *Gen Comp Endocrinol*. 2021 Apr 1;304:113721. doi: 10.1016/j.ygcen.2021.113721. Epub 2021 Jan 23. PMID: 33493505.
- Estienne A, Reverchon M, Partyka A, Bourdon G, Grandhaye J, Barbe A, Caldas-Silveira E, Rame C, Niżański W, Froment P, Dupont J. Chemerin Impairs In Vitro Testosterone Production, Sperm Motility, and Fertility in Chicken: Possible Involvement of Its Receptor CMKLR1. *Cells*. 2020 Jul 1;9(7):1599. doi: 10.3390/cells9071599. PMID: 32630345; PMCID: PMC7408590.
- Mellouk N, Ramé C, Barbe A, Grandhaye J, Froment P, Dupont J. Chicken Is a Useful Model to Investigate the Role of Adipokines in Metabolic and Reproductive Diseases. *Int J Endocrinol*. 2018 Jun 19;2018:4579734. doi: 10.1155/2018/4579734. PMID: 30018639; PMCID: PMC6029501.
- Kullu SS, Das A, Bajpai SK, Garg AK, Yogi RK, Saini M, Sharma AK. Egg production performance, egg yolk antioxidant profile and excreta concentration of corticosterone in golden pheasants (*Chrysolophus pictus*) fed diets containing different levels of green vegetables. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2017 Oct;101(5):e31-e42. doi: 10.1111/jpn.12555. Epub 2016 Nov 9. PMID: 27862403.
- Gugała D, Flis M, Grela ER. The effect of zinc, iron, calcium, and copper from organic sources in pheasant diet on the performance, hatching, minerals, and fatty acid composition of eggs. *Poult Sci*. 2019 Oct 1;98(10):4640-4647. doi: 10.3382/ps/pez162. PMID: 30980072.
- Estienne A, Brossaud A, Reverchon M, Ramé C, Froment P, Dupont J. Adipokines Expression and Effects in Oocyte Maturation, Fertilization and Early Embryo Development: Lessons from Mammals and Birds. *Int J Mol Sci*. 2020 May 19;21(10):3581. doi: 10.3390/ijms21103581. PMID: 32438614; PMCID: PMC7279299.
- Wyburn GM, Johnston HS, Draper MH, Davidson MF. The fine structure of the infundibulum and magnum of the oviduct of *Gallus domesticus*. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*. 1970 Jul;55(3):213-32. doi: 10.1113/expphysiol.1970.sp002071. PMID: 5201499.

Figure 1. Données morphométriques et paramètres de reproduction des poules faisanes de la lignée F11 et F22

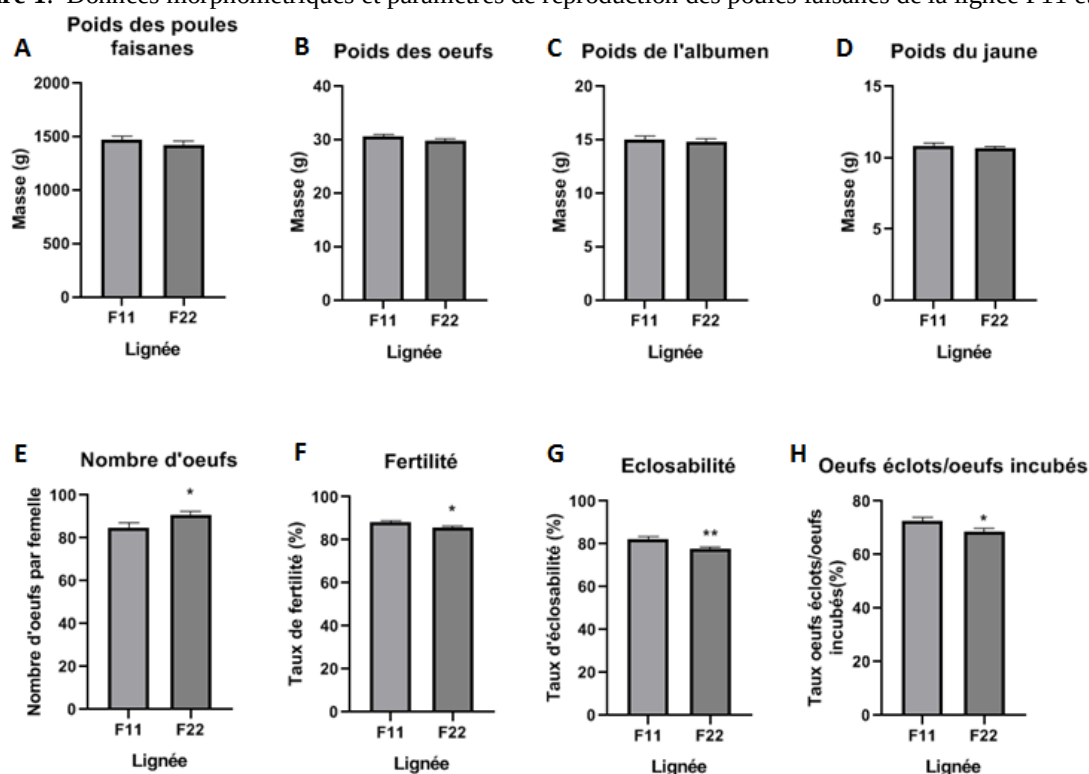


Tableau 1. Expression du système chémérine dans le tractus reproducteur des poules faisanes

Partie de l'oviducte	Infundibulum	Magnum	Isthmus	Uterus	Vagin
Chémérine (ARNm)	4,258±2,034	8,923±5,278	2,478±0,7858	9,178±2,388	5,483±3,843
GPR1 (ARNm)	906,9±172,5 ^a	456,1±200,1 ^a	484,1±67,69 ^a	2038±354,3 ^b	978,0±358,0 ^{ab}
Chémérine (protéine)	0,08927 ± 0.007 ^a	0,1773±0.03 ^b	0,08516±0.01 ^a	0,07623±0.01 ^a	0,05719±0.005 ^a

Tableau 2. Comparaison des lignées de poules faisanes F11 et F22 en termes de production de chémérine dans l'œuf

Lignée	F11	F22	P value
Chémérine dans le magnum	0,2952 ± 0.03	0,2063 ± 0.01	* (p=0.043)
Chémérine dans l'albumen	0,007857 ± 0.001	0,002424 ± 0.0004	**** (p<0,0001)