

MODIFICATIONS MOLECULAIRES ET HISTOLOGIQUES ASSOCIEES A DES MYOPATHIES DU MUSCLE DU FILET CHEZ LE POULET DE CHAIR

**Pampouille Eva^{1,2}, Hennequet-Antier Christelle¹, Juanchich Amélie¹, Brionne Aurélien¹,
Bordeau Thierry¹, Banville Maxime², Godet Estelle¹, Praud Christophe¹, Le Bihan-
Duval Elisabeth¹, Berri Cécile¹**

¹BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France,
²HUBBARD SAS, Mauguérand, 22800 le Foeil-Quintin, France

eva.pampouille@inra.fr

RÉSUMÉ

Depuis près de 10 ans, la filière avicole est confrontée à des myopathies observées essentiellement sur le filet des poulets de chair, telles que le white striping (WS) et le wooden breast (WB). Bien que des études antérieures aient démontré un lien défavorable avec la croissance et le rendement en filet des poulets, l'étiologie de ces défauts reste mal comprise. Afin de progresser dans la compréhension des modifications structurales et des acteurs moléculaires impliqués dans ces pathologies musculaires, une analyse transcriptomique sur puce poulet Agilent 8×60K ainsi que des études histologiques ont été mises en œuvre. L'étude a porté sur des muscles *Pectoralis major* issus de trois groupes : animaux à croissance lente (CL, n=8), animaux à croissance rapide visuellement indemnes de défauts (CR-C, n=6) ou sévèrement atteints par les deux types de défauts (CR-WSWB, n=7). La mesure du dépôt de collagène et de tissu adipeux par co-marquage immunohistochimique a montré une extension du tissu conjonctif ainsi que du tissu adipeux dans les muscles d'animaux à CR, et a permis d'affiner l'évaluation visuelle de la sévérité des défauts. L'analyse différentielle a mis en évidence un total de 10482 gènes différentiellement exprimés entre les trois groupes. L'enrichissement fonctionnel par « Gene Ontology » suggère qu'une altération du métabolisme énergétique, ainsi que du stress oxydatif a accompagné les variations de croissance et participé à l'apparition progressive des défauts WS et WB. Ce portrait moléculaire et histologique permet d'émettre des hypothèses quant aux mécanismes sous-jacents aux défauts WS et WB, et facilitera l'identification future des gènes et mutations impliqués pour limiter à terme l'apparition de ces défauts musculaires grâce à la sélection.

ABSTRACT

Molecular and histological changes associated with myopathies in broiler breast muscle

For nearly a decade now, the poultry industry has witnessed an increasing prevalence of broiler breast myopathies such as white striping (WS) and wooden breast (WB). Although previous studies have demonstrated unfavorable relationships with growth and breast muscle yield, the etiology of these defects remains poorly understood. To progress in the understanding of the structural changes and the molecular actors involved in these myopathies, a transcriptomic analysis using an 8×60K Agilent chicken microarray as well as an histological study have been performed. *Pectoralis major* muscles from three groups were compared: slow-growing animals (CL, n=8), fast-growing animals visually free from defects (CR-C, n=6), or animals severely affected by both WS and WB (CR-WSWB, n=7). The measurement of collagen and adipose tissue deposition by immunohistochemical co-labeling showed an extension of the connective tissue as well as adipose tissue in CR muscles, and allowed to refine the visual assessment of the defects severity. Differential analysis revealed 10,482 genes differentially expressed between the three groups. Genes clustering by "Gene Ontology" of biological processes suggests that alterations in energy metabolism, as well as oxidative stress, were associated with growth variations and contributed to the gradual establishment of WS and WB defects. This molecular and histological portrait makes it possible to hypothesize the mechanisms underlying the WS and WB defects, and will facilitate the future identification of the genes and mutations involved to limit the occurrence of these muscular defects by selection.

INTRODUCTION

La filière avicole repose en grande partie sur la production de poulets à croissance rapide, abattus à des poids élevés et destinés aux filières de découpe et de transformation. Celles-ci sont actuellement confrontées à la présence fréquente de défauts musculaires tels que le white striping (WS), caractérisé par des stries blanches parallèles aux fibres musculaires sur le muscle, et le wooden breast (WB), caractérisé par un muscle dur, visqueux et bombé (Kuttappan et al., 2016). Les conséquences de ces défauts sur la qualité de la viande sont multiples : altération de l'apparence du filet affectant l'acte d'achat par le consommateur (Kuttappan et al., 2012), modification de la valeur nutritionnelle de la viande et rendement technologique plus faible (Kuttappan et al., 2016). Ainsi, les viandes présentant ces défauts ne peuvent être vendues en frais et sont rétrogradées en mince pour la transformation (Lorenzi et al., 2014). Même s'il est clairement démontré que la fréquence et la gravité des défauts augmentent avec la croissance et le rendement en filet des animaux (Kuttappan et al., 2013 ; Russo et al., 2015), leur étiologie précise reste mal comprise. L'existence d'une base génétique du WS et du WB a été récemment démontrée (Bailey et al., 2015 ; Alnahhas et al., 2016) et des premières régions QTL de WS ont été identifiées (Pampouille et al., 2018). La sélection apparaît donc comme un levier possible pour réduire l'incidence des défauts musculaires du poulet, et pourrait bénéficier de l'identification des gènes (puis des mutations) impliqués. Notre étude visait à comparer les modifications histologiques ainsi que les profils d'expression génique de muscle *Pectoralis major* issus d'une lignée de poulet à croissance lente (CL) et d'une lignée à croissance rapide, sévèrement affectés par les défauts WS et WB (CR-WSWB) ou non (CR-C).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux, collecte d'échantillons et mesures de qualité de la viande

L'étude a été réalisée sur le muscle *Pectoralis major* de deux génotypes de poulet : une lignée expérimentale de poulets à croissance lente (CL) maintenue à l'INRA, et une lignée commerciale à croissance rapide (CR) sélectionnée pour la croissance et le rendement en filet. Les animaux des deux lignées ont eu accès à l'alimentation et à l'eau *ad libitum* et ont été abattus à l'âge de 6 semaines à l'unité expérimentale PEAT (INRA, Centre Val de Loire, Nouzilly, France). Des échantillons de *Pectoralis major* (gauche) ont été prélevés quinze minutes après l'abattage et directement congelés dans de l'azote liquide pour l'analyse moléculaire, ou bien dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide pour les analyses

histologiques, puis conservés à -80°C. Un jour après l'abattage, les muscles *Pectoralis major* droits ont été visuellement évalués pour classer les défauts WS et WB selon une échelle validée en trois points : 0 = absence de défauts, 1 = muscle modérément atteint et 2 = muscle sévèrement atteint. Chez les animaux CR, 2 groupes ont été constitués : un groupe contrôle CR-C (n=6) lorsque le muscle était visuellement indemne de défauts (WS=0, WB=0) et un groupe affecté CR-WSWB (n=7) lorsque le muscle présentait la forme sévère des deux défauts (WS=2, WB=2). Huit animaux supplémentaires de la lignée CL, indemne de tout défaut, ont été considérés pour l'analyse transcriptomique et la caractérisation histologique fine des muscles. La prise en compte dans le plan expérimental d'une lignée à croissance lente visait à mieux comprendre les modifications biologiques associées à la sélection sur le poids et le développement musculaire qui ont accompagné la mise en place des myopathies au sein des animaux à croissance rapide.

1.2. Immunohistochimie

Des sections transversales de muscle *Pectoralis major* de dix micromètres ont été réalisées pour l'ensemble des échantillons. Un co-marquage collagène VI-bodipy a été réalisé, permettant de quantifier respectivement l'extension des tissus conjonctifs et des tissus adipeux. Les sections transversales ont d'abord été fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4%. Ensuite, elles ont été incubées avec du sérum de chèvre à 10% puis avec un anticorps primaire dilué au 1/200 dirigé contre le collagène VI. Après lavage dans un tampon phosphate (PBS), les lames ont été incubées avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Cy2 dilué au 1/500 puis avec le bodipy 493/503 dilué au 1/3000. Les lames ont été montées au moviol. Six images ont été prises par échantillon à un grossissement de 10X afin d'être représentatives de la section transversale. La quantification du collagène VI et du bodipy a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ 1.50i (National Institute of Health, USA).

1.3. Analyse d'expression différentielle

L'ARN total a été extrait à partir d'échantillons de muscle *Pectoralis major* à l'aide du kit RNeasy® Mini (Qiagen, Valencia, CA, USA). Les profils transcriptomiques des muscles ont été obtenus à l'aide d'une puce poulet Agilent 8×60K. Le marquage des ARN et le traitement des puces à ADN ont été effectués par la plateforme @BRIDGe (INRA, UMR GABI, Jouy-en-Josas).

L'analyse différentielle a été réalisée à l'aide d'un modèle linéaire pour identifier les gènes différentiellement exprimés (DE) entre toutes les comparaisons deux à deux des trois groupes d'animaux (Ritchie et al., 2015). Les p-values ont été ajustées pour les tests multiples (Benjamini et

Hochberg, 1995). Les gènes ont été considérés DE si la p-value ajustée était $\leq 0,05$, et un différentiel (fold-change : |FC|) $\geq 1,2$ entre groupes a été appliqué. Les résultats de microarray ont été validés sur un set de 16 gènes par PCR quantitative (données non présentées).

1.4. Annotation fonctionnelle et test d'enrichissement

Une classification hiérarchique ascendante de l'expression standardisée des gènes DE dans au moins une des comparaisons a été construite sur la base d'une corrélation de Pearson et d'une distance d'agrégation de lien moyen. Une coupure dynamique du dendrogramme (package R `dynamicTreeCut` avec les paramètres `deepSplit = 1` et `minClusterSize = 300`) a été appliquée pour identifier des clusters de gènes DE présentant des profils d'expression similaires entre les trois groupes (CR-C, CR-WSWB et CL). L'ensemble des gènes exprimés sur la puce ont été annotés par « Gene Ontology » (Ashburner et al., 2000 ; The Gene Ontology Consortium, 2017) en processus biologiques à partir des identifiants poulet EntrezGene (taxid : 9031) et d'orthologues d'espèces bien annotés. Les tests d'enrichissement ont été réalisés pour chaque cluster indépendamment à l'aide d'un test exact de Fisher (p-value < 0.01) et de l'algorithme « elim » implémenté dans le package R `topGO` (Alexa et al., 2006).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les analyses histologiques réalisées dans cette étude avaient pour objectif un phénotypage fin et quantitatif des défauts, en complément des observations visuelles réalisées sur filets frais. Il est maintenant bien établi que les muscles atteints de WS et de WB présentent une extension anormale des tissus conjonctifs et adipeux, associée à des processus de nécrose et de régénération des fibres musculaires (Silhvo et al., 2014 ; Kuttappan et al., 2016). Dans notre étude, le pourcentage de la surface totale occupée par le collagène VI (représentatif de la fibrose) sur le champ microscopique était plus élevé chez les animaux CR que chez les animaux CL (Figure 1). De plus, l'extension des tissus conjonctifs endomysial et pérимysial était 1,6 fois plus importante dans les muscles CR-WSWB par rapport aux muscles CR-C. Par ailleurs, les muscles CR-WSWB se caractérisaient par une quantité de tissu adipeux (exprimée en pourcentage de la surface totale occupée par le bodipy) trois fois plus élevée que les muscles CR-C, la quantité de tissu adipeux intramusculaire étant quasi nulle dans les muscles CL. Nos résultats indiquent donc une modification des caractéristiques histologiques des muscles avec la sélection sur la croissance et la mise en place de phénomènes de fibrose et d'adipose exacerbés en cas de défauts sévères.

L'analyse différentielle a révélé 10482 gènes DE dans au moins une des trois comparaisons. Parmi eux, 6725

gènes étaient différentiels entre CL et CR-C, 7887 entre CR-C et CR-WSWB et 9608 entre CL et CR-WSWB. Six clusters de gènes DE présentant un profil similaire d'expression ont été identifiés (Figure 2). Les tests d'enrichissement réalisés indépendamment pour chaque cluster mettent en évidence 267 termes GO enrichis dans au moins un cluster.

Les clusters 1 et 4, qui représentaient 12% des gènes DE, permettent de distinguer les muscles CL et CR (indépendamment de la présence des défauts) (Figure 2). Les fonctions enrichies dans ces clusters étaient essentiellement liées à des processus métaboliques (protéine, glycogène, acide nucléique), au système immunitaire ou à la transduction du signal.

79% du total des gènes DE était réparti dans 2 clusters majoritaires, à la fois associés aux variations de croissance et à l'apparition des défauts. Ainsi, pour les 5168 gènes DE du cluster 2, on observe une diminution de l'expression entre les groupes CL, CR-C et CR-WSWB et à l'inverse, une augmentation graduelle de l'expression entre les trois mêmes groupes pour les 3117 gènes DE du cluster 5. L'analyse fonctionnelle de ces clusters montre un enrichissement significatif en processus métaboliques tels que la respiration cellulaire et la synthèse d'ATP couplée au transport d'électron dans le cluster 2, dont l'expression des gènes diminue avec la sévérité du défaut. De nombreuses enzymes glycolytiques (*PKFM*, *GAPDH*, *ENO3*, *PGKI*, *PKM*, *ALDOB*, *PGAM1*, *TP11*) sont également présentes dans le cluster 2. Le cluster 5 présente quant à lui un enrichissement de plusieurs fonctions dont 1) la synthèse de collagène et le stockage des lipides, qui sont les caractéristiques principales des défauts, 2) la réponse inflammatoire et l'activation du système immunitaire ainsi que la mort cellulaire, participant à la dégénérescence et la régénération du muscle, 3) l'assemblage des fibres de stress et l'organisation du cytosquelette d'actine, 4) le métabolisme des glucides, et enfin 5) la production d'anion superoxyde O_2^- impliqué dans le stress oxydatif. De nombreux gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif étaient surexprimés dans les muscles CR-WSWB (*ARNT*, *HIF1- α* , *GPX8*, *ALDOC*, *CRYAB*), y compris certaines protéines de choc thermique (*HSBP1*, *HSPA5*, *HSF2*, *HSPB7* et *HSPH1*), connues pour augmenter considérablement pendant le stress oxydatif. Les fonctions enrichies dans ces deux clusters indiquent donc qu'une réorientation des voies de production et d'utilisation des glucides à des fins énergétiques ainsi qu'une induction d'un stress oxydatif ont accompagné la croissance musculaire et la mise en place des défauts.

Enfin, 9% du total des gènes DE apparaissent spécifiques des défauts sévères et étaient soit surexprimés dans le groupe CR-WSWB par rapport aux deux autres groupes (pour le cluster 6) ou à l'inverse sous-exprimés (pour le cluster 3). L'analyse du cluster 6 montre un enrichissement des fonctions liées à la synthèse de glycosaminoglycans et de

protéoglycanes, au développement du système nerveux, à la réorganisation du cytosquelette d'actine ainsi qu'au transport de l'oxygène. Le cluster 3 quant à lui présente peu de fonctions enrichies, si ce n'est la fonction liée à la régulation de la réponse au stress oxydatif.

Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une réorientation des réserves glucidiques du muscle vers le métabolisme des sucres nucléotidiques et donc la synthèse de glycosaminoglycanes et de protéoglycanes, au détriment de la glycolyse et de la synthèse du glycogène dans les muscles affectés. Ceci permettrait de combattre le stress oxydatif induit dans ces muscles mais entraînerait un remodelage excessif de la matrice extracellulaire.

CONCLUSION

Au travers des approches histologique et génomique réalisées, cette étude a permis de dresser un tableau des modifications métaboliques et structurales associées aux variations de croissance musculaire et à l'établissement des défauts WS et WB chez le poulet.

Elle met en évidence de nombreux gènes impliqués, dont l'intérêt pour la prédiction et la sélection reste à affiner. Ainsi, une approche complémentaire visant à étudier les relations entre niveaux d'expression génique et phénotypes quantitatifs histologiques par une approche de type WGCNA (Weighted Correlation Network Analysis) va être réalisée. L'intégration de données génétiques (QTL, séquençage) permettra par ailleurs d'identifier des candidats à la fois expressionnels et positionnels, dont le polymorphisme pourrait être d'intérêt pour des applications en sélection.

REMERCIEMENTS

L'étude s'insère dans le cadre du projet TECNOVIA financé par les régions Bretagne et Pays de la Loire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alexa A., Rahnenführer J., Lengauer T., 2006. *Bioinformatics*, 22(13), 1600-1607.
- Alnahhas N., Berri C., Chabault M., Chartrin P., Boulay M., Bourin M.C., Le Bihan-Duval E., 2016. *BMC Genet.*, (17), 61.
- Ashburner M., Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G, 2000. *Nat Genet*, 25(1), 25-34.
- Bailey R.A., Watson K.A., Bilgili S.F., Avendano S., 2015. *Poult. Sci.*, 94(12), 2870-2879.
- Benjamini Y. and Hochberg Y., 1995. *J. R. Statist. Soc.B*, 57(1), 289-300.
- Kuttappan V.A., Lee Y.S., Erf G.F., Meullenet J.F.C., Mac Kee S.R., Owens C.M., 2012. *Poult. Sci.*, 91(5), 1240-1247.
- Kuttappan V.A., Brewer V.B., Mauromoustakos A., McKee S.R., Emmert J.L., Meullenet J.F., Owens C.M., 2013. *Poult. Sci.*, 92(3), 811-819.
- Kuttappan V.A., Hargis B.M., Owens C.M., 2016. *Poult. Sci.*, 95(11), 2724-2733.
- Lorenzi M., Mudalal S., Cavani C., Petracci M., 2014. *J. Appl. Poult. Res.*, (23), 754-758.
- Pampouille E., Berri C., Boitard S., Hennequet-Antier C., Beauclercq S., Godet E., Praud C., Jegou Y., Le Bihan-Duval E., 2018. *BMC Genomics*, (19), 202.
- Ritchie M.E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C.W., Shi W., Smyth G.K., 2015. *Nucleic Acids Res*, 43(7), e47.
- Russo E., Drigo M., Longoni C., Pezzotti R., Fasoli P., Recordati C., 2015. *Poult. Sci.*, 94(8), 1843-1848.
- Sihvo H.K., Immonen K., Puolanne E., 2014. *Vet. Pathol.*, 51(3), 619-623.
- The Gene Ontology Consortium, 2017, *NAR*, (45), 331-338

Figure 1. Co-marquage collagène VI-bodipy 493/503 des muscles *Pectoralis major* CL (A), CR-C (B) et CR-WSWB (C). Échelle : 100µm. Surface occupée sur le champ microscopique par le collagène VI (D) et le bodipy (E) pour chaque groupe.

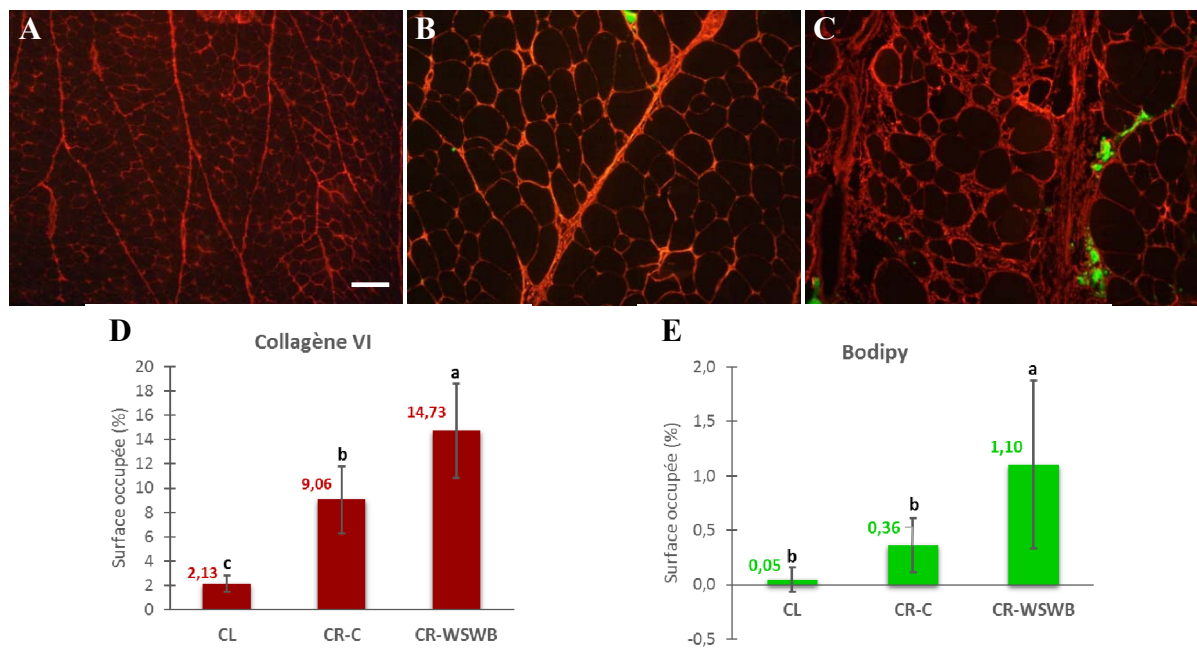


Figure 2. Heatmap et profils moyens d'expression des gènes DE regroupés en cluster pour les muscles CL, CR-C et CR-WSWB.

