

TRANSCRIPTOME DE LA COMPLÉMENTARITÉ DES FONCTIONS ENTRE LE GÉSIER ET LA JONCTION GASTRO-DUODENALE CHEZ LE POULET DE CHAIR

Juanchich Amélie^{1*}, Hennequet-Antier Christelle^{1*}, Cabau Cédric², Le Bihan-Duval Elisabeth¹, Duclos Michel J.¹, Mignon-Grasteau Sandrine¹, Narcy Agnès¹

¹BOA, INRA, Université de Tours, 37380, Nouzilly, France

²INRA, SIGENAE, GenPhySE, 31326, Castanet-Tolosan, France

* Contribution équivalente
amelie.juanchich@inra.fr

RÉSUMÉ

La capacité des poulets à digérer des matières premières variées est un des éléments clés de la durabilité des élevages avicoles. Gésier et intestin doivent fonctionner de façon concertée et synchronisée pour optimiser l'efficacité digestive. Les ARNs de gésier et de la jonction gastro-duodénale ont été séquencés pour 20 individus (10 EMAn⁺ et 10 EMAn⁻) issus d'un croisement F2 entre 2 lignées divergentes pour leur efficacité digestive et nourris avec un régime peu digestible. Les analyses statistiques des données de comptage RNA-seq n'ont pas permis d'identifier de gènes différentiellement exprimés entre les deux groupes EMAn⁺ et EMAn⁻, quel que soit le tissu malgré les différences phénotypiques observées. Ceci s'explique par une variabilité individuelle importante, notamment au sein de la population EMAn⁻. Pour lever ce verrou, nous avons développé une approche originale d'analyse fonctionnelle qui consiste à comparer de manière indirecte les réponses des deux groupes. Nous avons tout d'abord établi, pour chacun des groupes, une liste de gènes différentiellement exprimés entre le gésier et la jonction gastro-duodénale afin d'étudier la complémentarité des fonctions. Nous avons ensuite comparé ces deux listes. Au total, 8390 gènes sont différentiellement exprimés entre ces deux tissus chez les individus EMAn⁺, et 8402 chez les individus EMAn⁻. Parmi ces gènes, 1337 sont spécifiques des individus EMAn⁺ et 1349 des individus EMAn⁻. L'analyse fonctionnelle par « Gene Ontology » des listes de gènes spécifiques montre un enrichissement significatif en gènes impliqués dans la différenciation des cellules de support aux neurones chez les individus EMAn⁺, garants de la bonne communication entre cellules. De façon intéressante, le terme « Response to food » est enrichi chez les individus EMAn⁻, qui sont plus sensibles à la qualité de l'aliment. Cette analyse fournit une vision globale de l'impact de la sélection sur la complémentarité de fonctions entre gésier et intestin des poulets de chair, balance essentielle pour une digestion efficace.

ABSTRACT

Transcriptomic analysis of complementary functions between gizzard and gastro-duodenal junction in broiler

The ability of chickens to digest various raw materials is one of the key elements in the sustainability of poultry operations. Gizzard and intestine must work in a concerted and synchronized manner to optimize the efficiency of digestion. RNAs from the gizzard and the gastro-duodenal junction were sequenced from 20 individuals (10 AMEn⁺ and 10 AMEn⁻) from an F2 cross between two divergent lines selected for their digestive efficiency and fed with a hard to digest diet. Statistical analyzes of RNA-seq data failed to identify differentially expressed genes between the two AMEn⁺ and AMEn⁻ groups, regardless of the tissue, despite the observed phenotypic differences. This is explained by a significant individual variability, especially within the AMEn⁻ population. To remove this lock, we have developed an original approach that involves indirectly comparing the responses provided by the groups. Thus, we compared together the two lists of genes differentially expressed between gizzard and gastro-duodenal junction for each group in order to study the complementarity between the functions. In total, 8,390 genes are differentially expressed between these two tissues in AMEn⁺ individuals, and 8402 in AMEn⁻ individuals. Among these genes, 1337 are specific to AMEn⁺ individuals and 1349 to AMEn⁻ individuals. Functional analysis using Gene Ontology of the specific gene lists shows a significant enrichment of the genes involved in the differentiation of neuronal support cells in AMEn⁺ individuals, thus ensuring good inter-cellular communication. It is interesting to note that the term "Response to Food" is being enriched in AMEn⁻ individuals, who are more sensitive to food quality. This analysis provides an overview of the complementarity of functions that influence the gizzard / gut balance of broilers, essential for effective digestion.

INTRODUCTION

Alors que la sélection avicole a jusqu'ici privilégié des animaux très performants mais aussi très exigeants en ressources alimentaires de qualité et nécessitant un élevage dans un environnement optimisé, l'évolution vers des systèmes d'élevage limitant les intrants (notamment alimentaires) implique la recherche d'animaux résilients face à des conditions changeantes et parfois peu favorables. Ceci passe par une meilleure prise en compte dans les schémas de sélection avicoles de l'équilibre entre production et capacités d'adaptation des animaux, au travers de critères tels que l'efficacité digestive. L'identification des gènes et réseaux de gènes impliqués dans la fonction digestive est un prérequis à la compréhension de cette fonction biologique complexe. Elle peut faciliter sa prise en compte en sélection au travers de l'identification de marqueurs génétiques ou de biomarqueurs de l'efficacité alimentaire. Ceux-ci seront aussi utilisables pour l'évaluation de nouveaux systèmes d'élevage ou d'alimentation.

L'objectif du projet ADIGEN (Améliorer la Digestion par la GENétique) était donc d'identifier les gènes impliqués dans la digestion en caractérisant le transcriptome de différents compartiments du tractus digestif des poulets de chair (Juanchich et al., 2018). Gésier et intestin doivent fonctionner de façon concertée et synchronisée pour optimiser l'efficacité digestive. Les gènes sous-tendant les fonctions qui permettent d'assurer la complémentarité entre ces deux segments ont donc été étudiés. Le projet a approfondi la caractérisation de deux lignées de poulets sélectionnées de façon divergente sur leur capacité à digérer le blé (Mignon-Grasteau et al., 2004) et qui présentent des variations marquées de la morphologie et l'histologie au niveau de ces compartiments (Rideau *et al.* 2014).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Extraction ARNs et séquençage

Des poulets de chair issus d'un croisement de seconde génération (F2) entre 2 lignées de poulets bon digesteurs (D+) ou mauvais digesteurs (D-) ont été élevés au sol pendant 10 jours, puis en cages individuelles pour permettre la mesure de l'efficacité digestive au travers du critère d'EMAn (Energie Métabolisable pour un bilan Azoté nul). Les animaux grand-parentaux D+ et D- étaient issus de la 8^{ème} génération de sélection (Mignon-Grasteau et al., 2015). Tout au long de l'expérience, les oiseaux ont été nourris avec un régime contenant 52.5% de blé Rialto, 3110 kcal/kg MS et 21.1% de CP, similaire à celui utilisé lors de la sélection. Cette variété de blé a été choisie car elle est très dure et visqueuse, et donc particulièrement difficile à digérer. Le bilan digestif a

été réalisé entre 20 et 23 jours par collecte totale des fientes, selon le protocole décrit par Mignon-Grasteau et al. (2015). L'expression des gènes de 2 tissus clés de la fonction digestive a été étudiée : le gésier (G) pour son activité de broyage et pré-digestion et la jonction gastro-duodénale (GD) pour sa fonction de régulation de la motilité, des activités de sécrétion et de la trophicité du tractus digestif. Les 2 tissus d'intérêt ont été prélevés à l'issue du bilan digestif chez 20 individus F2 sélectionnés sur la base de leur forte efficacité digestive (10 EMAn⁺, $\mu=3509 (\pm 159)$ kcal/kg MS) ou leur faible efficacité digestive (10 EMAn⁻, $\mu=2818 (\pm 251)$ kcal/kg MS). Les animaux ont été mis à jeun pendant 9h30 puis réalimentés pendant 2h30 avant les prélèvements. Les tissus ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Les ARNs totaux des 2 tissus ont été extraits avec le kit RNeasy Mini (QIAGEN). Les 40 échantillons d'ARNs ont été séquencés en 2x150 pb en « paired-end » sur HiSeq2500 (plateforme GeT-PlaGe, Toulouse) en multiplexant 20 échantillons par ligne selon le protocole classique de séquençage Illumina.

1.2. Analyses bioinformatique et biostatistique

Les lectures ont été alignées sur la version 4 du génome du poulet (Galgal4) avec l'outil TopHat2, les gènes ont été assemblés avec STAR (Ensembl version 84) puis quantifiés au niveau gène avec featureCounts (paramètres par défaut pour les différents outils). Afin d'identifier des gènes impliqués dans la digestion, plusieurs analyses différentielles ont été réalisées avec le paquet R/Bioconductor EdgeR (McCarthy et al., 2012). Au préalable, les comptages bruts ont été normalisés pour prendre en compte la taille et des spécificités éventuelles des banques de séquences produites en utilisant la méthode trimmed mean of M-values selon les recommandations de Dillies et al. (2013).

Identification des gènes différentiellement exprimés (DE) entre groupes et tissus

Pour chaque gène, un modèle linéaire généralisé a été ajusté sur l'ensemble des données afin d'étudier les effets tissu (G, GD), groupe (EMAn⁻, EMAn⁺) et l'interaction tissu x groupe. Des tests de rapport de vraisemblance portant sur l'ensemble des effets, y compris l'interaction, ont été réalisés. Un gène est déclaré DE lorsque la p-valeur ajustée est inférieure à 0,05 après la correction de Benjamini-Hochberg (BH) qui permet un contrôle du taux de faux positifs dans le contexte de tests multiples (Benjamini and Hochberg 1995).

Identification des gènes DE entre les groupes, intra-tissu

Au sein de chaque tissu, une analyse différentielle a été effectuée afin d'identifier les gènes

DE entre les groupes EMAN⁺ et EMAN⁻. Un modèle linéaire généralisé a été ajusté avec un effet du groupe. Un test de rapport de vraisemblance portant sur la différence d'expression des gènes entre EMAN⁺ et EMAN⁻ au sein de chaque tissu a été réalisé. Un gène est déclaré DE lorsque la p-valeur ajustée est inférieure à 0,05 après la correction BH.

Identification des gènes DE entre les tissus, intra-groupe

Au sein de chaque groupe, une analyse différentielle a été effectuée afin d'identifier les gènes DE entre la jonction gastro-duodénale (GD) et le gésier (G). Un modèle linéaire généralisé a été ajusté avec un effet du tissu et un effet animal puisque les échantillons G et GD sont prélevés au sein du même animal. Pour identifier les gènes DE entre GD et G, un test de rapport de vraisemblance a été réalisé. Un gène est déclaré DE lorsque la p-valeur ajustée est inférieure à 0,05 après la correction BH.

1.3. Enrichissement fonctionnel

Nous avons utilisé une chaîne de traitement développée en langage R dans l'unité UMR BOA, afin d'identifier et hiérarchiser des fonctions enrichies entre GD et G, au sein des individus EMAN⁻ et EMAN⁺. Les gènes ont été annotés grâce à la « Gene Ontology (GO) » pour la catégorie Processus Biologique (BP) (Ashburner et al., 2000 ; The Gene Ontology Consortium, 2017). L'enrichissement fonctionnel des listes de gènes d'intérêt par rapport à la référence constituée des gènes exprimés a été déterminé grâce à un test exact de Fisher ($p < 0,01$).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Malgré les différences phénotypiques observées, les analyses statistiques des données de comptage RNA-seq n'ont pas permis d'identifier de gènes DE entre les deux groupes, que ce soit dans le modèle d'interaction ou le modèle intra-tissu. Ceci s'explique notamment par une variabilité individuelle importante au sein du groupe d'individus EMAN⁻, dont le coefficient de variation pour le caractère était de 9,33 contre 4,29 dans le groupe EMAN⁺.

Pour lever ce verrou, nous avons développé une approche originale d'analyse fonctionnelle qui consiste à comparer de manière indirecte les réponses exprimées par les deux groupes. Ainsi, nous avons comparé ensemble les deux listes de gènes DE entre les tissus GD et G pour chacun des groupes afin d'étudier la complémentarité des fonctions (analyse RNA-seq intra-lignée). Au total, 14470 et 14270 gènes sont exprimés chez les individus EMAN⁺ et EMAN⁻, respectivement. Parmi ces gènes exprimés, 8390 et 8402 sont différenciellement exprimés entre le

gésier et la jonction gastro-duodénale chez les individus EMAN⁺ et EMAN⁻, respectivement. Parmi ces gènes, 1337 sont uniquement DE chez les individus EMAN⁺ et 1349 chez les individus EMAN⁻ (figure 1). Un gène présente un profil particulier (LOC101751390) : il est sur-exprimé dans la jonction gastro-duodénale par rapport au gésier des individus EMAN⁺ alors qu'il est sous-exprimé chez les individus EMAN⁻ (figure 1). Malheureusement, ce gène n'est pas très bien caractérisé, ni annoté. En conclusion, les deux groupes présentent des différences d'expression pour 2687 gènes.

Pour caractériser ces différences, nous avons annoté d'un point de vue fonctionnel ces gènes et analysé les fonctions spécifiques de chaque groupe. Pour chaque liste, environ la moitié des gènes (613/1337 et 721/1349 respectivement) possèdent au moins une annotation GO dans la catégorie BP. L'analyse fonctionnelle par « Gene Ontology » des listes de gènes spécifiques montrent un enrichissement pour 21 termes GO pour la liste EMAN⁺ et 71 termes GO pour la liste EMAN⁻. Ces termes sont spécifiques de chacune des listes. Chez les individus EMAN⁺, 3 groupes fonctionnels de termes GO sont mis en évidence : développement et différenciation des astrocytes, métabolisme des acides gras et catabolisme de l'ADN (table 1). Les astrocytes sont des cellules de support aux neurones garants de la bonne communication entre cellules et organes. L'enrichissement significatif de cette fonction chez les EMAN⁺ est à mettre en relation avec les différences de transit précédemment observées entre les lignées D⁺ et D⁻ (Rougière et al., 2010). Les animaux de la lignée D⁺ étaient caractérisés par un temps de rétention plus long au niveau du gésier par rapport aux D⁻. De plus, un défaut de régulation de la motilité du gésier chez les D⁻ a été mise en évidence lié plus particulièrement à la phase de relaxation de l'organe. Par ailleurs, le métabolisme des acides gras (table 1) est fortement représenté (12 termes sur 21) pour les individus EMAN⁺. Parmi les gènes identifiés dans cette fonction, on retrouve notamment PPARD, ACAA1, ACOX3, ACADL, PHYH et DECR1 dont les fonctions sont bien caractérisées (Schulz H, 1991). Ils sont impliqués dans le métabolisme des acides gras, et plus spécifiquement dans la bêta-oxydation de ces derniers. Ceci témoigne d'un contrôle exacerbé des dépenses énergétiques chez les EMAN⁺ au niveau du gésier, pouvant être lié à la taille de l'organe dont le développement est reconnu pour être plus important chez les animaux de la lignée D⁺ par rapport aux D⁻ (de Verdall et al., 2011).

Chez les individus EMAN⁻, 4 groupes fonctionnels sont clairement identifiables : organisation des microtubules, métabolisme des protéines, régulation de l'expression des gènes et réponses aux stimuli externes (table 1). Une régulation importante de l'expression des gènes et du métabolisme des protéines est mise en évidence chez les individus

EMAn⁻ (respectivement 24 et 34 termes sur les 71 termes GO enrichis). L'organisation des microtubules est aussi impactée chez les individus EMAn⁻. Ce sont des fonctions basiques du métabolisme cellulaire qui semblent être dérégulées chez les individus EMAn⁻. De plus et de façon très intéressante, le terme « Response to food » dans le groupe fonctionnel « Réponses aux stimuli externes » (tableau 1) est enrichi chez les individus EMAn⁻ (p=0,0056). Les gènes qui supportent cet enrichissement sont notamment *SLC16A1*, *LEPR* et *BBS2*, connus pour leur rôle dans la signalisation suite à la prise alimentaire. Ce résultat est cohérent avec de précédentes observations qui montraient que les individus EMAn⁻ étaient plus sensibles à la qualité de l'aliment que les individus EMAn⁺ et répondaient de manière plus hétérogène à des variations de qualité de l'aliment (Mignon-Grasteau et al., 2004).

CONCLUSION

Cette analyse fonctionnelle des profils d'expression génique au niveau du gésier et de la jonction gastro-duodénale a permis de mettre en évidence des réponses spécifiques à chacune des lignées. Elles concernent par exemple des processus biologiques liés à la régulation nerveuse ou au métabolisme en réponse à l'alimentation. Ce travail servira de ressource pour les futures études destinées à mieux comprendre d'une part le contrôle génétique de la réponse de l'animal aux variations alimentaires et d'autre part, les mécanismes physiologiques sous-jacents. L'identification de leviers génétiques et/ou alimentaires dans ce cadre contribuera à développer des stratégies d'amélioration de l'utilisation des ressources alimentaires par le poulet de chair.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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), 25-9
- Bardou P, Mariette J, Escudié F, Djemiel C and Klopp C, 2014. BMC Bioinformatics, 15:293
- Benjamini, Y, Hochberg Y, 1995. Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological, 57(1), 289-300
- De Verdal H., Narcy A., Bastianelli D., Chapuis H., Mème N., Urvoix S., Le Bihan-Duval E., Mignon-Grasteau S. 2011. BMC Gene. 12, 59-68.
- Dillies MA, Rau A, Aubert J, Hennequet-Antier C, Jeanmougin M, Servant N, Keime C, Marot G, Castel D, Estelle J, Guernec G, Jagla B, Jouneau L, Laloë D, Le Gall C, Schaëffer B, Le Crom S, Guedj M, Jaffrézic F; French StatOmique Consortium, 2013. Brief Bioinform, 14(6), 671-683
- Juanchich A., Hennequet-Antier C., Cabau C., Le Bihan-Duval E., Duclos MJ, Mignon-Grasteau S., Narcy A., 2018. BMC Genomics, *in press*
- McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK, 2012. NAR, (40), 4288-4297
- Mignon-Grasteau S, Muley N, Bastianelli D, Gomez J, Peron A, Sellier N, Millet N, Besnard J, Hallouis JM, Carre B, 2004. Poult.Sci., (83), 860-867
- Mignon-Grasteau S, Rideau N, Gabriel I, Chantry-Darmon C, Boscher M-Y, Sellier N, Chabault M, Le Bihan-Duval E, Narcy A, 2015. GSE, 47:74
- Rideau N, Godet E, Combémoré C, Chaudéau M, Carré B, Mignon-Grasteau S, 2014. Poult.Sci., (93), 1245-1250
- Rougière N. & Carré B. 2010. Animal 4(11), 1861-1872.
- Schulz H, 1991. Biochim Biophys Acta, 1081(2):109-120
- The Gene Ontology Consortium, 2017, NAR, (45), 331-338

Tableau 1. Résumé de l’enrichissement fonctionnel entre les individus EMAn⁺ et EMAn⁻

	Groupe fonctionnel	Nombre de termes GO
EMAn ⁺ (1337 gènes DE spécifiques et 21 termes GOs enrichis)	Développement et différenciation des astrocytes	4
	Métabolisme des acides gras	12
	Catabolisme de l’ADN	2
	Autres	3
EMAn ⁻ (1349 gènes DE spécifiques et 71 termes GOs enrichis)	Organisation des microtubules	8
	Réponses aux stimuli externes	2
	Métabolisme des protéines	34
	Régulation de l'expression des gènes	24
	Autres	3

Figure 1. Diagramme de Venn (Bardou et al., 2014) des gènes DE entre tissus (GD vs G) pour chaque groupe EMAn⁺ et EMAn⁻ (up : gènes sur-exprimés dans GD ; down : gènes sous-exprimés dans GD)

