

UNE MODIFICATION DE L'ENVIRONNEMENT EMBRYONNAIRE INFLUENCE LE PHÉNOTYPE DES DESCENDANTS SUR TROIS GÉNÉRATIONS CHEZ LA CAILLE

Leroux Sophie¹, Gourichon David², Leterrier Christine³, Labrune Yann¹,
Coustham Vincent⁴, Zerjal Tatiana⁵, Morisson Mireille¹, Minvielle Francis⁵,
Pitel Frédérique¹

¹UMR INRA / INPT ENSAT / INPT ENVT - GenPhySE - 31326 CASTANET TOLOSAN,

²INRA - PEAT - 37380 NOUZILLY,

³UMR INRA / CNRS / UFR Tours / IFCE - 37380 NOUZILLY,

⁴INRA - URA - 37380 NOUZILLY,

⁵UMR INRA / AgroParisTech - GABI - JOUY-EN-JOSAS.

frederique.pitel@toulouse.inra.fr

RÉSUMÉ

Les phénomènes épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN, en participant à la régulation de l'expression des gènes, peuvent avoir une influence sur les phénotypes. Des études montrent en outre que l'information épigénétique peut être transmise à travers les générations. Dans le cadre du programme ANR EpiBird, nous avons réalisé une étude pilote afin d'estimer les différences phénotypiques dans la troisième génération (G3) entre deux lignées de cailles issues des mêmes ancêtres (G-1), aux œufs traités (G0 Epi+) ou non (G0 Epi-) par une injection de génistéine. La génistéine perturbe l'épigénome (notamment au niveau de la méthylation de l'ADN) et est un phyto-oestrogène connu pour son impact sur l'appareil reproducteur dans plusieurs espèces, au moins sur la première génération de descendants. Après 3 générations sans traitement, une différence significative sur la maturité sexuelle des animaux, qui n'est alors plus attribuable aux effets maternels directs, a été observée entre les lignées Epi+ et Epi- : les animaux Epi- sont plus précoces et pondent plus d'œufs sur leurs carrières. Un effet significatif a également été démontré sur l'interaction entre le poids à 3 semaines et le sexe des animaux. Les résultats de cette étude pilote sont d'ores et déjà très intéressants dans l'analyse de l'influence multigénérationnelle de l'environnement sur le phénotype des oiseaux d'élevage.

ABSTRACT

Changes in the embryonic environment have an effect on phenotypes of third generation offspring in quail.

The epigenetic phenomena, such as the DNA methylation, which participate to the regulation of gene expression, can influence the phenotypes and recent studies show that the epigenetic information can be transmitted across generations. In the context of the ANR research program EpiBird, we conducted a pilot study to estimate the phenotypic differences in the third generation (G3) between two lines of quails, issued from the same ancestors (G-1), obtained by treating the eggs (G0 Epi+) or not treating them (G0 Epi-) by injection of genistein. The genistein interferes with the epigenome (especially with the DNA methylation) and is a phyto-estrogen known for its impact on the reproductive system in several species, at least in the first generation of descendants. After 3 generations without treatment, a significant difference in the sexual maturity of animals, which is no longer attributable to direct maternal effects, was observed between the lines Epi + and Epi-: the Epi-animals started earlier to lay eggs and produced more eggs throughout their laying career. A significant interaction between line and sex was observed for the body weight at 3 weeks of age. The results of this pilot study are highly valuable in the analysis of the multi-generational impact of the environment on the phenotype of livestock.

INTRODUCTION

Les phénomènes épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN, en participant à la régulation de l'expression des gènes, peuvent avoir une influence sur les phénotypes (voir la communication JRA2015, Frésard et al.). Des études montrent en outre que l'information épigénétique peut être transmise à travers les générations. En particulier, la transmission intergénérationnelle de la méthylation de l'ADN est très clairement établie chez les végétaux, ainsi que l'influence de ces marques sur la variabilité des phénotypes (Cortijo *et al.*, 2014). Ces phénomènes pourraient expliquer une part, à déterminer, de l'"héritabilité manquante" (Eichler *et al.*, 2010, Guay *et al.*, 2014) évoquée depuis les études de GWAS (Genome Wide Association Studies) humaines. L'existence de transmission de marques épigénétiques acquises suite à des expositions environnementales sur plus de 3 générations est débattue chez les animaux, même si l'influence de l'environnement parental sur le phénotype des descendants directs est démontrée chez plusieurs espèces mammifères (Ho *et al.*, 2010, Jablonka *et al.*, 2009).

Les études à mener dans ce domaine, à la fois troublant et enthousiasmant pour un généticien cherchant à caractériser les causes moléculaires de la variabilité des caractères, nous semblent donc être de deux ordres : d'une part, estimer la part transmissible de cette variabilité d'une génération à l'autre, d'autre part évaluer la pertinence de la prise en compte de données épigénétiques dans les schémas de sélection. Pour démarrer un programme de recherche dans ce sens, nous avons choisi la caille comme espèce modèle, qui présente de nombreux avantages pour cette étude, dont sa vitesse de reproduction et son faible coût de production.

Nous présentons ici les premiers résultats d'une étude pilote, réalisée afin d'estimer les différences phénotypiques dans la troisième génération (G3) entre deux lignées de cailles issues des mêmes ancêtres (G-1), traités (G0 Epi+) ou non (G0 Epi-) par une injection de génistéine dans l'œuf. La génistéine est un phyto-œstrogène qui a été montré comme perturbant l'épigénome, notamment au niveau la méthylation de l'ADN (pour revue voir Woclawek-Potocka *et al.*, 2013).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Production des lignées miroir

A partir de 12 couples fondateurs de la lignée de cailles S+, ou "HSR" (High Social Reinstatement), issue d'une sélection divergente sur le caractère de motivation sociale (Mills *et al.*, 1991), deux lignées ont été produites : des œufs de chacune des 12 femelles ont été séparés en deux lots, un lot témoin sans traitement, un lot traité par injection de génistéine avant incubation, à raison de 500

microgrammes (50 µl de solution) par œuf. Les individus issus de ces œufs (12 couples par lignée) sont les fondateurs G0 de chacune des lignées (Figure 1), appelées "Epi-" pour la lignée témoin, "Epi+" pour la lignée issue des œufs traités. Deux générations ont ensuite été produites avec des généalogies exactement parallèles dans chaque lignée, et avec des contributions attendues identiques de chacun des fondateurs, de façon à minimiser les différences génétiques entre les deux lignées. Le dispositif était ainsi construit pour que nous puissions attribuer les différences éventuelles observées en troisième génération aux marques épigénétiques qui auraient été transmises. Pour chaque lignée, la génération G3 a été produite de façon à assurer un effectif suffisant pour la comparaison des mesures zootechniques classiques (croissance, ponte, consommation alimentaire...) dont on sait déjà que les effets du milieu sur la variation sont importants. En moyenne, 134 cailles de chaque sexe par lignée ont donc été produites et leurs performances mesurées dans les conditions habituelles de notre élevage expérimental, pour un total de 19 familles de pères (55 mères).

1.2. Analyse des performances de la dernière génération

Les performances mesurées sont listées dans le tableau 1. Les poids ont été mesurés à 3 et 6 semaines pour tous les individus (n=538). Le nombre d'œufs pondus a été mesuré pour sous-ensemble de femelles de chaque lignée (n=175). L'âge au premier œuf a été noté et l'intensité de ponte (nombre d'œufs pondus / durée de la ponte) a été calculée. A l'abattage (23 semaines) ont été mesurés l'envergure des ailes, le poids de l'animal et les poids du foie et du tissu adipeux, pour un ensemble d'individus (n=319).

Les comparaisons de moyennes entre lignées ont été effectuées grâce aux tests de Student ou Wilcoxon pour les phénotypes mesurés sur les femelles, par analyse de variance avec la lignée (L) et le sexe (S) pour effets fixes, pour les mesures effectuées sur les deux sexes (soit le modèle de base $Y = \mu + L + S + (L \times S) + e$).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

De nombreux caractères ont été mesurés sur les individus de la génération G3 issus de fondateurs dont les œufs avaient subi ou non une injection de génistéine. Le traitement n'a aucun effet significatif sur la majorité des phénotypes des descendants. Mais des résultats particulièrement intéressants ont été obtenus.

Une interaction significative ($p=0.0064$) sexe x lignée a été observée sur le poids à 3 semaines : le traitement des œufs augmente le poids des mâles (en moyenne 101,02 g pour la lignée EPI- contre 103,14 g pour la lignée EPI+) alors qu'il diminue le poids des femelles (en moyenne 106,31 g pour les femelles EPI- contre

103,05 g pour les femelles EPI+). Cet effet est encore ressenti à 6 semaines et à l'âge adulte, mais les différences ne sont pas significatives ou très peu (<10%). Des effets sexe-spécifiques ont déjà été observés, notamment pour l'influence du régime alimentaire de la mère, chez les mammifères (Gabory *et al.*, 2009, Gabory *et al.*, 2011). Chez les oiseaux, de tels effets ont déjà été observés chez le canard (voir la communication JRA2015, Morisson *et al.*).

La lignée a également un effet très significatif sur les poids de foie ($p=0.0034$) et de tissu adipeux ($p=0.0064$), sans interaction avec le sexe, en intégrant le poids de l'animal dans le modèle d'analyse de covariance. Ces résultats vont dans le sens d'un effet multigénérationnel d'un modificateur de méthylation, la génystéine, sur le métabolisme des lipides chez la caille.

L'influence de la lignée sur le nombre d'œuf pondus est très significative ($p=0.0016$, Figure 2), avec un nombre moyen d'œufs pondus de 72,09 dans la lignée EPI- contre 64,04 dans la lignée EPI+. Ce phénomène est avant tout lié à l'âge au premier œuf, qui est augmenté de près de 8 jours dans la lignée EPI+ (88,2 contre 80,7 jours dans la lignée EPI-, $p=0.0006$). Ces résultats très significatifs sont en sens inverse par rapport aux effets connus de la molécule employée : la génystéine est certes connue pour son impact sur l'appareil reproducteur dans plusieurs espèces, au moins sur une génération de descendants (pour revue voir Woclawek-Potocka *et al.*, 2013), mais son utilisation dans l'alimentation de cailles a plutôt tendance à augmenter leur production d'œufs (Akdemir *et al.*, 2009). Cette différence entre effets peut être due à l'administration du produit (dans l'alimentation / dans l'œuf) ou, plus probablement, à un effet indirect sur la troisième génération qui n'est pas de même nature que l'effet direct obtenu pendant

la vie de l'animal dont on a modifié le régime alimentaire. Le phénotype des descendants peut en effet apparaître comme une réponse "compensatrice" du stress des ancêtres, comme la tendance à l'obésité d'individus issus de parents en sous-nutrition (Jimenez-Chillaron *et al.*, 2009). Des analyses complémentaires sont à mettre en place pour expliquer l'effet de cette molécule après plusieurs générations sans traitement, et en particulier pour mettre en évidence l'implication éventuelle de phénomènes épigénétiques.

CONCLUSION

Ces analyses mettent en évidence l'impact d'une modification de l'environnement des fondateurs sur le phénotype des descendants, 3 générations plus tard, chez la caille. Cette étude pilote doit bien sûr être complétée par des programmes similaires menés dans des fonds génétiques différents, avec des molécules variées. Elle doit également être enrichie d'analyses moléculaires pour décrypter les causes, probablement épigénétiques, de cette modification trans-générationnelle du phénotype par l'environnement. Ces résultats sont d'ores et déjà très intéressants dans l'analyse de l'influence multigénérationnelle de l'environnement sur le phénotype des animaux d'élevage.

REMERCIEMENTS

Ce travail est soutenu par le programme ANR EpiBird (ANR-009-GENM-004).

Les auteurs remercient les membres de l'unité expérimentale PEAT (Nouzilly) qui ont contribué à cette étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Akdemir F et Sahin K, 2009. Poult Sci, (88), 2125-31.
2. Cortijo S, Wardenaar R, Colome-Tatche M, Gilly A, Etcheverry M, Labadie K, Caillieux E, Hospital F, Aury JM, Wincker P, Roudier F, Jansen RC, Colot V et Johannes F, 2014. Science, (343), 1145-8.
3. Eichler EE, Flint J, Gibson G, Kong A, Leal SM, Moore JH et Nadeau JH, 2010. Nat Rev Genet, (11), 446-50.
4. Gabory A, Attig L et Junien C, 2009. Mol Cell Endocrinol, (304), 8-18.
5. Gabory A, Attig L et Junien C, 2011. World J Diabetes, (2), 164-75.
6. Guay SP, Brisson D, Lamarche B, Gaudet D et Bouchard L, 2014. Epigenetics, (9), 718-29.
7. Ho DH et Burggren WW, 2010. J Exp Biol, (213), 3-16.
8. Jablonka E et Raz G, 2009. Q Rev Biol, (84), 131-76.
9. Jimenez-Chillaron JC, Isganaitis E, Charalambous M, Gesta S, Pentinat-Pelegrin T, Faucette RR, Otis JP, Chow A, Diaz R, Ferguson-Smith A et Patti ME, 2009. Diabetes, (58), 460-8.
10. Mills AD et Faure JM, 1991. J Comp Psychol, (105), 25-38.
11. Woclawek-Potocka I, Mannelli C, Boruszewska D, Kowalczyk-Zieba I, Wasniewski T et Skarzynski DJ, 2013. Int J Endocrinol, (2013), 650984.

Tableau 1. Performances mesurées sur la génération G3.
Moyenne (Ecart-type). NS : Non Significatif

Caractères	Effectifs	EPI-	EPI+	Significativité
Poids 3 semaines	538	103,54 (13,45)	103,09 (9,43)	NS
Poids 6 semaines	538	164,01 (17,16)	164,52 (11,69)	NS
Poids adultes	346	189,92 (29,85)	187,31 (24,47)	NS
Age au premier œuf	175	80,67 (12,28)	88,27 (18,26)	***
Nombre d'œufs pondus	175	72,09 (17,46)	64,04 (18,94)	**
Intensité de ponte	175	84,28 (14,89)	82,6 (14,17)	NS
Envergure des ailes	319	31,59 (2,88)	31,2 (2,85)	NS
Poids Tissu Adipeux	319	0,79 (NA)	1,01 (NA)	**
Poids du Foie	319	5,28 (1,64)	5,65 (1,68)	**

Figure 1. Dispositif animal utilisé.

L'injection a lieu une seule fois, pour la production des œufs de la première génération (G0).

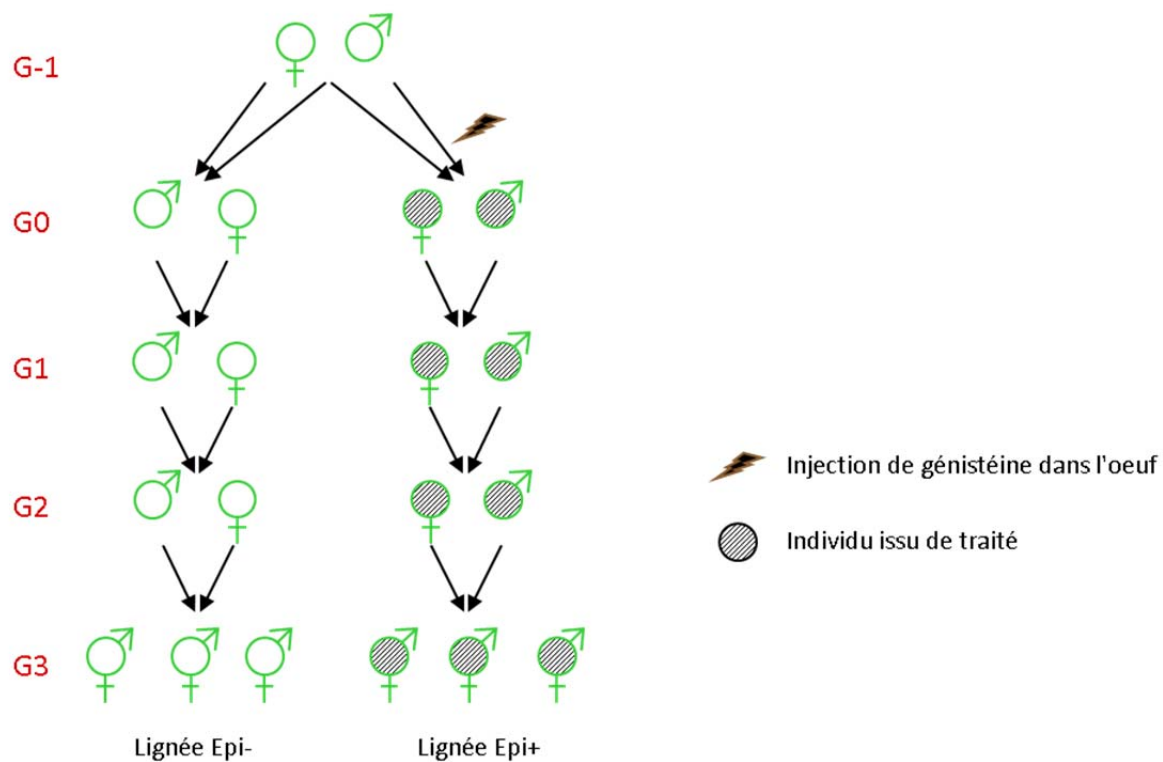


Figure 2. Comparaison du nombre d'œufs pondus par lignée sur la durée observée.
Boxplot représentant le nombre d'œufs pondus (en unités) par les femelles mesurées des lignées EPI+ (n=94) et EPI- (n=81).

