

VARIABILITE DE L'ABONDANCE DE CHEMERINE DANS L'ALBUMEN ET DANS LE PLASMA SANGUIN DE DIFFERENTES LIGNEES DE POULES PONDEUSES

Bernardi Ophélie¹, Reverchon Maxime¹, Ramé Christelle², Baumard Yannick³, Dupont Joëlle²

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

²*INRAE – UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements – 37380 NOUZILLY*

³*INRAE – Unité Expérimentale du Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours UEPEAT, 1295 – 37380 NOUZILLY*
ophelie.bernardi@inrae.fr

RÉSUMÉ

L'un des objectifs pour les entreprises de sélection avicoles et les accouvoirs est la production de poussins d'un jour viables et robustes. Cependant, la mortalité embryonnaire pouvant atteindre 40 % selon les espèces avicoles représente un problème majeur pour ces entreprises de sélection. Il est donc important d'identifier des indicateurs du développement embryonnaire utilisables en sélection génétique pouvant ainsi améliorer les performances de reproduction. Récemment, il a été montré que la chémérine en tant qu'hormone protéique pourrait avoir un rôle potentiel durant le développement embryonnaire aviaire. Le but de notre étude est d'analyser l'abondance de la chémérine au niveau plasmatique et de l'albumen de l'œuf chez des poules pondeuses expérimentales à un moment du cycle de ponte et d'évaluer sa variabilité pour en faire un potentiel critère de sélection. Ainsi, nous montrons que l'abondance de chémérine plasmatique est variable entre les lignées prélevées au même stade physiologique. Au niveau de l'albumen, la variabilité inter-poule de l'abondance de chémérine dans l'albumen est 2 fois plus importante que celle intra-poule pour une même lignée. Nous observons également différentes concentrations de chémérine dans l'albumen entre poules au même stade de ponte.

ABSTRACT

Variability of chemerin abundance in egg albumen and plasma in hens

One of the breeding companies goal is the production of viable and robust one day-old chicks. However embryo mortality up to 40 % depending of the avian species is a major problem for poultry industry. More knowledge, in order to determine new regulators of a good embryo development be used in genetic selection are necessary to improve reproduction. Recently, chemerin, as a protein hormone, has been shown to have a potential role during avian embryo development. The aim of the study is to analyse the abundance of chemerin in egg albumen and plasma in hens and to evaluate variability to make it a potential genetic trait. Thus, we show that the abundance of plasma chemerin is variable between hens at the same physiological stage. Concerning the level of chemerin in albumen, the inter-hen variability is 2 fold higher than the intra-hen variability. Different abundances of chemerin are also observed in the albumen between hens at the same stage of laying.

INTRODUCTION

La mortalité embryonnaire reste un problème majeur pour les professionnels de la filière avicole (données internes SYSAAF). Or, la production de poussins d'un jour viables et robustes est nécessaire aux entreprises de sélection avicoles afin de renouveler les cheptels de reproducteurs parentaux. Il est donc important de rechercher des perspectives d'amélioration notamment l'investigation de biomarqueurs du développement embryonnaire qui seront d'une part utilisables en sélection génétique et d'autre part pour améliorer les performances de reproduction. Pour qu'un biomarqueur soit un critère de sélection, il doit être facilement mesurable à haut débit, peu coûteux, fiable et héritable à la descendance. Cet indicateur doit être également stable chez un même individu et variable au sein du cheptel. Dans notre étude, nous avons envisagé la chémérine comme potentiel critère de sélection chez l'espèce aviaire.

La chémérine, également appelée TIG2 (tazarotene-induced gene 2) ou RARRES2 (retinoic acid receptor responder 2) est une hormone produite principalement par le foie et également par le tissu adipeux, les cellules immunitaires et reproductives (Mattern *et al.*, 2014). Ainsi, elle se retrouve impliquée dans plusieurs processus physiologiques tels que la régulation de l'homéostasie, du système immunitaire, du métabolisme, l'angiogenèse et dans la fonction de reproduction (Bernardi *et al.*, 2021). Après plusieurs clivages successifs, la forme active de la chémérine est capable de se lier à son principal récepteur transmembranaires CMKLR1 (chemokine-like receptor 1) mais aussi GPR1 (G protein receptor 1) et CCRL2 (C-C chemokine receptor-like 2). Ces trois récepteurs sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires. (Marchese *et al.*, 1994).

Chez les mammifères, les concentrations de chémérine dans le plasma sont positivement corrélées avec les niveaux de graisse corporelle, du glucose, des triglycérides et des lipides (Bozaoglu *et al.*, 2007) à l'inverse de la dinde (Diot *et al.*, 2015) et du poulet (Mellouk *et al.*, 2018). On retrouve le système chémérine impliqué dans la fonction de reproduction chez les mammifères avec une expression au niveau ovarien tel qu'une inhibition de la stéroïdogenèse dans les cellules granulosas (Reverchon *et al.*, 2012). La chémérine a également un impact négatif sur la maturation et la motilité du spermatozoïde (Elfassy *et al.*, 2018). Chez les espèces aviaires, la concentration plasmatique de chémérine est négativement corrélée avec l'éclosabilité et la qualité des œufs (Mellouk *et al.*, 2018). A l'inverse des mammifères, la chémérine et ses récepteurs sont plus exprimés dans les cellules de la thèque chez la dinde (Mellouk *et al.*, 2018). Notre laboratoire a montré la présence de chémérine au sein du tractus reproducteur avec une forte

expression génique et protéique au niveau du magnum, lieu où se forme l'albumen, par rapport aux autres compartiments. Ainsi, nous la retrouvons en forte concentration dans l'albumen et les membranes vitellines de l'œuf (Estienne *et al.*, 2021). Des analyses protéomiques ont identifié TIG2/RARRES2 dans le blanc (Mann *et al.*, 2007) et les membranes vitellines d'œufs de poule (Mann *et al.*, 2008). Il reste à déterminer maintenant si la chémérine au niveau de l'albumen peut être un bon marqueur pour accroître les performances de reproduction des espèces aviaires.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et collecte d'échantillons

L'étude a porté sur sept lignées expérimentales de poules pondeuses. Les animaux ont été élevés à l'unité expérimentale de Tours (UEPEAT, Nouzilly). Les lignées R+ et R- différaient sur la fraction résiduelle de la consommation alimentaire (Bordas *et al.*, 1984). La lignée Fayoumi est l'espèce la plus proche de la poule ancestrale et elle est résistante à la coccidiose (Bacciu *et al.*, 2014). La lignée DwNa se caractérise par des poules porteuses du gène du nanisme. La lignée OD présente des ovulations multiples. La lignée Cheptell est à l'origine du variant « crête en pois ». Enfin la lignée Gavora est dépourvue de gènes viraux endogènes (Inrae Productions).

Chaque lignée comptait 10 poules et se trouvaient en fin de période de ponte.

Les œufs ont été collectés quotidiennement durant une semaine afin de peser l'œuf, son jaune et son albumen. Environ 2 ml d'albumen ont été collectés par œuf et stockés à -20°C pour des analyses ultérieures. A la fin de la semaine de ponte, les animaux ont été abattus afin de prélever des échantillons de sang dans des tubes héparine et des échantillons du tractus reproducteur par dissection. Le plasma a été récupéré après centrifugation (5000 g pendant 10 min) puis stocké à -20°C avant utilisation.

1.2. Western-Blot

Les échantillons de blancs d'œufs ont été lysés à l'aide d'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. Les protéines des échantillons de plasma sanguin ont été dosés par BCA puis analysés par la technique de Western Blot comme décrit pour les échantillons d'albumen d'œufs.

1.3. Analyses statistiques

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM. Les données des poids des œufs, des ratios blanc/jaune, de ponte et de fertilité ont été analysées au moyen de test One-Way ANOVA. Un test t de Student a été réalisé pour comparer l'abondance plasmatique de chémérine entre les lignées. Enfin, un test One-Way ANOVA a été réalisé pour comparer les moyennes d'abondances de chémérine dans l'albumen entre les poules d'une lignée. Le logiciel GraphPad Prism 6 a été utilisé pour réaliser les tests statistiques.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Caractéristiques des lignées

Tout d'abord, nous observons que les lignées se discriminent sur le poids des œufs, le ratio blanc/jaune, le pourcentage de ponte et d'éclosabilité. Pour chacune de ces quatre caractéristiques, la lignée Fayoumi présentait les taux les plus faibles (Figure 1 A, B, D et E). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la lignée Fayoumi est la lignée la plus proche de l'espèce ancestrale.

Cependant, le pourcentage de fertilité ne diffère pas entre les lignées (Figure 1C).

1.2. Chémérine plasmatique

L'ensemble des échantillons de plasma de chaque poule ont été comparés à la lignée Fayoumi, la lignée la plus proche de la lignée ancestrale. Les résultats montrent que la lignée Fayoumi a une abondance de chémérine plasmatique significativement plus faible que les lignées OD ($p=0,0009$), Gavora ($p=0,0387$) et DwNa ($p=0,0461$) et inversement par rapport à la lignée Cheptel1 ($p=0,0094$). Entre les lignées R+ et R-, aucune différence sur l'abondance plasmatique de

chémérine n'a été mise en évidence ($p>0,05$) (Tableau 1).

1.2. Chémérine dans l'albumen

Pour chacune des poules, nous avons quantifié l'abondance de chémérine dans l'albumen dans 3 à 5 œufs pondus successivement. Puis, nous avons comparé les poules entre elles. Cela a été réalisé pour chacune des lignées.

Au sein d'une même lignée, nous observons différents profils d'abondance de chémérine dans l'albumen avec des poules qui présentent des taux élevés, moyens et bas de chémérine dans leurs œufs. Cela est appuyé par un coefficient de variabilité inter-poule allant de 50% à 116% en fonction de la lignée. Tandis que pour une même poule, l'abondance de chémérine dans ses œufs successifs semblent assez homogène (coefficient de variabilité intra-poule de 23% à 50% en fonction de la lignée) (Tableau 2). Il est intéressant de noter que nous observons une plus forte variabilité au sein de la population comparée à la variabilité individuelle (Tableau 2).

Il semble que cette adipo/hépatokine soit importante durant le développement embryonnaire précoce mais il reste encore à éclaircir son rôle majeur. Il a déjà été montré son rôle négatif sur la maturation *in vitro* des ovocytes chez l'espèce bovine (Reverchon *et al.*, 2014). De plus, au sein du laboratoire nous avons démontré sa présence au sein des annexes embryonnaires et son rôle dans l'angiogenèse durant le développement embryonnaire chez *Gallus gallus*. La chémérine est présente au sein des fluides embryonnaires tels que le liquide amniotique et le liquide allantoïque durant la période d'incubation. Egalement, il a été montré son rôle pro-angiogénique et anti-bactérien durant le développement embryonnaire (Estienne *et al.*, 2021).

CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats suggère que la chémérine dans le blanc de l'œuf pourrait être un critère candidat utilisable en sélection génétique. Cependant, aucun paramètre de reproduction (% de ponte, fertilité et éclosabilité) n'était corrélé avec l'abondance de chémérine plasmatique et dans l'albumen. Nous avons également montré aucune corrélation entre l'abondance de chémérine plasmatique et de chémérine dans l'albumen des œufs suggérant un lieu de production local de la chémérine dans le magnum distinct de la circulation sanguine (données non présentées ici). Cependant, le nombre d'animaux ($n=10$ pour chaque lignée) est très faible pouvant expliquer ces résultats négatifs. Les dosages ELISA de la chémérine dans ces échantillons et à la

descendance sont en cours d'analyse afin de confirmer ces résultats. L'ensemble de ces résultats renforce le rôle potentiel de la chémérine durant le développement embryonnaire des oiseaux.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé en partie grâce au pôle d'expérimentation avicole de Tours (PEAT, Nouzilly) et grâce à Michèle Tixier-Boichard et Tatiana Zerjal pour le développement de ces lignées expérimentales.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bacciu N., 2014. *Genetics Selection Evolution.*, 46:14
Bernardi O., 2021. *Mol Cell Endocrinol.*, (534) 111370
Bordas A., 1984. *Annales Agriculturae Fenniae* 233-237
Bozaoglu K., 2007. *Endocrinology*, (148), 4687-4694
Diot M., 2015. *Reprod Biol Endocrinol.*, (13) p. 81
Elfassy Y., 2018. *Int J Endocrinol.*, 3906490
Estienne E., 2021. *En cours de soumission*
Mann K., 2007. *Proteomics*, (7), 3558-3568
Mann K., 2008. *Proteomics*, (8), 2322-2332
Marchese A., 1994. *Biochem Biophys Res Commun*, (205) pp. 1952-1958
Mattern A., 2014. *IUBMB Life*, (2014), pp. 19-26
Mellouk N., 2018. *Reproduction.*, (155) pp. 321-331
Reverchon M., 2012. *Hum Reprod.*, (27), pp. 1790-1800
Reverchon M., 2014. *Biol Reprod.*, (90), p. 102

Figure 1. Performances de reproduction de différentes lignées de poules pondeuses expérimentales (moyenne $\pm$ SEM)

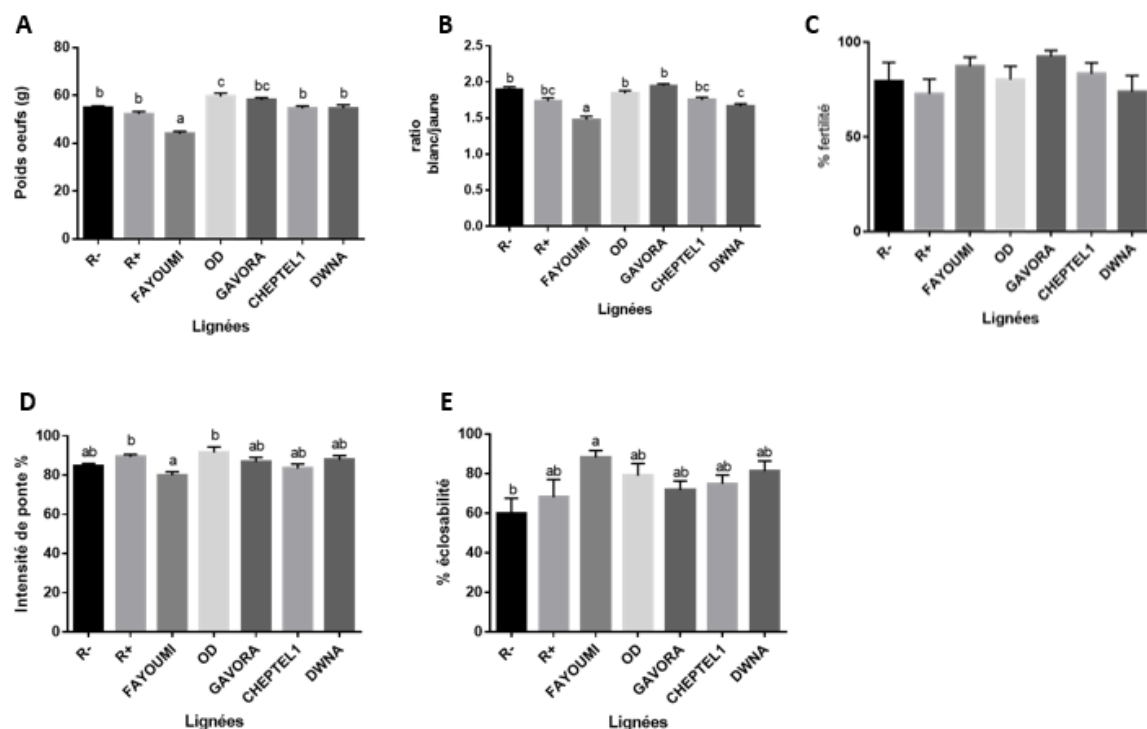


Tableau 1. Abondance de chémérine dans le plasma de différentes lignées de poules pondeuses expérimentales (moyenne $\pm$ SEM)

Comparaison lignées	Abondance chémérine plasmatique (ratio chem/ponceau)	p-value
R- versus R+	0,039 $\pm$ 0,007 versus 0,031 $\pm$ 0,004	0,3985
Fayoumi versus OD	0,022 $\pm$ 0,002 versus 0,044 $\pm$ 0,004	0,0009
Fayoumi versus Gavora	0,018 $\pm$ 0,001 versus 0,027 $\pm$ 0,003	0,0387
Fayoumi versus DwNa	0,015 $\pm$ 0,001 versus 0,024 $\pm$ 0,003	0,0461
Fayoumi versus Cheptel1	0,061 $\pm$ 0,007 versus 0,035 $\pm$ 0,004	0,0094

Tableau 2. Abondance (moyenne $\pm$ SEM) et variabilité (%) de chémérine dans l'albumen de différentes lignées de poules pondeuses expérimentales

Lignées	Abondance chémérine albumen (ratio chem/ponceau)	Variabilité inter-poule (%)	Variabilité intra-poule (%)
R-	0,011 $\pm$ 0,002	67,20	52,88
R+	0,034 $\pm$ 0,005	54,73	42,28
Fayoumi	0,021 $\pm$ 0,004	71,22	36,47
OD	0,017 $\pm$ 0,004	73,73	33,58
Gavora	0,009 $\pm$ 0,003	102,54	47,57
Cheptel1	0,007 $\pm$ 0,003	116,61	41,01
DwNa	0,034 $\pm$ 0,006	49,27	23,76