

SESSION

GENETIQUE - REPRODUCTION

SESSION

GENETIQUE - REPRODUCTION

Communications orales

SEQUENÇAGE DU GENOME ENTIER ET DIVERSITE GENETIQUE DE POPULATIONS SAUVAGES ET DOMESTIQUES DE PINTADE

Vignal Alain¹, Boitard Simon¹, Thebault Noémie¹, Dayo Guiguigbaza-Kossigan², Yapi-Gnaore Valentine², Youssao Issaka³, Berthouly-Salazar Cécile⁴, Pálinkás-Bodzsár Nóra⁵, Guémené Daniel⁶, Thibaud-Nissen Françoise⁷, Warren Wesley C.⁸, Tixier-Boichard Michèle⁹ and Rognon Xavier⁹

¹GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, INPT, ENVT, 31326 CASTANET TOLOSAN, ²CIRDES, 01 BP 454 BOBO DIOULASSO, ³Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, Université d'Abomey-Calavi, BP 2009, COTONOU, ⁴UMR DIADÉ, IRD, Université de Montpellier, 34090 MONTPELLIER, ⁵Research Centre for Farm Animal Gene Conservation, H-2100 GÖDÖLLÖ, ⁶SYSAAF, Centre INRA Val-de-Loire, 37380 NOUZILLY, ⁷National Center for Biotechnology Information, NIH, BETHESDA, MD 20894, ⁸McDonnell Genome Institute, Washington University School of Medicine, SAINT LOUIS, MS 63108, ⁹GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78352 JOUY-EN-JOSAS

xavier.rognon@agroparistech.fr

RÉSUMÉ

La pintade, *Numida meleagris*, est une espèce appartenant à l'ordre des Galliformes. Son aire de répartition recouvre une grande partie de l'Afrique sub-saharienne, du Sénégal à l'Érythrée et du Tchad à l'Afrique du Sud. Elle a probablement été domestiquée dans le Nord de cette zone, il y a environ 2 000 ans. La pintade domestique a ensuite été largement répandue dans le monde méditerranéen, puis à partir du XVI^{ème} siècle, dans le monde entier. Aujourd'hui elle est toujours élevée, dans le cadre d'une aviculture villageoise en Afrique et de façon plus formalisée dans d'autres régions du monde, principalement en France. Jusqu'à récemment, le manque de marqueurs moléculaires a fortement limité les études génétiques concernant la pintade. Pour initier de telles études, nous avons produit la première séquence entière du génome de la pintade. Nous l'avons utilisé comme référence pour une étude par une approche Pool-seq de 12 populations sauvages et domestiques d'Europe et d'Afrique. La domestication a entraîné une perte de diversité génétique. Le statut sauvage ou domestique sépare mieux les populations africaines que leur localisation géographique. Plusieurs régions génomiques montrant des signatures de sélection, liées à la domestication, à l'importation en Europe ou aux programmes de sélection plus intensifs en Europe, ont été détectées. Elles incluent des gènes candidats intéressants, dont *EDNRB2* qui est connu pour induire des phénotypes de dilution ou de taches blanches chez les oiseaux.

ABSTRACT

Whole-genome sequencing and genetic diversity of wild and domestic guinea fowl populations

The guinea fowl, *Numida meleagris*, belongs to the Galliformes order. Its natural range includes a large part of the sub-Saharan Africa, from Senegal to Eritrea and from Chad to South Africa. The domestication of this species may have occurred about 2000 years BP in the north of this area. Domestic guinea fowl was first introduced in the Mediterranean world and since the 16th century, throughout the rest of the world. Today, it is still farmed in Africa, mainly as a village poultry. More formal livestock farming has also been developed in other countries, mainly in France. Until now, few genetic studies have been conducted on this species, and very few molecular tools are currently available. To initiate such studies, we produced a first-whole-genome sequence of guinea fowl. We used it as a reference for a Pool-seq study of 12 wild and domestic populations from Europe and Africa. Domestication has led to a loss of genetic diversity. Wild or domestic status separates African populations better than their geographical location. Several genomic regions showing selection signatures related to domestication, importation to Europe or more intensive breeding programs in Europe, were also found. They contain interesting candidate genes, including *EDNRB2* which is known to induce white spotting or extreme diffusion of plumage coloration in domesticated birds.

INTRODUCTION

La pintade, *Numida meleagris* (famille des Numidae), est originaire d'Afrique. Son aire de répartition recouvre une grande partie de la zone sub-saharienne, du Sénégal à l'Érythrée et du Tchad à l'Afrique du Sud. Elle a probablement été domestiquée, il y a environ 2 000 ans, dans le Nord de cette zone (Larson et Fuller, 2014). Elle apparaît en Europe dès l'antiquité, puis en disparaît. A partir du XVI^{ème} siècle, cette espèce sera diffusée en Europe, puis à travers le monde. Aujourd'hui elle est toujours élevée, dans le cadre d'une aviculture villageoise en Afrique et de façon plus formalisée dans d'autres régions du monde, en particulier en France, 1^{er} producteur mondial.

Jusqu'à récemment, le manque de marqueurs moléculaires a fortement limité les études génétiques concernant cette espèce. Nous avons produit un premier assemblage de la séquence du génome de la pintade. Cet assemblage a été utilisé comme référence pour une étude de la diversité génétique, par séquençage de mélanges d'ADN (Pool-seq) d'individus de populations sauvages et domestiques d'Europe et d'Afrique. L'objectif était d'appréhender les processus de domestication et de sélection ayant conduit à la diversité des populations actuelles.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Le génome de référence

La séquence de référence a été produite à partir de l'ADN d'un mâle consanguin, issu de la lignée G44 (Galor). Le séquençage Illumina et l'assemblage des régions contiguës, ou scaffold, (logiciel ALLPATHS 2) ont été réalisés en collaboration avec l'Université Washington (Saint-Louis, USA). L'assemblage des scaffolds en chromosomes a été réalisé par alignement sur la référence *Gallus gallus*-5.0 du génome de la poule à l'aide du logiciel LASTZ, en tenant compte des réarrangements chromosomiques connus par des études de cytogénétique (Shibusawa et al., 2002).

1.2. Echantillonnage et séquençage

Afin d'évaluer la diversité génétique chez la pintade, nous avons étudié des individus provenant de 10 populations (Tableau 1), à savoir 3 populations sauvages africaines (1 d'Afrique du Sud et 2 du Burkina Faso), 4 populations domestiques traditionnelles africaines (3 du Burkina Faso et 1 du Bénin), et 5 populations domestiques européennes, dont 2 populations traditionnelles hongroises et 3 échantillons de lignées commerciales françaises. Les individus de la population BEG-s correspondent à un croisement commercial (1 lignée Beghin x 1 lignée Grimaud Frères Sélection) et ceux des échantillons GAL-s et GRI-s représentaient un mélange de lignées sélectionnées par les entreprises Galor et Grimaud Frères Sélection.

L'ADN a été extrait individuellement et quantifié afin de réaliser un mélange en quantités égales des échantillons. Le séquençage a été réalisé sur une plateforme Illumina HiSeq. Les lectures ont été alignées sur le génome de référence et les polymorphismes identifiés par Pool-hmm (<https://forge-dga.jouy.inra.fr/projects/pool-hmm>) par population puis dans une approche commune.

1.3. Analyses

Les fréquences alléliques des polymorphismes dans les populations ont été estimées avec la méthode Pool-HMM (Boitard et al., 2013), qui tient compte des spécificités du protocole Pool-seq (mélange des individus et erreurs de séquençage). La diversité génétique de chaque population a été évaluée d'une part par l'hétérozygotie moyenne, déduite de ces fréquences, d'autre part à partir des lectures brutes par une variante de l'estimateur de Watterson spécifique aux données Pool-seq implémentée dans le logiciel PoPoolation2 (Kofler et al., 2011). Les relations génétiques entre les populations ont été étudiées par Analyse en Composantes Principales (ACP) des fréquences alléliques.

Deux approches différentes ont été appliquées pour détecter des signatures de sélection. Premièrement, nous avons cherché à mettre en évidence les traces de sélection au niveau du génome de chaque population (Boitard et al., 2012). Cette approche recherche des régions génomiques présentant une diversité génétique réduite, tout en tenant compte des spécificités des données Pool-seq. Deuxièmement, nous avons cherché les régions génomiques différenciant fortement les populations (Fariello et al., 2017). Cette approche calcule la probabilité d'obtenir la diversité observée par hasard, les très faibles probabilités indiquant alors un événement de sélection.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Le génome de référence

Nous avons obtenu 2728 scaffolds pour une longueur totale de 1,04 Gb. Les N50 pour les contigs et les scaffolds sont de 232 kb et 7,8 Mb respectivement. L'assemblage final des scaffolds sur le génome étroitement apparenté du poulet est composé de 29 autosomes (seuls utilisés pour la suite de l'étude), du chromosome Z, d'un groupe de liaison (LGE64) et de l'ADN mitochondrial.

2.2. Diversité génétique

Les fréquences alléliques ont été estimées pour 10 205 115 SNP bi-alléliques. La diversité génétique, (H_e et Θ_{ws}) est moins importante dans les populations domestiques (tableau 1), en lien avec la réduction de la taille efficace résultant de la domestication.

Sur les 8 sous-espèces de Pintade, 2 sont représentées à l'état sauvage dans notre échantillonnage, *N. m. coronata* (Afrique du Sud) et *N. m. galeata* (Burkina Faso). La structure génétique mise en évidence par

l'ACP (Figure 1) montre sur le premier axe une différenciation entre *N. m. coronata* et les autres populations, en accord avec l'hypothèse de domestication initiale à partir de *N. m. galeata* en zone soudano-sahélienne (Blench, 2000 ; Larson et Fuller, 2014) et suivie par une diffusion ultérieure en Europe à partir de l'Afrique de l'Ouest (Belshaw, 1985). Parmi les populations du Burkina Faso, le statut domestiqué ou sauvage est plus discriminant que la localisation géographique. Les populations KOF-w et YAB-w se chevauchent, bien que le lieu d'échantillonnage de YAB-w soit plus proche de celui des populations domestiques SDA-t et SKO-t. Ceci laisse penser qu'il existe un très faible flux de gènes entre populations sauvages et domestiques, bien que l'élevage villageois de la pintade soit en totale liberté, à la différence de la situation observée pour la poule au Vietnam (Berthouly et al., 2009). Le deuxième axe oppose les populations ouest-africaines et européennes, avec une séparation des populations hongroises des lignées commerciales françaises.

2.3. Signatures de sélection

Dans l'approche intra-population, des milliers de régions génomiques montrent une réduction de diversité et sont donc potentiellement sous sélection. Parmi celles-ci, 5 sont potentiellement liées à la domestication, puisqu'elles ont été détectées dans au moins 6 (sur 7) des populations domestiques, sans montrer de signal significatif dans aucune des 3 populations sauvages (Figure 2a pour un exemple sur le chromosome 7). De même, 31 régions étaient potentiellement liées à l'importation en Europe, car détectées dans au moins 4 (sur 5) des populations européennes (Figure 2b pour un exemple sur le chromosome 1) et 64 à la sélection récente pour les caractères de production dans les lignées commerciales (détectées dans les 3 lignées).

Avec l'approche inter-populations, 8 régions ont été détectées. Deux de ces régions recouvrent des signatures de domestication détectées par l'approche intra-population, et une recouvre une signature européenne. Les données obtenues dans les 5 autres régions suggèrent que 3 d'entre elles sont également liées à la domestication ou à l'importation en Europe.

2.4. Régions/gènes candidats

Parmi les 223 gènes trouvés dans les régions détectées, nous avons concentré notre étude sur la présence d'allèles à fréquences extrêmes : $>0,75$ dans les populations sélectionnées et $<0,25$ dans les autres. Une liste de 58 gènes contenant de telles mutations, dont 25 avec annotations, a été établie. Nous présentons ici 2 de ces gènes candidats potentiellement impliqués dans la domestication.

La petite région de domestication de 21 kb en position 7,3 Mb sur le chromosome 7 (Figure 2a) contient *PAPPA2* comme seul gène. 27 SNP sur une portion de 20 kb du gène présentent des différences de fréquence extrêmes entre les populations sauvages et domestiquées, l'une d'entre elles modifiant la

séquence de la protéine (variant faux-sens). Ce pic étroit est observé dans les populations traditionnelles africaines du Burkina Faso et du Bénin, alors que dans les populations européennes, la signature de sélection englobe une région beaucoup plus large, de 219 kb. Une signature de sélection étroite suggère un événement ancien, alors qu'une région plus grande suggère une sélection récente. Une hypothèse expliquant cette observation pourrait être qu'une première étape de sélection aurait pu avoir lieu lorsque la pintade a été domestiquée en Afrique et qu'une deuxième s'est produite après l'importation de l'espèce en Europe, affectant un autre gène à proximité ou l'un des haplotypes restants dans *PAPPA2*. Un lien entre *PAPPA2* et le contrôle génétique de la taille corporelle a été rapporté chez la souris (Christians et al., 2006), l'homme (Lango Allen et al., 2010) et les bovins (Bouwman et al., 2018). Sa mise en évidence comme signature de domestication chez la pintade est à mettre en relation avec une domestication pour la production de viande.

Sur le chromosome 8, le locus LOC110403465, annoté *EDNRB2-like* contient aussi un variant faux sens présentant des fréquences alléliques extrêmes entre sauvages (0) et domestiques (1) et une analyse par BLAST confirme sa forte identité avec *EDNRB*. Ce gène est impliqué dans la pigmentation et plusieurs mutations codantes ont été associées à des taches blanches ou à l'extension du plumage blanc chez les poulets (Kinoshita et al., 2014).

L'observation sur les phénotypes individuels des pintades échantillonnées au Burkina Faso et au Bénin a confirmé l'implication possible de *EDNRB* dans la domestication : (1) toutes les pintades domestiques présentaient de grandes plaques de peau blanche sur la tête, tandis que les pintades sauvages avaient une peau noire sur tout le corps et la peau des pattes présentait fréquemment des zones blanches ou jaunes sur les pintades domestiques alors que celles des oiseaux sauvages étaient toujours noires; (2) 16 oiseaux sur 31 présentaient des taches blanches sur le ventre et plusieurs plumes des ailes étaient entièrement blanches, imitant le phénotype des taches blanches rencontré sur certains poulets marbrés porteurs d'une mutation de *EDNRB2*; (3) 5 oiseaux sur 31 présentaient un phénotype dilué allant du gris pâle au blanc, où un motif de taches fantômes pouvait être distingué, imitant la mutation 'mo' de *EDNRB2* décrite dans une race de poulets japonaise entièrement blanche par Kinoshita et al. (2014). Par ailleurs, *EDNRB* est exprimé dans les mélanocytes provenant de la crête neurale et est particulièrement mentionné par Wilkins et al. (2014) qui proposent qu'une altération minime des cellules de la crête neurale durant le développement embryonnaire puisse influencer de nombreux caractères morphologiques, physiologiques et comportementaux liés au syndrome de domestication.

CONCLUSION

Cette étude a révélé que les populations sauvages ont une diversité génétique plus importante que les domestiquées et que le statut sauvage ou domestique sépare mieux les populations africaines que leur localisation géographique. Le flux de gènes entre domestiques et sauvage est limité. Plusieurs régions génomiques montrant des signatures de sélection, liées à la domestication, à l'importation en Europe ou à la sélection commerciale, ont été détectées. Parmi les gènes candidats localisés dans ces régions, *EDNRB2* est connu pour induire des phénotypes de perte de coloration chez les oiseaux domestiques.

Remerciements

Les auteurs remercient les financeurs de cette étude (AGENAVI (Programme SeqVol), Département de Génétique Animale de l'INRA, AgroParisTech et Prix CSRS 2013-Fonds Eremitage pour la recherche scientifique en partenariat), ainsi que les partenaires (Entreprises de sélection, Direction Provinciale de l'Environnement du Houet, agents techniques sur le terrain) pour leur aide dans la collecte des échantillons et la plateforme Genotoul pour le séquençage des échantillons.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Belshaw R.H.H., 1985. Guinea Fowl of the World. Nimrod Book Services, Liss, Hampshire.
- Berthouly C., Leroy G., Van T.N., Thanh H.H., Bed'hom B. et al., 2009. BMC Genet., (10), 1.
- Boitard, S., Kofler, R., Françoise, P., Robelin, D. et al., 2013. Mol. Ecol. Resour. 13, 337–340
- Blench R.M., 2000. In : The Origins and Development of African Livestock: archaeology, genetics, linguistics and ethnography (Blench R.M., MacDonald K.C. edit.) Routledge, New York, pp314-338.
- Boitard S., Schlotterer C., Nolte V., Pandey R. V., Futschik A., 2012. Mol. Biol. Evol., (29), 2177–2186.
- Bouwman A.C., Daetwyler H.D., Chamberlain A.J., Ponce C.H. et al., 2018. Nature Genet., (50), 362–367.
- Christians J.K., Hoeflich, A., Keightley P.D., 2006. Genetics, (173), 1547–1553.
- Fariello M.I., Boitard S., Mercier S., Robelin D., Faraut T. et al., 2017. Mol. Ecol., (26), 3700–3714.
- Kinoshita K., Akiyama T., Mizutani M., Shinomiya A., Ishikawa A., et al., 2014. PloS One, (9), e86361
- Kofler R., Pandey R.V., Schlotterer C., 2011. Bioinforma. Oxf. Engl. 27:3435–3436.
- Lango Allen H., Estrada K., Lettre G., Berndt S.I., Weedon M.N. et al., 2010. Nature, (467), 832–838.
- Larson G., Fuller D.Q., 2014. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., (45), 115–136.
- Shibusawa M., Nishida-Umehara C., Masabanda J. et al., 2002. Cytogenet. Genome Res., 98, 225–230.
- Wilkins A.S., Wrangham R.W., Fitch W.T., 2014. Genetics, (197), 795–808.

Tableau 1 : Description de l'échantillonnage utilisé pour les analyses en Pool-seq

Les localisations géographiques et le nom des entreprises de sélection sont indiqués avec le nom de l'échantillon.
 *A cause de la faible profondeur de séquençage, ces 3 échantillons seront fusionnés en un seul échantillon 'Burkina Faso', nommé BUR-t, pour les analyses de signature de sélection.

Echantillon	Statut	Nombre d'individus	Profondeur de séquençage	H_e	Θ_w
AFS-w: Afrique du Sud	sauvage	3	14,47	0,1736	0,0035
KOF-w: Koflandé, Burkina Faso	sauvage	8	17,64	0,1319	0,0034
YAB-w: Yabé, Burkina Faso	sauvage	8	20,08	0,1499	0,0034
SDA-t: Sara-Dan, Burkina Faso*	traditionnel	5	9,21	0,0885	0,0021
SKO-t: Sarakongo, Burkina Faso*	traditionnel	5	13,01	0,1097	0,0024
DOR-t: Dori, Burkina Faso*	traditionnel	5	7,59	0,0941	0,0022
BEN-t: Bénin	traditionnel	15	15,69	0,1150	0,0026
GOD-t: Godollo, Hongrie	traditionnel	30	16,76	0,0944	0,0023
HAR-t: Hortobagy, Hongrie	traditionnel	30	18,04	0,1037	0,0022
BEG-s: Béghin, France	sélectionné	12	15,06	0,0999	0,0022
GAL-s: Galor, France	sélectionné	29	37,01	0,1125	0,0020
GRI-s: Grimaud Frères Sélection, France	sélectionné	20	38,71	0,1077	0,0019

Figure 1. (A) localisation des populations d’Afrique de l’Ouest. (B) Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée à partir des fréquences des polymorphismes identifiés. Voir le tableau 1 pour le nom complet des populations. Code couleur : bleu = populations sauvages ; vert = populations domestiques traditionnelles africaines ; orange = populations domestiques traditionnelles européennes ; rouge = lignées commerciales sélectionnées.

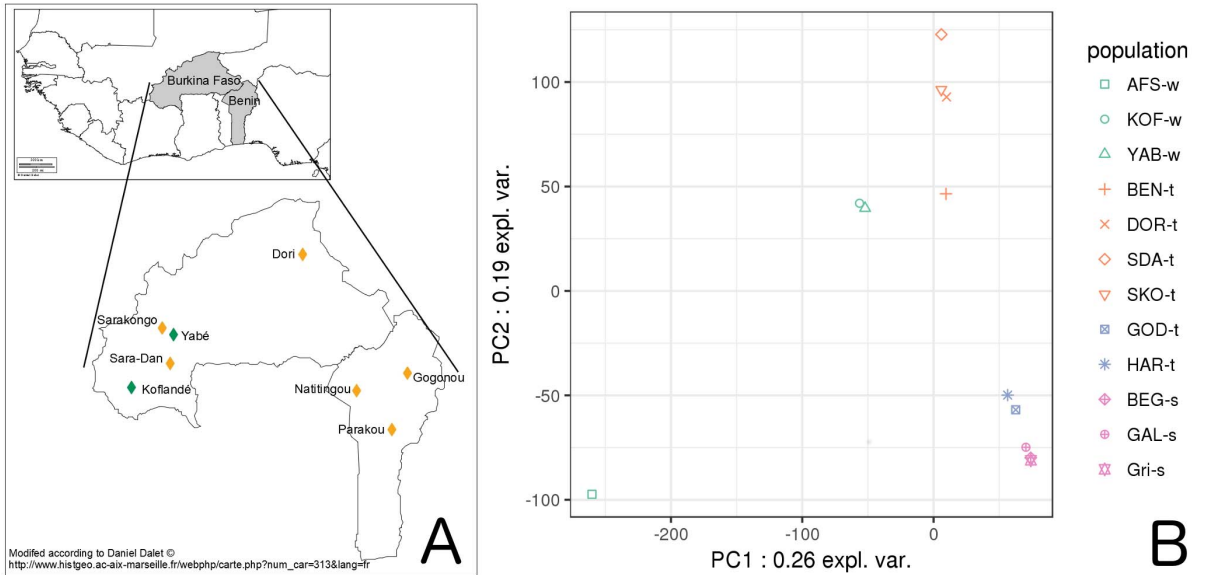
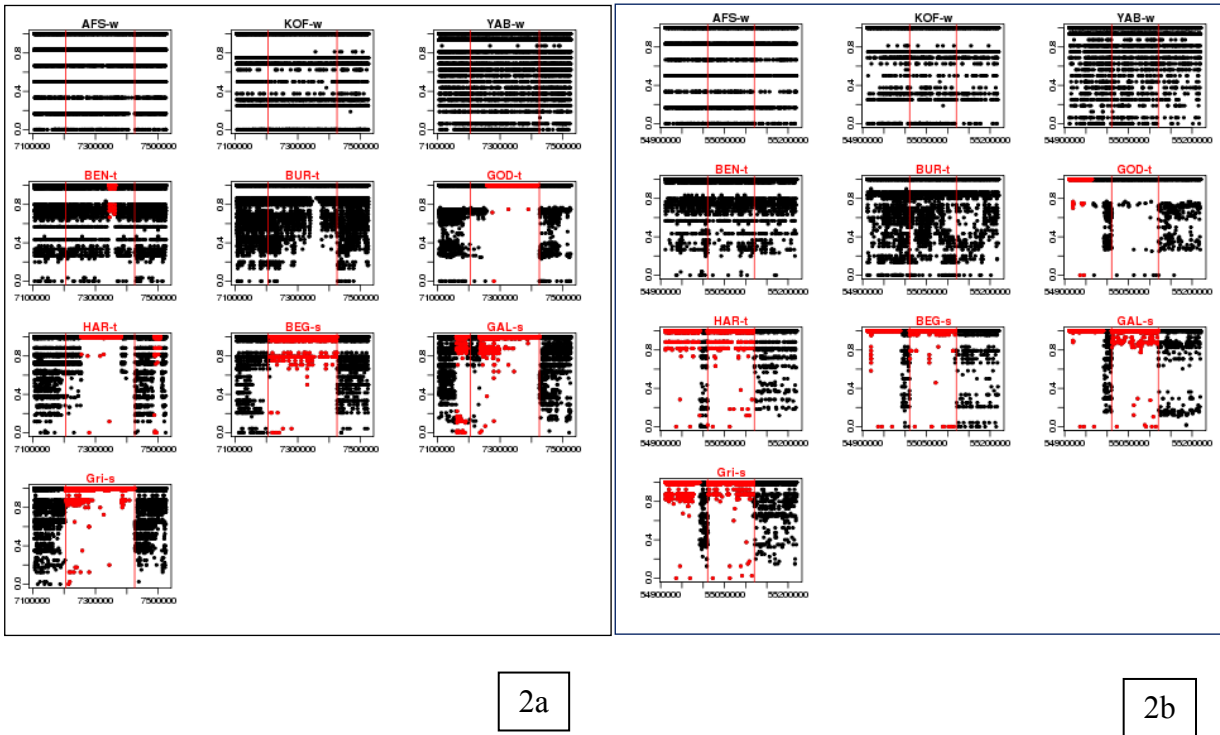


Figure 2. Profils de diversité génétique pour deux régions sous sélection, et dans les 10 populations. (2a) région localisée sur le chromosome 7, en lien avec la domestication ; (2b) région localisée sur le chromosome 1, en relation avec l’importation des pintades vers l’Europe. Pour chacune des populations, la fréquence de l’allèle majeur (axe y) est représentée pour tous les variants bi-alléliques de la région, selon leur position génomique (axe x). Les points rouges indiquent la région détectée dans chaque population et les lignes rouges indiquent l’union des régions détectées lors de la combinaison de toutes les populations sélectionnées.



DEVELOPPEMENT D'UNE PUCE DE GENOTYPAGE HAUTE DENSITE 600K POUR LE CANARD COMMUN ET LE CANARD DE BARBARIE

Thébault Noémie¹, Riquet Juliette¹, Diot Christian², Brard-Fudulea Sophie³, Guémené Daniel³, Alletru Bernard⁴, Cornil Maude⁴, Bouleau Pascal⁴, Blanchet Magali⁵, Le Mignon Guillaume⁵, Demeure Olivier⁵, Vignal Alain¹

¹*GenPhySE UMR 1388, Université de Toulouse, INRA, ENVT, 31320 CASTANET-TOLOSAN*

²*PEGASE UMR 1348, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 SAINT-GILLES*

³*SYSAAF, Centre INRA Val de Loire, 37380 NOUZILLY*

⁴*Gourmaud Sélection, Groupe Orvia, 85260 SAINT ANDRE 13 VOIES*

⁵*Grimaud Frères Sélection, Groupe Grimaud, La Corbière, 49450 ROUSSAY*

sophie.brard-fudulea@inra.fr

RESUME

La sélection génomique est aujourd'hui largement utilisée pour l'amélioration génétique des animaux et des plantes. Chez le canard, cette méthode pourrait permettre d'améliorer le progrès génétique pour des caractères non-mesurables sur les candidats à la sélection (létaux, exprimés chez un seul sexe, ou mesurés sur l'hybride pour la sélection des lignées pures). Malgré l'intérêt potentiel de l'utilisation de la sélection génomique chez le canard, aucun outil moderne de génotypage n'est disponible pour les canards commun (*Anas platyrhynchos*) et de Barbarie (*Cairina moschata*). Cette étude décrit la finalisation de l'assemblage du génome du canard de Barbarie, et la mise au point d'un outil de génotypage haut-débit et haute-densité pour les 2 espèces : une puce 600K Thermo Fisher SNP. L'assemblage du génome du Barbarie a permis d'obtenir 3702 scaffolds avec un N50 de 2,4 Mb. Les scaffolds ont ensuite été ordonnés en chromosomes, par alignement sur le génome du canard commun. Pour l'identification des SNP, des pools (mélanges) d'ADN de canards colvert, de Rouen, ainsi que de lignées commerciales de canards Pékin et de Barbarie ont été séquencés. Les séquences ont été alignées sur les génomes de référence correspondant. A l'issue des contrôles sur la qualité, 8,4 et 12,2 millions de SNP avec une Minor Allele Frequency (MAF) $\geq 0,05$ ont été identifiés pour le canard de Barbarie et pour le canard commun respectivement. Les SNP ont été filtrés afin de maximiser le nombre de marqueurs informatifs par population et d'assurer une bonne couverture du génome. A l'issue de ces tris, 343 950 SNP d'une part et 331 241 SNP d'autre part ont été choisis pour les canards commun et de Barbarie.

ABSTRACT

Development of a high-density 600K SNP array for Muscovy and Common Ducks

Genomic selection is widely used for genetic improvement of many plant and animal species. This evaluation method could potentially increase genetic gain in ducks for traits that cannot be measured on selection candidates (lethal, expressed in one sex only, or measured on hybrid duck for purebred selection). Implementation of genomic selection depends on the availability of genotyping tools, such as SNP chips, but so far none were developed neither for common duck (*Anas platyrhynchos*) nor Muscovy duck (*Cairina moschata*). This paper describes the assembly of the Muscovy duck genome (the common duck genome is already available), and the design of a 600K Thermo Fisher SNP chip. The common duck genome was used as reference for the assembly of the Muscovy genome: 3702 scaffolds were produced, with a N50 of 2.4 Mb. SNP were identified from sequence data: several Muscovy and common ducks populations (Rouen duck, Mallard duck, Pekin duck), were collected, and 50 samples were pooled independently for each population. After raw quality controls, 8.4 million SNPs and 12.2 million SNP were identified for Muscovy and common ducks respectively. Filters based on Minor Allele Frequency and genome coverage were used, and finally 343 950 SNP were kept for the common duck, and 331 241 SNP for the Muscovy duck.

INTRODUCTION

La mise en œuvre de la sélection génomique, qui révolutionne depuis plusieurs années l'amélioration génétique de plusieurs espèces, repose sur l'obtention des génotypes grâce à l'utilisation de puces SNP. Aucun outil de génotypage n'existe pour les deux espèces de canard Pékin et Barbarie, ainsi que pour le mulard produit de leur croisement, tous trois d'intérêt zootechnique en France. Il existe cependant un avantage potentiel d'évaluations génomiques pour des caractères difficiles à mesurer, voire non-mesurables sur les candidats à la sélection : robustesse, résilience, adaptabilité, résistances aux maladies, caractères de production et/ou de découpe mesurés sur le mulard pour la sélection des lignées des deux espèces parentales, caractères de reproduction mesurés sur les femelles pour la sélection des mâles... Le projet CanArray vise à développer une puce 600K SNP Thermo Fisher utilisable pour génotyper des canards communs et de Barbarie. Pour le développement de la puce, le génome du canard commun était disponible (Huang *et al.* 2013), mais pas celui du canard de Barbarie. Cet article décrit dans un premier temps la finalisation de l'assemblage du génome du canard de Barbarie, et dans un second temps l'identification et le choix de marqueurs SNP pour la première puce de génotypage mise au point pour les canards communs et de Barbarie.

1. MATERIEL & METHODES

1.1 Assemblage du génome du canard de Barbarie

Les séquences d'ADN disponibles pour assembler le génome du canard de Barbarie proviennent d'un individu mâle consanguin. Elles ont été obtenues dans le cadre du programme AGENAVI SeqVol, en collaboration avec l'Université Washington (Saint-Louis, USA) et se composent de 3702 scaffolds, de 0,1 à 15 Mb, pour une longueur totale de 1,109 Gb. L'assemblage des scaffolds en chromosomes a été réalisé par alignement sur le génome du canard commun.

1.1.1 Alignement et chaînage

L'alignement a été réalisé avec l'outil LAST (Frith, 2011). Les paramètres optimaux pour la réalisation de l'alignement ont été obtenus avec l'outil last-train (Hamada *et al.* 2017) : les paramètres par défaut sont utilisés par ce logiciel, puis ajustés itérativement en fonction des résultats obtenus jusqu'à stabilisation de la qualité de l'alignement. En raison de régions de similarité plus ou moins importantes entre les deux espèces, des blocs d'alignements sont obtenus, séparés par des régions ne s'alignant pas.

Le chaînage de ces blocs a été réalisé afin de les relier et de rajouter les séquences voisines sur le génome mais non alignées, tout en supprimant les blocs d'alignements chevauchants. Un script a été développé afin de permettre à l'utilisateur d'indiquer la distance maximale autorisée entre deux alignements pour le chaînage, avec pour objectif de produire les chaînes les plus longues possibles et sans recouvrement des séquences.

1.1.2 Filtre des alignements et assignation chromosomique

Des problèmes de scaffolds du canard de Barbarie s'alignant sur plusieurs régions du génome du canard commun compliquent grandement l'assignation chromosomique. La plupart sont dus à des micro-alignements de très petite taille causés par les séquences répétées, mais d'autres peuvent être dus à des problèmes d'alignements réels sur deux chromosomes, soit dus à des problèmes d'assemblage des scaffolds, soit à des séquences récemment dupliquées dans le génome. Ceci empêche une assignation chromosomique automatique des scaffolds. Afin de résoudre ce problème, le ratio entre le plus long alignement et le second en taille a été calculé pour chaque scaffold, sur lequel l'application d'un seuil a permis d'éliminer les micro-alignements. Les scaffolds filtrés ont été assignés à leur chromosome et retournés en cas d'alignement anti-sens avec la fonction `reverse_complement` de BioPython (Cock *et al.* 2009). Les scaffolds ne s'alignant pas ou n'ayant pas passé les filtres précédemment appliqués ont été intégrés au chromosome Unknown.

1.2 Construction de la puce

1.2.1 Séquençage

Un séquençage en mélange (pools) de 50 animaux par population a été réalisé sur des animaux échantillonnés parmi des populations françaises de canard colvert, de canard de Rouen, de canard Pékin et de canard de Barbarie. Pour les canards Pékin et de Barbarie, les échantillons proviennent des lignées expérimentales de l'INRA et des lignées des sélectionneurs français Grimaud Frères Sélection et Orvia Gourmaud Sélection. Compte-tenu de l'absence du chromosome W dans les deux génomes de référence des canards Pékin et de Barbarie, seuls des mâles ont été prélevés, à l'exception des Colverts pour lesquels des échantillons mâles et femelles ont été fournis.

Les bibliothèques de séquençage ont été réalisées avec le kit TruSeq DNA PCR, et les pools ont été séquencés avec la technologie Illumina HiSeq3000 à une profondeur de 50X.

1.2.2 Détection et caractérisation des SNP

Les séquences obtenues dans les différents pools ont été alignées sur les génomes de référence correspondants avec l'algorithme BWA (Li & Durbin, 2009), les alignements triés, puis les duplicats de PCR ont été marqués avec les outils Picard SortSam et MarkDuplicates (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). La recalibration de la qualité des données de séquençage conservées a été réalisée suivant le protocole proposé par Genome Analysis Tool Kit (McKenna *et al.* 2010).

Les fréquences alléliques ont été estimées avec le script Python pool-hmm.py (Boitard *et al.* 2013). Un autre script développé en Python regroupe les populations à analyser et conserve les positions pour lesquelles au moins une population présente un allèle différent de celui connu dans le génome de référence.

1.2.3 Qualité technique et spécificité génomique

Les SNP bi-alléliques polymorphes ont été sélectionnés dans les régions de couverture > 25X (plus de 25 lectures validées pour le locus), filtrés afin de ne garder que ceux à +/- 50 pb d'une insertion-délétion, et distants d'au moins 35 paires de bases d'un autre SNP (contrainte due à la longueur de l'amorce mise au point par Thermo Fisher). Finalement, les SNP retenus ont été alignés sur les génomes de référence des espèces correspondantes sur une longueur de 71 pb (le polymorphisme et 35 bases de part et d'autre), et seuls les alignements uniques ont été conservés. Un jeu de SNP communs aux deux espèces a également été identifié en alignant les séquences flanquantes des marqueurs identifiés chez les canards communs et de Barbarie.

1.2.4 Répartition et informativité

Le choix des SNP a tenu compte de leur répartition sur le génome pour différents niveaux de MAF donnés. La distance idéale entre 2 SNP a été estimée à 1,6 kb (600K marqueurs pour couvrir 1 Gb). Le choix des SNP a été réalisé en plusieurs étapes : il y a eu dans un 1^{er} temps un choix de SNP avec une $MAF \geq 0,15$ dans 75% des populations et répartis sur l'ensemble du génome, puis l'ajout de SNP avec le même critère de MAF dans 60% des populations, et enfin de SNP avec une MAF d'au moins 0,05 toutes populations confondues.

Un ordre de priorité des SNP pour le design de la puce a été défini : priorité 1 si le SNP était distant du SNP voisin de plus de 1,6 kb, priorité 2 si la distance était inférieure, priorité 3 si les allèles du polymorphisme étaient complémentaires (A/T ou C/G).

2. RESULTATS & DISCUSSION

2.1 Assemblage du génome du canard de Barbarie

2.1.1 Alignement et chaînage

Après alignement avec Last, 2397 des 3702 scaffolds de départ s'alignent sur le génome du canard commun avant chaînage et filtration. Les scaffolds ne s'alignant pas sont en fait de très petite taille et ne représentent qu'une couverture totale de 16,5 Mb. La séquence de ces scaffolds est soit trop divergente entre les deux espèces, spécifique du Barbarie ou pas séquencée pour des raisons techniques chez le Pékin. Parmi les scaffolds alignés, seuls 1177, de petite taille, s'alignent sur une cible unique et sont donc assignés à un chromosome, pour un total de 3,2 Mb seulement. Les 1220 scaffolds restants couvrent 1 108 980 Mb et s'alignent chacun sur plusieurs régions, notamment à cause de très courtes régions de similarité entre les deux espèces, dont la probabilité de présence augmente avec la longueur des scaffolds (Figure 1A). En effet, ces grands scaffolds ont dans la plupart des cas la très grande majorité de leur séquence alignée sur un unique chromosome Pékin, et les régions alignées sur d'autres chromosomes sont beaucoup plus petites (moins de 100kb).

L'étape de chaînage, qui permet de ne retenir que l'alignement principal, a conduit à supprimer un total de 8,74 Mb. La figure 1A et 1B présente un exemple d'alignement du scaffold 0 du canard de Barbarie sur le chromosome 4 du canard commun, avant et après chaînage.

2.1.2 Filtre des alignements

Après chaînage, certains scaffolds ont toujours des alignements multiples. Pour les résoudre, le seuil pour le filtre sur le ratio entre le plus long alignement et le second en taille a été fixé à 1% pour les scaffolds de taille inférieure au N50, et à 3% pour les scaffolds de taille supérieure au N50, afin de tenir compte du fait qu'un scaffold plus long a plus de chances de s'aligner à plusieurs endroits du génome. Un filtre sur le pourcentage d'alignement a été fixé à 60% afin d'éliminer les faux-positifs.

Ces 2 filtres ont conduit à l'élimination de 618 scaffolds. *In fine*, le génome du canard de Barbarie aligné sur le génome du canard commun compte 1780 scaffolds, pour une couverture du génome de 0,966 Gb, et un N50 de 2,194 Mb.

2.1.3 Assignment chromosomique des scaffolds

Les résultats de l'assignment chromosomique des scaffolds sont présentés dans la figure 2. Les longueurs des chromosomes sont du même ordre de grandeur chez le canard de Barbarie, le canard commun et la Poule. La taille du chromosome

unknown est calculée comme la somme des séquences non assignées. Le chromosome unknown est plus petit chez le canard de Barbarie que chez le canard commun car du fait de l'évolution des technologies, la longueur des séquences générées est plus longue chez le Barbarie que chez le canard commun.

2.2 Construction de la puce

2.2.1 Détection des SNP

Un total de 9,2 millions et 23,6 millions de loci polymorphes ont été identifiés chez le canard de Barbarie et le canard commun respectivement. Le nombre de loci polymorphes plus élevé chez le canard commun est dû au séquençage de populations très différenciées : le Colvert et le Rouen d'une part (environ 14 millions de SNP identifiés), et les lignées de canard Pékin d'autre part (environ 9 millions de SNP identifiés).

2.2.2 Choix des SNP

Le tableau 1 présente le nombre de SNP conservés à l'issue de chaque étape de sélection. A noter que pour l'élimination des SNP trop proches les uns des autres, les loci polymorphes des Colvert n'ont pas été pris en compte car ils auraient conduit à l'élimination d'un trop grand nombre de marqueurs du canard commun. En revanche, ces lignées ont été utilisées pour calculer les MAF et la répartition sur le génome des loci conservés.

Les listes finales de SNP soumises à Thermo Fisher comptaient 472K SNP pour le canard commun, et 446K SNP pour le canard de Barbarie. Seuls 1K SNP commun aux 2 espèces ont été identifiés dans ces 2 listes. A l'issue d'échanges avec Thermo Fisher basés sur des tests réalisés sur les amorces *in silico*, un total de 673 886 SNP seront présents sur la puce :

343 950 SNP pour le canard commun, et 331 241 SNP pour le canard de Barbarie.

CONCLUSION

L'assemblage du génome du canard de Barbarie réalisé dans ce projet avec pour référence le génome du canard commun a permis d'obtenir le 1^{er} génome de référence pour cette espèce, d'une taille totale proche d'1 Gb. La production de ce génome assemblé était un prérequis essentiel pour le choix de marqueurs pour la puce 600K. Le séquençage des populations françaises a permis la production de ressources génomiques en quantité et en qualité suffisantes pour le choix des marqueurs de la puce. Les marqueurs ont été sélectionnés afin d'assurer une bonne couverture du génome, avec des MAF variées. Intra-espèce, la proportion de SNP variables dans les populations de canard Pékin et de Barbarie ayant servi à l'identification des marqueurs devrait être d'au moins 80%. Le test de la puce prévu en 2019 permettra de confronter les performances attendues de cet outil aux résultats des 1^{ers} génotypages, et de faire avancer la réflexion sur l'intégration de la génomique dans les schémas de sélection de canards.

Remerciements

Les auteurs remercient les Régions Pays de la Loire-Bretagne et Nouvelle-Aquitaine pour le soutien financier apporté au projet, préalablement labellisé par les pôles de compétitivité Valorial et Agri-Sud-Ouest, respectivement. Les auteurs remercient également Mr. Eric Poullain (SARL du Domaine de la Feuge) pour la fourniture d'échantillons de canard Colvert. Les auteurs remercient également Eric Poullain (SARL du Domaine de la Feuge) pour la fourniture d'échantillons de canard Colvert.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boitard, S., Kofler, R., Françoise, P., Robelin, D., Schlötterer, C., Futschik, A., 2013. *Mol Ecol Resour* 13, 337–340
- Cock, P.J.A., Antao, T., Chang, J.T., Chapman, B.A., Cox, C.J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., de Hoon, M.J.L., 2009. *Bioinformatics* 25, 1422–1423
- Fillon, V., Vignoles, M., Crooijmans, R.P.M.A., Groenen, M. a. M., Zoorob, R., Vignal, A., 2007. *Anim. Genet.* 38, 303–307
- Frith, M.C., 2011. *Nucleic Acids Res* 39, e23–e23
- Hamada, M., Ono, Y., Asai, K., Frith, M.C., 2017. *Bioinformatics* 33, 926–928
- Huang, Y., Li, Y., Burt, D.W., Chen, H., Zhang, Y., Qian, W., Kim, H., Gan, S., Zhao, Yiqiang, Li, J., Yi, K., Feng, H., Zhu, P., Li, B., Liu, Q., Fairley, S., Magor, K.E., Du, Z., Hu, X., Goodman, L., Tafer, H., Vignal, A., Lee, T., Kim, K.-W., Sheng, Z., An, Y., Searle, S., Herrero, J., Groenen, M.A.M., Crooijmans, R.P.M.A., Faraut, T., Cai, Q., Webster, R.G., Aldridge, J.R., Warren, W.C., Bartschat, S., Kehr, S., Marz, M., Stadler, P.F., Smith, J., Kraus, R.H.S., Zhao, Yaofeng, Ren, L., Fei, J., Morisson, M., Kaiser, P., Griffin, D.K., Rao, M., Pitel, F., Wang, J., Li, N., 2013. *Nature Genetics* 45, 776–783
- Li, H., Durbin, R., 2009. *Bioinformatics* 25, 1754–1760

McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., DePristo, M.A., 2010. *Genome Res.* 20, 1297–1303

Figure 1. Alignement des 15 Mb du scaffold 0 du canard de Barbarie sur le génome du canard commun avant chaînage (A) et après (B). Chaque couleur correspond à un chromosome différent (chromosome 4 en bleu foncé). En abscisse : position sur le scaffold 0 en paires de bases. En ordonnée : position sur le chromosome du canard commun en paires de bases.

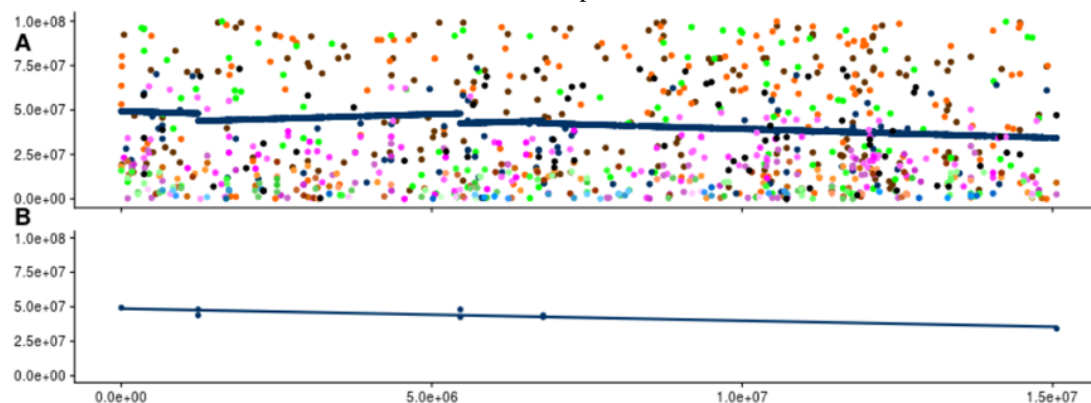


Figure 2. Histogramme de la taille des chromosomes pour la Poule (en bleu), le canard de Barbarie (en orange) et le canard commun (en vert). Les numéros des chromosomes sont indiqués, Un : chromosome unknown (séquences non assignées).

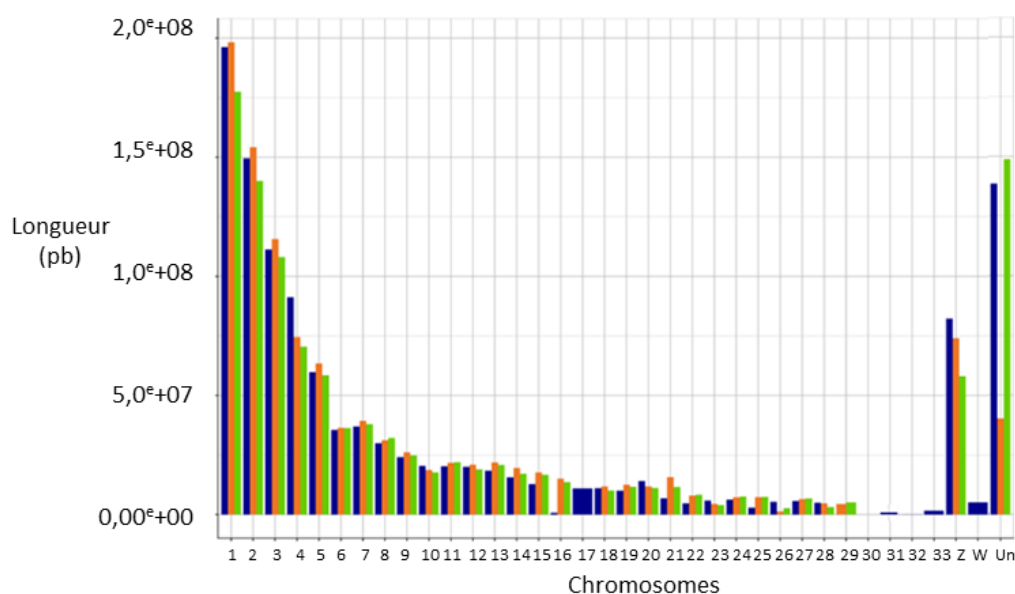


Tableau 1. Nombre de loci conservés pour la construction de la puce à chaque étape de tri.

Tri réalisé	Nombre de SNP chez le canard commun	Nombre de SNP chez le canard de Barbarie
Loci polymorphes dans au moins une population	23,6M	9,2M
Absence d'indel à au moins 50 pb	12,6M	6,2M
Suppression des SNP séparés par moins de 35 pb	8,1M	4,5M
SNP bi alléliques & profondeur de lecture comprise entre 25 et 100	8,0M	4,4M
Ségrégation dans au moins 75% des populations & MAF > 0,05	2,2M	2,0M
Alignement unique sur le génome de référence	2.1M	1.9M
Répartition sur le génome en fonction de la MAF	472K	446K

DEVELOPPEMENT D'UN PANEL DE MARQUEURS SNP POUR DETECTER L'HYBRIDATION ENTRE LA CAILLE DES BLES ET LA CAILLE JAPONAISE.

Rouger Romuald¹, Brard-Fudulea Sophie¹, Thébault Noémie², Pitel Frédérique², Vignal Alain², Bed'hom Bertrand³, Rognon Xavier³, Lumineau Sophie⁴, Guémené Daniel¹

¹SYSAAF, INRA, Centre Val-de-Loire, 37380 Nouzilly, France ; ²GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, ENVT, 31326 Castanet Tolosan; ³GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas; ⁴Univ Rennes, Normandie Univ, CNRS EthoS UMR6552, 35042 Rennes.
romuald.rouger@inra.fr

RÉSUMÉ

La Caille des Blés (*Coturnix coturnix*) est une espèce migratrice couramment chassée en Europe. Des lâchers sont effectués dans les pays où cette pratique est autorisée afin de compléter les populations naturelles de cette espèce. De récentes études ont prouvé que certains individus de lâchers sont issus de l'hybridation avec la Caille japonaise (*Coturnix japonica*), espèce élevée pour sa chair et ses œufs. L'objectif de cet article est donc de proposer un jeu de marqueurs et une méthodologie statistique permettant de distinguer les individus *C. coturnix* des individus *C. japonica* et de leurs hybrides. A partir de données de séquençage issues de 20 *C. japonica* et 2 *C. coturnix*, 1.7 millions de SNP ont été détectés. Parmi ceux-ci, 192 marqueurs candidats ont été choisis comme potentiellement discriminants et testés sur des populations de référence. Comme attendu, la différenciation génétique estimée sur la base de ces marqueurs entre les deux espèces est forte ($F_{ST}=0.80$). Trente-deux marqueurs diagnostics de l'espèce ont pu être mis en évidence. Ils ont été inclus dans un panel de 96 marqueurs sélectionnés pour leur puissance statistique à discriminer les individus des deux espèces. Un traitement statistique *ad hoc* a été utilisé afin d'exploiter l'information produite par ce panel. Les résultats de simulations indiquent que la méthode permet de distinguer les individus issus de rétrocroisement jusqu'à la 3^{ème} génération avec un taux d'erreur d'assignation d'environ 1%. Testée sur des individus issus d'élevage, cette méthode démontre son utilité pour écarter les individus issus d'hybridation. Cette méthode est un nouvel outil permettant de contrôler le niveau d'introgression génétique de *C. japonica* dans les populations naturelles de *C. coturnix*.

ABSTRACT

The common quail (*Coturnix coturnix*) is a migratory species that is hunted in many countries across Europe. Restocking is performed in countries where it is allowed to supplement natural population of this species. Recent studies have shown that some of these restocking birds result from hybridization with the Japanese quail (*Coturnix japonica*) that is used for egg and meat production. The goal of this paper is to propose a set of markers and a statistical method allowing the discrimination of *C. coturnix*, *C. japonica* and their hybrids. Sequencing data obtained from 20 *C. japonica* and 2 *C. coturnix* allowed the detection of 1.7 millions SNP markers. From this list, 192 candidate markers were chosen as potentially discriminatory and tested on reference populations. As expected, the genetic differentiation between the two species estimated using these markers was high ($F_{ST}=0.80$) and thirty-two species-specific diagnostic markers were identified. These were included in a final panel of 96 markers selected for their statistical power to discriminate individuals from the two species. An *ad hoc* statistical method was used in order to use the information produced by this panel. Simulations showed that our method discriminates backcrossed individuals up to the third generation with an assignment error rate of approximately 1%. This method was also tested on farm animals where it showed its efficiency in removing hybrid individuals from the population. This method is a new promising tool to manage the level of genetic introgression of *C. japonica* in natural populations of *C. coturnix*.

INTRODUCTION

L'hybridation entre deux espèces proches est un phénomène couramment observé chez de nombreuses espèces animales dont les oiseaux (Randler 2002). Ses conséquences écologiques et évolutives peuvent être contrastées en ce qui concerne le maintien des espèces parentales. Ainsi l'hybridation peut être bénéfique en servant de pont entre deux espèces pour l'échange de gènes adaptatifs ou en contrant les effets de la dépression de consanguinité dans de petites populations. *A contrario*, la production importante d'hybrides peut impacter négativement la démographie des populations parentales si le succès reproducteur des hybrides est inférieur à celui des parents. Ce phénomène peut également aboutir au remplacement des populations parentales par l'hybride en cas d'hétérosis (i.e. vigueur hybride) (Todesco et al. 2016). Chez les oiseaux, une des causes communes d'hybridation est la mise en contact d'individus issus de populations naturelles avec des individus issus de populations domestiquées. Ainsi chez *Gallus gallus*, l'étude des plumages éclipses de spécimens de collection a mis en évidence que le type sauvage était progressivement remplacé dans son aire de répartition par des individus issus de l'hybridation avec le type domestiqué (Peterson and Brisbin 1999). Chez la perdrix, des hybrides entre la perdrix chukar (*Alectoris chukar*) et la perdrix rouge (*Alectoris rufa*) ont été utilisés afin de supplémer les effectifs de cette dernière, couramment chassée dans son aire de répartition. Néanmoins, la facilité des hybrides à se reproduire en milieu naturel couplé à la faible capacité des hybrides face au risque de prédation (Casas et al. 2011) sont susceptibles de mettre en danger certaines populations naturelles d'*A. rufa*. En réaction, un test ADN a été développé pour détecter les hybrides *Alectoris rufa x chukar*, test sur lequel se base maintenant la réglementation (Junta de Andalucía, 2016).

L'exemple de la Caille des Blés (*Coturnix coturnix*) est similaire. Cette espèce migratrice est largement chassée et des lâchers réguliers sont encore employés dans certains pays pour compenser les effectifs prélevés (e.g. Espagne, Italie ; Sanchez-Donoso et al. 2012). Afin d'améliorer les qualités zootechniques de ces individus de lâchers, l'hybridation avec la Caille japonaise (*Coturnix japonica*) est encore considérablement employée dans certains pays. La forte capacité des individus de lâchers à se reproduire par rapport aux individus sauvages se traduit par une introgression du génome de *C. japonica* à l'intérieur des populations sauvages de *C. coturnix* (Sanchez-Donoso et al. 2014). De plus la survie réduite des individus hybrides en environnement sauvage met en péril la survie des populations sauvages (Puigcerver et al. 2014). La détection des hybrides basée sur des critères phénotypiques (plumage, chant) est souvent difficile, notamment après plusieurs générations de

rétrocroisement. Afin de quantifier la présence d'individus hybrides en populations naturelles ou parmi les individus de lâchers, il est donc important de développer un test génétique *ad hoc*.

Le but de cette étude est donc de (1) proposer un panel de marqueurs moléculaires spécifiquement développés pour distinguer les individus *C. coturnix* des individus *C. japonica*; (2) adapter une méthode statistique permettant l'assignation d'individus dont le pedigree est inconnu.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Séquençage et désignation des marqueurs SNP candidats.

Les séquences de 20 *C. japonica* issues de deux lignées sélectionnées de façon divergente sur leur comportement social (lignées S+ et S-, INRA Val-de-Loire) ainsi que celle de 2 *C. coturnix* (U. Rennes, CNRS) ont été obtenues à la suite du programme ANR SNP-BB (ANR 009-GENM-008) et mises à disposition pour ce projet. A partir de ces séquences, 1.7 millions de SNP ont pu être détectés. Une phase de nettoyage bio-informatique et d'analyses des fréquences alléliques a permis de réduire ce nombre à 41000 SNP potentiellement spécifiques à l'une ou l'autre des espèces, parmi lesquels 192 marqueurs candidats ont été choisis dans le but de couvrir le génome de *Coturnix sp.* de façon homogène.

1.2. Génotypage des populations de références et analyses préliminaires.

Quatre-vingt-six individus considérés comme appartenant à l'espèce *C. coturnix* et 91 individus considérés comme appartenant à l'espèce *C. japonica* ont été génotypés à chacun des 192 marqueurs candidats (Tableau 1). Soixante individus hybrides dont le niveau d'hybridation est connu et 24 individus provenant d'un élevage espagnol ont également été génotypés. Enfin, 3 individus provenant de l'étude de Chazara et al. 2010 et issus de prélèvements de chasse ont été inclus, parmi lesquels deux avaient été identifiés comme hybrides (Individus 3 et 4 de Chazara et al. 2010), le troisième ayant un profil génétique incertain (Individu 9 de Chazara et al. 2010) (Tableau 1).

De ce jeu de données ont tout d'abord été écartés les SNP présentant plus de 5% de données manquantes. Ensuite, les individus présentant plus de 5% de données manquantes ont été retirés. Cette phase de filtrage a abouti à l'obtention d'un jeu de données épuré comportant 171 marqueurs pour 232 individus (dont 66 *C. coturnix*, 81 *C. japonica*, 25 individus de statut incertain et 60 hybrides de niveau d'hybridation connu, Tableau 1).

Une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été conduite sur les échantillons provenant des deux populations *C. coturnix* et *C. japonica* afin d'évaluer la confiance dans l'utilisation de ces derniers comme échantillons de référence. Les 96 meilleurs marqueurs

ont ensuite été sélectionnés sur la base de l'indice F_{st} de différenciation génétique (Nei 1987).

Tableau 1 Nombre et origine des échantillons utilisés dans la présente étude. n correspond au nombre d'individus génotypés, n_1 correspond au nombre d'individus ayant passé le filtre de qualité.

	n	n_1
<i>C. japonica</i>		
Sept lignées commerciales	71	61
Population INRA (Val-de-Loire, PEAT-Nouzilly)	10	10
Individus non domestiqués (Japon)	10	10
<i>C. coturnix</i>		
Prélèvement de chasse :		
France (Chazara et al. 2010)	27	27
Espagne	20	20
Maroc	10	5
U. Rennes 1, CNRS	29	14
<i>Statut incertain</i>		
Elevage espagnol	24	22
Individus issus de Chazara et al. 2010	3	3
<i>Hybrides de niveau d'hybridation connu obtenus à l'INRA Val de Loire (PEAT-Nouzilly)</i>		
Hybrides F1	20	20
Hybrides F2	20	20
Hybrides F7	20	20
Total	264	232

1.3. Méthode statistique

La méthode statistique utilisée ici est inspirée des méthodes classiques d'assignation individuelle à des classes d'hybrides (Montecinos et al. 2017; Campton and Utter 1985) et est une simplification de la méthode implémentée dans le logiciel NewHybrids (Anderson and Thompson 2002). Dans cette approche, nous considérons qu'un individu de pedigree inconnu peut être issu d'un nombre fini de classes d'individus (C_i) (Tableau 2).

Tableau 2 Dénomination des classes d'individus (C_i) utilisées dans cette étude. Le terme rétrocroisement se comprend ici comme le croisement d'un individu hybride avec un individu « Blé » ou « Jap ».

Dénomination	Description
« Blé »	Individus <i>C. coturnix</i>
« Jap »	Individus <i>C. japonica</i>
« F1 »	Croisement entre un individu « Blé » et un individu « Jap »
« Fx »	Croisement entre deux individus hybrides dont aucun ancêtre n'est issu de rétrocroisement
« BléB ₁ »	Rétrocroisement entre un individu « F1 » et un individu « Blé »
« BléB _i »	Rétrocroisement entre un individu « BléB _{i-1} » et un individu « Blé »
« JapB ₁ »	Rétrocroisement entre un individu « F1 » et un individu « Jap »

« JapB₁ » Croisement entre un individu « JapB_{i-1} » et un individu « Jap »

Soit un locus biallélique l dont les allèles sont A et a ; sachant les fréquences alléliques dans chacune des populations « Blé » et « Jap » de référence, il est possible d'exprimer la fréquence de l'allèle A (p_{C_i}) au sein de chaque classe :

$$p_{C_i} = 0,5 \times p_{C_j} + 0,5 \times p_{C_k} \quad (1)$$

Avec p_{C_j} et p_{C_k} les fréquences alléliques au sein des classes des deux parents j et k dont un individu de classe C_i est le produit. De même, les fréquences génotypiques attendues au sein de n'importe quelle classe sont :

$$p(AA)_{C_i} = p_{C_j} \times p_{C_k}$$

$$p(Aa)_{C_i} = p_{C_j} \times (1 - p_{C_k}) + (1 - p_{C_j}) \times p_{C_k} \quad (2)$$

$$p(aa)_{C_i} = (1 - p_{C_j}) \times (1 - p_{C_k})$$

Ainsi, pour un individu dont on connaît le génotype G_i à un locus il est possible de calculer la probabilité d'observer ce génotype dans une classe d'individus donnée C_i . On note cette probabilité $p(G_i|C_i)$. Sous hypothèse d'indépendance entre loci, la probabilité d'observer un génotype multilocus G à l'intérieur d'une classe donnée C_i est donc égale à :

$$p(G|C_i) = \prod_{l=1}^L p(G_l|C_i) \quad (3)$$

Où L correspond au nombre de loci auxquels chaque individu est génotypé.

Par utilisation de la formule de Bayes et en faisant l'hypothèse *a priori* qu'un individu a la même probabilité de provenir de chacune des classes d'individu, on peut déterminer la probabilité que l'individu de génotype G provienne de la classe C_i comme

$$p(C_i|G) = \frac{p(G|C_i)}{\sum_{m=1}^M p(G|C_m)} \quad (4)$$

Avec M le nombre de classes d'individus considérés. On se réfère à cette probabilité dans la suite de cet article comme étant la probabilité d'assignation du génotype G à la classe d'individus C_i . On considérera un individu comme appartenant à une classe si sa probabilité d'assignation à cette classe est supérieure à 0,90. L'implémentation de cette méthode a été effectuée à l'aide du logiciel R (R Core Team 2018).

1.4. Assignment d'individus hybrides produits *in silico*

Un jeu de données a été simulé afin de tester la performance du jeu de 96 marqueurs pour la détection d'individus hybrides. Ce jeu de données comporte 100 individus pour chacune des classes suivantes : Blé, Jap, F1, F2, BléB₁, BléB₂, BléB₃. Le génotype multilocus de chaque individu a été simulé en tenant compte des probabilités données en équation (1). La probabilité d'assignation de ces individus simulés a été calculée pour chacune des classes suivantes : « Blé », « Jap », « F1 », « Fx », « BléB₁ », « BléB₂ », « BléB₃ », « JapB₁ », « JapB₂ », « JapB₃ ».

1.5. Assignment d'individus réels hybrides ou de statut incertain.

La probabilité d'assignation des 60 individus hybrides de niveau connu et des 25 individus de statut incertain a été calculée en utilisant les mêmes classes que pour l'assignation des individus simulés.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Statistiques descriptives et sélection des 96 meilleurs marqueurs

Sur les 171 marqueurs retenus à la suite du génotypage, 32 marqueurs présentent un caractère diagnostique de l'espèce (i.e. l'un des allèles est fixé chez *C. coturnix* et l'autre allèle est fixé chez *C. japonica*). L'analyse en composantes principales basée sur l'ensemble des 171 marqueurs montre une nette distinction entre les deux populations de référence, sans individu de coordonnées intermédiaires (Figure 1). Les deux individus *C. coturnix* ségrégeant le long de l'axe 2 de l'ACP sont ceux dont le génome a été séquencé afin de définir les 192 marqueurs à tester, quelques marqueurs spécifiques à ces deux individus les différenciant des autres individus de l'espèce. Le F_{ST} multilocus entre *C. japonica* et *C. coturnix* calculé sur la base des 171 marqueurs est de 0,80. Les 96 meilleurs marqueurs ont été sélectionnés sur la base de leur F_{ST} (mini=0,69, maxi=1). A l'échelle de ces 96 marqueurs, le F_{ST} multilocus est de 0,93.

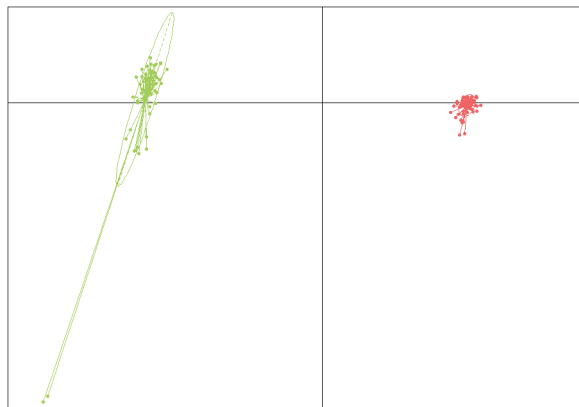


Figure 1 Analyse en composantes principales basée sur les génotypes des populations *C. coturnix* (en vert) et *C. japonica* (en rouge). Les axes des abscisses et des ordonnées expliquent respectivement 67,9% et 4% de l'inertie totale.

2.2. Assignment d'hybrides *in silico* aux différentes classes d'individus.

Parmi les 100 individus *C. coturnix* produits par simulation, tous sont correctement assignés à leur espèce avec des probabilités d'assignation supérieures à 0,90 (Figure 2). Les résultats sont similaires pour les individus *C. japonica*, F1 et F2. A quelques exceptions près (5 dans cette simulation), les individus BléB₁ sont également tous assignés à la bonne classe. Le nombre d'individus au statut ambigu augmente pour les

individus BléB₂ et BléB₃. Pour les individus BléB₂, une proportion non négligeable ont un statut ambigu entre la classe « BléB₃ » et « BléB₂ ». Le pattern est identique pour les individus BléB₃ dont la probabilité d'assignation à la classe « Blé » est quelquefois élevée. Néanmoins, cette probabilité ne dépasse le seuil d'assignation que dans de rares cas (Figure 2). La méthode présentée ici présente ses limites lors de la tentative d'assignation d'individus BléB₄ (données non présentées), les fréquences alléliques attendues dans la classe d'individu correspondante « BléB₄ » sont tellement proches des fréquences de la classe « Blé » que 96 marqueurs ne sont pas suffisant pour obtenir une distinction satisfaisante des individus des deux classes. En résumé, cette simulation démontre que la méthode présentée ici distingue les individus issus de rétrocroisement de 3^{ème} génération (« BléB₃ ») des individus *C. coturnix* avec un taux d'erreur d'assignation d'environ 1%.

2.3. Assignment d'individus réels hybrides ou de statut incertain.

Parmi les soixante individus hybrides de niveau connu, tous les individus ont été assignés sans ambiguïté à la classe dont ils sont censés être issus, à l'exception d'un seul (Figure 2). La haute probabilité d'assignation de cet individu F7 à la classe « JapB₁ » est probablement le fruit du hasard, les aléas de méiose dans sa généalogie ayant abouti à la mise à l'état homozygote de nombreux allèles *C. japonica* chez celui-ci.

Les deux individus considérés comme hybrides dans l'étude de Chazara *et al.* (2010) ont ici également été assignés à la classe hybride « Fx ». Le troisième individu au profil génétique incertain a lui été considéré comme appartenant sans ambiguïté à la classe « Blé » dans le présent article. Dans leur étude, Chazara *et al.* (2010) ont utilisé des marqueurs microsatellites qui n'étaient pas choisis sur la base de leur propriété discriminante entre *C. coturnix* et *C. japonica*. Le gain de précision obtenu grâce à l'utilisation du jeu de marqueurs spécifiques permet donc d'expliquer ce résultat.

Enfin, parmi les 22 échantillons provenant de l'élevage espagnol, seulement 13 individus sont assignés à la classe « Blé », 3 sont assignés à la classe « BléB₁ », 3 à la classe « BléB₂ », et 3 ont un statut ambigu entre la classe « BléB₁ » et la classe « BléB₂ ». Ce résultat démontre l'utilité de la méthode pour détecter la présence d'individus hybrides en populations naturelles et contrôler le statut génétique des individus de lâchers dans les pays où cette pratique est utilisée.

CONCLUSION

Notre étude met à disposition un outil moléculaire et statistique permettant de distinguer les individus *C. coturnix* de *C. japonica* et de leurs hybrides. Les études antérieures ayant eu le même objectif mettaient en œuvre des marqueurs non originellement développés dans ce but (Smith *et al.* 2018; Amaral *et al.* 2007;

Sanchez-Donoso et al. 2014). Cette étude est la première pour laquelle le choix des marqueurs a été explicitement effectué avec l'objectif de différencier les deux espèces.

Le lâcher de *Coturnix sp.* afin de compléter les populations naturelles est encore une pratique courante dans certains pays (Espagne, Italie). Jusqu'à présent aucun outil n'existait pour vérifier le statut génétique des individus utilisés lors de ces lâchers. Notre méthode permet ce contrôle et pourra être utile afin de limiter les risques d'introgessions génétiques de *C. japonica* vers les populations naturelles de *C. coturnix* (Smith et al. 2018).

De nombreuses pistes d'amélioration sont également envisagées pour raffiner la méthode (plus grand

nombre de marqueurs, description fine de la diversité génétique chez les populations naturelles de *C. coturnix*). En parallèle, une méthode d'estimation de l'introgession génétique au niveau populationnel et non plus individuel est en cours de développement. Ces deux méthodes complémentaires feront l'objet d'une future communication.

REMERCIEMENTS

Une partie du financement du projet a été supporté par AGENAVI (projet SNP-Cailles)

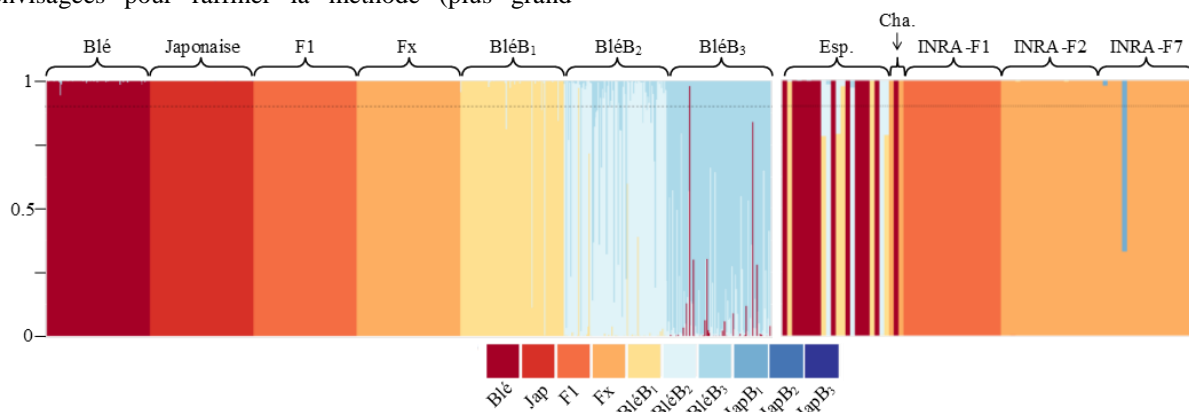


Figure 2 Graphique représentant les probabilités d'assignation aux différentes classes d'individus. Chaque barre verticale représente un individu. A gauche, les individus produits par simulation (de Blé à BléB₃) ; à droite les individus réellement génotypés (de Esp. à INRA-F7). (Esp. : Cailles issues d'un élevage espagnol, Cha. : Cailles considérées comme hybrides par Chazara *et al.* (2010)). La ligne horizontale en pointillé représente le seuil d'assignation placé à 0.9 dans cette étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amaral A., Grosso A.R., Chikhi L., Bastos-Silveira C., 2007. *Folia Zool.* 56(3):285-300
- Anderson E.C., Thompson E.A., 2002. *Genetics.* 160(3), 1217-29
- Campton D.E., Utter F.M., 1985. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42(1), 110-119
- Casas F., Mougeot F., Sánchez-Barbudo I., Dávila J. A. Viñuela, J., 2011. *Biol. Invasions.* 14(2), 295-305
- Chazara O., Minvielle F., Roux D., Bed'hom B., Feve K., Coville J.-L., Kayang B.B., Lumineau S., Vignal A., Boutin J.M., Rognon X., 2010. *Conserv. Genet.* 11(3), 1051-1062
- Montecinos A.E., Guillemain M.-L., Couceiro L., Peters A.F., Stoeckel S., Valero M., 2017. *Mol. Ecol.* 26(13), 3497-3512
- Nei M., 1987. In : *Molecular Evolutionary genetics.* Columbia University Press, pp512
- Peterson A.T., Brisbin I.L., 1999. *Bird Conserv. Int.* 9,387-394
- Puigcerver M., Sanchez-Donoso I., Vilà C., Sardà-Palomera F., García-Galea E., Rodríguez-Teijeiro J. D., 2014. *Biol. Conserv.* 171,74-81
- R Core Team, 2018. <https://www.R-project.org/>.
- Randler C., 2002. *Anim. Behav.* 63(1), 103-119.
- Sanchez-Donoso I., Huisman J., Echegaray J., Puigcerver M., Rodriguez-Teijeiro J. D., Haile F., Vila C., 2014. *Front. Ecol. Evol.* 2,15.
- Sanchez-Donoso I., Vilà C., Puigcerver M., Butkauskas D., Caballero de la Calle J. R., Morales-Rodríguez P. A., Rodríguez-Teijeiro J. D. 2012. *PLoS ONE.* 7(6)
- Smith S., Fusani L., Boglarka B., Sanchez-Donoso I., Marasco V., 2018. *Eur. J. Wildlife Res.* 64(5):51.
- Todesco M., Pascual M.A., Owens G.L., Ostevik K.L., Moyers, B.T., Hübner S., Heredia S.M., Hahn M.A., Caseys C., Bock D.G., Rieseberg, L. H., 2016. *Evol. Appl.* 9(7), 892-908.
- Junta de Andalucía, 2016. https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/Copia%20de%20Borrador%20de%20Orden%20de%20certificaci%C3%B3n%20gen%C3%A9tica%20Corregido-2_1.pdf

ÉTUDE DU DÉSÉQUILIBRE DE LIAISON DANS DES LIGNÉES DE POULES DE TYPES GÉNÉTIQUES “PONTE” ET “CHAIR”

Hérault Frédéric¹, Varenne Amandine², Burlot Thierry², Recoquillay Julien³, Macé Camille³, Fagnoul Frédéric³, Picard-Druet David¹, Herry Florian^{1,2}, Allais Sophie¹ et Le Roy Pascale¹

¹PEGASE, INRA, Agrocampus Ouest, 16 Le Clos 35590 Saint-Gilles, France

²NOVOGEN, 5, rue des Compagnons, Secteur du Vau Ballier, 22960 PLEDREAN, France

³HUBBARD, Mauguierand 22800 Le Foeil, France

frederic.herault@inra.fr

RÉSUMÉ

La structure du déséquilibre de liaison (DL) au sein des populations en sélection impacte fortement la précision obtenue lors des études de cartographie de QTL ou lors de l'évaluation génomique des reproducteurs. Chez les oiseaux, la structure hétérogène du génome nécessite de décrire précisément le DL pour optimiser la sélection. L'utilisation des puces SNP haute densité pour le génotypage des populations de volailles est une opportunité pour approfondir notre connaissance de la structure du DL de ces populations. L'objectif de cette étude est d'acquérir une connaissance haute résolution de la structure du DL au sein de populations de poules de types ponte et chair. Nous avons analysé les génotypes (puce 600 K Affymetrix® Axiom® HD SNP) de 1541 animaux issus de 3 populations. L'étendue et le niveau du DL ont été estimés par le r^2 moyen à distance physique donnée entre SNP. Cette étude met en évidence des différences importantes de structure du DL entre lignées et entre chromosomes. L'étendue et le niveau du DL sont plus importants dans les lignées de type ponte ou pour les macro-chromosomes et le chromosome Z. Ce niveau important de DL peut faciliter la détection de QTL sur ces chromosomes, mais peut également compliquer la localisation fine de polymorphismes causaux. À l'inverse, le faible niveau de DL observé sur les micro-chromosomes nécessite l'utilisation d'une forte densité de SNP pour détecter une association avec un phénotype, mais devrait permettre la cartographie fine d'un polymorphisme causal. Ces différences sont à prendre en considération pour définir une stratégie de génotypage économique et efficace pour la cartographie fine de QTL ou l'évaluation génomique.

ABSTRACT

A Linkage disequilibrium study in layers and broiler commercial chicken populations.

Knowledge of the linkage disequilibrium (LD) pattern is useful in animal genetic studies as it underlies mapping studies and genomic selection. This is all the more important in birds given the heterogeneous structure of the avian karyotype. Recently, the availability of the high density 600 K Affymetrix® Axiom® HD SNP genotyping array allowed to assess an in-depth knowledge of the LD pattern in chicken genome. The aim of the present study was to assess a higher resolution of the LD pattern in chicken genome in layer and broiler lines. In this study, we analyzed genotypes of 1541 animals from layers and broiler commercial populations to characterize their LD pattern. LD was measured by the average r^2 value at a given physical distance between SNP. LD extended over a larger region for layer lines than for broiler line. Most differences between lines appeared at small interval distances (< 0.5Mb). LD extent and decay differed considerably between chromosomes categories. Average r^2 values were higher for Z chromosome than for macro, intermediates and micro-chromosomes. The extent of useful LD observed for autosomal chromosomes was at least ten-fold longer for layer lines than for broiler. Finally, this study shed light on high LD for Z chromosome. The differences in LD pattern observed between chromosomes and chicken lines should be taken into account to define an economically efficient genotyping strategy.

INTRODUCTION

La structure du déséquilibre de liaison (DL) au sein des populations en sélection impacte fortement la précision obtenue lors des études de cartographie de QTL ou lors de l'évaluation génomique des reproducteurs. En se basant sur le génotype de plusieurs centaines de milliers de marqueurs, les études d'association à l'échelle du génome (GWAS) reposent sur l'étendue et le niveau du déséquilibre de liaison (DL) entre marqueur et polymorphisme causal pour aboutir à une localisation fine de QTL. Le DL est également un des paramètres affectant la précision des évaluations génomiques. Une connaissance approfondie du DL est donc un préalable pour parvenir à une prédiction fiable de la valeur génétique des candidats à la reproduction et pour maximiser le gain génétique en sélection génomique (Meuwissen et al., 2001). D'autre part, l'étendue du DL est également un paramètre important pour la sélection d'un sous-ensemble de marqueurs pour la réalisation d'une puce basse densité nécessaire pour la mise en œuvre de stratégies de génotypage à large échelle. Depuis 2013, une puce haute densité (600 K Affymetrix® Axiom® HD SNP genotyping array) est disponible pour le génotypage des poules. Ce support de génotypage a été réalisé en se basant sur 24 lignées de poules (lignées expérimentales ou commerciales de types pontes et chairs) de manière à assurer une distribution uniforme (sur la base d'une carte génétique) de marqueurs informatifs quel que soit le type d'individu génotypé (Kranis et al., 2013).

Chez les oiseaux, la structure du génome est particulièrement hétérogène. Chez la poule le génome est composé de 38 autosomes et d'une paire de chromosomes sexuels. Les autosomes sont organisés en chromosomes de grande taille ou macro-chromosomes qui contiennent de 40 – 200 millions de paires de bases (Mb) (chromosomes 1 à 5), chromosomes de taille intermédiaire de 20 – 40 Mb (chromosomes 6 à 10) et de micro-chromosomes dont la taille est inférieure à 20 Mb (chromosomes 11 à 38). Le taux de recombinaison et la densité génique de ces micro-chromosomes sont supérieurs à ceux des autres catégories de chromosomes (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004).

L'objectif de cette étude est d'acquérir une connaissance haute résolution de la structure du DL au sein de populations de poules de types génétiques ponte et chair en nous référant aux génotypes obtenus à partir d'une puce haute densité (600 K Affymetrix® Axiom® HD SNP genotyping array).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Génotype

Les génotypages de 1541 animaux provenant de deux lignées commerciales de poules pondeuses et d'une lignée commerciale de poulet de chair ont été utilisés dans le cadre de cette étude. Les deux lignées de poule pondeuses proviennent de la société NOVOGEN. Il s'agit d'une lignée Leghorn à œuf blanc (L, 771 individus) et d'une lignée Rhode-Island (RI, 447 individus) à œuf brun. La lignée de type chair, lignée mâle à croissance rapide (Shaver Yellow Cornish (SYC), 383 individus), vient quant à elle de la société HUBBARD. Les génotypages ont été effectués avec le support 600 K Affymetrix® Axiom® HD SNP genotyping array. Ce support de génotypage contient 580 961 SNP répartis sur les chromosomes 1 à 28, le chromosome 33, le groupe de liaison LGE64 ainsi que sur les deux chromosomes sexuels. Parmi ces SNP, 3 724 n'ont pas pu être localisés. La localisation des marqueurs a été effectuée sur la version 5 de l'assemblage du génome de *Gallus gallus*.

Au sein de chaque lignée la qualité des données de génotypages a été contrôlée avec le logiciel PLINK (PLINK version 1.9; www.cog-genomics.org/plink/1.9/) (Chang et al., 2015). Les SNP dont le taux d'assignation de génotype (call rate) est inférieur à 95%, la fréquence de l'allèle minoritaire (MAF) est inférieure à 0,05 ou s'éloignant trop de l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) (P-value <0,0001) ont été supprimés de l'analyse. Pour réaliser cette étude, seuls les SNP possédant une assignation chromosomique ont été utilisés. Les SNP localisés sur les chromosomes W, 16, 33 et sur le groupe de liaison LGE-64 ont également été supprimés de l'analyse, du fait du faible nombre de marqueurs localisés sur ces chromosomes. L'ensemble des individus de l'analyse ont été conservés et avaient un call rate > 95%.

1.2. Estimation du déséquilibre de liaison

Le DL, qui est caractéristique d'une population, décrit les associations non aléatoires entre allèles à des loci différents. Le niveau de DL peut être mesuré par le r^2 qui mesure la corrélation entre allèles de deux loci. Ainsi deux marqueurs ayant un r^2 de 1 sont totalement équivalents et l'un peut être utilisé comme substitut de l'autre (l'information contenue est équivalente). Dans le cadre de cette étude, le r^2 a été utilisé comme mesure du DL entre chaque paire de SNP au sein d'un chromosome pour chaque lignée étudiée. Cette mesure a été effectuée avec le logiciel PLINK. Le niveau et l'étendue du DL ont été calculés pour chaque catégorie de chromosome selon la classification établie par l'International Chicken Genome Sequencing Consortium, à savoir les macro-chromosomes, les chromosomes intermédiaires, les micro-chromosomes et le chromosome sexuel Z. Au sein de chaque lignée, la structure du DL a été estimée pour chaque catégorie de chromosome comme étant la valeur moyenne du r^2 pour une distance physique donnée entre SNP.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Marqueurs

Comme le montre le Tableau 1, la plupart des SNP non conservés dans l'étude ont été supprimés du fait de leurs faible MAF. Il apparaît clairement dans ce tableau que les lignées de type ponte ont une proportion de SNP à faible MAF plus importante que la lignée de type chair montrant une quasi-fixation d'un nombre plus important de SNP dans ces lignées. La lignée Leghorn est la lignée qui possède le plus petit nombre de marqueurs informatifs, tandis que la lignée SYC est la lignée possédant le plus grand nombre de marqueurs informatifs. Ce résultat démontre que la lignée chair est plus polymorphe que les lignées de type ponte. Cette différence de variabilité génétique peut s'expliquer d'une part par l'histoire de la lignée (création plus ou moins récente) et d'autre part par le nombre de reproducteurs non apparentés utilisés dans chacune des lignées. Ces résultats corroborent les résultats d'études précédentes (Megens et al., 2009; Qanbari et al., 2010). Malgré de grandes différences dans le nombre de marqueurs informatifs retenus pour chaque lignée, la couverture du génome est sensiblement la même pour les trois lignées considérées (environ 1,02 Gb). La distance moyenne entre deux marqueurs informatifs consécutifs est inférieure à 5 kb pour toutes les lignées.

2.2. Analyse du déséquilibre de liaison

L'étendue et la décroissance du DL ont été estimées pour chaque lignée en fonction de la distance physique séparant les marqueurs (Tableau 2).

Dans les trois lignées étudiées, le DL décroît à mesure que la distance séparant les marqueurs augmente, pour atteindre 0,02 quand la distance entre les SNP considérés est supérieure à 3 Mb pour la lignée chair ou supérieure à 5 Mb pour les lignées ponte. Le niveau du DL varie énormément entre les lignées considérées, et cela d'autant plus que les distances entre marqueurs sont petites. La lignée Leghorn et la lignée chair ont respectivement le niveau de DL moyen le plus fort et le plus faible quel que soit la distance inter-marqueurs considérée et ce malgré le fait que la distance moyenne entre deux marqueurs adjacents soit plus importante dans les lignées ponte que dans la lignée chair.

L'étendue et la décroissance du DL ont également été analysées intra-lignée en fonction des catégories de chromosomes. Comme le montre la Figure 1, l'étendue et la décroissance du DL dépendent grandement de la catégorie de chromosome considérée. Quelle que soit la lignée considérée, le niveau du DL est plus élevé et s'étend sur une plus grande distance pour le chromosome Z puis pour les macro-chromosomes que pour les chromosomes intermédiaires et les micro-chromosomes. Le niveau

et l'étendue du DL sont plus importants dans la lignée Leghorn que dans la lignée RI et la lignée SYC.

De manière générale, un DL moyen supérieur à 0,3 est considéré comme suffisant et donc utile pour mener des analyses d'association ou des évaluations en sélection génomique (Ardlie et al., 2002; Calus et al., 2008). De ce point de vue, comme le montre le Tableau 3, l'étendue du DL utile ($DL > 0.3$) pour l'ensemble des autosomes est très similaire pour les deux lignées ponte. Au niveau du génome l'étendue du DL utile se situe entre 200 et 300 kb pour les lignées ponte et entre 20 et 30 kb pour la lignée chair. A titre de comparaison, l'étendue du DL utile se situe entre 280 et 413 kb dans les races porcines occidentales (respectivement Large White et Duroc) et entre 33 kb et 40 kb pour les races bovines (Holstein et Angus) (Ai et al., 2013; Pérez O'Brien et al., 2014). Au niveau des chromosomes de grande taille (macro et intermédiaire) l'étendue du DL utile dans les lignées ponte est environ 10 fois plus grande que chez la lignée chair. Cet écart est plus important encore si l'on considère les micro-chromosomes pour lesquels apparaît également une légère différence entre les lignées ponte. Cette différence d'étendue du DL utile au niveau des micro-chromosomes pourrait s'expliquer par le fait que le taux de recombinaison est plus important pour ces chromosomes de petites tailles que pour les autres autosomes. Cette importante différence d'étendue du DL utile entre lignées n'est toutefois pas observée au niveau du chromosome Z. L'étendue du DL utile sur le chromosome Z est de l'ordre de 500-1500 kb pour la lignée L, 400-500 kb pour la lignée RI et 300-400 kb pour la lignée chair. La différence d'étendue du DL utile entre le chromosome Z et les chromosomes de grande taille (macro et intermédiaire) est relativement faible pour les lignées ponte, elle est d'un facteur 10 pour la lignée chair.

CONCLUSION

Dans le cadre de cette étude nous avons réalisé une caractérisation haute résolution de la structure du DL de trois lignées commerciales de poules de types génétiques ponte et chair en nous basant sur des génotypes obtenus à partir d'une puce haute densité (600K Affymetrix® Axiom® HD SNP genotyping array). L'étendue et le niveau de DL observés varient grandement entre lignées et entre catégories de chromosomes. Les différences observées entre lignées sont nettement plus marquées entre types génétiques ponte et chair qu'entre les deux lignées de type ponte. L'étendue importante du DL pour le chromosome Z ainsi que pour les macro-chromosomes peut faciliter la détection de QTL sur ces chromosomes. Cependant cette caractéristique du DL va rendre plus compliquée la localisation fine des polymorphismes causaux. A l'inverse, sur les micro-chromosomes, le faible niveau de DL observé impose l'utilisation d'une carte plus dense en marqueurs afin de pouvoir identifier une

association marqueurs / phénotype, mais devrait être un avantage pour la cartographie fine d'un polymorphisme causal. Ces différences dans la structure du DL entre différents types génétiques et catégories de chromosomes sont à prendre en considération pour définir une stratégie de génotypage économique et efficace pour la cartographie fine de

QTL ou l'évaluation génomique. Concrètement, dans le cadre de la réalisation d'une puce basse densité pour la mise en œuvre d'un génotypage de routine à grande échelle, ces résultats impliquent une sélection de marqueurs différenciée (nombre et localisation) en fonction des lignées à génotyper.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ai, H., Huang, L., Ren, J., 2013. PLOS ONE 8, e56001.
- Ardlie, K.G., Kruglyak, L., Seielstad, M., 2002. Nat Rev Genet 3, nrg777.
- Calus, M.P.L., Meuwissen, T.H.E., de Roos, A.P.W., Veerkamp, R.F., 2008. Genetics 178, 553–561.
- Chang, C.C., Chow, C.C., Tellier, L.C., Vattikuti, S., Purcell, S.M., Lee, J.J., 2015. GigaScience 4, 7.
- International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004. Nature 432, nature03154.
- Kranis, A., Gheyas, A.A., Boschiero, C., Turner, F., Yu, L., Smith, S., Talbot, R., Pirani, A., Brew, F., Kaiser, P., Hocking, P.M., Fife, M., Salmon, N., Fulton, J., Strom, T.M., Haberer, G., Weigend, S., Preisinger, R., Gholami, M., Qanbari, S., Simianer, H., Watson, K.A., Woolliams, J.A., Burt, D.W., 2013. BMC Genomics 14, 59.
- Megens, H.-J., Crooijmans, R.P., Bastiaansen, J.W., Kerstens, H.H., Coster, A., Jalving, R., Vereijken, A., Silva, P., Muir, W.M., Cheng, H.H., Hanotte, O., Groenen, M.A.M., 2009. BMC Genet 10, 86.
- Meuwissen, T.H.E., Hayes, B.J., Goddard, M.E., 2001. Genetics 157, 1819–1829.
- Pérez O'Brien, A.M., Mészáros, G., Utsunomiya, Y.T., Sonstegard, T.S., Garcia, J.F., Van Tassell, C.P., Carvalho, R., da Silva, M.V.B., Sölkner, J., 2014. Livestock Science, Genomics Applied to Livestock Production 166, 121–132.
- Qanbari, S., Hansen, M., Weigend, S., Preisinger, R., Simianer, H., 2010. BMC Genet 11, 103.

Tableau 1. Description des marqueurs pour chaque lignée.

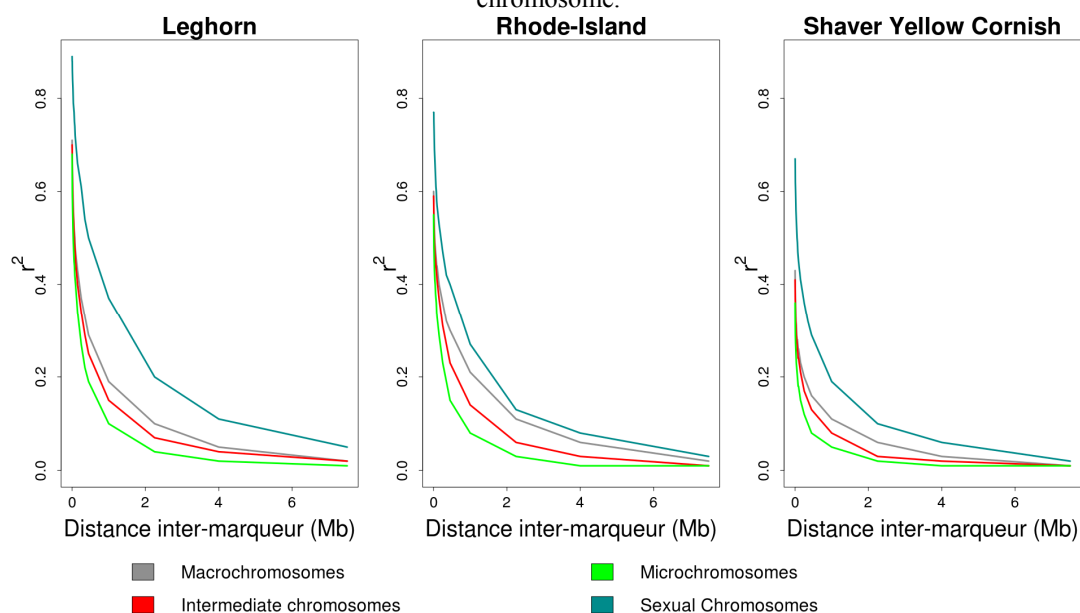
	Ponte		Chair
	L	RI	SYC
Nombre total de SNP	580 961	580 961	580 961
SNP Call rate < 95%	2 530	7 541	4 274
MAF ¹ < 0,05	327 452	258 772	181 584
HWE ² < 0,0001	3 857	12 538	6 664
SNP conservés	245 669 (42%)	300 362 (52%)	386 187 (66%)
Couverture du génome (Mb)	1 017	1 017	1 019
Distance moyenne entre SNP adjacent (kb)	4,1	3,4	2,6

¹ MAF: Nombre de SNP ayant une MAF <0,05² HWE: Nombre de SNP s'écartant de l'équilibre de Hardy-Weinberg P-value <0,0001.**Tableau 2.** Niveau du déséquilibre de liaison en fonction de la distance physique entre SNP.

	Ponte		Chair
	L	RI	SYC
Distance (Mb) ¹	Moyenne ± SD	Moyenne ± SD	Moyenne ± SD
0.0-0.025	0.62 ± 0.37	0.52 ± 0.38	0.34 ± 0.33
0.025-0.05	0.53 ± 0.37	0.46 ± 0.37	0.28 ± 0.29
0.05-0.075	0.49 ± 0.36	0.43 ± 0.36	0.25 ± 0.28
0.075-0.12	0.44 ± 0.35	0.39 ± 0.35	0.23 ± 0.26
0.12-0.2	0.39 ± 0.34	0.35 ± 0.33	0.2 ± 0.24
0.2-0.5	0.29 ± 0.3	0.27 ± 0.29	0.15 ± 0.2
0.5-1.5	0.16 ± 0.22	0.15 ± 0.21	0.08 ± 0.14
1.5-3.0	0.07 ± 0.14	0.07 ± 0.14	0.04 ± 0.09
3.0-5.0	0.04 ± 0.09	0.04 ± 0.09	0.02 ± 0.05
5.0-10.0	0.02 ± 0.05	0.02 ± 0.05	0.01 ± 0.02

¹ Distance (Mb): basé sur l'assemblage de référence Gallus gallus - 5.0.**Tableau 3.** Etendue du déséquilibre de liaison utile ($r^2 > 0.3$).

	Ponte		Chair
	L	RI	SYC
Génome	200-300 kb	200-300 kb	20-30 kb
Macro-chromosomes	300-400 kb	400-500 kb	30-40 kb
Chromosomes intermédiaires	200-300 kb	200-300 kb	20-30 kb
Micro-chromosomes	100-200 kb	90-100 kb	5-7.5 kb
Chromosome Z	500-1500 kb	400-500 kb	300-400 kb

Figure 1. Décroissance du déséquilibre de liaison en fonction de la distance entre SNP par catégorie de chromosome.

APPORT DES INFORMATIONS SUR DES CROISEES DANS LE CADRE DE L'EVALUATION GENOMIQUE SUR LA QUALITE DES ŒUFS CHEZ LA POULE.

Picard Druet David¹, Varenne Amandine², Hérault Frédéric¹, Herry Florian^{1,2}, Allais Sophie¹, Burlot Thierry² et Le Roy Pascale¹

¹PEGASE, INRA, Agrocampus Ouest, 16 Le Clos 35590 Saint-Gilles, ²NOVOGEN, 5, rue des Compagnons, Secteur du Vau Ballier, 22960 PLEDHAN, France

david.picard-druet@inra.fr

RÉSUMÉ

Depuis quelques années, la sélection génomique commence à se mettre en place dans la filière avicole. Dans le but d'optimiser les schémas de sélection, et donc le progrès génétique des populations sélectionnées, il est important de connaître la précision de l'évaluation génomique, comparativement à l'évaluation génétique. Dans une étude précédente, il avait été observé que l'usage de la sélection génomique à la naissance était une stratégie très prometteuse pour la sélection des reproducteurs en race pure. Le croisement entre lignées pures étant utilisé à large échelle par les schémas de sélection avicoles, il s'est posé la question de l'utilisation des données des descendantes croisées sur l'évaluation des reproducteurs, et de leur influence sur la précision de l'évaluation.

Dans le cadre de cette étude, 2 objectifs ont été poursuivis. Tout d'abord, estimer la corrélation génétique, pour un même caractère de qualité d'œuf, entre la performance exprimée par des poules de lignée pure, et celle des poules croisées. Ensuite, estimer les différences de précision apportées par l'intégration des données des croisées à l'évaluation en lignée pure.

Les résultats ont montré que la corrélation génétique entre caractère pur et croisé est forte, mais ne permet pas de considérer qu'il s'agit du même caractère. L'ajout des performances de croisées aux évaluations a permis d'obtenir des résultats globalement meilleurs qu'en évaluations séparées.

ABSTRACT

Contribution of crossbred information for genomic evaluation of egg quality in layers.

Avian breeders are currently putting in place genomic selection in their selection schemes. One key parameter to optimize selection schemes, and so genetic gain of selected populations, is to correctly predict the accuracy of genomic evaluation. In a previous study, it has been shown that genomic selection at birth was a very promising strategy for breeders selection in purebred. As crossbred between pure lines is commonly used in avian selection schemes, raises the question about the use of crossbred offspring in breeders evaluation, and their impact on evaluation accuracy.

In this study, we had 2 goals. First, estimation of genetic correlation, for the same egg quality trait, between performance from pure line, and cross line layers. Then, estimation of the differences in evaluation accuracy, by adding crossbred information to pure line evaluation.

Results shown that genetic correlation between purebred and crossbred trait is strong, but did not allow to consider that it is the same trait. Adding crossbred performances into evaluations allowed to obtain better results, globally, than in separated evaluations.

INTRODUCTION

Depuis quelques années, la sélection génomique commence à se mettre en place dans la filière avicole en France. Dans le but d'optimiser les schémas de sélection, et donc le progrès génétique des populations sélectionnées, il est important de connaître la précision de l'évaluation génomique, comparativement à l'évaluation génétique. Dans de précédentes études (Wolc et al 2015, Wolc et al 2016, Picard Druet et al 2018), il avait été observé que l'usage de la sélection génomique à la naissance était une stratégie très prometteuse pour la sélection des reproducteurs en race pure, comparée à l'évaluation génétique sur collatéraux utilisée traditionnellement en sélection.

Dans ce contexte s'est posée la question de l'utilisation des données des descendantes croisées sur l'évaluation des reproducteurs. Le croisement entre lignées pures est utilisé à large échelle par les schémas de sélection avicoles, notamment afin d'obtenir des individus adaptés aux différents marchés. Les performances de ces individus ne sont pas exploitées lors des évaluations des reproducteurs, qui n'utilisent que les performances des apparentés de lignée pure.

Or, plusieurs études (Dekkers 2007, Cavero et al. 2010, Xiang et al. 2016 JAS) ont mis en avant l'intérêt d'utiliser les données d'animaux croisés pour évaluer les reproducteurs, que ce soit en évaluation génétique, ou en évaluation génomique. Il a également été montré une différence entre les caractères mesurés chez des individus de race pure, et les caractères mesurés chez leurs descendants croisés (Cavero et al. 2010, Xiang et al. 2016 GSE). Ces différences ont un impact sur l'optimisation des schémas de sélection.

Deux objectifs ont été poursuivis dans le cadre de cette étude. Tout d'abord, estimer la corrélation génétique entre la performance exprimée par des poules de lignée pure, et celle des poules croisées pour des caractères de qualité d'œuf. Ensuite, estimer les différences de précision apportées par l'intégration des données des croisées à l'évaluation en lignée pure, en évaluation génétique et en évaluation génomique.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Données

Les données phénotypiques (Tableau 1) portent sur les performances en qualité d'œuf de 19 220 poules de

lignée pure (réparties en 12 lots) et 44 436 descendantes croisées (réparties en 9 lots). Ces données proviennent des lignées Rhode Island, sélectionnées par la société Novogen. Trois caractères de qualité d'œuf ont été étudiés : Poids de l'œuf (PO), couleur de la coquille (LAB, caractère composé du ratio entre la part de rouge et de jaune dans la couleur, et la clarté de la coquille) et force nécessaire pour fracturer la coquille (FF).

À ces informations s'ajoutent les génotypes des reproducteurs de lignée pure (1 214 mâles et 1 148 femelles, également phénotypées), obtenus avec une puce 600k SNP Affymetrix® Axiom® HD. Après filtration, 302 102 SNPs ont été conservés dans les génotypes.

Les données ont été regroupées en 2 jeux, le premier avec les données récoltées sur les individus âgés d'environ 50 semaines, dont tous les individus sont en cages collectives (CC), le second sur ceux âgés de 70 semaines, avec les poules croisées en cages collectives, et les individus de race pure en cages individuelles (CI).

Pour chaque caractère, les mesures ont été ajustées pour les effets environnementaux via la procédure GLM de SAS®. Le modèle prend en compte la batterie, la position de la cage dans la batterie, le lot, l'âge de la poule, ainsi que le nombre de jours écoulés entre la ponte et la mesure. Les données dont les résidus avaient une valeur absolue supérieure à 5 fois l'écart type du caractère, ont ensuite été supprimées. Elles représentaient moins de 0,1% des mesures. Enfin, les performances ont été centrées et réduites.

Parmi cette population, une population candidate de 174 reproducteurs mâles, de lignée pure, ayant des descendants purs et croisés, a ensuite été constituée afin de pouvoir estimer leurs valeurs génétiques dans différents cas de figure.

1.2. Évaluations

Les différents logiciels utilisés pour les évaluations sont issus de la suite BLUPF90 (Miszta et al. 2002). Les matrices de variances-covariances ont été estimées via REML, en utilisant l'ensemble des données à notre disposition (phénotypiques et génotypiques). Chaque caractère a été évalué séparément, en bi-caractère : PB (caractères mesurés chez des individus de race pure) et CB (caractères mesurés chez leurs descendants croisés).

Les matrices obtenues ont permis d'estimer l'héritabilité de chaque caractère, ainsi que les corrélations génomiques entre caractère PB et caractère CB.

Ces matrices ont ensuite été utilisées pour réaliser les évaluations avec une méthodologie BLUP (évaluation génétique) ou Single Step GBLUP (ssGBLUP, évaluation génomique) (Aguilar et al. 2010).

L'objectif majeur était d'observer la précision de l'évaluation mixte (avec toutes les données phénotypiques), par rapport aux évaluations séparées (l'évaluation utilisant uniquement les performances des PB et celle utilisant uniquement les performances issus des individus CB).

Différents cas de figure ont été utilisés pour ces différentes évaluations :

- Utilisation des génotypes des reproducteurs mâles et femelles (évaluation génomique) ou non (évaluation génétique)
- Variation de la quantité d'information phénotypique à disposition : ascendance ; ascendance et collatéraux ; ascendance, collatéraux et descendance.
- Utilisation des données des individus jeunes (CC) ou en fin de carrière (CI).

1.3. Estimation des précisions des évaluations

Afin d'estimer la précision de nos évaluations mixtes, il a fallu fixer l'évaluation de référence, dont les valeurs génétiques estimées ont été considérées comme étant la Valeur Génétique Vraie.

Deux références ont été utilisées :

La première référence utilisée a été la meilleure évaluation possible (avec l'ensemble des données, génotypique et phénotypique) avec uniquement les mesures faites sur les individus de race pure, pour les caractères PB. L'objectif était de pouvoir comparer le comportement de l'évaluation mixte par rapport à l'évaluation sur les données de race pure, en utilisant une référence commune.

Dans un second temps, la référence utilisée a été la meilleure évaluation possible (avec l'ensemble des données, génotypique et phénotypique), mais cette fois-ci, en évaluation mixte.

La précision des évaluations pour chaque caractère a ensuite été estimée via une corrélation de Pearson entre les valeurs génétiques ou génomiques estimées pour la population candidate, et la valeur de référence, pour notre population candidate de 174 individus.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1. Paramètres génétiques

L'héritabilité des différents caractères (Tableau 2), que ce soit en CC ou en CI, est proche de celles estimées lors des évaluations uniquement sur pures ou sur croisées (Picard Druet et al 2018).

Les corrélations génétiques entre caractères PB et CB (Tableau 3), comprises entre 0,75 et 0,8, montrent qu'il

y a un fort lien entre caractères PB et CB, mais qu'on ne peut pas considérer qu'il s'agisse du même caractère. Ces résultats sont cohérents avec ce qui avait été montré dans la littérature (Cavero et al. 2010, Xiang et al. 2016).

2.2. Précision des évaluations

Les résultats présentés ici sont ceux obtenus avec les données CI, comparés à la référence pure. Les autres résultats obtenus, avec les données CC, et avec les autres références sont très semblables.

L'évolution générale de la précision de l'évaluation en fonction de la quantité d'information à disposition (Figure 1) est très proche de celle observée en évaluation uniquement sur la lignée pure (Picard Druet et al 2018). L'ajout d'information phénotypique permet d'améliorer la précision de l'évaluation. Les évaluations génomiques sont également plus précises que les évaluations génétiques, à quantité d'information phénotypique équivalente, de par la prise en compte de l'information génotypique.

L'écart de précision estimé entre caractère PB et CB reflète ce qui était estimé en matière de corrélation génétique entre ces caractères. Ce ne sont pas les mêmes, ce qui se répercute dans l'estimation de la valeur génétique des reproducteurs sur les caractères PB et CB, et donc la corrélation avec la référence.

On peut également observer une différence entre les estimations de précision des caractères PO, LAB et FF. À quantité d'information égale, la corrélation des valeurs estimées pour ces caractères à la référence n'est pas la même. Un tel phénomène avait déjà été observé en évaluation avec les données pures. Cela peut s'expliquer par une architecture génétique différente de ces caractères, ce qui a un impact sur la qualité de l'évaluation (Romé et al. 2015).

Concernant l'évaluation génomique sur descendance (qui est la référence mixte), on n'observe pas de fortes différences en matière de précision d'évaluation, si l'on compare évaluation mixte par rapport aux évaluations pures et croisées séparément. La référence mixte semble donc assez proche des références pures et croisées, sans être strictement identique.

En comparant les estimations de précision des caractères PB en évaluation mixte avec celles obtenues en évaluation pure, par rapport à la référence pure

(Figure 2), on peut observer que l'évaluation mixte obtient des résultats aussi bien corrélés, sinon mieux, à la référence que ceux de l'évaluation pure. Ainsi, en évaluation génomique mixte sur ascendance, le caractère PO a une corrélation de 0,57 au lieu de 0,55, et 0,63 au lieu de 0,54 en évaluation génomique sur ascendance et collatéraux, ceci en prenant en compte que la référence utilisée désavantage l'évaluation mixte. En utilisant la référence mixte, la précision estimée de l'évaluation mixte augmente, en moyenne de 0,05 en CI.

Un résultat équivalent est observé quand on compare l'évaluation mixte avec l'évaluation croisée, par rapport à la référence croisée.

L'évaluation mixte semble donc permettre d'obtenir des résultats plus proches de la meilleure évaluation possible, en comparaison des évaluations séparées.

CONCLUSION

Nous avons pu observer que les caractères PB et CB, s'ils sont proches, ne peuvent être considérés comme identiques, et cela se répercute dans la précision de l'évaluation. Un reproducteur n'aura pas la même valeur génétique sur caractère PB et sur caractère CB.

Cela signifie qu'en fonction de l'objectif de sélection, sur caractère PB ou CB, les reproducteurs sélectionnés ne seront pas les mêmes.

L'évaluation commune utilisant les données pures et croisées permet d'obtenir globalement des précisions plus élevées qu'en évaluation séparée, que ce soit en évaluation pure ou croisée. Cet ajout de données permet en outre d'avoir les informations sur la valeur génétique des reproducteurs par rapport aux deux types de caractères, PB et CB. L'intégration des données des descendants croisés à l'évaluation des reproducteurs semble donc une stratégie prometteuse, dans le but d'optimiser la précision de l'évaluation.

Il reste encore à juger de la pertinence de l'évaluation mixte, en fonction des objectifs de sélection. En effet, l'usage des données de croisées en sélection suppose d'avoir, en plus des mesures de performances, une traçabilité entre les descendantes croisées et leurs géniteurs en race pure. Le surcoût engendré n'est pas forcément optimal dans le cadre d'un choix de sélection sur caractère PB, par exemple.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguilar, I., Misztal, I., Johnson, D.L., Legarra, A., Tsuruta, S. & Lawlor, T. J. (2010). A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. *Journal of Dairy Science* 93, 743–752.
- Cavero D., Schmutz M. and Preisinger R., 2010. *Lohmann Information*, vol. 45 (2), page 19
- Deckers J.C.M., 2007. *J. Anim. Breed. Genet.* 124, 331–341
- Misztal I., Tsuruta S., Strabel T., Auvray B., Druet T., Lee D., 2002. *Proceedings Of the 7th WCGALP*, vol.28, p.743
- Misztal I., Legarra A., Aguilar I. 2009, *J. Dairy Sci.*, 92(9):4648–4655
- Picard Druet D., Herry F., Varenne A., Hérault F., Allais S., Burlot T., Le Roy P., 2018. Accuracy of genomic evaluation in pure line layers. 11. *World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP)*, Feb 2018, Auckland, New Zealand
- Romé H., Varenne A., Hérault F., Chapuis H., Alleno C., Dehais P., Vignal A., Burlot T., Le Roy P., 2015. *Genet Sel Evol*, 48:22
- Wolc A., Zhao H. H., Arango J., Settar P., Fulton J.E., O'Sullivan N.P., Preisinger R., Stricker C., Habier D., Fernando R.L., Garrick D.J., Lamont S.J., Dekkers J.C.M., 2015. *Genetics Selection Evolution*, 47:59
- Wolc A., Kranis A., Arango J., Settar P., Fulton J.E., O'Sullivan N.P., Avendano A., Watson K.A., Hickey J.M., Campos G.d.l., Fernando R.L., Garrick D.J., Dekkers J.C.M., 2016. *ResearchGate*, 6(1):23
- Xiang T., Nielsen B., Su G., Legarra A., Christensen O.F., 2016. *J. Anim. Sci.*, 94:936–948
- Xiang T., Christensen O.F., Vitezica Z.G., Legarra A., 2016. *Genet Sel Evol*, 48:92

Tableau 1. Nombre d'individus dans les populations PB et CB

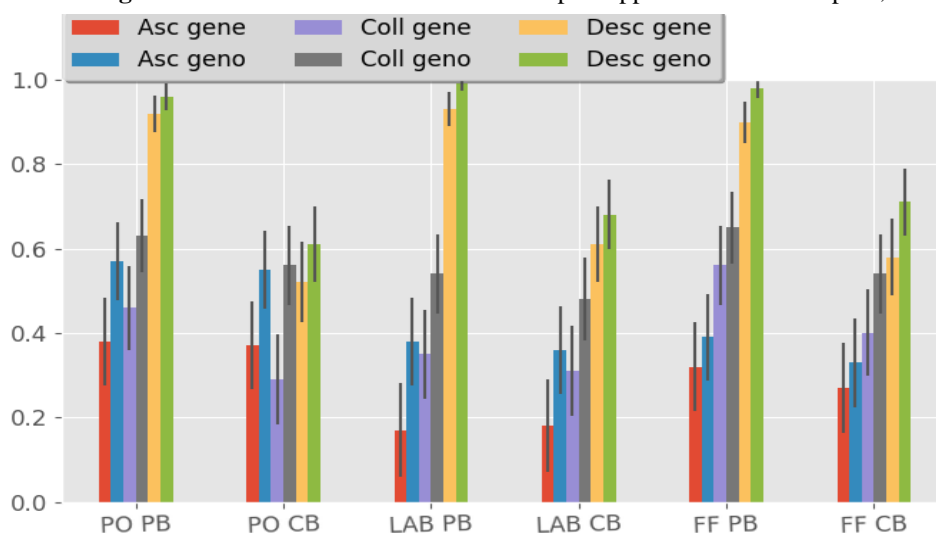
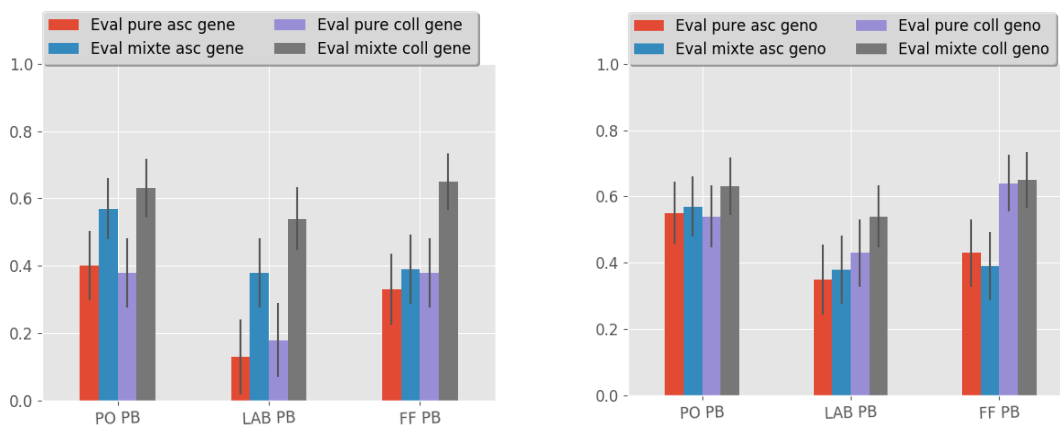
	PB	CB
Phénotypés	19 220	44 436
Génotypés	2 362	0
Généalogie	20 434	46 798

Tableau 2. Héritabilités des caractères en évaluation mixte (entre parenthèse, l'erreur standard)

	PO PB	PO CB	LAB PB	LAB CB	FF PB	FF CB
CC	0.65 (0.02)	0.80 (0.02)	0.62 (0.02)	0.55 (0.02)	0.28 (0.02)	0.27 (0.02)
CI	0.77 (0.00)	0.83 (0.00)	0.64 (0.01)	0.51 (0.01)	0.44 (0.03)	0.30 (0.03)

Tableau 3. Corrélations génétiques entre caractères PB et CB en évaluation mixte (entre parenthèse, l'erreur standard)

	PO	LAB	FF
CC	0.71 (0.02)	0.81 (0.02)	0.75 (0.02)

Figure 1. Précision des évaluations mixtes par rapport à la référence pure, en CI**Figure 2.** Comparaison de la précision des évaluations mixtes, par rapport à la référence pure, en CI. À gauche, évaluations génétiques, à droite, évaluations génomiques.

INTÉRÊT DE L'UTILISATION DE L'IMPUTATION POUR L'ÉVALUATION GÉNOMIQUE EN POULE PONDEUSE

Herry Florian^{1,2}, Picard Druet David², Hérault Frédéric², Varenne Amandine¹, Burlot Thierry¹, Le Roy Pascale² et Allais Sophie²

¹NOVOGEN, 5 rue des Compagnons, Secteur du Vau Ballier, 22960 Plédran, ²PEGASE, INRA, Agrocampus Ouest, 16 Le Clos 35590 Saint-Gilles, France

florian.herry@inra.fr

RESUMÉ

La disponibilité en 2013 d'une puce à SNP commerciale haute densité (600 000 marqueurs) pour l'espèce poule a permis la mise en place de la sélection génomique dans les filières ponte et chair. Toutefois, le coût de cette puce reste élevé pour génotyper en routine l'ensemble des candidats à la sélection. L'un des enjeux est le développement de puces SNP basse densité (BD) de moindre coût. L'objectif est d'imputer l'ensemble des génotypes manquants pour revenir à une information 600K SNP avant de réaliser l'évaluation génomique. Toutefois, l'impact de l'utilisation directe des génotypages BD sur la précision des évaluations génomiques a été peu décrit.

L'objectif est donc de juger de l'intérêt de l'imputation des génotypages BD pour l'évaluation génomique dans une lignée de poule pondeuse. Les puces BD ont été construites selon une méthodologie équidistante. Les évaluations génomiques ont été réalisées sur le poids d'œuf et sur la force de fracture, avec une méthodologie ssGBLUP. L'impact des erreurs d'imputation, ou de l'absence d'imputation, sur le classement des candidats à la sélection lors d'une évaluation génomique sur ascendance a été évalué. Pour cela, les valeurs génomiques obtenues (GEBV), avec les génotypages imputés ou non depuis la puce BD, ont été comparées aux GEBV obtenues avec la puce haute densité (HD). La précision des GEBV a également été étudiée en prenant en référence les GEBV estimées sur descendance.

Le classement des candidats à la sélection avec les génotypages BD imputés est plus corrélé avec celui basé sur les génotypages HD que sans imputation. Toutefois, les corrélations sont toutes supérieures à 0.95 pour une densité supérieure à 5K SNP. L'impact de l'imputation sur le classement des individus est donc faible. Par ailleurs, la précision des GEBV estimées sur ascendance est équivalente entre les différentes stratégies (avec ou sans imputation) dans le cas du poids d'œuf pour une densité supérieure à 2K SNP, mais tend à se dégrader pour de très basses densités de SNP dans le cas de la force de fracture. L'utilisation de l'imputation est possible sans diminution significative de la précision des évaluations génomiques par ssGBLUP. L'absence d'imputation est également possible mais la dégradation observée sur la précision des GEBV semble dépendre des caractères.

ABSTRACT

Interest of using imputation for genomic evaluation in layer chicken

With the availability of the 600K Affymetrix® Axiom® high-density (HD) single nucleotide polymorphism (SNP) chip, genomic selection has been implemented in broiler and layer chicken. However, the cost of such HD SNP chip is still too high to genotype all selection candidates. A solution is to develop low density SNP chip, at a lower price, and to impute all missing markers before doing a genomic evaluation. However, the impact of the direct use of low density SNP chip on genomic evaluation accuracy is not well documented.

In this perspective, the interest of using or not imputation in genomic selection was studied in a pure layer line. An equidistant methodology was used to design low density SNP chips. Egg weight and egg shell strength were evaluated with ssGBLUP methodology. The impact of imputation errors or the absence of imputation on the ranking of the selection candidates was assessed with a genomic evaluation based on ancestry. To do so, genomic estimated breeding values (GEBV), with imputed or not imputed genotyping from the low density SNP chip, were compared to the GEBV obtained with the HD SNP chip. The accuracy of GEBV was also investigated by considering as reference the GEBV estimated on offspring.

With imputed HD genotyping, the ranking was slightly more correlated to that with HD genotyping than that with low density genotyping. However, Spearman correlations were above 0.95 with more than 5K SNPs. Thus the reordering of the breeders was limited. Finally, the GEBV accuracy estimated on ancestry was equivalent with or without imputation for a SNP density superior to 2K. But this accuracy tended to be decreased for some traits with less than 2K SNPs.

INTRODUCTION

Le développement d'une puce à SNP (Single Nucleotide Polymorphism) commerciale haute densité (HD) de 600 000 marqueurs en 2013 (Kranis et al., 2013) a permis le développement de la sélection génomique dans les filières poules de chair et ponte. Toutefois, les coûts d'une telle puce restent un problème. Des puces à SNP basse-densité (BD) à moindre coût peuvent être développées en sélectionnant un sous-ensemble de marqueurs de la puce HD puis en imputant les génotypes aux marqueurs manquants. Il existe trois principales méthodes pour développer une puce BD. La première consiste à sélectionner des SNP de façon équidistante en tenant compte ou non de la MAF (Fréquence Allélique Mineure) des SNP (Weigel et al., 2009 ; Wang et al., 2013 ; Herry et al., 2018). La deuxième consiste à sélectionner les SNP ayant des effets forts sur les caractères d'intérêt (Weigel et al., 2009 ; Zhang et al., 2011). Enfin la troisième consiste à sélectionner les SNP en tenant compte du déséquilibre de liaison (DL) entre SNP (Herry et al., 2018). Cette méthode a été étudiée compte tenu des particularités du génome aviaire et de la structure du DL (Robert et al., 2015). Les facteurs influençant la qualité de l'imputation ainsi que les relations entre qualité de l'imputation et évaluation génomique des candidats à la sélection sont bien documentés. À cause des erreurs d'imputation, il est attendu une diminution de la précision des évaluations génomiques des candidats à la sélection avec des génotypes imputés comparativement à celle obtenue avec des génotypes HD. La littérature confirme cela pour les puces BD allant jusqu'à 3K SNP avec une diminution, parfois limitée, de la précision des imputations (Weigel et al., 2009 ; Raoul et al., 2017). Enfin, à notre connaissance, peu d'études ont été menées en volailles (Wang et al., 2013). Peu d'études se sont penchées sur les conséquences d'une utilisation directe des génotypes BD sans imputation sur la précision des évaluations des candidats à la sélection.

L'objectif de cette étude est de juger de l'intérêt de l'imputation des génotypes BD pour l'évaluation génomique des candidats à la sélection.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1 Animaux

La population d'étude est constituée de quatre générations de coqs et de poules pondeuses Rhode Island issues d'une lignée pure commerciale créée et sélectionnée par Novogen (Plédran, France) dont les effectifs sont détaillés dans le Tableau 1.

1.2 Génotypes

Des prises de sang ont été réalisées au niveau de la veine brachiale des animaux et l'ADN a été extrait et hybridé sur la puce de génotype 600K Affymetrix® Axiom® HD. L'ensemble des animaux a été génotypé

pour 580 961 SNP. Les génotypes ont ensuite été filtrés par un contrôle qualité permettant de retenir 300 351 SNP informatifs pour les analyses, répartis sur les macro-chromosomes (1 à 5), les chromosomes intermédiaires (6 à 10), les micro-chromosomes (11 à 33) et le chromosome sexuel Z. Ces SNP sont désignés sous l'appellation 300K par la suite.

Parmi les individus génotypés de la génération G1, 67 individus mâles ont plus de 10 descendants avec des performances.

1.3 Phénotypes

Les mesures de performances sur le poids d'œuf (PO, en g) et sur la force de fracture (FF, en N) de la coquille ont été collectées à collectées entre 60 et 90 semaines et correspondent à des données individuelles. La force de fracture est mesurée grâce à une machine mesurant la force maximale (en N) appliquée à la coquille pour la fêler.

Tableau 1. Récapitulatif des données

	Rhode Island		
	Génotypes	Phénotypes	
Données	2362 individus	75 122 œufs	7983♀
Génération G0	447♂	29 318	2840♀
Génération G1	580♂	18 461	2028♀
Génération G2	132♂ ; 665♀	18 306	1885♀
Génération G3	55♂ ; 491♀	9037	1230♀

1.4 Simulation des puces basse-densité

À partir de la puce 300K, plusieurs puces BD ont été développées en sélectionnant un sous-ensemble de SNP de la puce HD. Une méthode « équidistante » (EQ), a été étudiée en sélectionnant des SNP à intervalles réguliers le long de chaque chromosome en maximisant la MAF des SNP retenus. 12 puces ont été créées avec des densités de SNP allant de 1K à 50K.

1.5 Qualité des imputations

Dans cette étude, les candidats à la sélection sont les 580 individus G1 avec des génotypes BD. Ceux-ci sont imputés à partir des génotypes HD des 447 mâles de la génération G0. Ces mâles G0 sont les pères ou les demi-frères des pères des candidats à la sélection (G1).

Pour chaque puce BD, la qualité de l'imputation des candidats à la sélection est mesurée par la corrélation de Pearson moyenne par SNP entre les vrais génotypes HD et les génotypes HD imputés.

1.6 Stratégies d'évaluations génomiques

Le poids d'œuf (PO) et la force de fracture de la coquille (FF) ont été évalués avec la méthodologie du Single Step GBLUP (Legarra et al., 2009). Les deux

caractères sont évalués simultanément selon un modèle animal multi-caractère.

Le premier objectif est d'étudier l'impact des erreurs d'imputation sur les évaluations génomiques sur ascendance. Une évaluation génomique sur ascendance « Asc_HD » est réalisée avec les génotypes HD des mâles G0 et des candidats, ainsi que les phénotypes des femelles G0. Une deuxième évaluation « Asc_Imp » est réalisée en remplaçant pour les candidats les génotypes HD par les génotypes BD imputés. Pour chaque puce BD, des corrélations de Spearman (corrélations de rang) sont calculées entre les vraies GEBV HD et les GEBV BD imputées pour les 67 mâles reproducteurs G1 avec des descendantes mesurées ainsi que pour les 150 meilleurs individus G1 selon leur GEBV HD, en fonction du caractère d'étude. Le deuxième objectif vise à étudier l'impact des imputations sur la précision des évaluations génomiques. Pour cela, une évaluation génomique sur descendance « Full_HD » des individus G1 avec descendance (donc les 67 reproducteurs G1) est réalisée en utilisant l'ensemble des informations disponibles (génotypes et performances des ascendantes, collatérales et descendantes). Pour chaque puce BD, des corrélations de Pearson sont calculées entre les GEBV « Full_HD » et les GEBV BD imputées estimées sur ascendance pour les 67 mâles reproducteurs G1.

Enfin, il est également intéressant d'étudier les possibles conséquences d'une utilisation directe des génotypes BD sans imputation sur les évaluations génomiques. Pour cela, les deux objectifs précédents sont repris en utilisant directement les génotypes BD de l'ensemble des animaux.

1.7 Logiciels utilisés

Les génotypes des candidats à la sélection sont imputés avec le logiciel FImpute (Sargolzaei et al., 2014).

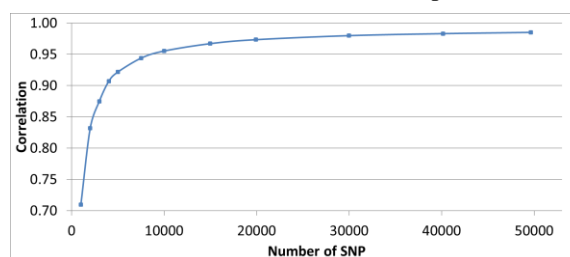
Le scénario « Full_HD » avec l'ensemble des informations disponibles est utilisé pour estimer les paramètres génétiques du modèle. Le programme remlf90 (Misztal et al., 2002) est utilisé pour estimer les composantes de la variance, génétique et résiduelle. Les différentes évaluations sont ensuite réalisées avec blupf90, ces composantes étant fixées.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1 Qualité des imputations

Les corrélations moyennes entre les vrais génotypes HD et les génotypes BD imputés augmentent avec le nombre de SNP sur les puces BD (Figure 1). Pour des densités de 3K et 20K SNP, les corrélations sont respectivement de 0.8747 et 0.9374. Un point d'inflexion est noté entre 5K et 10K SNP. Enfin, pour une densité de 1K la corrélation moyenne diminue à 0.7098 témoignant d'une qualité d'imputation dégradée.

Figure 1. Évolution des corrélations de Pearson entre génotypes HD et génotypes BD imputés en fonction du nombre de SNP sur les puces BD.



2.2 Impact des erreurs d'imputations

Les résultats sont similaires pour les deux caractères et ne sont développés que pour le PO.

2.1.1 Sur les 150 meilleurs individus G1

La figure 2 montre pour le PO une augmentation des corrélations de Spearman entre les GEBV « Asc_HD » et les GEBV « Asc_Imp » avec une augmentation du nombre de SNP sur les puces BD. En effet, pour les puces 3K et 20K, les corrélations sont respectivement de 0.9045 et 0.9885. Ceci est cohérent avec la littérature. Wang et al. (2013) ont montré en poulet de chair qu'utiliser des génotypes 20K imputés à partir de 766 SNP permettait d'augmenter par deux les GEBV pour le poids des individus ou l'intensité de ponte par rapport aux GEBV obtenus avec des génotypes 20K imputés à partir de 377 SNP.

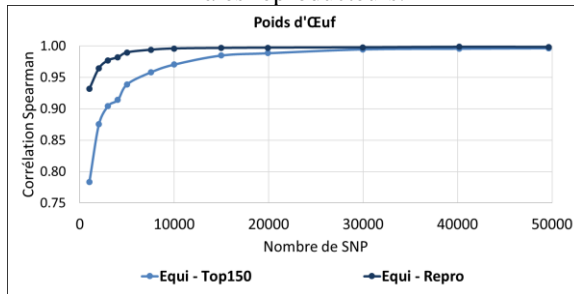
Enfin, avec plus de 5K SNP, les corrélations moyennes sont supérieures à 0.95, ce qui indique un reclassement plutôt faible des meilleurs individus.

2.1.2 Sur les individus reproducteurs G1

Les corrélations de Spearman ont été calculées pour les 67 individus reproducteurs G1. La figure 2 montre pour le PO une augmentation des corrélations de Spearman avec le nombre de SNP sur les puces BD. En effet, pour les puces 3K et 20K, les corrélations sont respectivement de 0.9771 et 0.9972. Les résultats sont donc supérieurs à ceux obtenus pour les 150 meilleurs individus G1. Ceci s'explique par le fait que les 67 individus reproducteurs ne sont pas les meilleurs individus pour le PO, mais les meilleurs individus pour un index multi-caractère. Ces 67 individus sont donc répartis dans l'ensemble du classement des 580 individus G1 pour le PO.

Enfin, pour une densité de SNP supérieure à 2K, des corrélations supérieures à 0.95 sont obtenues, indiquant un reclassement plutôt faible des 67 individus reproducteurs. En revanche, pour la puce 1K, la corrélation est de 0.9316, signe qu'une diminution importante du nombre de SNP peut avoir des conséquences plus fortes sur les évaluations et le reclassement des individus.

Figure 2. Évolution des corrélations de Spearman entre les GEBV « Asc_HD » et les GEBV « Asc_Imp » pour les 150 meilleurs mâles ou les 67 mâles reproducteurs.



2.3 Impact sur la précision des évaluations génomiques

Les corrélations de Pearson sont calculées pour le PO et FF entre les GEBV « Full_HD » et les GEBV BD imputées estimées sur ascendance pour les 67 individus reproducteurs G1. Les résultats sont similaires pour les deux caractères et ne sont développés que pour le PO. Les corrélations varient jusqu'à une densité de 20K SNP puis deviennent stables pour des densités supérieures. Les corrélations pour les puces 1K et 20K sont respectivement de 0.4472 et 0.4854. Toutefois, la corrélation entre les GEBV « Full_HD » et les GEBV « Asc_HD » est de 0.4848. Cette corrélation représente la valeur théorique maximale atteignable en réalisant une évaluation sur ascendance avec la puce HD (au lieu des puces BD). Les corrélations associées aux différentes puces ne sont significativement pas différentes de celle obtenue avec la puce HD. En effet l'erreur standard pour chaque puce est de ± 0.11 . Ceci est en accord avec les résultats précédents montrant un impact faible des erreurs d'imputation sur le reclassement des reproducteurs. En effet, pour une densité supérieure à 3K SNP, les corrélations entre GEBV HD estimées sur ascendance et GEBV BD imputées estimées sur ascendance sont supérieures à 0.99. Ces résultats sont cohérents avec la littérature. VanRaden et al. (2012) ont montré qu'en moyenne pour 28 caractères en bovin, la fiabilité des résultats diminuait de 61.1% avec 300K SNP à 60.7% avec 45K SNP (et imputés à 300K). En revanche, Chen et al. (2014) ont montré chez les bovins que 50K SNP imputés à partir de 384 SNP entraînait une diminution de la précision des évaluations de 0.61 à 0.49 pour le rendement laitier, et de 0.62 à 0.53 pour le taux de cellules.

Enfin, il est important de noter que la différence entre les densités des puces BD et la densité de la puce HD (300K) est beaucoup plus élevée que dans d'autres études.

2.4 Impact de l'absence d'imputation

Les résultats sont similaires pour les deux caractères et ne sont développés que pour le PO.

2.4.1 Sur les 150 meilleurs individus G1

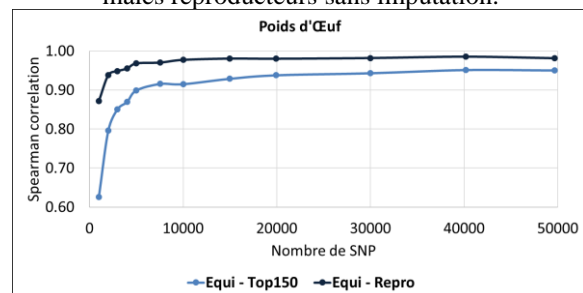
La figure 3 montre une augmentation des corrélations de Spearman entre les GEBV « Asc_HD » et les GEBV « Asc_BD » avec le nombre de SNP sur les puces BD. En effet, pour les puces 3K et 20K, les corrélations sont respectivement de 0.8507 et 0.9379. Comparativement aux résultats obtenus avec imputation (0.9045 et 0.9885 pour les puces 3K et 20K respectivement), il est noté une diminution des résultats des évaluations sans imputation avec une baisse des corrélations de 0.0538 et 0.0506 pour les puces 3K et 20K respectivement. De plus, les résultats sont significativement plus faibles pour les puces à très basse densité. En effet, pour la puce 1K, la corrélation moyenne est de 0.6261 sans imputation quand elle est de 0.7833 avec imputation. L'impact sur le reclassement des individus est donc conséquent pour de très faibles densités de SNP.

Enfin, à partir de 20K SNP, les corrélations semblent atteindre un seuil pour une corrélation moyenne de 0.95 alors qu'avec les imputations elles étaient supérieures à 0.99.

2.4.2 Sur les individus reproducteurs

Les corrélations de Spearman entre les GEBV « Asc_HD » et les GEBV « Asc_BD » ont été calculées pour les 67 individus reproducteurs G1. La figure 3 montre pour le PO une augmentation des corrélations de Spearman avec le nombre de SNP sur les puces BD. En effet, pour les puces 3K et 20K, les corrélations sont respectivement de 0.9484 et 0.9802. Les corrélations sont donc supérieures à celles obtenues pour les 150 meilleurs individus G1 du fait d'une meilleure distribution des 67 individus reproducteurs dans le classement des 580 individus G1. En revanche, en comparant avec les résultats obtenus avec imputation, les résultats sont plus faibles mais ne sont significativement pas différents. Toutefois, les corrélations pour la puce 1K sont de 0.8718, indiquant un reclassement des individus plus élevé que précédemment (0.9316) et pouvant impacter la précision des évaluations génomiques.

Figure 3. Évolution des corrélations de Spearman entre les GEBV « Asc_HD » et les GEBV « Asc_BD » pour les 150 meilleurs mâles ou les 67 mâles reproducteurs sans imputation.



2.5 Impact de l'utilisation directe des génotypages BD sur la précision des évaluations génomiques

Les corrélations de Pearson sont calculées pour le PO et FF entre les GEBV « Full_HD » et les GEBV HD

non imputés estimées sur ascendance pour les 67 individus reproducteurs G1.

Pour des densités de SNP supérieures à 2K, les résultats sont plutôt stables. En effet, pour les puces 3K et 20K, les corrélations sont respectivement de 0.4471 et 0.4675 pour le PO. Toutefois les erreurs standards associées à ces corrélations sont de ± 0.11 , ce qui indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les différents résultats. Ceci est cohérent avec les résultats précédents montrant un impact léger de l'absence d'imputation sur le reclassement des reproducteurs. De plus, la corrélation entre les GEBV « Full_HD » et les GEBV « Asc_HD » est de 0.4848. Pour une densité de SNP supérieure à 2K, une utilisation directe des puces BD sans imputations pourrait donc permettre d'obtenir des résultats aussi bons que ceux obtenus avec imputation ou qu'avec la puce HD elle-même.

En revanche, la corrélation moyenne pour la puce 1K est de 0.4018 (± 0.11). De même, pour la FF, la corrélation moyenne pour la puce 1K est de 0.2980 (± 0.12) alors que la corrélation entre les GEBV « Full_HD » et les GEBV « Asc_HD » est de 0.4027. Bien que non significatives, ces baisses de corrélations montrent que l'utilisation directe de puces à très faible densité sans imputation pourrait avoir des impacts sur la précision des évaluations.

3. CONCLUSION

L'objectif des sélectionneurs est d'obtenir de bons résultats d'évaluations génomiques des candidats à la sélection. En mettant en lien précision des imputations et conséquences sur les évaluations génomiques, il a été montré que la densité de SNP n'avait finalement qu'un impact très faible sur le reclassement des meilleurs individus et des reproducteurs, ainsi que sur la précision des évaluations génomiques. Sans imputation, l'utilisation directe des génotypes BD des candidats à la sélection a montré que des résultats moins corrélés étaient obtenus comparés à ceux obtenus avec imputation. Pour des densités de SNP supérieures à 2K, les corrélations entre GEBV HD et GEBV BD restent toutefois supérieures à 0.90. En revanche, le reclassement des meilleurs individus pour un caractère est plus impacté, notamment pour de faibles densités de SNP. Ainsi, peu de marqueurs peuvent suffire pour faire le tri entre bonnes et mauvaises familles mais peuvent ne pas suffire pour trier intra-famille le meilleur candidat.

Enfin, il convient de noter qu'en fonction des caractères étudiés, une précision plus faible des évaluations génomiques est obtenue pour de très faibles densités de génotypes (1K).

BIBLIOGRAPHIE

- Chen L., Li C., Sargolzaei M. et al., 2014. PLoS One. 9:e101544.
 Hérault F., Yon J., Herry F. et al., 2016. <https://prodinra.inra.fr/record/375447>
 Herry F., Hérault F., Picard Druet D. et al., 2018. BMC Genetics. 19:108-121.
 Kranis A., Gheyas A.A., Boschiero C. et al., 2013. BMC Genomics. 14:59-71.
 Legarra A., Aguilar I. et Misztal I., 2009. J. Dairy Sci. 92:4656-4663.
 Misztal I., Tsuruta S., Strabel T. et al., 2002. Proc. 7th. World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod.
 Raoul J., Swan A.A., et Elsen J.M., 2017. Genet. Sel. Evol. 49:76-87.
 Robert R., Hérault F., Romé H. et al., 2015. Proc. 9th. Eur. Symp. Poult. Genet.
 Sargolzaei M., Chesnais J.P. et Schenkel F.S., 2014. BMC Genomics. 15:478-489.
 VanRaden P.M., Null J.D., Sargolzaei M. et al., 2012. J. Dairy Sci. 95:1-11.
 Wang C., Habier D., Peiris B.L. et al., 2013. Poult. Sci. 92:1712-1723.
 Weigel K.A., de los Campos G., González-Recio O. et al., 2009. J. Dairy Sci. 92:5248-5257.
 Zhang Z., Ding X., Liu J. et al., 2011. J. Dairy Sci. 94:3642-3650.

SESSION

GENETIQUE - REPRODUCTION

Synthèse

LE PROJET MILLE GENOMES GALLUS : COMMENT PARTAGER LES DONNEES DE SEQUENCES POUR MIEUX LES UTILISER

Michèle Tixier-Boichard¹, Frédéric Lecerf², Philippe Bardou³, Christophe Klopp³

¹ GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78352 JOUY-EN-JOSAS, ²PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35042 RENNES, ³SIGENAE, INRA, 31326 CASTANET-TOLOSAN,
michele.tixier-boichard@inra.fr

RESUME

Le séquençage du génome entier est maintenant utilisé dans de nombreux projets de recherche sur le poulet. Le projet Mille Génomes Gallus s'inspire du projet Mille Génomes Bovins et a pour objectif de rassembler les séquences du génome entier d'animaux du genre *Gallus*, produites par les équipes de recherche et les entreprises de sélection. L'intérêt est d'augmenter la puissance des analyses en augmentant le nombre de génomes comparés. Les applications concernent l'analyse de la structure du génome, la caractérisation globale de la diversité de l'espèce, l'identification de mutations causales et l'aide à la sélection génomique. Cette synthèse décrit d'abord le contexte de la génomique du poulet avant de développer le concept du projet Mille Génomes, de l'illustrer avec un projet pilote utilisant les données produites par des équipes françaises et de discuter les modalités de son extension. Le projet pilote français regroupe 207 séquences individuelles issues de 8 projets de recherches financés par des fonds publics, sur une large gamme de populations (poulets de chair, poules pondeuses, races locales, ancêtres sauvages). Les jeux de données sont décrits par des métadonnées techniques et des métadonnées liées à l'animal et sa population d'origine. Aucune information phénotypique n'est partagée. L'équipe SIGENAE a aligné l'ensemble des séquences sur la version 5 du génome de référence et a répertorié plus 40 millions de variants SNP. L'analyse de structure des populations regroupe les 207 individus en sept groupes génétiques. L'étude des SNP du gène *MC1R* montre une signature de sélection chez les pondeuses de plumage rouge. D'autres analyses sont prévues, notamment pour les variants structuraux. Les projets en cours en Europe et les contacts pris avec des équipes étrangères laissent penser que la cible de Mille Génomes peut être atteinte rapidement. Les principes d'un futur accord de consortium sont exposés.

ABSTRACT

The Mille Gallus genomes project: how to share sequence data in order to better exploit them.

The Mille Gallus genomes project aims at gathering whole genome sequence data in chicken, produced by research teams as well as breeding companies, on the model of the Mille Bull genomes project. The main interest is to increase the power of analyses by increasing the number of genomes to compare. Applications are to improve the knowledge of the chicken genome, to characterize with a high accuracy the genetic diversity at the species level, to facilitate the identification of causal mutations and to provide support to genomic selection by facilitating imputation of sequence data from SNP data. A pilot project has started in France with the collection of 207 individual genome sequences produced by eight publicly funded projects on a range of chicken populations (fast-growing and slow-growing broilers, layers, local breeds, wild ancestors). Data sets are described by technical metadata and by metadata on the animal and its population of origin. Phenotypic data are not shared. The SIGENAE team has aligned all sequences on the GalGal5 reference genome and used a common pipeline for SNP calling. More than 42 millions SNP were identified. A structure analysis led to group the 207 individuals in seven genetic clusters. The analysis of SNP in the coding sequence of the *MC1R* gene showed a selection signature in the brown-egg layers related to red plumage. Other analysis are planned, including detection of structural variants. On-going projects in Europe and feedback from international teams led to think that the target of Mille genomes can be reached quickly. The principles of a future consortium agreement are presented.

1-CONTEXTE DE LA GENOMIQUE DU POULET

1.1. Particularités de l'espèce

Le poulet est une espèce d'intérêt économique majeur pour l'alimentation humaine, avec 109 millions de tonnes de viande produites et 70 millions de tonnes d'œufs en 2017 (<http://www.fao.org/faostat>). Le poulet est aussi une espèce modèle utilisée de longue date pour la biologie du développement, grâce à l'accès relativement facile à l'embryon à tous les stades de développement. Cette conjonction d'espèce économique et d'espèce modèle lui a valu d'être la première espèce d'élevage à avoir son génome séquencé. L'intérêt de séquencer le génome du poulet était aussi de constituer une référence pour l'assemblage du génome d'autres oiseaux, comme par exemple la pintade (voir Vignal et al, communication courte soumise aux JRA 2019).

La principale espèce ancêtre sauvage du poulet, *Gallus gallus*, vit toujours dans son habitat naturel en Asie (Inde, au Vietnam, en Thaïlande...) de même que les espèces proches que sont *Gallus sonneratii*, *Gallus lafayetii* et *Gallus varius*. L'étude du génome de ces espèces permet donc d'aborder le processus de domestication du poulet par la génomique. Le génome du poulet est plus compact que celui des mammifères avec 1,26 Gigabases contre environ 3 Gigabases, son séquençage est donc moins coûteux. La première version du génome de référence a été produite à partir de l'ADN d'une population consanguine de poule de jungle (Hillier et al., 2004). La dernière version disponible est la version 6.

1.2. Révolution de l'approche génome entier

Une fois qu'un génome de référence a été produit pour une espèce, le réséquençage des génomes individuels permet d'obtenir une masse d'informations sur l'histoire d'une espèce ou d'une race, mais aussi sur la diversité génétique accessible pour la sélection (Vignal et Besbes, 2005) comme pour la gestion des populations en conservation. Le génome est parfois décrit comme une archive de l'histoire d'une population car son analyse permet de reconstituer les variations d'effectif, de détecter des événements d'introgression entre espèces ou entre races au sein d'une espèce, de détecter des signatures de sélection ou encore d'identifier un individu ancêtre commun aux animaux porteurs d'une anomalie génétique.

Le génome constitue ainsi un même référentiel pour tous les travaux de recherche sur la génétique d'une espèce. Le séquençage a ainsi conduit à remplacer les marqueurs microsatellites des années 1990-2010 par les marqueurs SNP, défini comme la variation par rapport au génome de référence d'une base

précisément localisée dans le génome. De ce fait, les résultats de différentes études deviennent beaucoup plus facilement comparables entre eux qu'auparavant.

Sur le plan technique, le séquençage a constamment gagné en efficacité et son coût a régulièrement diminué. En 2018, le coût du séquençage d'un génome entier de poulet, avec une profondeur de 10X (c'est-à-dire qu'une position du génome est en moyenne lue 10 fois afin d'être connue de façon certaine) variait entre 300 et 400 euros selon les prestataires de séquençage. Le résultat de ce séquençage comprend toutes les variations présentes chez l'individu par comparaison au génome de référence, et notamment celles qui lui sont propres. A titre d'exemple, le génotypage d'un poulet pour le seul outil public à haute densité de 580000 marqueurs SNP (jeu standardisé dénommé 'puce de génotypage) coûtait environ 150 euros en 2018 pour produire une information certes très utile mais ne permettant pas de détecter les variants nouveaux propres à l'individu étudié.

Toutefois, l'extraction des informations pertinentes à partir des données de réséquençage suppose un travail d'analyse beaucoup plus important que celui nécessaire pour exploiter les résultats d'une puce de génotypage. Les principales étapes sont résumées dans la figure 1. Identifier un variant génétique par sa position en nombre de bases sur un chromosome permet aussi de rechercher dans les bases de données si d'autres variants ont déjà été décrits à cette position ou à son voisinage.

L'analyse de données devient le facteur limitant, mutualiser l'analyse permet de mieux exploiter les données de réséquençage et de génotypage, et d'augmenter la puissance des comparaisons entre individus ou entre groupes, c'est la principale motivation d'un projet « Mille Génomes ».

1.3 Contexte de l'open data et de l'open science

Récemment, les agences de financement de la recherche et notamment l'Union Européenne ont souhaité que les données produites grâce à des financements publics soient accessibles à tous les acteurs de la recherche, publics ou privés, et plus généralement à tous les citoyens, qui financent indirectement ces recherches. Cette stratégie dite 'open data' est considérée comme nécessaire au développement de l'innovation à partir de la recherche. Elle s'inscrit dans une volonté plus large de science ouverte à la société. Elle est particulièrement relayée par la 'Research Data Alliance' (<https://www.rd-alliance.org/>) dont le nœud français est coordonné par le CNRS dans le cadre du projet européen RDA Europe 4.0, qui a démarré le 1er mars 2018. Les institutions de recherche telles que l'INRA ont adhéré à cette stratégie et accompagnent leurs chercheurs dans cette démarche

non intuitive, chaque chercheur ayant naturellement le réflexe de conserver ses données pour la question qu'il elle veut traiter. Il ne s'agit pas de diffuser n'importe comment des données mais de les produire et de les conserver de manière standardisée et de les documenter avec des 'méta-données' utilisant un vocabulaire standardisé afin de faciliter la réutilisation des données. L'idée est bien qu'une seule personne ou qu'un seul groupe de chercheurs ne peut exploiter totalement un jeu de données et que le partage de ces données améliore leur utilisation et la connaissance qui en est extraite. L'enjeu est aussi de ne pas être le dernier à exploiter ses données et la stratégie *open data* pousse à une certaine accélération de la recherche. Ainsi, chaque projet de recherche doit comporter un plan de gestion des données produites, décrivant le type de données produites, leurs conditions d'accès et d'utilisation futures (stockage, période d'embargo, reconnaissance du producteur initial des données).

La génomique se prête particulièrement bien à cette stratégie de partage des données, grâce à la standardisation de la description des données de séquence et à l'existence d'entrepôts internationaux qui rassemblent les données du génome de référence et des génomes individuels, tels que NCBI développé aux Etats-Unis (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ensembl développé en Europe (<http://www.ensembl.org>) ou encore UCSC développé par une université américaine (<https://genome.ucsc.edu/>).

2. LE CONCEPT 'Mille GENOMES'

Le concept Mille Génomes a été inventé pour l'espèce humaine (www.internationalgenome.org) en 2010 avec une publication de référence en 2012 décrivant la variabilité génétique de 1092 génomes humains (The Mille Genomes Project Consortium, 2012). L'espèce bovine a été la première espèce domestique à bénéficier de cette approche et constitue l'exemple de référence pour mettre en place un projet Mille Génomes pour le poulet.

2.1 Le projet Mille Génomes bovins :

L'idée est née en Australie en 2011 et un premier consortium a été créé en 2012 avec 7 partenaires dont l'INRA. L'objectif est d'avoir accès à un grand nombre de séquences individuelles sans augmenter les coûts par partenaire, au sein d'un consortium dans le cadre d'un contrat signé par chaque membre. Pour un membre, l'intérêt est double : il accède à une quantité d'information beaucoup plus importante ; il bénéficie

d'un traitement des données normalisé. Les lectures une fois alignées sur le génome de référence (étape 1-figure 1) sont rassemblées dans un même site où sont réalisées toutes les étapes de traitement avec une même méthode, afin de redistribuer à tous les membres du consortium les résultats de l'étape 3 de la figure 1. La première publication de référence issue de ce projet date de 2014 et montre que l'analyse de la séquence de 234 taureaux facilite la cartographie génétique de caractères monogéniques mais aussi complexes (Daetwyler et al., 2014).

Pour garantir l'homogénéité du traitement, seules les lectures de séquences obtenues par la technologie Illumina sont partagées et caractérisées par des descripteurs minimaux obligatoires : race, identifiant de l'animal (potentiellement anonymisé mais unique), sexe, profondeur de séquence, plusieurs critères techniques de réalisation du séquençage. Les membres sont obligatoirement apporteurs de données de séquences : à la création du consortium, le minimum d'apport était d'au moins 10 animaux avec une profondeur individuelle au moins égale à 4X pour un total supérieur à 100X (par exemple, au moins 10 animaux à 10X ou 25 animaux à 4X). Les données ont été apportées par fournées successives, dénommées 'run' : de 125 animaux au run 1, à 2433 au dernier run (n° 6). L'apport minimal demandé augmente à chaque run afin de renforcer l'engagement des partenaires. Le consortium comptait plus de 30 membres en 2017. Environ la moitié des données de séquences brutes sont déposées dans les sites publics au fur et à mesure des publications réalisées. Le choix du dépôt en base publique relève de l'apporteur de données et n'est pas une obligation du consortium. On voit donc ici un exemple où l'open data est contrôlé : les données sont d'abord partagées au sein d'un consortium avant d'être progressivement rendues publiques.

Dans ce consortium, chaque membre finance ses coûts, y compris de séquençage. Le coordinateur australien (DEPI, Melbourne, Australie) finance le stockage des données et les analyses communes (étapes 1 à 3, figure 1) alors que le travail d'annotation (étape 4, figure 1) est partagé entre différents membres du consortium. A titre d'exemple, le résultat du run 4 a permis d'identifier plus de 35 millions de NP et 1,7 millions d'InDels¹ à partir des données de séquence fournies par 20 partenaires sur 1147 animaux issus de 27 races. Une particularité de ce consortium est aussi d'améliorer la qualité des données apportées en utilisant l'information de déséquilibre de liaison à l'échelle de l'échantillon total pour fournir la probabilité a posteriori du génotype de chaque individu. Ce traitement conduit à inférer les génotypes absents ou à corriger les

¹ Petite suppression (délétion) ou addition (insertion) d'un faible nombre de bases (1 à 50)

génotypes peu fiables et à faire disparaître les pseudo-allèles issus d'erreurs de séquençage. Cette étape importante pour la qualité des résultats n'est possible qu'en traitant l'ensemble des données, elle constitue donc une plus-value du consortium.

Il est capital de noter que les phénotypes et les génotypes utilisés en sélection ne sont pas partagés. Chaque partenaire peut réaliser pour son compte des analyses avec les données mutualisées. Ainsi, les associations entre variants de séquence (SNP + Indels) et phénotypes sont réalisées par les partenaires sur leurs propres données de phénotypes et ces données sont partagées lorsque l'ensemble des membres du consortium le jugent utile. Cela a permis au consortium d'identifier l'ensemble des QTLs déterminant la taille des bovins et d'en faire une publication commune (Bouwman et al., 2018).

Une autre valorisation importante pour la sélection est de pouvoir reconstituer la séquence d'un animal qui n'a été que génotypé. Ainsi, la connaissance du génotype à un certain nombre de positions dans le génome (en général au moins 50000) permet de déduire la séquence la plus probable entre chaque position génotypée grâce au référentiel de SNP établi par le projet Mille Génomes. De ce fait, des animaux génotypés sont presque aussi bien connus que des animaux séquencés. Cette étape s'appelle 'imputation' et peut être réalisée par un partenaire sans avoir à partager les résultats obtenus. Elle améliore grandement la précision de la sélection conduite par ce partenaire et permet aussi de construire de grandes populations de cartographie pour identifier directement les variants candidats sous-jacents aux QTL. Elle est d'autant plus utile que le nombre d'animaux génotypés et apparentés aux animaux séquencés est grand. Ainsi, en France et à ce jour, près de 100 000 animaux avec phénotypes et génotypes SNP de puces ont été imputés à l'échelle de la séquence. Cet argument d'imputation a été décisif pour constituer le consortium bovin à l'époque où la sélection génomique se mettait en place dans tous les pays. La majorité des animaux séquencés correspondent à des taureaux ancêtres ayant une forte contribution génétique à leur population. Ils sont très informatifs en termes de variants présents dans les populations mais n'ont aucun intérêt stratégique en termes de phénotypes ou de sélection.

2.2 Objectifs du projet Mille Génomes Gallus

L'objectif général est d'augmenter la puissance des analyses génomiques en augmentant le nombre de génomes séquencés accessibles pour une même analyse. Quatre types d'applications sont proposées.

2.2.1. Analyse de la structure du génome

Rassembler le plus grand nombre de séquences permet non seulement une identification plus complète des variants de type SNP et InDel, mais aussi d'étudier leur répartition dans le génome, notamment en distinguant les macrochromosomes des microchromosomes qui sont une particularité des oiseaux (à l'exclusion des rapaces). Une étape supplémentaire par rapport au projet bovin serait de répertorier l'ensemble des variants structuraux, par exemple les insertions rétrovirales qui sont connues pour entraîner certaines modifications morphologiques majeures chez le poulet (coquille bleue, plumage blanc, emplumement lent...).

2.2.2. Caractérisation de la diversité de l'espèce

Le poulet est une espèce à intervalle de génération court, qui a vu un grand nombre de races se différencier en quelques siècles, qui a accumulé le plus grand nombre de générations de sélection pour des populations commerciales, et qui a aussi permis le développement d'un grand nombre de lignées expérimentales présentant des phénotypes extrêmes. S'il est possible de découper la filière en poule de ponte, poulet de chair et races locales, il n'y a pas une seule race ultra dominante comme l'est la race bovine Holstein, et l'analyse de la diversité génétique est donc un objectif sans doute plus important que pour le projet Mille Génomes bovin. De plus, les projets de diversité génétique ont jusqu'à maintenant été réalisés avec différentes puces de génotypage ayant très peu de marqueurs en commun ce qui empêche la mutualisation de ces données, alors que le séquençage permettrait de connecter ces projets.

Les applications envisagées concernent l'identification d'allèles spécifiques de races ou de lignées, l'étude de scénarios de domestication et la détection de flux de gènes entre populations sauvages et domestiques ou entre populations domestiques, par exemple entre races locales et lignées commerciales. La condition est évidemment que des données de séquence soient apportées pour ces différents types de populations.

2.2.3. Identification de mutations causales

Plusieurs cas de figure peuvent se présenter :

- Répertorier toutes les variations possibles pour un gène candidat d'intérêt général : on peut penser à l'exemple du gène de coloration *MC1R*, pour lequel différents variants de la séquence codante ont déjà été publiés, sans que les variants des régions régulatrices soient encore décrits ; les partenaires disposant de données de coloration sur les animaux séquencés pourraient alors progresser dans l'analyse entre phénotype et génotype ;
- Identifier la base génétique d'un phénotype à déterminisme mendélien en comparant des

sous-ensembles de populations définis sur la base de ce phénotype, ce qui suppose l'accord des fournisseurs de données ;

- Rechercher les signatures de sélection entre deux lignées divergentes : cette analyse sera généralement prise en charge par le partenaire ayant produit les lignées mais ce partenaire aura la possibilité de savoir si les variants candidats trouvés dans ses lignées sont uniques ou plus ou moins fréquents dans d'autres populations.

2.2.4. Imputation de la séquence à partir des génotypes

Comme dans le cas du projet Mille Génomes bovin, mutualiser les données des animaux séquencés permettra de mieux tirer parti des données privées de génotypage des candidats à la sélection. Le partage des séquences améliorera l'analyse des dispositifs privés de chaque membre du consortium de séquençage, et notamment ceux des partenaires privés, sans qu'il leur soit besoin de partager leurs données de génotypage ou de phénotypage. Cette application s'est révélée particulièrement utile pour la détection d'anomalies létales à l'état homozygote chez les bovins, en enrichissant les nombreuses données de génotypage par la prédiction de la séquence.

3. LE PROJET PILOTE FRANÇAIS Mille GENOMES GALLUS

3.1. Origine des données

Ce pilote s'appuie sur la mutualisation des données de séquence de 207 animaux issus de 9 projets de recherche financés par l'ANR ou l'Europe et conduits par des équipes françaises (Tableau 1). Chaque projet devient en quelque sorte un témoin pour les autres. Les animaux séquencés proviennent des 4 espèces du genre *Gallus*, si bien qu'on peut parler d'un projet Mille Génomes *Gallus*. Chaque jeu de données est décrit par un ensemble de 18 métadonnées (Tableau 2). L'ensemble de ces données est regroupé sur le serveur de la plateforme SIGENAE du département de Génétique Animale de l'INRA à Toulouse.

L'exploration des bases de données publiques a permis d'identifier 88 jeux de données supplémentaires de séquences individuelles disponibles pour le poulet, qui représentent principalement des races locales asiatiques (67 individus), quelques lignées commerciales (6) ou expérimentales (9) et 6 individus sauvages. On peut donc déjà disposer de 295 séquences individuelles ; toutefois la profondeur des séquences varie de 5 à 90X. En considérant une profondeur minimale de 10X pour garantir une information assez fiable, on doit retirer 20 jeux de données, dont 4 issus

du projet pilote français. Il reste alors un jeu de données de bonne qualité pour 275 animaux, soit du même ordre de grandeur que le run 2 du projet bovin.

3.2. Méthodes d'analyse

L'étape 1 (figure 1) a été réalisée pour les 207 jeux de données individuels des projets français en utilisant la version 5 du génome de référence de *Gallus gallus*, mais la version 6 étant disponible depuis la fin 2018, il est probable qu'un nouvel alignement soit nécessaire dans le futur. Les étapes 2 à 4 ont été réalisées comme décrit dans le figure 1.

Nous avons commencé par des analyses de diversité génétique pour illustrer l'intérêt de la mutualisation des données. Pour cela, nous avons conservé uniquement les SNP pour lesquels un identifiant était disponible dans la base dbSNP (environ 5 millions de SNP concernés). Le calcul des distances génétiques 'identité-par-état' a été conduit avec le logiciel plink (version 1.9) ainsi que le regroupement des distances pour obtenir le graphe multidimensionnel (MDS). Les analyses de structure de population ont été réalisées avec le logiciel ADMIXTURE (Alexander et al, 2009). Le nombre de groupes K (c'est-à-dire le nombre de populations ancestrales) a été estimé en utilisant la procédure de validation croisée disponible avec ADMIXTURE (option --cv) en faisant varier K de 1 à 30 et en choisissant la valeur de K permettant de minimiser l'erreur de validation croisée.

Le gène *MC1R* a été choisi comme exemple de gène candidat dont les variants vont être inventoriés. Pour définir les positions sur la séquence génomique, une comparaison (blastn) entre la séquence codante du gène (NM_001031462) et la séquence génomique du chromosome 11 (NC_006098.4) le contenant a été réalisée. Pour chaque population, la région génomique contenant la séquence codante (un seul exon) correspondant au gène *MC1R* sur le chromosome 11 (assemblage GalGal5 : NC_006098.4 - 11:19084582..19085526) a été extraite des fichiers issus de l'étape 4. Les fréquences alléliques ont été calculées avec le logiciel vcftools. La position des variants identifiés a été comparée aux positions des mutations déjà connues (Ling et al., 2003).

3.3. Résultats

3.3.1. Analyse globale de la diversité

Le nombre total de SNP détectés atteint 42 millions. Les jeux de données montrant les valeurs les plus faibles (moins de 10 millions de SNP) correspondent aux projets qui comprennent peu d'animaux (Fr-AgEncode, Epibird) ou des animaux de lignées

fermées ou sélectionnées depuis un grand nombre de générations (ChickSeq, UtOpIGe)). Les poulets de chair et les poulets labels montrent un peu plus de variation et les individus sauvages *Gallus gallus* montrent la plus grande variation (14 millions). Les 3 autres espèces sauvages montrent aussi un haut niveau de variation par rapport au génome de référence *Gallus gallus*, avec 12 à 14 millions de SNP.

3.3.2. Structuration de la diversité génétique

L'analyse des distances génétiques d'identité-par-état (IBS : Identity By State) et leur représentation par MDS plot (figure 2) permettent de séparer les populations selon leur niveau de variabilité sur le 1er axe : à gauche les poules sauvages et traditionnelles, puis les poulets de chair et enfin les pondeuses à droite. L'axe 2 sépare les pondeuses à œufs bruns commerciales (UtOpIGe) en haut à droite des pondeuses à œufs bruns expérimentales en bas à droite, avec un gradient pour les autres populations. Les données du projet UtOpIGe montrent des distances génétiques faibles entre individus. Le projet QTLDJ ajouté sur le graphique correspond à des séquences de mélanges pour des lignées expérimentales Leghorn.

L'analyse de structure de population fait apparaître 7 regroupements ou clusters (Figure 3). Le cluster 4 est défini par le projet ACRIGEN (poulet de chair moderne) et le cluster 5 par le projet UtOpIGe (pondeuses œufs bruns) alors que le cluster 2 est caractéristique du projet ChickSeq (lignée ancienne de poulet de chair) mais on détecte un apparentement faible avec d'autres clusters à l'intérieur de ce groupe. Les animaux sauvages *Gallus gallus* définissent le cluster 7 et ceux des 3 autres espèces le cluster 6. Les races locales ont un fort apparentement au cluster 7 et montrent un apparentement faible à modéré avec tous les autres clusters, y compris le cluster 6, ce qui traduit l'absence de sélection forte chez ces populations qui sont ainsi plus proches de l'ancêtre sauvage non sélectionné. Le cluster 3 correspond probablement à l'origine White Leghorn présente dans les projets Epibird et Fr-AgEncode. Enfin, le projet SABRE, constitué d'animaux croisés F1 entre des lignées de poulet label, montre logiquement une composition diversifiée du génome avec un apparentement à 6 clusters, assez proche de la situation observée pour les races locales.

Il est possible d'identifier quelques régions du génome qui sont encore partagées entre des races locales et des races très sélectionnées alors que les races très sélectionnées ont définitivement perdu une fraction de la diversité génomique de l'espèce *Gallus* et sont les plus éloignées de l'ancêtre sauvage.

3.3.3. Diversité du gène candidat *MC1R*

La séquence codante de *MC1R* comporte 1 exon pour lequel 10 SNPs ont été identifiés entre les populations étudiées (Tableau 3). On observe nettement la fixation de l'allèle en position 427 chez les pondeuses à œufs bruns qui sont les seules à avoir un plumage coloré rouge alors que les variants en position 636 et 637 sont fixés chez toutes les pondeuses et en ségrégation chez les poulets de chair. Le SNP en position 427 correspond au remplacement d'une thréonine par une alanine en position 143 du récepteur et a déjà été associé à la couleur rouge (Ling et al., 2003). Le variant en position 376 est le plus fréquent en Leghorn blanche et présent chez quelques poulets du chair du projet ChickSeq. La variante 644 est la plus fréquente chez les poulets labels du projet SABRE. Les poulets de chair ne sont jamais fixés pour aucun variant de *MC1R* ce qui est cohérent avec le fait qu'ils ont été sélectionnés pour une absence de couleur de plumage alors que les pondeuses à œufs bruns ont été sélectionnées pour une couleur de plumage rouge. La situation des Leghorn blanche est intermédiaire car les variants 636 et 637 sont présents chez les 4 animaux étudiés, un plus grand nombre d'individus devraient être génotypés pour confirmer la fixation de ces variants dans cette population.

4. EXTENSION DU PARTENARIAT

4.1. Gouvernance et modèle économique

Comme pour le Mille Génomes bovin, un accord de consortium est nécessaire pour pérenniser cette initiative et l'étendre à des jeux de données internationaux. Dans le cas du projet bovin, l'accord de consortium est signé par toutes les institutions apportant des données mais le comité de pilotage est restreint aux membres fondateurs qui ont constitué le consortium initial et apporté les données du premier run. L'objectif de l'accord est de définir les droits et devoirs des partenaires, de fixer les conditions d'entrée, d'organiser la coordination des études afin de définir celles qui sont réalisées en commun et celles qui peuvent être réalisées en interne par chaque partenaire, et de préciser les conditions de valorisation des résultats. En particulier, toutes les études doivent être connues du comité de pilotage, doivent citer l'origine des données et, en cas de propriété intellectuelle, une licence gratuite est attribuée à tous les membres et leurs partenaires ayant fourni des données, ce qui constitue aussi une forte motivation pour intégrer le consortium. Le consortium est limité à des organismes académiques mais la plupart sont associés à des sélectionneurs privés ou coopératifs dont les intérêts sont pris en compte car ils possèdent les animaux séquencés et ont parfois contribué au financement des recherches. Des

sélectionneurs concurrents entre eux ont donc accepté de mutualiser leurs données de séquence afin d'en extraire plus d'informations pour leur usage interne.

Le projet pilote français implique des équipes (Tableau 1) qui se réunissent régulièrement dans le cadre du réseau de génétique avicole de l'INRA et actuellement coordonné par l'unité BOA à Tours. Seules les données du projet UtOpIGe ont été obtenues sur une lignée commerciale de l'entreprise NOVOGEN dans le cadre d'un projet financé par l'ANR qui a fait l'objet d'un accord de consortium. Les conditions d'utilisation de ces données sont donc déjà définies par cet accord initial qui doit continuer à être respecté pour la participation au projet Mille Génomes. Il en est de même pour tous les projets apporteurs de données sur d'autres populations pour lesquels un accord contractuel aurait déjà été établi.

Les conditions d'entrée actuellement utilisées pour le projet pilote sont les suivantes :

- Données de séquence individuelles ayant une profondeur minimale de 10X ;
- Apport minimum de 300X (30 animaux à 10X), considérant que le seuil initial de 100X choisi pour le projet bovin correspond environ à 300 Gb et donc à 300 génomes de poulet ;

Les données de séquençage de mélange sont acceptées en supplément, elles sont plus difficiles à mutualiser car elles sont soumises à un aléas supplémentaire, avec une profondeur moyenne du génome généralement faible et hétérogène entre les individus d'un mélange.

Le modèle économique est calqué sur le projet bovin : les membres financent l'acquisition des données qu'ils apportent et le coordinateur finance le stockage des données et la constitution du fichier global des variants, avec sa mise à jour en cas d'évolution de la séquence de référence. Le coût de stockage annuel de 500 séquences (10X) varie de 6000 à 12000 euros selon que les données restent immédiatement accessibles (stockage 'chaud') ou non (stockage 'froid'), ce qui représente moins de 1% du coût total d'obtention de 500 séquences 10X, estimé à 1,75 Millions d'euros. Le coût le plus important est celui des ressources humaines en charge des analyses.

4.2 Prospection de nouveaux partenaires

Plusieurs partenaires internationaux potentiels, publics ou privés, ont déjà été approchés. Il s'agit de :

- l'Université de Wageningen aux Pays-Bas et de l'entreprise Hendrix Genetics avec un total d'au moins 250 séquences individuelles ayant une profondeur au moins égale à 10X ; l'entreprise Hendrix Genetics a financé l'acquisition de la plus grande partie des données proposées mais n'exige pas d'exclusivité et le

consortium pourra rester ouvert à d'autres partenaires privés qui financeraient l'apport de données ;

- le Friedrich Loeffler Institute, Mariensee, et l'Université de Göttingen en Allemagne avec 50 séquences individuelles de profondeur au moins égale à 10X;

Ces institutions ont confirmé leur intérêt pour participer et une première version d'accord de consortium inspiré de celui du projet bovin leur a été soumise avec peu de corrections demandées. De plus, ces institutions sont partenaires du projet européen IMAGE, coordonné par l'INRA, qui finance le séquençage de 300 poulets (profondeur $\geq 10X$) représentant principalement des races locales des 3 pays, France, Allemagne, Pays-Bas. L'intégration de ces institutions et des données de IMAGE porterait le total de séquences individuelles dépassent le seuil de profondeur de 10X de 203 à 803, auxquelles s'ajoutent 72 jeux de données publiques. Des données pourraient également être apportées par le Roslin Institute (100) et l'université de Nottingham (nombre à préciser) mais leur accord de principe n'a pas été confirmé.

Au niveau international, les institutions les plus intéressées sont en Chine et en Corée. Les équipes américaines contactées n'ont pas souhaité s'engager ou bien ont proposé de commencer par stocker les données rassemblées, ce qui n'était pas notre demande.

CONCLUSIONS

La cible de 1000 séquences de poulet en profondeur 10X est atteignable à court terme. L'exemple du modèle bovin a montré une dynamique d'attractivité croissante du projet encouragée par les premiers résultats obtenus sur l'identification d'anomalies génétiques. Dans le cas du projet pilote poulet, une telle analyse n'est pas réalisable actuellement par insuffisance d'animaux génotypés dans les populations représentées par des animaux séquencés. En revanche, deux types d'analyse seraient dès maintenant réalisables : (1) identifier les régions du génome et les SNP candidats déterminant des caractères discriminant les populations, tels que la couleur de coquille (2) produire un inventaire des variants structuraux dans le génome du poulet, qui n'a jamais encore été réalisé sur un effectif aussi important représentatif des principaux types de populations, sauvages et domestiques. La première action à engager est la signature de consortium avec les différentes institutions.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les porteurs de projets nommés dans le Tableau 1 qui ont apporté leurs données à ce projet pilote.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alexander D., Novembre J., Lange K., 2009. *Genome Res.*, (19), 1655-1664.

Bouwman A.C., Daetwyler H.D., Chamberlain A.J., Ponce C.H., Sargolzaei M., et al., 2018. *Nature Genet.*, (50), 362-367.

Daetwyler H.D., Capitan A., Pausch H., Stothard P., van Binsbergen R., et al., 2014. *Nature Genet.*, (46), 858-865.

Hillier L.W., Miller W., Birney E., Warren W., Hardison R.C., et al., 2004. *Nature*, (432) 695-716.

Ling M.K., Lagerström M.C., Fredriksson R., Okimoto R., Mundy N.I., Takeuchi S., Schiöth H.B., 2003. *Eur. J. Biochem.*, (270), 1441-1449.

Vignal A., Besbes B., 2005. 6èmes Journées de la Recherche Avicole, St Malo, 30-31 Mars, 2005.

Tableau 1 - Description des jeux de données individuelles rassemblés dans le projet pilote Mille Génomes Gallus

Projet	Correspondant (unité INRA ou entreprise)	Type de population	Nombre d'individus	Profondeur moyenne
FR-AgEncode	E. Giuffra, (GABI), S. Lagarrigue (PEGASE)	pondeuses Leghorn, lignée expérimentale	4	38
EpiBird	F. Pitel (GenPhySe)	pondeuses Leghorn, RIR et croisement F1, lignées expérimentales	12	15
UtOpIGe	P. Le Roy (PEGASE) T. Burlot (NOVOGEN)	pondeuses œuf bruns, lignée commerciale	90	14
FEEDaGENE	S. Lagarrigue et T. Zerjal (GABI)	pondeuses RIR, lignée expérimentale	19	46
ACRIGEN	E. Le Bihan-Duval (BOA)	poulet de chair, lignée expérimentale dérivée d'animaux d'un sélectionneur	16	18
CHICKSEQ	S. Lagarrigue	poulet de chair, lignée expérimentale	24	15
SABRE	S. Mignon-Grasteau (BOA)	poulet label croisement F1 entre 2 lignées expérimentales dérivées d'une lignée commerciale	6	29
Domestichick	M. Tixier-Boichard (GABI)	races locales (tous les continents : projet AvianDiv) individus sauvages des 4 espèces du genre <i>Gallus</i>	36	33
Données publiques		races locales asiatiques, lignées commerciales, lignées expérimentales, individus sauvages,	88	20
TOTAL			295	

Tableau 2 - Métadonnées utilisées pour décrire les jeux de données

catégorie	métadonnée
Jeu de données	Nom du projet
population	Espèce
	Statut : domestique ou sauvage
	Type : non sélectionnée, locale, commerciale, expérimentale, croisement
	Nom : standardisation à mettre en place en l'absence de référentiel
individu	Identifiant : format à standardiser
	Sexe
	Pedigree : oui/non
	Identifiant_père
	Identifiant_mère
échantillon ADN	Mélange
	Nombre d'individus/ mélange
séquençage	Technologie
	Date d'obtention des données
	Longueur des fragments en bp
	Méthode paired-end : oui / non
	Profondeur : nombre de génomes-équivalents
	Code md5

Tableau 3 - Fréquence des variants SNP trouvés dans la séquence codante de MC1R. Une valeur 0 indique la présence homozygote de l'allèle de référence.

position	Utopige	FEEDaGENE	FR-AgEncode	Acrigene	CHICKSEQ	SABRE
	Pondeuses œufs bruns		Leghorn blanche	Poulets de chair		
69	0	0	0	0,75	0,35	0,5
212	0	0	0	0,75	0,34	0,5
274	0	0	0,88	0,75	0,53	0,5
376	0	0	0,88	0	0,07	0
398	0	0	0,13	0,25	0	0,33
427	1	1	0	0	0,41	0,17
636	1	1	1	0,25	0,475	0,5
637	1	1	1	0,25	0,475	0,5
644	0	0	0	0,03	0,07	0,5
834	0	0	0,13	0	0	0

Figure 1 - Analyse des données de séquençage du génome entier utilisées pour le projet Mille Génomes Poulet. Après le séquençage, l'étape 1 identifie les fragments obtenus en les alignant sur le génome de référence. L'étape 2 compare les fragments localisés à la séquence de référence pour en identifier les variations. L'étape 3 applique différents filtres pour éliminer les faux positifs. L'étape 4 (facultative) est l'annotation fonctionnelle des variants.

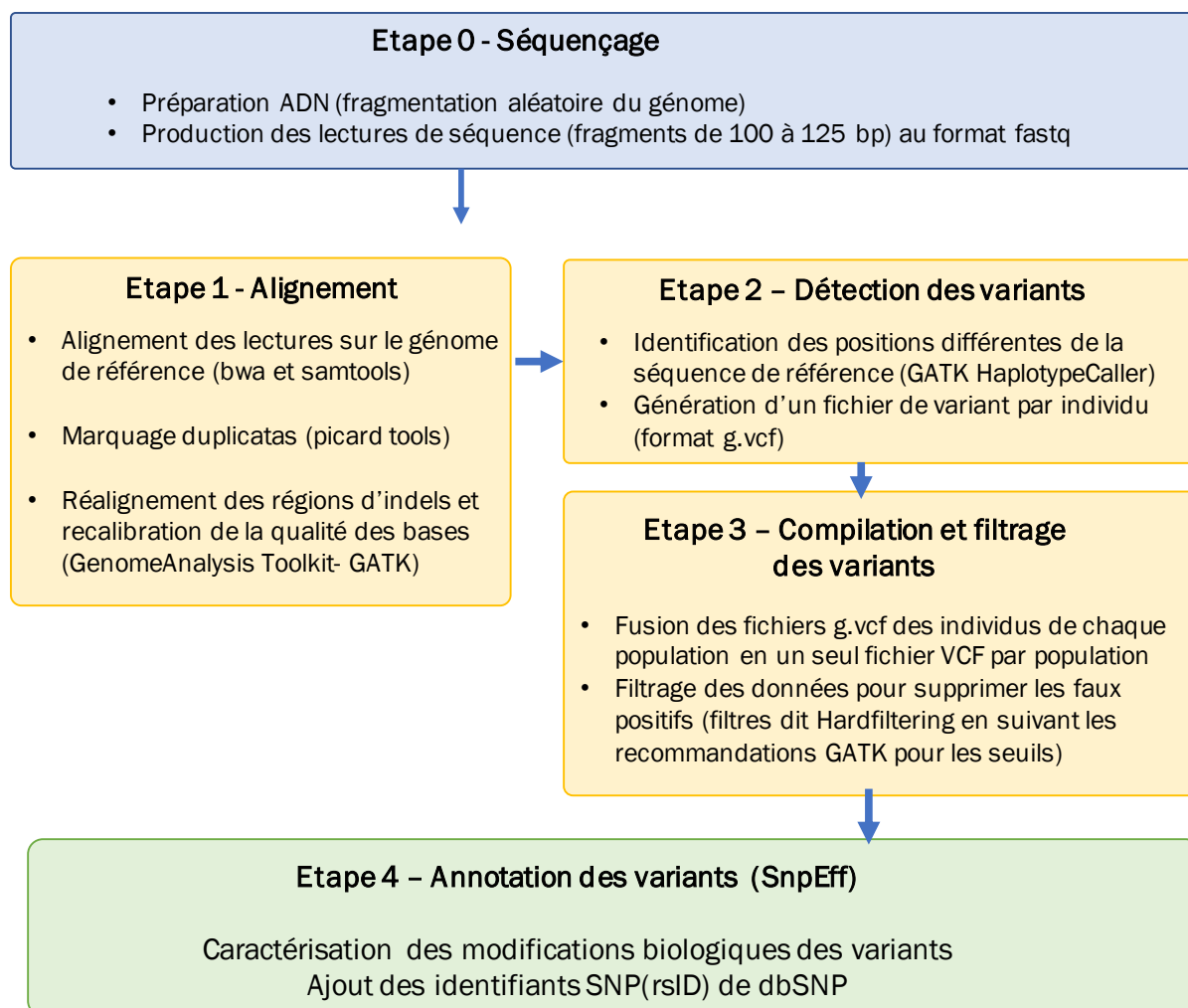


Figure 2 - Projection des individus en fonction des distances génétiques d'identité par état. Le symbole 'x' désigne les individus sauvages du projet Domestichick.

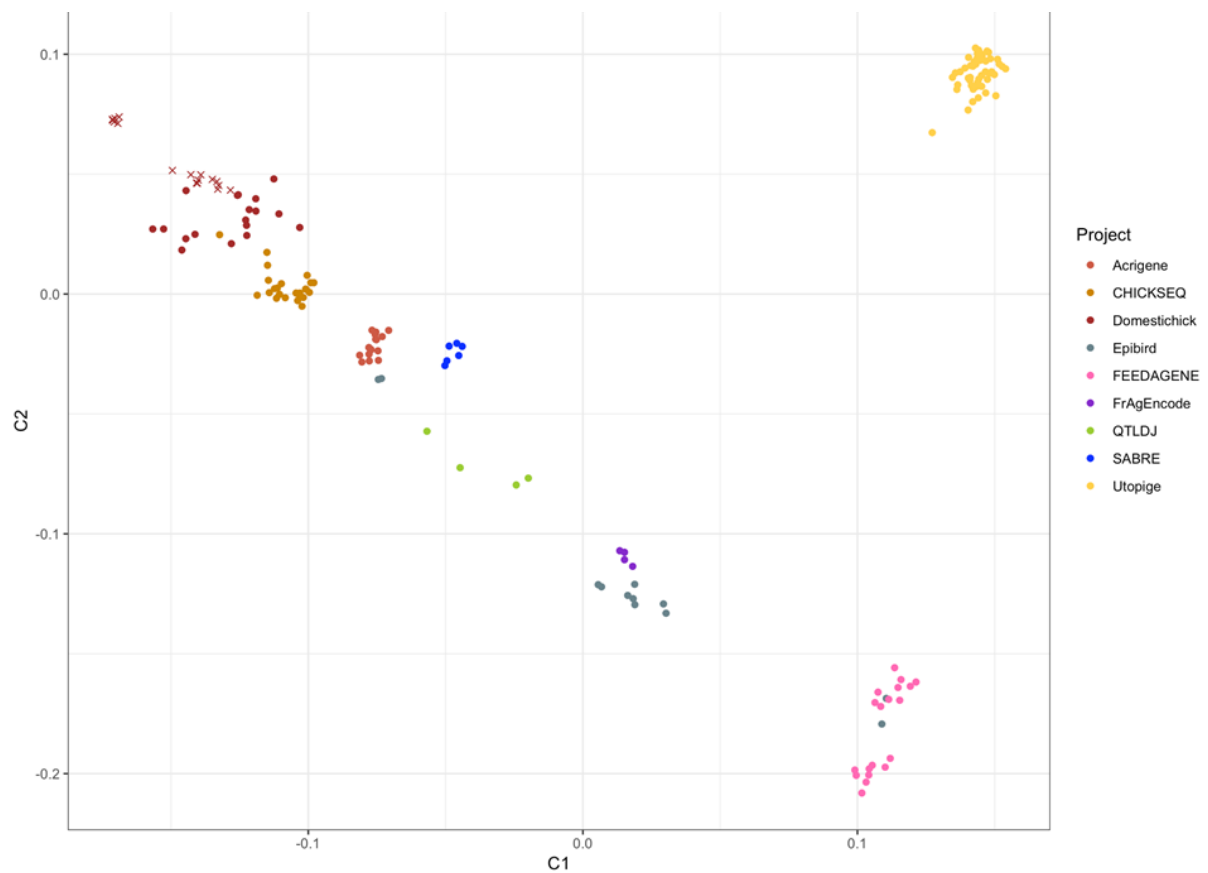
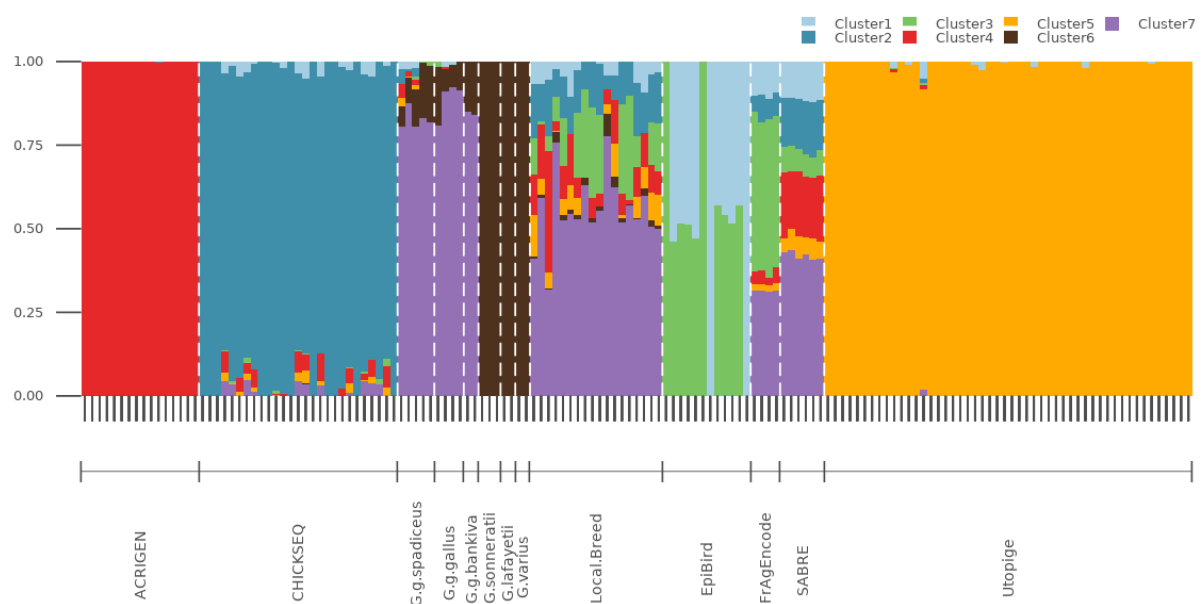


Figure 3 - Résultats de l'analyse de structure montrant l'existence de 7 groupes génétiques différents (clusters) ; un animal est représenté par une colonne, les segments de couleur différente dans une même colonne représentent la fraction d'appartenance du génome de l'individu aux différents groupes génétiques



SESSION

GENETIQUE - REPRODUCTION

SESSION

GENETIQUE - REPRODUCTION

Communications orales

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 PPARG, 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.

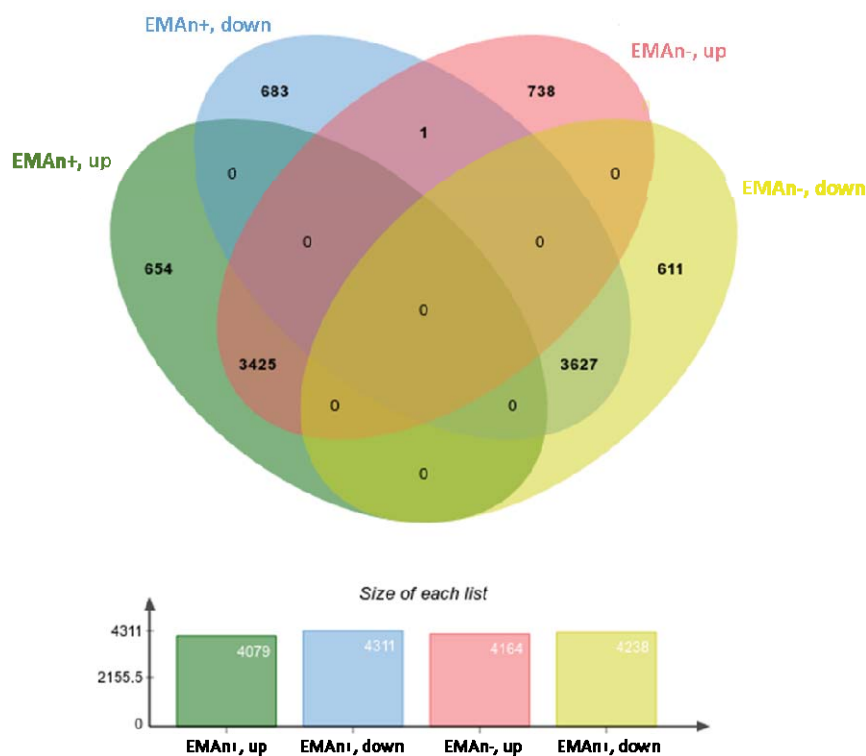
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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
	<i>Autres</i>	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
	<i>Autres</i>	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)



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 glycosaminoglycane 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.

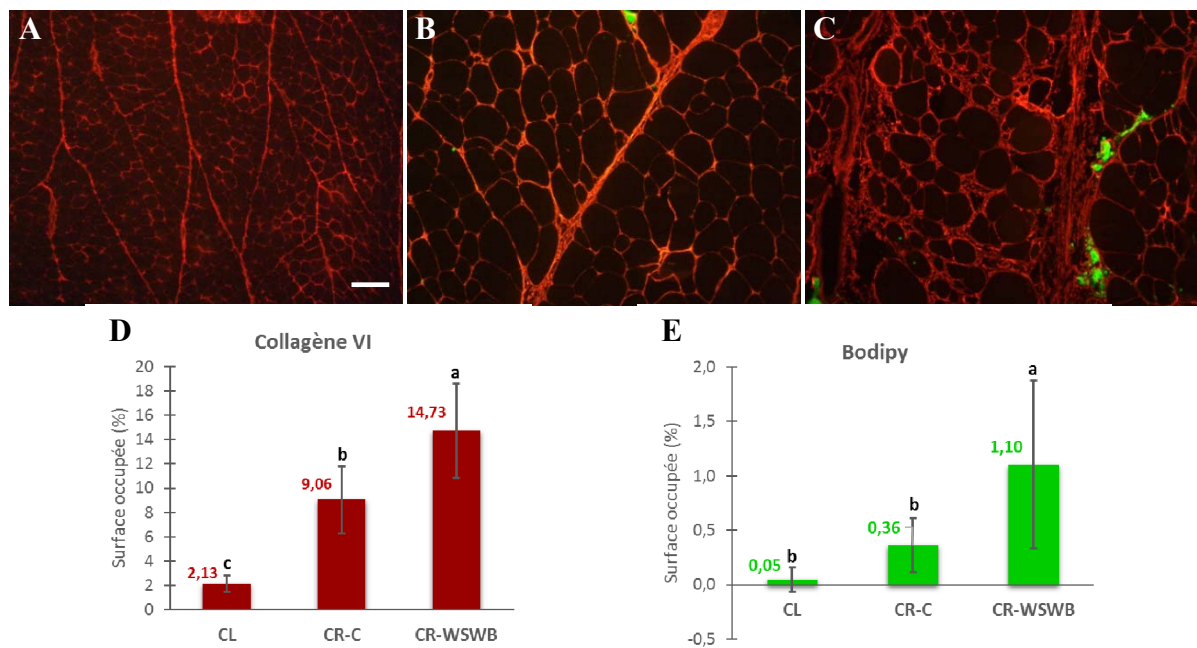
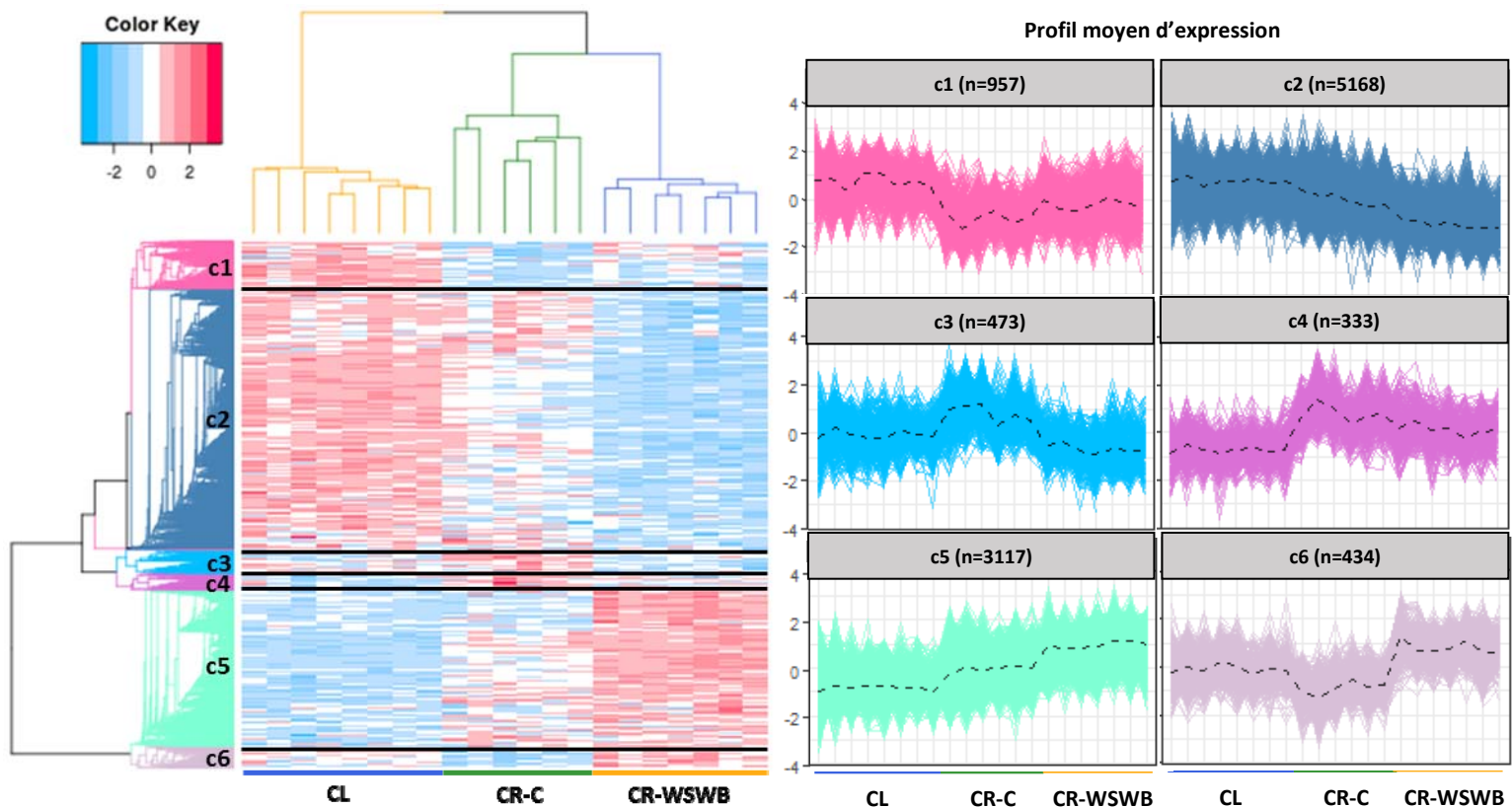


Figure 2. Heatmap et profils moyens d'expression des gènes DE regroupés en cluster pour les muscles CL, CR-C et CR-WSWB.



VARIATION DES RESERVES ENERGETIQUES : IMPACT SUR LA REPRODUCTION ET LES CARACTERISTIQUES DES ŒUFS A COUVER EN LIGNEES CHAIR

Métayer-Coustard Sonia ^{1*}, Franzoni Alessandro ^{1,2}, Réhault-Godbert Sophie ¹, Collin Anne ¹, Travel Angélique ³, Raynaud Emilie ¹, Baumard Yannick ⁴, Delaveau Joël ⁴, Rat Christophe ⁴, Cailleau-Audouin Estelle ¹, Godet Estelle ¹, Brionne Aurélien ¹, Berri Cécile ¹, Le Bihan-Duval Elisabeth ¹

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

² Département des Sciences Vétérinaires, Université de Pise, 56124 Pise, Italie

³ ITAVI, INRA Centre Val de Loire, 37380, Nouzilly, France

⁴ INRA, UE1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, 37380 Nouzilly, France

*sonia.metayer-coustard@inra.fr

RÉSUMÉ

La sélection des lignées de type chair pour une augmentation de la croissance et du rendement en muscle s'est accompagnée de changements physiologiques importants. Alors que des gains considérables ont été obtenus sur les performances en élevage, des limites apparaissent en termes de qualité des produits mais aussi de reproduction, questionnant la durabilité de la production de viande. L'antagonisme génétique entre production et reproduction reste un verrou majeur pour la durabilité de la sélection des lignées de type chair. Chez les souches lourdes, on observe un amenuisement des réserves énergétiques musculaires, évaluées au travers du Potentiel Glycolytique. Ce caractère, héritable, détermine génétiquement le niveau du pH ultime (pHu) de la viande, pour lequel deux lignées divergentes (pHu+ et pHu-) ont été sélectionnées. D'abord étudiées sous l'angle de la qualité de la viande, ces deux lignées constituent un matériel génétique précieux pour aborder le lien entre statut énergétique de l'animal, reproduction, qualité des œufs et in fine des poussins à l'éclosion. L'analyse de la dernière génération de sélection montre une variation des caractères de reproduction en défaveur de la lignée pHu+, caractérisée par une entrée en ponte plus tardive, un taux de ponte plus faible, ainsi qu'un pourcentage d'œufs cassés plus élevé. De façon originale, une modification des caractéristiques des œufs est également observée, en termes de poids et de qualité de la coquille qui varient entre les deux lignées.

ABSTRACT

Variation in energy stores: impact on reproduction and egg characteristics in meat-type strains

Selection of meat-type lines for increased growth and muscle development has been accompanied by significant physiological changes. While considerable gains have been made in production performance, limits appear in terms of product quality and reproduction, questioning the sustainability of meat production. The genetic antagonism between production and reproduction remains a major challenge to maintain the sustainability of selection on meat-type lines. In heavy strains, there is a decrease in muscle energy reserves, as assessed through the Glycolytic Potential. Divergent selection on breast meat ultimate pH from a commercial grandparental female broiler line has originated in two experimental lines: pHu+, presenting the lower energy status, and pHu-, presenting the higher energy status. These two lines constitute valuable genetic materials to address the link between the energy status of the animal, reproduction, egg quality and ultimately chick quality at hatch. Analysis of the 11th generation of selection highlights variation in breeding characteristics to the detriment of pHu+ line, characterized by a first egg delayed, lower egg laying rate and higher percentage of broken eggs. Surprisingly, a change in egg's characteristics is also observed, including weight and eggshell quality, which vary between the two lines.

INTRODUCTION

La sélection des lignées de type chair pour une augmentation de la croissance et du développement musculaire a eu un impact considérable sur la physiologie et le métabolisme des animaux en élevage (Emmerson et al. 1997, Havenstein et al. 2003). Alors que des gains considérables ont été obtenus sur les performances en élevage, des limites apparaissent en termes de qualité des produits mais aussi de reproduction, questionnant la durabilité de la sélection sur des critères de production de viande (Barbato 1999, Petracci et al. 2015). Chez les souches lourdes, on observe de moindres réserves énergétiques musculaires (Berri et al. 2001, Le Bihan-Duval et al. 2008). Ce caractère, héritable, détermine génétiquement le niveau du pH ultime (pHu) de la viande (et donc sa qualité), pour lequel deux lignées divergentes (pHu+ et pHu-) ont été sélectionnées (Alnahhas et al. 2014 et 2015; Beauclercq et al. 2016 et 2017). Initialement étudiées sous l'angle de la qualité de la viande, ces deux lignées constituent un matériel génétique précieux pour aborder le lien entre statut énergétique de l'animal, reproduction, qualité des œufs à couvrir et *in fine* des poussins.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

L'étude a porté sur des poules reproductrices issues de la 11^{ème} génération de sélection, pour laquelle un différentiel de 0,6 unité pH était observé pour le critère de sélection (pHu du filet mesuré chez le poulet en croissance dans le filet à 6 semaines). Ce dernier était de 5,55 dans la lignée pHu- et de 6,17 dans la lignée pHu+. Quatre-vingts femelles pour chacune des deux lignées ont été placées en bâtiment de reproduction dans un environnement contrôlé de 20 à 40 semaines. Deux inséminations par semaine ont été pratiquées avec 50 µl d'un pool de spermatozoïdes de coqs de lignée pHu+ pour les femelles pHu+ et de coqs pHu- pour les femelles pHu-.

1.2. Collecte et caractérisation des œufs

Les œufs ont été collectés et pesés entre 23 et 39 semaines et les œufs anormaux (doubles, mous ou cassés) ont été enregistrés pendant toute la période. Les œufs ont été pesés. Les caractéristiques des œufs (% de coquille, d'albumen et de vitellus) ont été déterminées sur 20 œufs de poules âgées de 34 à 35 semaines d'âge par lignée.

1.3. Suivi d'incubation et d'éclosion

Les œufs de poules âgées de 34 à 35 semaines d'âge ont été collectés sur deux semaines pour en avoir suffisamment. Plus de 400 œufs ont été mis en incubation pour chaque lignée. La fertilité réelle (nombre d'œufs fertiles sur le nombre d'œufs mis en incubation), la mortalité embryonnaire et le

nombre d'animaux éclos ont été enregistrés. Tous les œufs écartés aux mirages (E7 puis E14) ont été systématiquement ouverts pour évaluer la précocité ou pas de la mort de l'embryon. L'éclosabilité a été calculée par rapport au nombre d'œufs fertiles.

1.4. Qualité des poussins

Les poussins éclos ont été pesés et la qualité des animaux a été qualifiée selon la grille de scores de Tona et al. (2003), complétée par de nouveaux critères de qualité (posture, température et signe de déshydratation). Cette analyse a été réalisée sur 116 poussins éclos de chaque lignée. Le score total correspond à une note sur 120 points au total.

1.5. Analyses statistiques

Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes \pm SEM. Les données relatives à l'incubation et à l'éclosion (fertilité, mortalité embryonnaire, éclosion) ont été analysées au moyen de tests de Chi2. Les données de ponte, de caractéristiques des œufs et de score de qualité total des poussins ont été analysés à l'aide du logiciel Statview®, version 5 (SAS Institute, Cary, NC, USA) au moyen d'analyse de variance pour détecter les différences significatives entre les groupes.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Performances de ponte

Les données collectées entre 23 et 39 semaines d'âge montrent un démarrage de ponte plus tardif pour la lignée pHu+ (Figure 1). Au pic de ponte, à 30 semaines pour les deux lignées, la lignée pHu- présente un taux de ponte plus élevé (80,59% vs 72,36%) et cette différence reste notable sur toute la période étudiée. Des niveaux élevés d'œufs cassés ont été observés, en particulier au cours du premier tiers de la période considérée (Figure 2). A partir de 29 semaines, on observe une différence marquée du pourcentage d'œufs cassés, en défaveur de la lignée pHu+. Le pourcentage d'œufs à jaunes doubles est maximum à 26 semaines d'âge pour les pHu- (3,27 %) contre 27 semaines pour les pHu+ (1,69%). Quelle que soit la lignée, ce pourcentage devient inférieur à 1% à partir de 28 semaines d'âge.

2.2. Caractéristiques des œufs

La caractérisation des œufs a permis de mettre en évidence des différences entre lignées (Tableau 1). La sélection divergente sur le pHu de la viande a ainsi conduit à la production d'œufs plus lourds (+6,2%) pour la lignée pHu+. Le pourcentage de coquille des pHu+ tend à être inférieur à celui des pHu-, ce qui suggère une coquille plus fragile pour les pHu+. Ce résultat explique en partie le nombre plus important d'œufs cassés dans la lignée pHu+. La quantité de vitellus et d'albumen est supérieure pour les pHu+, mais la proportion albumen/poids d'œuf et vitellus/poids d'œuf ne diffère pas entre les deux lignées.

2.3. Fertilité et Mortalité embryonnaire

La sélection divergente a également impacté la fertilité des animaux (Tableau 2 ; $P < 0,04$). La lignée pHu+ présente en effet une fertilité de 3,3 % inférieure (davantage d'œufs clairs) à celle des pHu- pour un lot d'œufs issus de poules âgées de 34 à 35 semaines d'âge. Au cours de l'incubation, la mortalité embryonnaire présente deux pics principaux, le premier dans les quatre premiers jours de développement puis un second pic plus tardif entre les jours 18 et 22 de l'incubation. Globalement, elle ne diffère pas entre les deux lignées. Seul les profils de mortalité embryonnaire diffèrent avec plus de mortalités tardives chez les pHu-. L'éclosabilité ne diffère pas entre les pHu+ et pHu-

2.4. Qualité des poussins

Le poids des poussins à l'éclosion est significativement différent entre les deux lignées avec un poids de poussin supérieur chez les pHu+ (41,8g vs 38,7g, $P < 0,0001$). Cette différence de poids perdure après une semaine de démarrage (93,25g vs 89,27g, $P = 0,0005$). Un effet sexe est également noté ($P = 0,03$). La lignée pHu- présente un score global de qualité significativement supérieur à celui des pHu+ ($P = 0,007$, Figure 3). Au cours de la semaine de démarrage (J0 à J7), une mortalité plus importante a été notée dans la lignée pHu+ (14,1% des animaux mis en élevage vs 0,6% chez les pHu).

Il est intéressant de noter que les femelles représentent 10,2% de cette mortalité contre seulement 3,9 % de mâles. Des autopsies ont été réalisées et sont en cours d'analyse. Une caractérisation métabolique fine de ces animaux permettra de mieux comprendre ces différences de développement et de robustesse des animaux.

CONCLUSION

En conclusion, ces premiers résultats suggèrent une altération des performances de reproduction étudiées et des modifications des caractéristiques des œufs en relation avec la diminution des réserves énergétiques associée à la sélection pour une augmentation du pHu. Ces premières observations ouvrent la voie à de futures études de génétique et de nutrition pour évaluer l'apport du statut énergétique en termes d'amélioration des caractères de reproduction et de qualité du poussin dont la dégradation pénalise les filières de type chair. De façon originale, elles suggèrent également la possibilité d'identifier de nouveaux indicateurs ou biomarqueurs du statut énergétique à partir des mesures en lien avec la reproduction et la qualité de l'œuf.

Cette étude a été financée par le CAS DAR et le CIPC (projet 2018-2020 Chick'Tip) et a été réalisée dans le cadre de l'UMT Biologie Intégrative Recherche et Développement (BIRD).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alnahhas N., C. Berri, M. Boulay, E. Baéza, Y. Jégo, Y. Baumard, M. Chabault, Le Bihan-Duval E., 2014. J. Anim. Sci., (92), 3816-3824.
- Alnahhas N., Le Bihan-Duval E, Baéza E, Chabault M, Chartrin P, Bordeau T, Cailleau-Audouin E, Meteau K, Berri C., 2015. J Anim Sci., 93(9):4524-31.
- Barbato G.F., 1999. Poult Sci. 78(3):444-52.
- Beauclercq S., Nadal-Desbarats L, Hennequet-Antier C, Collin A, Tesseraud S, Bourin M, Le Bihan-Duval E, Berri C., 2016. J Proteome Res., 15(4):1168-78.
- Beauclercq S., Hennequet-Antier C, Praud C, Godet E, Collin A, Tesseraud S, Métayer-Coustard S, Bourin M, Moroldo M, Martins F, Lagarrigue S, Bihan-Duval EL, Berri C., 2017. Sci Rep., 7(1):6447.
- C. Berri N., Wacrenier N., Millet E., Le Bihan-Duval E, 2001. Poultry Science, 80 (7), 833-838
- Emmerson, D.A. 1997. Poult Sci., 76(8):1121-5.
- Havenstein, G.B., Ferket, P.R., Qureshi, M.A., 2003. Poult Sci., 82(10):1500-8.
- Le Bihan-Duval E., Debut M., Berri C., Sellier N., Santé-Lhoutellier V., Jégo Y., Beaumont C., 2008. BMC Genetics, 10 (53), 6 p.
- Petracci, M., Mudalal, A.L., Soglia, F. and Cavani, C., 2015. World's Poultry Science Journal, 71(2), 363-374.
- Tona K., Onagbesan O, De Ketelaere B, Decuyper E, Bruggeman V., 2003. Poult Sci., 82(12), 1974-9.

Tableau 1. Caractéristiques des œufs issus des lignées pHu+ et pHu-

Lignée	Poids des œufs (g)	% de coquille*	% d'albumen*	% de vitellus*
pHu+	63,2 ± 0,3	9 ± 0,1	52,9 ± 0,60	29 ± 0,8
pHu-	59,5 ± 0,3	9,5 ± 0,1	52,4 ± 0,4	29,8 ± 0,4
P Value	$P < 0,0001$	$P = 0,018$	NS	NS

* Les pourcentages de coquille, albumen et vitellus sont rapportés au poids de l'œuf.

Tableau 2. Performances de reproduction des lignées pHu+ et pHu- de 34 à 35 semaines d'âge

Lignée	Fertilité	Morts totaux (%)	Morts précoces (%)	Morts tardifs (%)	Eclosabilité (%)
pHu+	86,4	20,4	62,9	37,1	79,1
pHu-	89,7	23,9	50,5	49,5	76,1
P Value	P = 0,04	NS	NS	P = 0,05	NS

Figure 1. Courbe de ponte des lignées pHu+ et pHu-

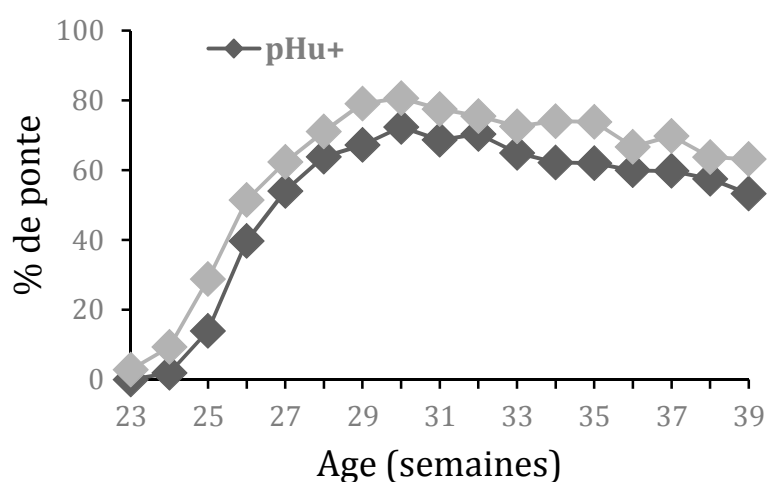


Figure 2. Pourcentage d'œufs cassés sur la période 23-39 semaines d'âge

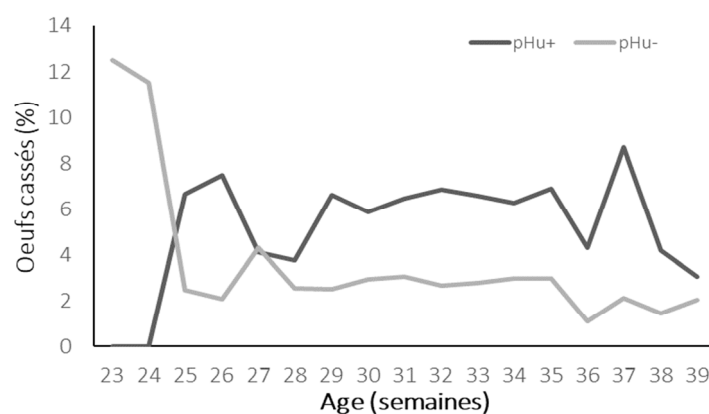
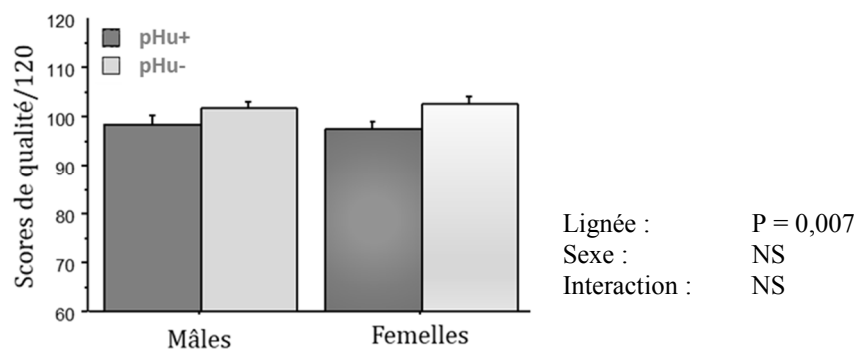


Figure 3. Scores de qualité des poussins à J0 (scores sur 120 points)



IMAGERIE MEDICALE, POUR UNE MESURE PRECISE ET NON INVASIVE CHEZ LE POULET DE CHAIR PARENTAL COBB500

**J. Grandhay^a, F. Lecompte^a, C. Staub^b, E. Venturi^b, I. Plotton^c, E. Cailleau-Audouin^d,
A. Barbe^a, P. Ganier^e, C. Ramé^a, S. Brière^f, J. Dupont^a et P. Froment^{a*}**

^a INRA UMR85 PRC, Nouzilly, 37380 Nouzilly, France – ^b INRA UEPAO, Nouzilly, 37380 Nouzilly, France – ^c Université Claude Bernard Lyon 1, 69100 Villeurbanne, France – ^d INRA UMR BOA, 37380 Nouzilly, France – ^e INRA, UEPEAT, Nouzilly, 37380 Nouzilly, France – ^f Hendrix Genetics Turkeys France SAS, La Bohardièrre, BP 1, St-Laurent de la Plaine, 49290 Mauges Sur Loire, France

*pascal.froment@inra.fr

Résumé

Nous avons développé des méthodes peu invasives pour suivre la composition corporelle d'une lignée parentale de poulets de chair (Cobb 500, mâles et femelles) de l'éclosion à l'âge adulte. Nous avons évalué la cinétique d'engraissement, la croissance et la qualité musculaire et osseuse, les paramètres de reproduction (volume des gonades) et des marqueurs du métabolisme des animaux en utilisant l'imagerie médicale (échographie, CT-scan) couplée à la détermination de la concentration du plasma en triglycérides et phospholipides. L'échographie a été réalisée sur des animaux vigiles de 4 à 32 semaines et l'utilisation du CT-scan chez les mêmes animaux anesthésiés a permis de confirmer et compléter ces mesures. Nous avons ainsi pu décrire la cinétique d'engraissement en fonction du sexe. À partir de la puberté (20 semaines d'âge), peu avant le début de la ponte, les femelles avaient 1,6 fois plus de tissu adipeux que les mâles ($P < 0,001$). Dans le groupe des femelles, l'augmentation du tissu adipeux était associée à des taux élevés de triglycérides plasmatiques à partir de 16 semaines (8 fois plus que chez les mâles au début de la ponte). La structure osseuse était également différente, puisque le rapport os/poids corporel était 30% plus faible chez les femelles que chez les mâles à l'âge adulte de 32 semaines ($P < 0,001$). La mesure du volume d'une même section des muscles Pectoralis major et minor a montré une croissance comparable entre les mâles et les femelles. Lors de la période de ponte, le nombre de follicules jaunes était associé au volume de tissu adipeux ovarien ($r = 0,80$). En conclusion, l'utilisation du CT-scan et de l'échographie a permis de suivre la composition corporelle d'une même cohorte de poulets de chair parentaux sans utiliser des méthodes invasives.

Abstract

Medical imaging for precise and non-invasive measure of body composition in Cobb500 parental broiler chicken

We developed non-invasive methods to track the body composition of a parental broiler line (Cobb500, male and female) from hatching to adulthood. We evaluated fattening kinetics, muscle and bone growth and quality, reproductive parameters (gonad volume) and markers of animal metabolism using medical imaging (ultrasound, CT-scan) and we determined the plasma concentration in triglycerides and phospholipids. Ultrasound was performed on live animals from 4 to 32 weeks of age and the use of CT-scan in the same anesthetized animals confirmed and completed these measurements. We were able to describe the fattening kinetic according to sex. From puberty (20 weeks of age), shortly before the onset of egg-laying, females had 1.6 times more fat than males ($P < 0.001$). In the female group, the increase in adipose tissue was associated with increased levels of plasma triglycerides from 16 weeks (8 times more than in males at the start of egg laying). The bone structure was also different. The bone / body weight ratio was 30% lower in females than males at 32 weeks of age ($P < 0.001$). Measurement of the volume of the same section of the Pectoralis major and minor muscles showed comparable growth between males and females. During the laying period, the number of yellow follicles was associated with the volume of ovarian adipose tissue ($r = 0.80$). In conclusion, the use of CT-scan and ultrasound system allowed to follow the body composition of the same cohort of parental chickens without using invasive methods.

INTRODUCTION

Au cours du dernier demi-siècle, la vitesse de croissance et le rendement musculaire des poulets de chair commerciaux a fortement augmenté grâce à la sélection génétique. Cette dernière, a abouti au fil du temps à la production d'animaux de plus en plus lourds qui développent des troubles de la reproduction et des lésions musculo-squelettiques (Richards et Proszkowiec-Weglarz, 2007). Afin d'éviter un excès d'engraissement, connu pour avoir un effet négatif sur la locomotion et la reproduction, différentes stratégies ont été mises en place, telles que la restriction alimentaire (Yu et al., 1992). En effet, une restriction alimentaire permet de récupérer une hiérarchie folliculaire, une production d'œuf de qualité et de retarder l'apparition de la puberté qui est devenue trop précoce (Pan et al., 2014). Cependant, cette pratique d'élevage, en plus de poser des questions éthiques, entraîne des comportements agressifs et un bien-être qui est fortement affecté. Afin de mieux connaître le profil de développement du poulet de chair parental, nous avons suivi leur composition corporelle à l'aide de la technique d'imagerie médicale et des indicateurs biochimiques par spectrométrie de masse.

Ainsi, la présente étude a été menée afin d'évaluer le développement de 4 tissus (muscle, graisse, os, gonades) chez le même animal de la naissance à l'âge adulte (32 semaines). Nous avons étudié une souche parentale de poulets de chair (Cobb500) dans les deux sexes. Les données obtenues par l'échographie et le scanner à rayons X ont été associées à des paramètres métaboliques afin d'explorer les indicateurs potentiels de la composition corporelle.

MATERIELS ET METHODES

Le protocole a été validé par le comité d'éthique (CEEA VdL) sous le numéro : APAFIS#4749-2DI6D3311 1352712

1. Les animaux

40 poussins reproducteurs (20 mâles et 20 femelles Cobb 500, Hendrix Genetics) ont été répartis au sol dans des groupes homogènes de 10 dans 4 parquets de 3 m² et élevés dans l'unité expérimentale du centre d'expérimentation avicole de Tours (UEPEAT). A leur arrivée, les poussins ont bénéficié de 24 h de lumière suivi d'une diminution progressive de l'exposition à la lumière jusqu'à atteindre 8 heures, puis l'exposition a été augmentée jusqu'à 15 h de lumière pendant la période de ponte. Du premier jour à la 3^{ème} semaine, l'ensemble des poussins ont reçu un aliment ad libitum. À partir de la 3^{ème} semaine, les poussins ont été rationnés selon les

recommandations du fournisseur. Les animaux ont été pesés toutes les 4 semaines.

2. Mesures en imagerie médicale

Les analyses d'imagerie médicale ont été réalisées sur l'ensemble du corps du poulet toutes les 4 semaines de 4 à 32 semaines d'âge.

Les acquisitions ont été réalisées avec un CT biomédical (Siemens As Definition) avec les paramètres suivants : balayage de 100 kV et 120 mA avec une épaisseur de 0,6 mm (500 images) et un pitch de 0,45. Un filtre de reconstruction Safire I26 a été utilisé pour mieux caractériser les tissus.

Les mesures par échographie ont été réalisées avec un MyLab 30 Gold Vet ultrasound scanner (Hospimed France, Saint-Crépin-Ibouville, France) équipé de deux sondes linéaires fonctionnant en basses fréquences pour l'étude de l'engraissement (5MHz) et en haute fréquence pour l'étude des muscles (15MHz).

3. Analyses biochimiques du plasma

Le plasma a été récupéré après centrifugation (3 000 g pendant 10 minutes à 4 ° C), puis stocké à -20 ° C jusqu'à son utilisation. Les concentrations plasmatiques en triglycérides et phospholipides ont été obtenues par dosage enzymatique (kit Biolabo Triglyceride, Kit Biolabo Phospholipides, Maizy, France). Les mesures ont été effectuées selon le protocole du fabricant.

4. Analyses statistiques

Les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm SEM, Les valeurs ont été analysées avec une ANOVA à l'aide du logiciel Graphpad et jugées significatives lorsque *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le but de la présente étude est de suivre la composition corporelle des mêmes animaux de l'âge de 4 à 32 semaines en utilisant des méthodes non invasives comme l'imagerie médicale (scanner à rayons X et échographe).

1. Développement musculaire

Le poids corporel de l'ensemble des animaux est mesuré toutes les 4 semaines de l'âge de 4 semaines à 32 semaines (Figure 1A), suivi d'une analyse au CT-scan et à l'échographe de 10 animaux de chaque sexe de l'âge de 4 semaines à 32 semaines. Les mâles apparaissent naturellement plus lourds que les femelles (P < 0.001), cependant au niveau de la croissance du muscle pectoralis aucune différence statistique ne ressort entre les sexes (Figure 1B). La

sélection génétique ayant porté sur la croissance musculaire des animaux, il est normal de ne pas voir de différence entre les sexes.

2. Croissance osseuse

Le développement osseux est évalué en analysant l'évolution du volume du squelette et plus particulièrement le volume de l'os cortical (os dur) (Figure 2A). Dès l'âge de 8 semaines, les mâles ont un squelette plus important que les femelles ($P < 0.05$). Cette différence s'accroît avec l'âge, par exemple à 32 semaines, les femelles ont un squelette 1,5 fois moins important que les mâles ($P < 0.001$). Cette différence ne vient pas de la croissance osseuse car il n'y a pas de différence entre les sexes lorsqu'on rapporte la longueur du tibia au poids (Figure 2B). Cependant, une différence de la qualité osseuse (volume os cortical du tibia/longueur du tibia) est ressortie avec des femelles ayant une qualité osseuse amoindrie ($P < 0.001$) (Figure 2C). Cette différence de la qualité osseuse vient des hormones sexuelles, la testostérone favorisant la formation de l'os cortical (ce qui a été mesuré) chez les mâles (Notelovitz, 2002), alors que chez les femelles, les œstrogènes vont favoriser la formation de l'os médullaire (os mou) (Beck et Hansen, 2004).

3. L'engraissement

Nous avons déterminé le volume de tissu adipeux dans les tissus abdominaux mais surtout dans tout le corps. Distinctement, à l'âge de 20 semaines, lorsque l'activité des ovaires augmente et peu de temps avant le début de la ponte (à 23 semaines), le volume du tissu adipeux est fortement accru chez la femelle (Figure 3A, $P < 0.001$). À 32 semaines, les mâles sont à 64% du volume de tissu adipeux des femelles. À l'âge de 20 semaines, nous observons une augmentation des niveaux de triglycérides et de phospholipides chez les femelles mais pas chez les mâles. Pour les triglycérides, la concentration finale des femelles est huit fois supérieure à celle des mâles (Figure 3B) ($P < 0.001$). Cette augmentation du tissu adipeux uniquement chez la femelle est due à sa fonction de reproduction : les femelles réalisent un stockage de lipides qui sont nécessaires à la production d'œufs (ex : synthèse de lipides pour le jaune).

La mesure de l'épaisseur du tissu adipeux par échographie est fortement corrélée au dépôt de graisse entière estimé par tomographie par émission de positons chez les femelles ($P < 0.001$, $r = 0.84$). Chez le mâle, la

corrélation est moindre ($P < 0.001$, $r = 0.53$), en raison de leur masse graisseuse plus faible. Ces résultats montrent que l'utilisation d'un échographe pour suivre l'engraissement était aussi fiable qu'un CT-scan.

4. Développement des gonades

Le CT-scan nous a aussi permis de suivre quelques paramètres de reproduction chez les animaux.

Chez le mâle, nous avons analysé le volume testiculaire au CT-scan. Ce n'est qu'à partir de l'âge de 24 semaines que nous avons pu observer les testicules. Avant cet âge, les animaux n'étant pas pubères, les testicules sont trop petits pour être distingués des autres organes. C'est donc à 24 semaines que nous avons un pic de développement testiculaire suivi d'une diminution jusqu'à 32 semaines. Cela a déjà été observé dans la littérature : le volume diminue après un pic afin de se stabiliser (Vizcarra *et al.*, 2010).

Chez la femelle, l'activité de l'ovaire est observée par le biais de la concentration d'œstrogène dans le plasma, qui a augmenté à l'âge de 20 semaines, avec un pic autour de 340 pg / ml chez les femelles âgées de 24 à 28 semaines. Les premiers œufs sont apparus à 23 semaines et les poules présentent 5 à 6 follicules jaunes à partir de 24 semaines (observés au CT-scan). Le nombre de follicules est corrélé avec le volume de tissu adipeux ovarien ($r = 0.80$, $P < 0.001$) et avec le volume de tissu adipeux ($r = 0.63$, $P < 0.01$).

CONCLUSION

Notre étude a permis de suivre différents biomarqueurs (anatomiques ou biochimiques) de développement tissulaire (muscle, graisse, os, gonades) sur les mêmes animaux avec des outils non invasifs. Elle a permis aussi d'explorer des indicateurs potentiels de la composition corporelle facilement mesurables par échographie ou par analyse sanguine : cela aidera à adapter le régime alimentaire à l'évolution de la composition corporelle afin d'optimiser les performances de ponte et de reproduction.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES

Beck, M. M., and K. K. Hansen. 2004. Poult. Sci. 83:200–206.

Notelovitz, M. 2002. Fertil. Steril. 77 Suppl 4:S34-41.

Pan, Y.-E., Z.-C. Liu, C.-J. Chang, Y.-F. Huang, C.-Y. Lai, R. L. Walzem, and S.-E. Chen. 2014. Anim. Reprod. Sci. 151:229–236.

Richards, M. P., and M. Proszkowiec-Weglarz. 2007. Poult. Sci. 86:1478–1490.

Vizcarra, J. A., J. D. Kirby, and D. L. Kreider. 2010. Poult. Sci. 89:328–334.

Yu, M. W., F. E. Robinson, and A. R. Robblee. 1992. Poult. Sci. 71:1739–1749.

Figure 1 : Développement musculaire. (A) Courbes du poids corporel. (B) Evolution du volume du muscle pectoralis (n = 10)

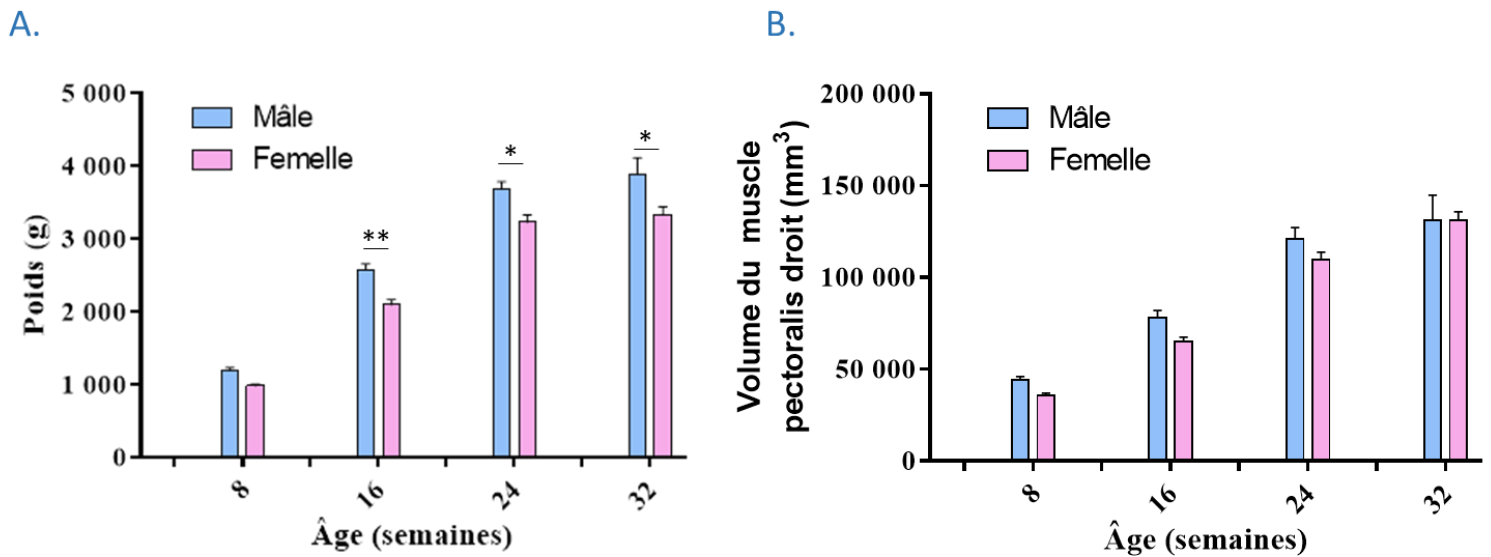
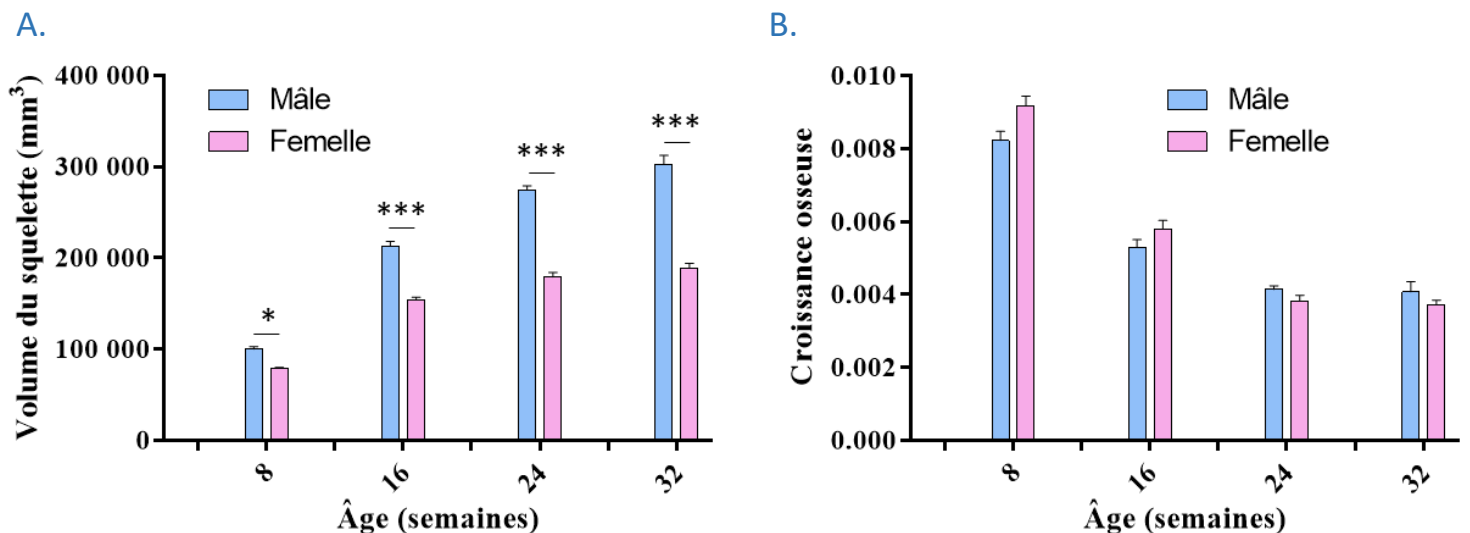
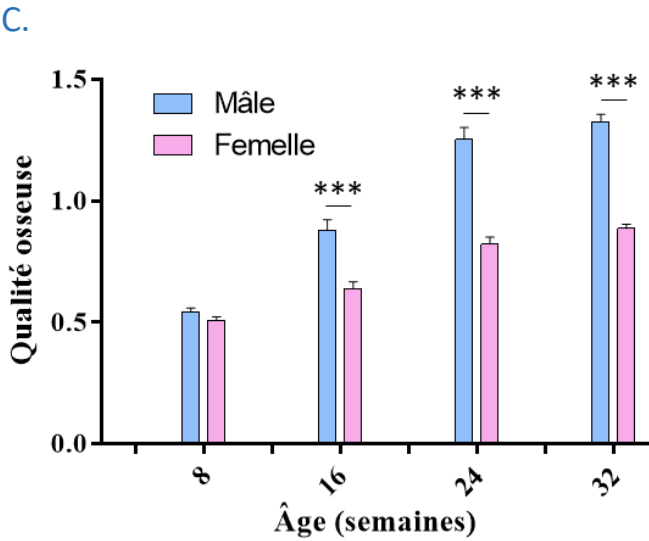
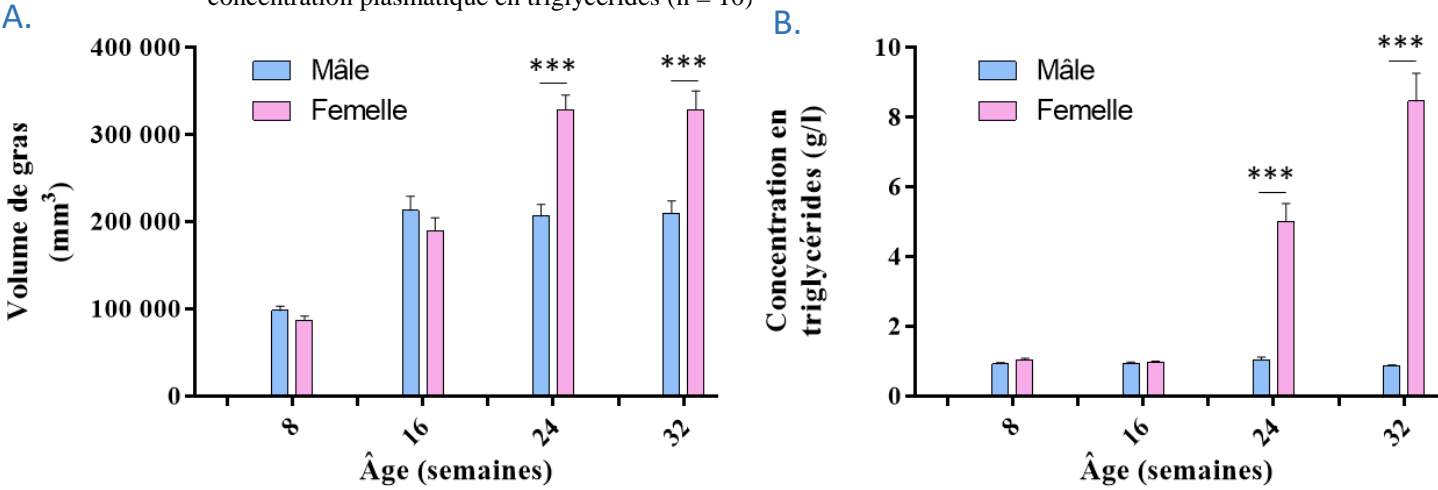


Figure 2 : Croissance osseuse. (A) Evolution du volume du squelette entier. (B) Croissance osseuse (Longueur du tibia/poids corporel). (C) Qualité osseuse (Longueur du tibia/Volume du tibia) (n = 10).





• **Figure 3 :** L’engraissement. (A) Evolution du volume de la masse adipeuse. (B) Cinétique de la concentration plasmatique en triglycérides (n = 10)



SESSION

GENETIQUE - REPRODUCTION

Synthèse

GENETIQUE, COMPORTEMENT ET BIEN-ETRE : AVANCEES ET PERSPECTIVES POUR LA SELECTION AVICOLE

Mignon-Grasteau Sandrine¹, Calandreau Ludovic², Guettier Elodie¹, Warin Laura³

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

²*PRC, CNRS, IFCE, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France*

³*ITAVI, UMR BOA, BPI, F-37380 Nouzilly, France*

sandrine.grasteau@inra.fr

RÉSUMÉ

Les recherches sur la génétique des comportements en aviculture ont longtemps poursuivi un double objectif. Il fallait tout d'abord adapter l'animal à son environnement, au moment où les conditions d'élevage devenaient standardisées et optimisées afin de maximiser la production. Les travaux dans ce cadre ont notamment porté sur la génétique des comportements sociaux et de peur, afin que les animaux soient capables de vivre en groupes de grande taille et pour éviter les comportements de picage, en particulier chez les poules pondeuses. Un second objectif était de contrebalancer les effets négatifs sur le bien-être de la concentration des efforts de sélection sur quelques critères de production. La croissance rapide et l'augmentation du rendement en filet des poulets de chair ont été tout particulièrement associées à des troubles tels que les boiteries ou des problèmes cardio-vasculaires. Cet objectif est toujours d'actualité avec la question de la douleur chez animaux atteints de myopathies (white striping, wooden breast).

Aujourd'hui, les systèmes d'élevage se diversifient à la fois pour faire face au changement du contexte de production mais également pour mieux intégrer les attentes de la société vis-à-vis de l'élevage. Plutôt que d'adapter l'animal à son environnement, il s'agit donc désormais d'améliorer le dialogue entre l'animal et son environnement et de rééquilibrer les rapports entre production et bien-être animal, dans un contexte de production fluctuant et moins optimisé qu'auparavant. La tolérance à la chaleur devient par exemple un critère important face au changement climatique, y compris dans les pays tempérés. En outre, l'évolution de la production vers des systèmes de plus en plus ouverts vers l'extérieur va conduire à étudier la capacité d'adaptation des oiseaux à des facteurs tels que la lumière naturelle ou leur potentiel à utiliser les parcours et les enrichissements de milieu. Emergent enfin aujourd'hui des travaux visant à prendre en compte, dans la compréhension du bien-être animal, l'ensemble de l'histoire de vie des animaux en déterminant différents types de personnalité chez les animaux.

ABSTRACT

Genetics, behaviour and welfare: advances and perspectives for selection

During a long time, researches on behavioural genetics in poultry have been focused on two objectives. A first goal was to adapt the animal to its production environment while rearing conditions became standardised and optimised. Within this frame, research studies were focused on genetics of social behaviour and fear, so that animals are able to live in large groups, especially in laying hens, to avoid feather pecking behaviour. A second goal was to counterbalance the negative effects on welfare of a selection focused on a few number of production traits. Rapid growth and increased breast meat yield in broilers have for example been associated with troubles as lameness or cardio-vascular troubles. This second goal is still topical with the question of pain in animals affected by myopathies as white striping and wooden breast.

Nowadays, production systems are diversifying to cope with changes in production context and to take into account social expectations regarding animal production. The question is thus not anymore to adapt the animal to its environment, but to improve the dialog between the animal and its environment and to restore the balance between production and welfare, in a more fluctuating and less optimal production environment than before. Tolerance to heat stress becomes for example an important criterion to be able to face global warming, even in temperate countries. Moreover, the evolution of production towards more open systems with access to open-air will increase the need of study on the potential of animals to use open-air and environmental enrichments. Finally, researchers also start to take into account the whole life of animals and their personality for a better assessment of their welfare.

INTRODUCTION

La relation homme-animal a fortement évolué en lien avec les grandes modifications de l'élevage au XX^{ème} siècle (ANSES 2018). L'élevage a en effet connu un fort développement après-guerre qui s'est traduit par une amélioration globale du statut sanitaire, l'intensification de la production et la mise en place de l'amélioration génétique des animaux principalement sur des critères de productivité. L'optimisation des conditions d'élevage à la fois à l'étage de la sélection et à l'étage de la production ont contribué à l'efficacité de la sélection, en permettant aux animaux d'exprimer leur potentiel génétique pour des caractères tels que la vitesse de croissance ou la production d'œufs. La sélection des meilleurs candidats à la reproduction a donc été particulièrement efficace et a conduit à des évolutions spectaculaires des performances des animaux (Preisinger et Flock 2000 ; Zuidhof et al. 2014). Cependant, du fait de corrélations parfois défavorables entre caractères de production et de bien-être, ces évolutions ont pu entraîner une dégradation du bien-être des animaux.

La capacité des animaux à souffrir a été le principal argument mis en avant pour justifier les devoirs des hommes envers les animaux. La réflexion philosophique sur le bien-être animal s'est donc principalement centrée, dans ses débuts, sur la limitation des souffrances. Les recherches ont donc été orientées dans un premier temps sur la compréhension des causes de souffrance et le fait de contrebalancer la dégradation du bien-être consécutive à la sélection.

Plus récemment, les travaux scientifiques ont mis en évidence chez les animaux des capacités cognitives complexes et la possibilité de ressentir des émotions (Marino, 2017). Ces compétences des animaux en termes de sensibilité et de conscience confirment le bien-fondé de ce souci moral et en accroissent la portée en l'étendant du volet négatif (minimisation des douleurs/ souffrances) à un volet positif (maximisation des plaisirs).

L'objectif de cette synthèse est donc de dresser un panorama des connaissances sur les relations entre génétique et comportement des volailles et de les resituer dans le contexte actuel de production, afin de dégager des perspectives d'amélioration du bien-être animal dans les conditions d'élevage actuelles et futures.

1. LIENS ENTRE GENETIQUE ET BIEN-ETRE ANIMAL

L'objectif des recherches sur les liens entre la sélection génétique et le bien-être animal a longtemps été focalisé sur les déterminants génétiques de comportements importants pour l'adaptation de l'animal à des conditions de vie optimisées, standardisées et intensives. De ce fait, les

comportements sociaux (e.g., agressivité entre congénères, relation avec l'homme) ou de peur (e.g. réaction face à des perturbations environnementales) ont été étudiés en priorité, car ils étaient essentiels pour que les animaux s'adaptent à la vie en grands groupes.

Du fait de l'apparition de perturbations de comportement et de bien-être dans les souches fortement sélectionnées sur les critères de production, le second objectif des recherches en génétique a consisté à chercher des moyens de compenser ces conséquences de la sélection.

1.1. Un animal bien adapté à son environnement d'élevage

a) Les comportements sociaux et de peur des oiseaux domestiques

La domestication chez les oiseaux, en particulier chez les poules et poulets, au contraire des effets souvent observés chez les mammifères ne semble pas avoir été associée à une augmentation de la sociabilité (Nicol 2015). En effet, si les poulets ou poules commerciaux présentent bien des différences de comportements sociaux avec la poule de Jungle (Schultz et al. 2001), ces différences vont dans le sens d'une plus grande agressivité chez les poules domestiques que chez leur ancêtre sauvage (Vaïsanen et al. 2005), ce qui proviendrait du fait que ces oiseaux ont été initialement domestiqués pour organiser des combats de coqs. De façon conjointe, la sélection sur des traits de production et l'intensification des conditions d'élevage semblent également avoir favorisé l'apparition de comportements agressifs, ou l'émergence d'interactions sociales néfastes au bien être des individus (Mignon-Grasteau and Faure 2002). Ainsi, la sélection des poules pondeuses sur les nombre d'œufs et la précocité de ponte a été associée à une augmentation du comportement de picage (Vaïsanen et al. 2005 ; Su et al. 2006). Bien qu'étant un comportement exploratoire redirigé et non un comportement agressif, le picage peut produire, dans sa forme la plus sévère, des effets très délétères en élevage. Su et al. (2006) ont par exemple ainsi montré qu'après 5 générations de sélection divergente sur le picage chez la poule pondeuse, la lignée fortement piqueuse présentait une qualité d'emplumement dégradée (scores de 11.6/20.0 vs. 16.9/20.0 à 29 semaines) et une ponte plus faible (65% vs. 73% à 40 semaines) par rapport à la souche faiblement piqueuse. Outre la douleur liée à l'arrachage des plumes, la présence de zones déplumées tend à augmenter les risques de cannibalisme et la mortalité. Les conséquences de la sélection sur des traits de production sur les comportements sociaux des oiseaux domestiques ont suscité de nombreuses recherches afin de comprendre les bases biologiques, génétiques

des comportements sociaux. Des expériences de sélection sur un comportement de picage atténué ou sur la motivation à rejoindre les congénères des individus ont été tentées avec succès, mais elles reposent sur des mesures très chronophages (Launay et al. 1991, Kjaer et al. 2001). Des analyses génétiques du comportement ont complété ces expériences de sélection pour démontrer l'existence d'un déterminisme génétique des comportements sociaux. Chez la poule, vingt-six régions du génome ont ainsi été associées au comportement de picage. Chez la caille, Recoquillay et al. (2013) ont également détecté des QTL reliés à la motivation sociale et ont montré que celle-ci était reliée à l'âge d'entrée en ponte. Des études récentes ont enfin permis d'identifier des gènes candidats de ces comportements, comme le gène TTRAP pour la socialité chez la poule (Johnsson et al. 2018) ou le gène PMEL17 pour le picage (Keeling et al. 2004). TTRAP est une phosphodiesterase impliquée dans la réparation de l'ADN et dont l'effet sur le comportement pourrait passer par sa capacité à protéger les neurones de la dégradation. PMEL17 joue un rôle central dans la synthèse des mélanocytes et affecte donc la couleur du plumage des animaux, elle-même liée à l'agressivité des animaux (Karlsson et al., 2011).

Un autre effet majeur de la domestication a été une forte diminution des comportements de peur, notamment vis-à-vis de l'homme (Jensen 2014). Ainsi, des études ont montré que la poule pondeuse exprimait moins de comportements de peur ou de comportements anti-prédateurs que la poule de Jungle (Schütz et al. 2001 ; Campler et al. 2009). Les comportements de peur n'ont cependant pas totalement disparu chez les oiseaux domestiques et il est largement admis que lorsque ceux-ci sont trop fréquents ou trop intenses, ils peuvent exercer un impact négatif sur le bien-être et les capacités productives des animaux en élevage. Chez la poule, un niveau de peur élevé évalué par l'intensité des réactions comportementales (agitation, cri, fuite, immobilité, ...) des animaux dans différentes situations de stress (environnement nouveau, isolement social ...) est ainsi négativement corrélé avec la ponte, la qualité de l'œuf ou la croissance (Jones 1996 ; Jones et al. 1997 ; Schütz et al. 2004). Les travaux menés sur des oiseaux domestiques ont révélé que certains comportements de peur ont une héritabilité moyenne, voire forte. Cela a été confirmé par le succès de plusieurs expériences de sélection sur différents comportements de peur comme la durée d'immobilité tonique chez la caille japonaise (Mills et Faure 1991) ou la réaction à la nouveauté chez la poule (Uitdehaag et al. 2008 ; Rozempolska-Rucinska et al. 2017). Près de 20 QTLs sont référencés dans QTL database sur différents comportements de peur chez la poule.

Il est important de souligner que la plupart des travaux présentés ci-dessus ont nécessité des mesures de comportement qui sont bien souvent chronophages et qui demandent des conditions de test standardisées, ce qui est bien souvent difficilement réalisable en condition d'élevage sur de très grands groupes d'individus. De plus, obtenir une vision complète du comportement de l'animal nécessite de réaliser différents tests, chacun lié à un comportement particulier.

Enfin, un grand nombre de ces études a reposé sur l'étude du comportement d'un individu, celui qui pique par exemple, alors que les volailles en élevage vivent en grand groupe et que les interactions sociales sont au cœur d'un dialogue entre des individus émetteurs et d'autres récepteurs. Le cannibalisme chez la poule pondeuse dépend ainsi à la fois du génotype de l'émetteur (celui qui pique) et de celui qui se fait piquer (Ellen et al. 2008). Afin de s'attaquer à ce type de problème inhérent aux interactions sociales, Muir a initié un nouveau type de stratégie de sélection basée sur la performance d'un groupe d'individus plutôt que sur celle d'un seul individu (Muir 1996). Les pères étaient sélectionnés sur la base de la mortalité et du nombre d'œufs pondus par leurs filles élevées en cages collectives de demi-sœurs. Ces travaux ont montré qu'une telle sélection permettait d'obtenir une amélioration de la ponte comparable à celle obtenue en sélectionnant les animaux en cage individuelle, tout en limitant la peur, l'agressivité et le comportement de picage (Bolhuis et al. 2009). Ainsi, une stratégie de sélection basée sur la performance d'un groupe ou tenant compte des effets sociaux offre une piste de recherche future particulièrement prometteuse (Ellen et al. 2014). Des modèles génétiques ont été développés pour permettre l'évaluation génétique des animaux en intégrant ces effets sociaux (Bijma 2014).

b) Adaptation au plein-air

Il a été démontré chez la poule pondeuse que l'utilisation du parcours différait en fonction de la souche (Kjaer et al. 1998). Ces différences sont en particulier liées à la vitesse de croissance, les poulets de chair à croissance rapide (GMQ > 40g/j) se déplaçant moins (5% vs 11% du temps) et passant davantage de temps au repos (55% vs 20-35% du temps) que les souches à croissance lente (GMQ < 25g/j), élevées en plein-air (Bokkers et Koene 2003 ; Castellini et al. 2016). Lorsque le niveau d'activité locomotrice augmente, l'utilisation du parcours est meilleure chez les volailles (Kjaer 2017). Castellini et al. (2016) ont également montré que les poulets à croissance lente passent en moyenne 60% de leur temps sur parcours contre 20% pour les poulets à croissance rapide. De plus, lorsqu'ils sont à l'extérieur, ces derniers restent plus proche des trappes que les poulets à croissance lente et exploitent donc

une proportion plus réduite du parcours (Nielsen et al. 2003 ; Castellini et al. 2016).

Certains travaux montrent de plus qu'au sein d'une même souche de poulets, il existe une très grande variabilité individuelle dans la capacité des animaux à utiliser les parcours et identifient des poulets sédentaires qui sortent peu et des poulets explorateurs qui utilisent plus fréquemment et de façon plus complète les parcours (Germain et al. 2011). L'existence d'une base génétique à la propension à utiliser les parcours a été confirmée par des études génétiques du comportement exploratoire (Chapuis et al. 2011 ; Germain et al. 2011). Chez le poulet de chair, l'héritabilité estimée est de 0,14 pour la propension à sortir et de 0,13 pour la durée des sorties (Chapuis et al. 2011). Chez la poule, l'héritabilité estimée est comprise entre 0,30 et 0,49 pour la fréquence des sorties vers un accès extérieur couvert et est comprise entre 0,21 et 0,32 pour la durée. Il semble donc possible de travailler via la sélection génétique sur une meilleure exploitation des parcours par les animaux (Icken et al. 2008). Les corrélations génétiques entre l'exploitation de cet accès extérieur et les performances des poules sont cependant défavorables (Icken et al. 2008). Il est donc important de trouver un juste équilibre entre performances de croissance, d'efficacité alimentaire ou de ponte et adaptation à l'environnement d'élevage.

1.2. Contrebalancer les effets négatifs sur le bien-être animal de la sélection sur des critères de performances

a) Troubles locomoteurs

Depuis les années 1950, la sélection a été très intense et a permis des progrès spectaculaires en portant l'essentiel de l'effort de sélection sur quelques critères de production (vitesse de croissance, développement du filet, engraissement et efficacité alimentaire des volailles de chair, ponte et efficacité alimentaire des poules pondeuses). L'EFSA (European Food Safety Authority) en 2010 indiquait que la sélection avait engendré de nombreuses modifications aux niveaux métaboliques et comportementaux de ces animaux, notamment les troubles locomoteurs ou les ascites.

Les problèmes locomoteurs des poulets de chair sont selon les cas liés à la croissance rapide et/ou au fort développement du filet et ont atteint des prévalences de 15 à 30% selon les cas (Duggan et al. 2016). Ainsi, la croissance rapide a été de pair avec l'apparition de la dyschondroplasie tibiale ou de déformations de type valgus-varus. Ces troubles ayant une héritabilité moyenne à élevée, ils ont pu être introduits dans les schémas de sélection afin d'en diminuer la fréquence (Arnould et al. 2011 ; Duggan et al. 2016).

Les poulets lourds et à fort développement de filet ont également une qualité de marche altérée, notamment du fait du déplacement vers l'avant de leur centre de

gravité (Nielsen et al. 2003 ; Duggan et al. 2016). Chez le canard et le poulet de 7 semaines par exemple, ces auteurs ont constaté que les animaux lourds marchaient 1.3 à 1.4 fois moins vite et faisaient des pas 4 à 9 fois plus courts que les animaux légers. L'évaluation de la qualité de la marche est cependant plus complexe car les outils permettant une évaluation reproductible sont encore très coûteux. L'héritabilité de la qualité de la marche est donc relativement faible et les corrélations avec le poids ou le rendement en filet très variables d'une lignée à l'autre, ce qui complique son utilisation comme critère de sélection (Duggan et al. 2017). Enfin, la plus grande inactivité des poulets à croissance rapide les conduit à un contact plus important avec la litière, ce qui entraîne plus fréquemment des dermatites de contact.

b) Troubles métaboliques et cardio-vasculaires

La sélection sur les performances de croissance s'est également accompagnée de l'apparition de troubles métaboliques qui affectent le bien-être animal tels que les ascites, qui proviennent d'un déséquilibre entre les organes sources d'oxygène (cœurs, poumons) et les organes consommateurs (muscles pectoraux, Collins et al. 2014). Ce caractère héritable a pu être contre-sélectionné et de récents travaux suggèrent qu'il pourrait dépendre de gènes candidats impliqués dans la myogenèse (Lubritz et al. 1995 ; Tarrant et al. 2017). Plus récemment, la sélection de souches lourdes et à fort pourcentage de filet s'est accompagnée de l'apparition de myopathies dégénératives telles que le « white striping » et le « wooden breast » dont on peut supposer qu'elles génèrent de la douleur chez les animaux atteints (Berri 2015). Alnahhas et al. (2016) ont montré que le white striping était fortement héritable et très corrélé au pourcentage de filet.

2. REPOSITIONNEMENT DES QUESTIONS DANS LE CONTEXTE ACTUEL

L'élevage est aujourd'hui au cœur d'une controverse qui met en question sa légitimité, le statut de l'animal dans notre société, et plus globalement notre rapport à la nature. L'utilisation d'approches participatives, par exemple au travers d'enquêtes comme dans le projet CASDAR ACCEPT ont permis d'identifier la perception par différents acteurs de la société de l'activité d'élevage (Delanoue et al. 2018). Les résultats montrent que, si l'environnement est longtemps apparu comme la préoccupation centrale de nos concitoyens, les questions de bien-être animal, et plus globalement d'éthique animale, sont aujourd'hui au cœur des débats.

Les systèmes d'élevage se diversifient pour mieux s'adapter à ces demandes. Il ne s'agit donc plus comme précédemment d'adapter l'animal à un

environnement donné, mais d'améliorer le dialogue entre l'animal et son environnement et de rééquilibrer les rapports entre capacité productive et bien-être animal afin de permettre une production en quantité et en qualité suffisantes, dans le respect du bien-être animal, dans des conditions de production plus fluctuantes, moins standardisées et moins optimisées qu'auparavant. La grande diversité des génotypes existants et la sélection pour ces objectifs dans ces nouveaux systèmes d'élevage sont des leviers à mettre en œuvre pour réduire le conflit entre bien-être et productivité (Dawkins et Layton 2012).

2.1. Adaptation au changement global

Le changement global va affecter la production des volailles principalement au travers du réchauffement climatique et de la compétition entre homme et animal pour l'accès aux ressources. Il sera nécessaire pour maintenir le bien-être d'avoir des animaux qui soient capables de s'adapter à des conditions alimentaires plus difficiles et plus hétérogènes. S'il a été montré que pour les génotypes à croissance modérée ou lente, la sélection pouvait être un outil efficace dans ce but, les marges de manœuvre restent à évaluer pour les animaux à croissance plus rapide.

Les animaux devront être également plus tolérants à la chaleur pour faire face à une température moyenne plus élevée, mais également à des pics de chaleur plus fréquents. Or, les génotypes à croissance rapide sont particulièrement sensibles à la chaleur, puisqu'ils produisent beaucoup de chaleur mais ont plus de mal à l'évacuer, en particulier quand la densité d'élevage est élevée (Arnould et al. 2011). Certains gènes réduisant l'emplumement comme les gènes cou nu ou frisé permettent de maintenir les performances de croissance et de reproduction des animaux exposés à la chaleur (Lin et al. 2006 ; Sharifi et al. 2010).

Sélectionner directement la tolérance à la chaleur est en revanche plus complexe car la mesure de la température rectale de l'animal s'avère peu répétable et peu pratique à utiliser pour la sélection. En revanche, Loyau et al. (2016) ont montré que la capacité des animaux à dissiper la chaleur, estimée par thermographie au niveau des pattes pouvait être suffisamment répétable et héritable pour être utilisée en sélection. La sélection génomique pourra également favoriser l'adaptation à la chaleur des animaux, des analyses récentes ayant identifié des zones du génome liées à l'oxygénation du sang pendant le stress thermique chez la poule pondeuse (van Goor et al. 2016). Enfin, le développement de biomarqueurs est une autre piste à explorer. Dans une étude du métabolome, Wang et al. (2018) ont ainsi montré une différence dans l'équilibre acido-basique du sang pendant un stress thermique entre une souche adaptée à la chaleur et une souche commerciale.

2.2. Vers des systèmes plus ouverts vers l'extérieur et la recherche de comportements positifs

Dans le cadre du projet ACCEPT, il a été mis en évidence que l'attente principale de beaucoup de citoyens-consommateurs non issus du milieu agricole concerne l'accès au plein air (Dockès et al. 2017).

Cela implique d'orienter les recherches vers des systèmes de production plus ouverts, qui permettent aux animaux d'exprimer des comportements positifs (par exemple, l'exploration de l'environnement, le toilettage...). Plusieurs stratégies sont possibles et certains de nos voisins européens se sont déjà orientés vers la voie de l'amélioration du bien-être animal en avançant politiquement (tables rondes, lobbying), économiquement et sur les pratiques de commercialisation (création de labels bien-être officiels et privés notamment).

Dans plusieurs pays d'Europe du Nord, des cahiers des charges intègrent déjà certaines des attentes sociétales pour l'élevage de poulet de chair avec par exemple des densités plus faibles ou l'apport de matériaux d'enrichissement et de lumière naturelle.

L'éclairage grâce à la lumière du jour peut paraître une solution idéale pour régler les problèmes d'éclairage des bâtiments. Cependant, dans la plupart des systèmes, un complément par éclairage artificiel est essentiel pour maintenir la production (Prescott et al. 2003). Un des points clés concerne également la génétique puisque l'accent est mis sur le choix de souches à croissance plus lente pour pallier les problèmes cités précédemment, et également pour que celles-ci soient capables d'évoluer correctement dans un milieu plus riche et stimulant que celui proposé jusqu'à présent. Certains cahiers des charges imposent également l'accès à un espace extérieur via des jardins d'hiver ou des parcours plus ou moins vastes (par exemple avec le label bien-être « Beter Leven » aux Pays-Bas). Ces démarches rencontrent un franc succès puisqu'en Allemagne, Initiative Tierwohl, qui permet aux éleveurs de mettre en œuvre des mesures pour le bien-être, comptabilise à ce jour 69% des poulets produits tandis que le label Kip van morgen qui repose fortement sur des critères de bien-être (plus d'espace pour les animaux, accès à la lumière naturelle, enrichissements de milieu) a presque totalement remplacé le poulet standard dans les rayons frais des supermarchés aux Pays-Bas.

Il en va de même avec la filière pondeuse pour laquelle les modes d'élevage ont considérablement évolué ces dernières années. La part des cages a baissé significativement à l'échelle de l'UE entre 2003 et 2017 (80 % et 57% des poules en cage, respectivement). La transition des systèmes d'élevages est amenée aujourd'hui à s'accélérer en France, dans un contexte où la plupart des acteurs de l'aval ont pris l'engagement de ne plus s'approvisionner en œufs issus de cage d'ici 2020 à

2025. D'après les données 2016 de la DGAL, ce sont donc 750 bâtiments de poules pondeuses en cages qui devront être transformés ou remplacés dans les prochaines années. Par conséquent, les animaux devront être capables d'évoluer dans des systèmes ouverts plus complexes. Les développements technologiques vont faciliter la mesure de la capacité des animaux à s'adapter à ces nouveaux environnements et donc leur sélection. Kjaer (2017) ont ainsi utilisé des transpondeurs (sur les poules) et des antennes au sol de la cellule d'élevage pour sélectionner des animaux sur leur activité locomotrice. De même, en plaçant des capteurs sur les trappes de sortie des bâtiments et autour du parcours de poulets label, Chapuis et al. (2011) ont montré qu'il était possible de sélectionner les animaux sur la fréquence de sortie sur le parcours ou la durée des sorties. La capacité des animaux à résister aux pathogènes sera également un point critique dans ces systèmes ouverts, car les animaux y seront plus exposés qu'en système clos, alors même que la demande de la société pour une diminution notable des intrants médicamenteux devient de plus en plus forte.

En plus de ces évolutions structurelles, la pratique de l'époinçage est remise en cause en Europe et ne sera, à terme, plus pratiquée. Pour limiter les soucis de picage sévère liés au non-époinçage, les enrichissements de milieu semblent constituer un levier efficace. Cependant, ces enrichissements ne sont utiles que si les animaux les utilisent et explorent correctement leur environnement. La génétique doit contribuer à l'adaptation des animaux à ces évolutions en favorisant l'expression d'un panel plus développé de comportements positifs dans ces environnements

plus stimulants, sans que cela ne se fasse au détriment des performances zootechniques.

Afin de s'assurer que le bien-être des animaux dans leur milieu est satisfaisant, il faut disposer d'outils simples et pertinents pour l'évaluer. C'est ainsi que l'ITAVI et les filières avicoles ont co-construit la grille d'évaluation du bien-être EBENE, en consultant les ONG et les scientifiques. Cette adéquation entre l'animal et son environnement pourra ultérieurement être évaluée plus finement grâce aux nouvelles technologies (analyse d'images, analyse de sons...). Enfin, un champ récent d'investigation montre l'intérêt de prendre en compte la personnalité des animaux pour la sélection. En effet, Rozemploska-Runcinska et al. (2018) ont montré chez la poule pondeuse que la corrélation génétique entre les caractères de production d'œufs et le comportement dans un test d'objet nouveau étaient très différentes selon que les animaux sont classés comme peureux ou curieux à un test d'objet nouveau (-0.37 à -0.30 chez les animaux peureux vs. 0.07 à 0.16 chez les animaux curieux). Ce tempérament implique une évaluation multi-dimensionnelle de l'animal à la fois qualitative et quantitative (Koolhass et Van Reenen 2016). Il implique également qu'on peut atteindre un état de bien-être par différents chemins et que des animaux ayant des réactions différentes à des situations données peuvent être équivalents en termes de bien-être. Pour être à même d'évaluer réellement l'état de bien-être des animaux, il sera donc indispensable de réaliser des évaluations multi-critères du bien-être dans différentes situations et de la capacité de l'animal à revenir à un état stable après une perturbation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alnahhas N., Berri C., Chabault M., Chartrin P., Boulay M., Bourin M.C., Le Bihan-Duval E., 2016. BMC Genet., (17), 61.
- ANSES, 2018. Saisine n°2016-SA-0288.
- Arnoult C., Michel V., Le Bihan-Duval E., 2011. INRA Prod. Anim., (24), 165-170
- Berri C., 2015. INRA Prod. Anim. (28), 115-118.
- Bijma P., 2014. Heredity, (112), 61-69.
- Bokkers E.A.M., Koene P., 2003. Behav. Proc., (67), 121-130.
- Bolhuis J.E., Ellen E.D., Van Reenen C.G., De Groot J., Napel J.T., Koopmanschap R.E., De Vries Reilingh G., Uitdehaag K.A., Kemp B., Rodenburg T.B., 2009. Physiol. Behav., (97), 470-475.
- Campler M., Jöngren M., Jensen P., 2009. Behav. Proc., (81), 39-43.
- Castellini C., Mugnai C., Moscati L., Mattioli S., Amato M.G., Mancinelli A.C., Dal Bosco A., 2016. It. J. Anim. Sci., (15), 37-46.
- Chapuis H., Baudron J., Germain K., Pouget R., Blanc L., Juin H., Guémené D., 2011. 9^{èmes} J. Rech. Avic., Tours, 29 et 30 mars 2011.
- Collins K.E., Kiepper B.H., Ritz C.W., McLendon B.L., Wilson J.L., 2014. Poult. Sci., (93), 2953-2962.

- Dawkins M.S., Layton R., 2012. *Anim. Welf.*, (21), 147-155.
- Delanoue E., Dockès A.C., Chouteau A., Roguet C., Philibert A., 2018. *INRA Prod. Anim.*, (31), 51-68.
- Dockès A.C., Delanoue E., Chouteau A., Philibert A., Magdelaine P., Roguet C., 2017. 12^{èmes} J. Rech. Avic. Palm. Foie Gras, Tours, 5-6 avril 2017.
- Duggan B.M., Hocking P.M., Clements D.N., 2016. *Biol. Open*, (5), 1077-1085.
- Duggan B.M., Rae A.M., Clements D.N., Hocking P.M., 2017. *Genet. Sel. Evol.*, (49), 42.
- EFSA Panel on animal health and welfare, 2010. *EFSA J.*, (8), 1666.
- Ellen E.D., Visscher J., van Arendonk J.A., Bijma P., 2008. *Poult. Sci.*, (87), 233-239.
- Ellen E.D., Rodenburg T.B., Albers G.A., Bolhuis J.E., Camerlink I., Duijvesteijn N., Knol E.F., Muir W.M., Peeters K., Reimert I., Sell-Kubiak E., van Arendonk J.A., Visscher J., Bijma P., 2014. *Front Genet.*, (5), 377.
- Germain K., Parou P., Chapuis H., Pouget R., Juin H., Guémené D., Leterrier C., 2011. 9^{èmes} J. Rech. Avic., Tours, 29 et 30 mars 2011.
- Icken W., Caverio D., Schmutz M., Thurner S., Wendl G., Preisinger R., 2008. *Br. Poult. Sci.*, (49), 533-541.
- Jensen P., 2014. *Ann. Rev. Anim. Biosci.*, (2), 85-104.
- Johnsson M., Henriksen R., Fogelholm J., Höglund A., Jensen P., Wright D., 2018. *Genetics*, (209), 209-221.
- Jones R.B., 1996. *World Poult. Sci. J.*, (52), 131-174.
- Jones R.B., Satterlee D.G., Marks H.L., 1997. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, (52), 87-97.
- Karlsson A.C., Mormède P., Kerje S., Jensen P., 2011. *Behav. Genet.*, (41), 312-322.
- Keeling L., Andersson L., Schütz K.E., Kerje S., Fredriksson R., Carlborg O., Cornwallis C.K., Pizzari T., Jensen P., 2004. *Nature*, (431), 645-646.
- Kjaer J.B., Isaksen P.K., 1998. 32nd Cong. Int. Soc. Appl. Ethol., Clermont-Ferrand, 21 au 25 juillet 1998.
- Kjaer J.B., Sørensen P., Su G., 2001. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, (71), 229-239.
- Kjaer J.B., 2017. *Plos One* (12), e0182103.
- Koolhaas J.M., Van Reenen C.G., 2016. *J. Anim. Sci.*, (94), 2284-2296.
- Launay F., Mills A.D., Faure J.M., 1993. *Behav. Proc.*, (24), 95-110.
- Lay D.C., Fulton R.M., Hester P.Y., Karcher D.M., Kjaer J.B., Mench J.A., Mullens B.A., Newberry R.C., Nicol C.J., O'Sullivan N.P., 2011. *Poult. Sci.*, (90), 278-294.
- Lin H., Jiao H.C., Buyse J., Decuypere E., 2006. *W. Poult. Sci. J.*, (62), 71-86.
- Loyau T., Zerjal T., Rodenburg T.B., Fablet J., Tixier-Boichard M., Pinard-van der Laan M.H., Mignon-Grasteau S., 2016. *Animal*, (10), 1594-1601.
- Lubritz D.L., Smith J.L., MacPherson B.N., 1995. *Poult. Sci.*, (74), 1237-1241.
- Marino L., 2017. *Anim. Cognition*, (20), 127-147.
- Mignon-Grasteau S., Faure J.M., 2002. *INRA Prod. Anim.*, (15), 357-364.
- Mills A.D., Faure J.M., 1991. *J. Comp. Psychol.*, (105), 25-38.
- Muir W.M., 1996. *Poult. Sci.* (75), 447-458.
- Nicol C.J., 2015. *The behavioural biology of chicken* (C.J. Nicol edit.) CABI, Wallingford.
- Nielsen B.L., Thomsen M.G., Sorensen P., Young J.F., 2003. *Br. Poult. Sci.*, (44), 161-169.
- Preisinger R., Flock D., 2000. *BSAP Occasional Publication*, (27), 20-28.
- Prescott N.B., Wathes C.M., Jarvis J.R., 2003. *Anim. Welf.*, (12), 269-288.
- Recoquillay J., Leterrier C., Calandreau L., Bertin A., Pitel F., Gourichon D., Vignal A., Beaumont C., Le Bihan-Duval E., Arnould C., 2013. *PLoS One*, (8), e82157.
- Rozempolska-Rucinska I., Kibala L., Prochniak T., Zieba G., Lukaszewicz M., 2017. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, (193), 73-76.
- Rozempolska-Rucinska I., Zieba G., Kibala L., Prochniak T., Lukaszewicz M., 2018. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, (30), 1674-1678.
- Schütz K.E., Forkman B., Jensen P., 2001. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, (74), 1-14.
- Schütz K.E., Kerje S., Jacobsson L., Forkman B., Carlborg O., Andersson L., Jensen P., 2004. *Behav. Genet.*, (34), 121-130.
- Scott M.L., 1997. *Poult. Sci.*, (58), 108-115.
- Sharifi A.R., Horst P., Simianer H., 2010. *Poult. Sci.*, (89), 1360-1371.

- Su G., Kjaer J.B., Sorensen P., 2006. Poult. Sci., (85), 191-197.
- Tallentire C.W., Leinonen I., Kyriazakis I., 2018. Sci. Rep., (8), 1168.
- Tarrant K.J., Dey S., Kinney R., Anthony N.B., Rhoads D.D., 2017. Poult. Sci., (96), 1544-1552.
- Uitdehaag K.A., Rodenburg T.B., Komen H., Kemp B., van Arendonk J.A.M., 2008. Poult. Sci., (87), 2486–2492.
- Van Goor A., Ashwell C.M., Persia M.E., Rothschild M.F., Schmidt C.J., Lamont S.J., 2016. BMC Genomics, (17), 287.
- Väisänen J., Lindqvist C., Jensen P., 2005. Br. Poult. Sci., (46), 156-158.
- Wang Y., Saelo P., Chanthavixay K., Gallardo R., Bunn D., Lamont S.J., Dekkers J., Kelly T., Zhou H., 2018. Poult. Sci., (97), 770-780.
- Zuidhof M.J., Schneider B.L., Carney V.L., Korver D.R., Robinson F.E., 2014. Poult. Sci., (93), 2970-2982.

SESSION

GENETIQUE - REPRODUCTION

SESSION
GENETIQUE - REPRODUCTION

Posters

ESTIMATION DES PARAMETRES GENETIQUES DANS UN SCHEMA OU LES PEDIGREES SONT CONNUS A POSTERIORI : ETUDE PAR SIMULATION

Chapuis Hervé¹, Typhanie Ruer², Magali Blanchet²

¹ GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, ENVT, 31326 CASTANET TOLOSAN

² Grimaud Frères Sélection, La Corbière, Roussay 49450 SEVREMOINE

herve.chapuis@inra.fr

RESUME

La qualité des paramètres génétiques estimés dépend du nombre de familles mesurées et de leur taille dans la population étudiée. Classiquement, dans les populations avicoles, ces éléments sont pris en compte lors de l'éclosion afin de disposer d'un échantillon aussi représentatif que possible. Si les pedigrees ne sont pas parfaitement connus lors de l'éclosion mais a posteriori avec des marqueurs moléculaires (cas d'une reproduction au sol, sans cages individuelles, en monte naturelle avec des parquets de x mâles et y femelles), il faut s'assurer du dimensionnement du dispositif pour obtenir des paramètres exploitables. C'est particulièrement vrai dans un contexte expérimental où la taille des populations est limitée à la fois par le budget et par le respect du principe des 3 R (réduction). La question se pose dans le cas d'espèces ne se reproduisant pas en cages (oies) mais plus généralement en prévision d'un éventuel abandon des cages individuelles en sélection. Nous avons simulé une population expérimentale d'oies fonctionnant selon ce principe en faisant varier la taille des lots de $n=200$ à $n=1000$ pour étudier les propriétés statistiques (biais et dispersion) des paramètres génétiques estimés, qu'il s'agisse de caractères mesurés sur les candidats à la sélection ou sur des collatéraux abattus. Nous avons aussi envisagé les conséquences d'erreurs dans la généalogie. En appliquant quelques règles non contraignantes pour équilibrer les origines familiales, nous obtenons des propriétés très similaires pour les paramètres génétiques obtenus avec un pedigree connu à l'éclosion ou a posteriori. Un taux d'erreur de 5% dans l'assignation des parentés n'entraîne pas une nette dégradation de la propriété des paramètres génétiques. La taille des lots mis en place pour obtenir des paramètres exploitables devra cependant tenir compte du taux de succès de l'assignation à un couple parental unique. D'autres études seront nécessaires pour quantifier le gain génétique espéré dans de telles conditions.

ABSTRACT

Estimation of genetic parameters in a poultry design when pedigrees are not known at hatch. A simulation study.

Statistic properties of genetic parameters depend on the number and size of families sampled in the studied population. In a monitored poultry population, these factors are usually accounted for at hatch. In the case of *a posteriori* DNA-pedigreed population, the design must be carefully setup, lest inaccurate genetic parameters would be estimated. Here we simulated a goose population featuring batches used for breeding or for slaughtering. Batch size varied from $n=200$ to $n=1000$ measured animals, and we also investigated the consequences of pedigree errors on the prediction error of genetic parameters. Using simple rules to limit disequilibrium in familial representation, we obtained very similar statistical properties between classical and *a posteriori* DNA-pedigreed designs. A 5% rate of false pedigree did not lead to an unbearable deterioration of the parameter accuracy. The computations were based on the number of animals uniquely assigned to a parental pair. The expected assignment success should therefore be accounted for at setup. Further study should be carried out to predict the expected genetic gain in case of *a posteriori* DNA-pedigreed populations

INTRODUCTION

La connaissance des paramètres génétiques est indispensable pour la mise en place d'un schéma de sélection performant. Quelle est la part de la variance observée qui est imputable à la génétique et quelles sont les relations entre les caractères d'intérêt ? La réponse à ces questions dépend de l'héritabilité et des corrélations génétiques, qui doivent être estimées, à partir des performances collectées et des généalogies enregistrées depuis plusieurs générations. La qualité de l'estimation des paramètres génétiques dépend classiquement du nombre et de la taille des familles mesurées. Ces facteurs font généralement l'objet d'une planification et sont contrôlés dans le cadre d'un plan d'accouplement hiérarchique (1 ♂ croisé avec k ♀), qui suppose des cages individuelles et souvent le recours à l'insémination artificielle. Nous nous sommes intéressés au cas où les généalogies ne sont pas connues à l'éclosion (cas de la reproduction au sol, où les femelles peuvent pondre hors des nids) afin d'évaluer l'impact d'un tel schéma sur la précision et le biais des paramètres estimés. Dans ce cas les pedigrees sont obtenus a posteriori via des marqueurs moléculaires, et rien ne garantit une représentation équilibrée des différentes familles possibles. En utilisant une approche similaire à celle de Chapuis et David (2018), nous avons simulé un schéma de sélection d'oies comprenant des lots de renouvellement et des lots destinés au gavage afin d'évaluer la qualité des paramètres génétiques estimés.

1 MATERIELS ET METHODES

1.1 Population simulée

La population comporte 4 cheptels (Cf figure 1) mesurés (G_1 à G_4) et 2 générations d'ancêtres (G_0 et G_{-1}). Les cheptels G_1 et G_3 sont considérés comme des cheptels de renouvellement. G_2 et G_4 sont abattus. 4 caractères sont simulés de façon à estimer 2 héritabilités et une corrélation génétique dans chaque type de cheptel ainsi que la corrélation entre un caractère mesuré dans un lot abattu et dans un lot de renouvellement. Les caractères seront appelés car1 et car2 dans le lot de renouvellement, car3 et car4 dans le lot exclu du renouvellement. Nous avons testé deux valeurs différentes pour l'héritabilité : $h^2=0,3$ pour les caractères 1 et 3, $h^2=0,5$ pour les caractères 2 et 4. Les corrélations génétiques simulées sont ici de +0,5.

1.2 Principe de l'étude

Une population fictive organisée en 6 cheptels (figure 1) est simulée selon les règles classiques de la génétique quantitative. Les performances sont analysées pour estimer les paramètres génétiques, ce qui permet de comparer valeurs vraies et valeurs estimées. Les opérations étant répétées un grand nombre de fois ($n=400$), on peut calculer le biais et la précision des paramètres génétiques estimés, en fonction des facteurs de variation envisagés.

La qualité de l'estimation sera appréciée par la racine carrée de l'erreur quadratique moyenne (\sqrt{MSE}), qui combine biais et précision. Considérant que la vraie valeur d'un paramètre a une probabilité de 90% de se trouver à moins de deux écarts types de la moyenne, on considérera qu'une valeur acceptable pour \sqrt{MSE} doit être inférieure à la moitié de l'héritabilité, afin de la déclarer « significativement différente de 0 ». Pour une corrélation génétique non nulle, on cherche à s'assurer de son signe et là encore on considérera satisfaisantes les valeurs de \sqrt{MSE} inférieures, en valeur absolue, à la moitié de la corrélation simulée.

1.3 Facteurs de variation

1.3.1 Plans d'accouplement

Nous avons considéré 10 parquets de 5 ♂ accouplés à 20 ♀, soit un effectif de reproducteurs de 50 pères et 200 mères dans les cheptels G_{-1} , G_0 et G_1 . Les résultats obtenus sont comparés à plan de croisement hiérarchique de 50 mâles, chacun accouplé à 4 femelles. L'effectif de reproducteurs (qui est donc le nombre minimal d'animaux mesurés) est de 250 dans les deux schémas.

1.3.2 Taille des lots considérés

L'estimation des paramètres génétiques ne pose problème que quand on est en situation d'effectifs contraints. Nous avons considéré un schéma expérimental où les lots étaient de $n=600$ individus dans les cheptels de renouvellement et les lots abattus. Afin de tester la robustesse des paramètres en fonction des effectifs dans ces deux cheptels, nous avons fait varier la taille d'un type de lot (renouvellement ou gavage) de $n=200$ à $n=1000$, en fixant la taille des lots de l'autre type à $n=600$. Pour les lots de renouvellement, la taille minimale ne pouvant être inférieure à 250, les valeurs testées allaient de 300 à 1000.

1.3.3 Erreurs d'assignation

Afin de tenir compte d'une éventuelle erreur d'assignation consécutive à des erreurs de

génotypages, les paramètres génétiques ont aussi été estimés avec un pedigree erroné dans lequel, pour chacun des cheptels, 5% des animaux ont eu leurs parents aléatoirement échangés.

2 RESULTATS & DISCUSSION

2.1 Taille des lots

Les figures 2 et 3 représentent la qualité des estimations (exprimée au travers de \sqrt{MSE}) en fonction de la taille des lots de renouvellement (lots G1 et G3, figure 2) ou de celle des lots abattus (lots G2 et G4, figure 3). Comme attendu, la qualité des paramètres s'améliore avec la taille des lots (\sqrt{MSE} diminue quand le nombre d'individus mesurés croît). Dans tous les cas on obtient des valeurs inférieures au seuil de tolérance fixé (0,15 pour une héritabilité supposée de 0,3 et 0,25 pour un paramètre ayant une valeur de 0,25). Comme on pouvait s'y attendre, dans la mesure où les animaux mesurés dans les lots abattus n'ont pas de descendants, la valeur de \sqrt{MSE} est légèrement plus élevée sur la figure 3 signalant une estimation moins précise que pour les caractères mesurés dans les lots de renouvellement.

La valeur de \sqrt{MSE} est meilleure (plus faible) pour les héritabilités, puis pour la corrélation génétique entre deux caractères mesurés sur les mêmes animaux. La valeur la plus élevée (qui reste inférieure à la borne de 0,25) est observée pour la corrélation génétique entre deux caractères mesurés chacun sur des animaux de lots distincts.

Il faut également noter que les effectifs considérés ici sont les animaux « efficaces », c'est-à-dire avec des mesures et un pedigree connu. Avec un succès de réassignation à un couple parental unique autour de 0,80 (donnée non publiée), il faudrait mettre en place des lots de 375 animaux pour obtenir les résultats lus pour 300 animaux.

2.2 Effet du plan d'accouplement

On ne constate aucune détérioration de la qualité des estimations qui serait due au passage d'un schéma classique (accouplements hiérarchiques en cages individuelles) à un schéma de reproduction au sol. Notons toutefois que nous avons ici considéré un nombre égal d'individus issus de chacun des 10 parquets de reproducteurs. C'est une règle simple à mettre en œuvre afin d'équilibrer le dispositif. Néanmoins, nos simulations envisagent, intra bloc, une grande diversité de situation, avec parfois des contributions très inégales des reproducteurs, ce qui nous permet de considérer qu'elles reflètent bien la situation envisagée en pratique. Dans un souci de préserver la diversité génétique, et en situation

d'effectifs limités, la panmixie totale (avec monte naturelle, ce qui suppose la prise en compte des comportements sexuels) n'est cependant pas souhaitée dans nos populations expérimentales.

2.3 Effet des erreurs d'assignation

L'introduction d'un taux de 5% de fausses généalogies dans le pedigree dégrade systématiquement la qualité des estimations. Cette dégradation reste néanmoins modérée et l'erreur sur les paramètres demeure acceptable. Nous avons considéré un taux d'erreur de 5% dans les pedigrees réassignés, à ne pas confondre avec le taux d'erreur des génotypages. Les algorithmes de réassignation utilisés (Barbotte et al, 2012 ; Allal et al, 2015) tiennent compte des éventuelles erreurs de génotypage et par conséquent, ce taux nous a semblé être une borne haute. Notons également que, hors des cas où la sélection génomique est mise en place, le taux d'erreur dans les pedigrees établis dans les schémas classiques n'est pas connu. Il est supposé nul, alors que des défaillances dans la traçabilité ne sont pas exclues.

CONCLUSION

Par simulation nous avons démontré qu'en appliquant des règles simples visant à limiter le déséquilibre des représentations familiales, l'utilisation de pedigrees connus a posteriori par génotypage (et donc non contrôlés lors de la mise en place du cheptel à l'éclosion) permettait d'estimer correctement des paramètres génétiques. Ces estimations sont, par ailleurs, robustes vis-à-vis d'un taux modéré d'erreurs de généalogies.

Comme toute modélisation, celle-ci a fait l'objet de simplifications et ne prétend donner qu'un ordre de grandeur de la précision attendue. Hors les situations extrêmes pour des effectifs mesurés très faibles, la marge de sécurité semble suffisante pour déceler une héritabilité non nulle, ce qui permet d'envisager des travaux exploratoires sur des nouveaux caractères, tout en limitant le nombre d'animaux utilisés, afin de respecter le principe de Réduction appliqué en expérimentation animale (Russel et Burch, 1958). La mise en œuvre dans des schémas de sélection commerciaux impliquant plusieurs caractères et donc l'estimation de corrélations génétiques requiert, quant à elle, des effectifs plus importants. Ces schémas sont concernés par un objectif de progrès génétique, dont la prédiction devra faire l'objet de travaux complémentaires en cas d'assignation de parenté. De même, si l'on envisageait une sélection en monte naturelle, des travaux complémentaires de modélisation seraient nécessaires, afin de prendre en compte le

déséquilibre de représentation familiale induit par les comportements sexuels et les compétitions entre reproducteurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allal, F., Doan, Q., Chatain, B., Vergnet, A., Vandeputte, M. (2015). Aquaculture 2015: Cutting edge science in Aquaculture, Montpellier, FRA (2015-08-23 - 2015-08-26).
- Barbotte, L., Boichard, D., Genestout, L., Haffray, P., Chapuis, H., Chantry-Darmon, C., Boscher, M. Y. (2012). Programme and Abstract Book 33rd Conference of the International Society for Animal Genetics (p. 100). Cairns, AUS (2012-07-15 - 2012-07-20).
- Chapuis, H., David, I. (2018). 11. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP), Auckland, NZL. NZL : Massey University. 1130 p.
- Russell W., Burch R. (1959) The Principles of Humane Experimental Technique. Londres R.-U. : Methuen.

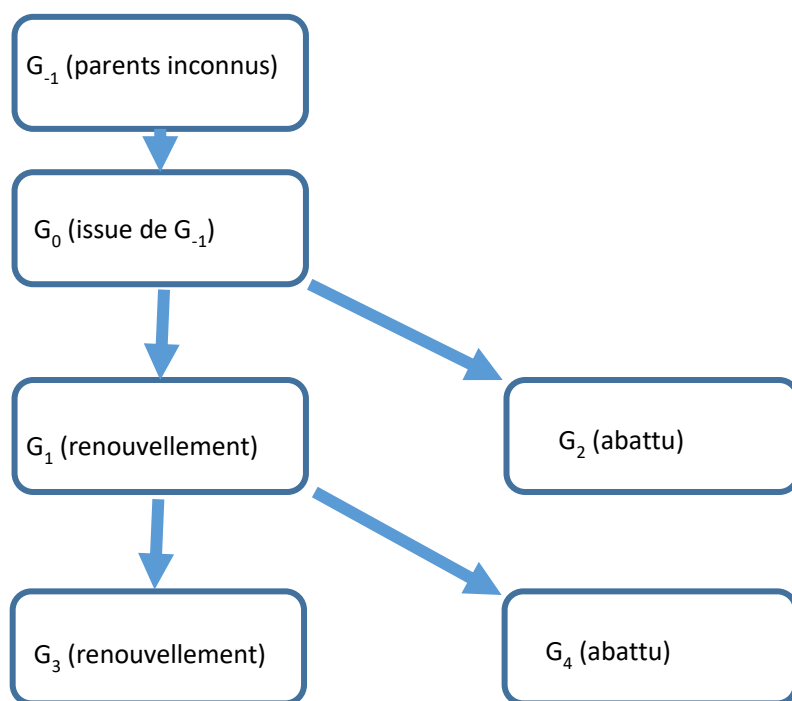


Figure 1: Organisation des différents cheptels simulés

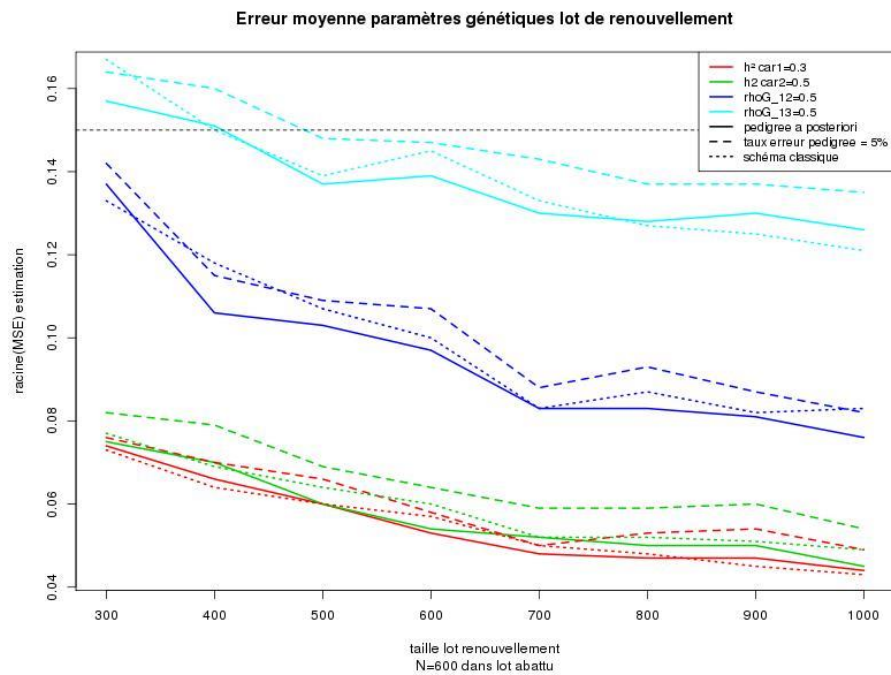


Figure 2: Erreur moyenne prédite pour les différents paramètres génétiques en fonction de la taille des lots de renouvellement (G_1 et G_3). Le schéma avec réassignation de parenté est comparé à un schéma classique (accouplements hiérarchiques et cages individuelles), et un taux d'erreur de 5% dans l'assignation est également envisagé.

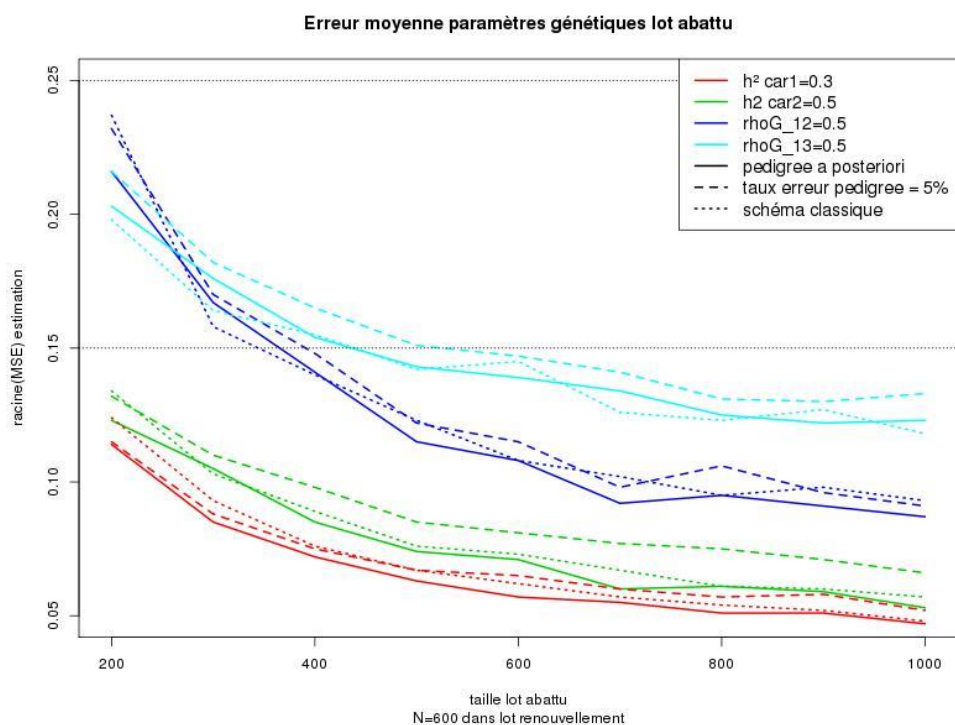


Figure 3: Erreur moyenne prédite pour les différents paramètres génétiques en fonction de la taille des lots abattus (G_2 et G_4). Le schéma avec réassignation de parenté est comparé à un schéma classique (accouplements hiérarchiques et cages individuelles), et un taux d'erreur de 5% dans l'assignation est également envisagé.

VARIATIONS STRUCTURALES DU GENOME ENTRE DES POPULATIONS SAUVAGES ET DOMESTIQUES DE POULES *GALLUS GALLUS*

Piégu Benoît¹, Arensburger Peter², Beauclair Linda¹, Chabault Marie³, Raynaud Emilie³, Coustham Vincent³, Brard-Fudulea Sophie⁴, Guémené Daniel⁴, Guizard Sébastien^{1,5}, Le Bihan-Duval Elisabeth³, Bigot Yves¹

¹ PRC UMR INRA0085, CNRS 7247, Centre INRA Val de Loire, 37380 Nouzilly - France

² Biological Sciences Department, California State Polytechnic University, Pomona, CA 91768 - United States of America

³ BOA UMR INRA 0083, Centre INRA Val de Loire, 37380 Nouzilly, France

⁴ SYSAAF, Centre INRA Val de Loire, 37380 Nouzilly, France

⁵ Florimond Desprez, 3 Rue Florimond Desprez, 59242 Cappelle en Pélève, France

sophie.brard-fudulea@inra.fr

RESUME

Les travaux réalisés jusqu'à présent pour comprendre au niveau génomique les causes des différences morphologiques, physiologiques et comportementales entre les poules sauvages et les races et lignées de poules domestiques se sont principalement basés sur des données moléculaires de type SNP. Pourtant, il a été montré que d'autres types de variations du génome jouent un rôle dans l'évolution des oiseaux. Cette étude compare les tailles de génome de la Poule rouge de jungle et de plusieurs races et lignées de poule, et recherche l'origine des variations en se concentrant sur les séquences dupliquées (CNV, Copy Number Variation). Des données de séquence ont été obtenues sur 3 espèces de poules sauvages et sur 18 races et lignées de poules domestiques. L'analyse des CNV a été réalisée à l'aide de CNVator, en se limitant aux régions pouvant être alignées sur le génome de référence de la poule. Les résultats montrent que les variations de taille de génome ne peuvent être causées par des éléments transposables. En revanche, des variations structurales significatives sont causées par des ADNr, des répétitions au niveau des télomères, des centromères, et de l'ADN satellite subtélomérique, ainsi que par des duplications de segments chromosomiques. Une partie de ces variations serait due à la domestication de la poule, et une autre à la sélection réalisée intra-race ou lignée. Compte-tenu de la présence de gènes dans ces régions, il est possible que ces modifications structurales du génome aient joué un rôle dans l'adaptation des races et lignées de poules aux environnements humains.

ABSTRACT

Variations in genome organization between wild and domesticated lineages of fowls belonging to the *Gallus gallus* species

Efforts to elucidate the causes of morphological, physiological and behavioral differences between wild fowls and their domesticated relatives, the chicken, have so far mainly focused on the identification of single nucleotide mutations. Other types of genomic variations have however been demonstrated to be important in avian evolution, including chicken domestication and associated variations in phenotype. Such variations include several types of sequences duplicated in tandem that can each vary in their level of repetitions. These may be at the origin of genome size differences between related species, sub-species, populations and lines. Here, we report on genome size differences between the red jungle fowl and several domestic chicken breeds and selected lines, and explore the origins of these differences within the repeated portions of these genomes. No differences were found with regard to transposable element abundance. However, sequences duplicated in tandem such as rDNA units, telomere repeats, centromeric and subtelomeric satellite DNA and segmental duplications were found to have been significantly re-shaped, first during domestication and subsequently by human-mediated breeder selection.

INTRODUCTION

Depuis la domestication de la Poule dans le Sud de l'Asie (il y a 8000 ans d'après les données archéologiques, voire 42 à 74 000 ans d'après des données moléculaires, Sawai *et al.*, 2010), sa diffusion dans le reste du monde a conduit à la création de races dites anciennes liées à la localisation géographique des animaux. Les races modernes sélectionnées actuellement sont apparues plus récemment, au cours du 19^e siècle. La domestication peut être considérée comme une adaptation de l'animal à un environnement humain, où la capacité à survivre en milieu sauvage peut être perdue. En plus de ce processus, la sélection mise en œuvre depuis la fin du 19^e siècle s'est initialement concentrée sur l'amélioration de performances de production. Au niveau génétique et génomique, des signatures de sélection (fréquences alléliques très basses/très élevées pour certains gènes) ont été observées, et par comparaison avec la Poule rouge de jungle il a été montré que la diversité génétique avait diminué, et que la proportion de mutations non-silencieuses fixées était élevée. Il y a par contre eu peu de travaux de comparaison structurale du génome de la Poule rouge de jungle et des races domestiques. L'objectif de cette étude est (i) de regarder si de la variabilité de taille de génome existe entre la Poule rouge de jungle et les races domestiques, (ii) de rechercher les causes des diminutions de taille de génome observées, et (iii) de comparer spécifiquement les CNV (copy number variations) et leurs contenus entre Poule rouge de jungle, races anciennes, et lignées sélectionnées.

1. MATERIEL & METHODES

1.1 Echantillons biologiques, mesure de la quantité d'ADN dans les globules rouges et séquençage

Des échantillons de sang ont été prélevés sur 3 races sauvages de poule (Poule rouge de jungle, Poule grise de jungle, Poule sri-lankaise de jungle), et 18 races/lignées de poules domestiques (Alsacienne, Araucana, Barbu, Brahma, Faverolle, Fayoumi, Gournay, Houdan, Orpington, Serama, Silky, lignées de pondeuses à œufs bruns ou blancs). La taille du génome dans les cellules sanguines a été évaluée par cytométrie, avec une taille arbitraire de 1 unité pour la Poule rouge de jungle qui servira de référence pour la comparaison des tailles de génome.

Pour 10 individus (2 Poules rouge de jungle, 2 Araucana, 2 Alsacienne, 2 White Leghorn et 2 Poules grise de jungle), l'ADN a été purifié à partir

de cellules sanguines, et la concentration en ADN des cellules a été estimée par spectrophotométrie et fluorescence. Pour 5 échantillons (un de chacune des races citées précédemment), 5 librairies ont été préparées (longueur moyenne de 550 à 600 pb), et le séquençage MiSeq a été réalisé par la plateforme I2BC (Gif-sur-Yvette, France). La qualité des lectures a été analysée avec FastQC, et elles ont ensuite été filtrées à l'aide de TrimonomaticsSE.

1.2 Quantifications des composants des séquences

A partir de ces données, 2 approches ont été mises en œuvre pour identifier les variations de séquences répétées entre les 5 races. Pour la 1^{ère} approche les répétitions ont été recherchées avec les logiciels RepeatExplorer (Novák *et al.*, 2010, 2013) et dnaPipeTE. Pour la 2^{ème} approche, les lectures ont été alignées sur le génome de référence de la Poule avec le logiciel bowtie2 (Langmead *et al.*, 2012). Le comptage du nombre de répétitions pour chaque race par rapport à celles présentes chez la Poule rouge de jungle a été obtenu avec Bioconductor featureCounts (Guizard *et al.*, 2016).

Les variations des niveaux d'ARN ribosomiaux transcrits entre la Poule rouge de jungle et l'Araucana, l'Alsacienne et la White Leghorn ont été déterminés par qPCR.

La variation du nombre de répétitions télomériques du motif TTAGGG présentes chez la Poule rouge de jungle, l'Araucana, l'Alsacienne et la White Leghorn a été estimée par hybridation dot blot (quantification par fluorométrie proche infrarouge). Pour les répétitions en tandem dans les régions sub-télomériques et dans les centromères, une librairie des séquences de ces régions a été créée à partir des séquences disponibles dans les bases de données publiques afin de palier à leur absence dans le génome de référence de la Poule. Les lectures générées dans ce projet ont été alignées sur cette librairie avec le logiciel Bioconductor featureCounts.

1.3 Analyse des CNV

Les CNV sont des fragments d'ADN d'au moins 50 paires de bases dont la perte ou le gain contribue significativement à la variabilité de la taille du génome. L'outil CNVator a été utilisé pour détecter des CNV. Pour tous les génomes utilisés, les données de séquences proviennent de bases de données. Les filtres suivants ont été appliqués pour choisir ces données : alignement d'au moins 90% des séquences sur le génome de référence de la Poule, au moins 90% de lectures uniques après suppression des duplicats de PCR, profondeur de

séquençage moyenne de 8X. Les lectures des jeux de données passant ces filtres ont été alignées sur la version 5 du génome de référence de la Poule à l'aide de bowtie2.

Le calcul de la densité normalisée des lectures a été réalisé par CNVator sur des fenêtres de 100 pb, avec correction pour le taux local en GC. L'analyse avec CNVator a été réalisée en fixant comme paramètres une p-value de détection inférieure à 0,01, et une longueur de CNV d'au moins 0,5 kb, ces paramètres devant limiter le risque de détecter de faux CNV (Yi *et al.*, 2014). Les CNV incluant des régions non-connues du génome de référence ont été exclus, ainsi que les lectures s'alignant sur des régions non-assemblées du génome. De même les chromosomes Z et W n'ont pas été pris en compte car la plupart des séquences venaient d'individus mâles. A l'issue de ces tris sur le génome de référence, il restait 0,9 Gpb dans le génome de référence (1,28 Gpb initialement).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Longueur de l'ADN

La longueur de l'ADN a été estimée dans 3 races de poules sauvages et dans 18 races et lignées de poules domestiques. La Figure 1 montre qu'il est possible de distinguer 2 groupes. Le 1^{er} groupe est celui des races ayant un génome 5 à 15% plus petit que celui de la Poule rouge de jungle: il s'agit des 2 espèces proches de *Gallus gallus*, de 7 races de poules européennes et américaines, d'une lignée asiatique, et de 2 lignées commerciales de pondeuses. Les tailles de génome des 8 autres races et lignées n'étaient pas significativement différentes de celle de la Poule rouge de jungle. A noter que la taille de génome varie significativement entre les lignées White Leghorn. Ces résultats montrent qu'il existe de la variabilité de taille de génome entre la Poule rouge de jungle et les races anciennes de poules, et qu'il est possible d'observer de la variabilité de taille de génome pour un même type génétique de poule. Pour comprendre les causes de ces variations, la composition structurale des séquences a été étudiée.

2.2 Variations des séquences répétées

Les logiciels RepeatExplorer et dnaPipeTE ont été utilisés pour regarder s'il existe de la variabilité dans le nombre de séquences répétées, quelle que soit leur structure ou leur origine, entre les séquences d'une Poule rouge de jungle, d'une Poule grise de jungle, d'une Araucana, d'une Alsacienne et d'une White Leghorn. L'analyse de ces 5 jeux de données n'a pas révélé de variation significative des proportions en répétitions. De même l'alignement

de ces 5 jeux de séquences sur le génome de référence de la poule n'a pas permis de détecter de différence significative entre les nombres de lectures des différentes races s'alignant sur des séquences répétées.

La qPCR réalisée pour détecter les répétitions en tandem des ADN ribosomiaux chez une Poule rouge de jungle, une Poule grise de jungle, une Araucana, une Alsacienne et une White Leghorn ont mis en évidence des différences significatives : la quantité d'ADN ribosomal est moitié moins importante chez l'Alsacienne et l'Araucana comparées à la Poule rouge de jungle. Chez la Poule grise de jungle et la White Leghorn, la quantité d'ADN ribosomal est ¼ moins importante que celle de la Poule rouge de jungle. Le génome de la Poule rouge de jungle étant composé de 0,5 à 2% d'ADN ribosomal (Su & Delany, 1998 ; Delany *et al.*, 1999), ces différences de quantité d'ADN ribosomal pourraient expliquer en partie les différences de taille de génome observées entre les races.

Chez la Poule, les répétitions télomériques TTAGGG représentent 3 à 4% du génome. L'hybridation dot-plot de l'ADN génomique de 3 Poules rouges de jungle, 2 Poules grises de jungle, 2 Araucana, 2 Alsaciennes et 2 White Leghorn a été réalisé sur un oligonucléotide (TTAGGG)₇. Par rapport à la Poule rouge de jungle, les résultats montrent une part de répétitions télomériques plus faible chez les races domestiques : 1,3% chez l'Alsacienne, 1,2 % chez l'Araucana et les White Leghorn, contre 1,9% chez la Poule rouge de jungle. Chez la Poule grise de jungle, ce taux de répétitions télomériques est un peu plus élevé (2,7%).

L'alignement des lectures d'ADN sur la librairie de séquences répétées en tandem permet de supposer que 5,5 à 6,5% du génome de la Poule rouge de jungle sont composés de ce type de répétitions. Chez les autres races (à l'exception de la White Leghorn), 2 fois moins de lectures alignées ont été obtenues.

A l'issue de l'ensemble de ces analyses, les variations des séquences répétées étudiées pourraient expliquer environ 5% de la réduction de taille de génome observée entre la Poule rouge de jungle et les races domestiques anciennes (environ 2% dus à l'ADN ribosomal, 2 à 4% aux répétitions TTAGGG, et 6% aux séquences dupliquées en tandem dans les centromères et les télomères). Ces variations sont suffisantes pour justifier les différences de tailles de génome constatées entre la Poule rouge de jungle et les White Leghorn, en revanche elles n'expliquent que partiellement les différences observées avec les autres races.

2.3 Analyse des CNV

Après application des filtres, 15 jeux de données publics et privés ont été retenus pour l'analyse des CNV : 3 Araucanas, 3 Poules coréennes, 3 Poules rouges de jungle, 5 White Leghorn, 1 White Plymouth Rock. Deux types de profils pour les CNV ont pu être distingués à l'issue de ces analyses.

Le 1^{er} profil est celui des 3 Poules rouges de jungle : par comparaison avec le génome de référence de *Gallus gallus*, la délétion de 11 à 14 millions de paires de bases a été observée, ainsi que la duplication de 2 à 3 millions de paires de bases. En terme de quantité d'ADN, ces CNV représentent une variation totale de 35 à 45 millions de paires de bases (90% due à des délétions, 10% à des duplications).

Le 2nd profil est celui des races domestiques de poules, chez lesquelles CNVator permet d'observer des délétions de 14 à 30 millions pb, et des duplications de 2,5 à 5 millions pb. En terme de quantité d'ADN, ces CNV représentent une variation totale de 20 à 30 millions de paires de bases (70% due à des délétions, 30% à des duplications). Les duplications de CNV sont 2 fois plus importantes chez la Poule rouge de jungle par rapport aux races domestiques, tandis que les délétions de CNV représentent 2 à 3 fois plus d'ADN chez les races de poules domestiques comparées aux Poules rouges de jungle. Ces résultats montrent que les causes de variation de la quantité d'ADN dans les CNV diffèrent entre les Poules rouges de jungle d'une part et les races domestiques d'autre part.

Cette étude s'est limitée aux autosomes (70% du génome de la Poule rouge de jungle). A l'échelle du génome entier, les CNV devraient expliquer au total 4 à 5% de la différence de quantité d'ADN entre la Poule rouge de jungle et les races domestiques (45 à 55 millions pb, même ordre de grandeur que pour les répétitions en tandem). Au total, les séquences dupliquées et les répétitions en tandem seraient donc responsables de 8 à 10% des différences de tailles de génomes observées entre la Poule rouge de jungle et les races domestiques. Par ailleurs, les résultats montrent que chez les White Leghorn et chez la White Plymouth Rock, il existe des variations interindividuelles significatives (part des CNV dans le génome et nombre de loci affectés par des délétions), suggérant que la variabilité existe inter-races mais aussi intra-race (Figure 2a, 2b).

2.4 Contenu des CNV

Pour l'analyse du contenu des CNV, les échantillons ont été répartis en 5 groupes : les

Poules rouges de jungle, les Poules coréennes domestiques, 3 White Leghorn issue d'une même lignée, et 3 White Leghorn issues de lignées différentes et obtenant des résultats similaires en terme de taux de CNV. Les 4 derniers groupes de cette liste sont considérés comme des poules domestiques, par opposition à la Poule rouge de jungle. Il a été observé 50 à 70% de délétions et duplications de CNV communes aux 5 groupes. Sur ces CNV communs aux 5 groupes, 385 délétions sont communes à la Poule rouge de jungle et aux races domestiques. Au sein des 4 groupes de poules domestiques, 614 délétions communes ont été identifiées, dont 29 non-présentes chez la Poule rouge de jungle. Ce résultat suggère que la domestication et la sélection ont conduit à un très faible nombre de nouvelles délétions dans les CNV par rapport à celles existant déjà chez la Poule rouge de jungle.

La composition des CNV a été étudiée, afin de vérifier si des gènes contenus dans des CNV ont vu leur nombre diminuer ou ont disparu avec la domestication, et si au contraire il existe des gènes qui seraient présents dans les CNV des Poules domestiques et absents des CNV de la Poule rouge de jungle.

Les processus biologiques concernés par les gènes présents dans les CNV ont été étudiés avec le plugin ClueGO du logiciel Cytoscape, utilisé sur la base de donnée *Gallus gallus* 2018 de QuickGO. Pour les CNV ayant subi des délétions, ces analyses ont permis de constater un enrichissement des CNV de la Poule rouge de jungle comparés à ceux des poules domestiques pour 22 gènes impliqués dans 7 voies métaboliques (méiose ovocytaire, signalisation AGE-RAGE dans les complications du diabète, signalisation de l'apeline, récepteur du glutamate, transport lysosomal). Chez les poules domestiques, les CNV sont enrichis pour plusieurs centaines de gènes impliqués dans la régulation de la transcription de l'ADN, le développement des cellules épithéliales, le système immunitaire et le système nerveux. Pour les CNV ayant subi des duplications, un enrichissement significatif a été observé chez l'Araucana pour 10 gènes, dont certains impliqués dans le fonctionnement du système immunitaire. Chez les Poules coréennes, l'enrichissement concerne le fonctionnement du cytosquelette.

CONCLUSION

Les résultats de la cytométrie ont montré que des différences de 5 à 15% pouvaient être observées entre la taille des génomes de la Poule rouge de jungle et des races domestiques de poules, anciennes et récentes. L'analyse des séquences a

confirmé que cette variabilité était principalement due à des répétitions en tandem (8 à 10%). Les délétions constatées dans les CNV permettent de supposer que la domestication a conduit à une modification du nombre de copies de gènes, avec des fragments homozygotes présents chez la Poule rouge de jungle d’une part, et homozygotes absents ou hétérozygotes chez les Poules domestiques d’autre part. Les voies métaboliques concernées par ces gènes sont principalement la régulation de la transcription, le système immunitaire et le développement du cerveau. La réduction du nombre de séquences répétées dans les régions juxtaposées

aux télomères et dans les centromères pourrait, comme chez les mammifères, être la cause de maladies (la réduction des régions sub-télomériques altérant la transcription des gènes voisins d’après Mefford & Trask, 2002). Des études complémentaires basées sur de plus larges jeux de données seraient nécessaires, afin de valider l’hypothèse selon laquelle la perte de séquences répétées en tandem au cours de la domestication aurait réduit la capacité des animaux à s’adapter à de nouveaux environnements et/ou à résister à certaines maladies.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Delany, M.E., Krupkin, A.B., 1999. Genome. 42, 60-71
Guizard, S., Piégu, B., Arensburger, P., et al., 2016. BMC Genomics. 17, 659
Langmead, B., Salzberg, S. 2012. Nat. Methods. 9, 357-359
Mefford, H.C., Trask, B.J., 2002 Nat. Rev. Genet. 3, 91-102
Novák, P., Neumann, P., Macas, J., 2010. BMC Bioinformatics. 11, 378
Novák, P., Neumann, P., Pech, J., et al., 2013. Bioinformatics. 29, 792-793
Sawai, H., Kim, H.L., Kuno, K., et al. 2010. PLoS One. 5, e10639
Su, M.H., Delany, M.E., 1998. Poult. Sci. 77, 1748-1754
Yi, G., Qu, L., Liu, J., et al., 2014. BMC Genomics.15, 962

Figure 1. Taille de génome en unités arbitraires chez différentes races et lignées de poules (référence : Poule rouge de jungle). WLL : White Layer Line, BLL : Brown Layer Line

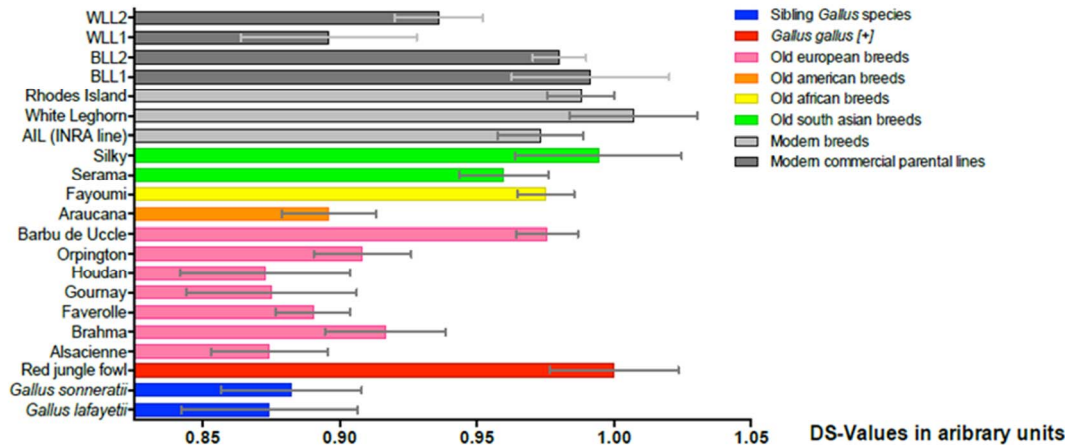
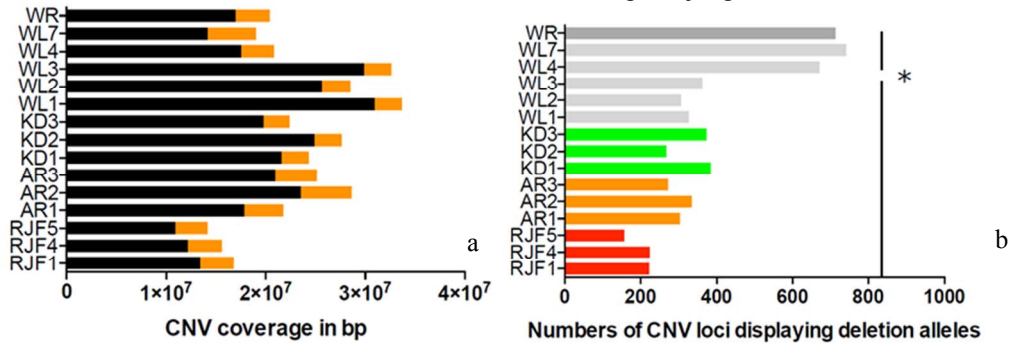


Figure 2. (a) Part des CNV dans les chromosomes de différentes races de poules et (b) nombre de CNV avec délétions d’allèles. WR : White Plymouth Rock, WL : White Leghorn, KD : Poule coréenne, AR : Araucana, RJF : Poule rouge de jungle



EFFETS A COURT ET LONG TERMES DE LA MANIPULATION THERMIQUE EMBRYONNAIRE SUR LA PHYSIOLOGIE DE LA CAILLE JAPONAISE

Vitorino Carvalho Anaïs ¹, Hennequet-Antier Christelle ¹, Couroussé Nathalie ¹,
Brionne Aurélien ¹, Gimmonnet Coralie ¹, Crochet Sabine ¹, Bordeau Thierry ¹, Darras
Veerle M. ³, Collin Anne ¹, Coustham Vincent ¹

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

³Laboratory of Comparative Endocrinology, Department of Biology, KU Leuven, B-3000
Leuven, Belgium

vincent.coustham@inra.fr

RÉSUMÉ

Des changements environnementaux durant l'embryogenèse peuvent avoir des répercussions sur le développement ultérieur et le phénotype de l'individu. Dans ce contexte, il a été montré que les poulets thermo-manipulés pendant la période d'incubation (du jour 7 à 16) présentent une tolérance plus importante à la chaleur à l'âge adulte. Chez la caille, la thermo-manipulation (TM) reste peu étudiée et l'acquisition potentielle d'une telle résistance n'a jamais été testée. Ainsi, nous avons développé un modèle de TM chez la caille japonaise (*Cortunix japonica*) et analysé les effets à court et long termes sur le développement et la physiologie des animaux. La résistance des animaux à la chaleur a également été testée par un challenge thermique à 35 jours d'âge (36°C pendant 7h). La TM induit une diminution du taux d'éclosion et une augmentation de la mortalité au cours des quatre premières semaines de vie. Ce traitement impacte significativement la croissance des cailles de l'éclosion jusqu'à 25 jours de vie. Bien que le coup de chaleur ait été perçu par les animaux (augmentation de la température interne), aucune gêne (hyperventilation, prostration, etc.) n'est observée dans les groupes contrôle et TM. Aucun impact du traitement embryonnaire et du coup de chaleur n'est observable après 35 jours de vie post-éclosion. L'analyse de nombreux paramètres physiologiques (comme la température ou les niveaux des métabolites sanguins) est actuellement en cours et permettra certainement de mieux comprendre l'impact de la TM sur la résistance des cailles face à une exposition à la chaleur aiguë.

ABSTRACT

Short and long-term effects of embryonic thermal manipulation on Japanese quail physiology

In vertebrates, the embryonic environment is known to affect the development and health of the new born and/or adult individuals. In chickens, the thermal-manipulation (TM) of eggs during the incubation period was associated with the improvement of the heat-tolerance of animals. However, little is known for quail. Therefore we investigated the impact of TM in quail by analyzing its short and long-term effects on zootechnical, physiological and metabolic parameters. Heat-tolerance was tested by a heat challenge (36°C for 7h) at 35 days of age. TM significantly reduced the hatching rate of treated animals and increased mortality during the first four weeks of life. Moreover, a significant increase of weight at hatching followed by a significant decrease at 25 days of age was observed in TM quails (males and females). After 35 days of age, no impact of TM or heat challenge treatments was observed. Numerous physiological parameters (including temperature and metabolites levels in blood) are currently investigated. Altogether, these data will give us new insights about the TM impact of the quail heat tolerance.

INTRODUCTION

Chez les vertébrés, l'environnement embryonnaire est connu pour avoir des impacts à long terme sur le développement et la santé des individus. Dans ce contexte, il a été montré que des traitements embryonnaires consistant en l'augmentation cyclique de la température d'incubation (TM) induisaient une tolérance plus importante à la chaleur chez les poulets adultes (Piestun *et al.*, 2008; Piestun *et al.*, 2009; Loyau *et al.*, 2013; Loyau *et al.*, 2015). Cette augmentation de la tolérance est associée à des modifications physiologiques, métaboliques et d'expression génique (Piestun, *et al.*, 2008; Piestun, *et al.*, 2008; Piestun *et al.*, 2009; Loyau, *et al.*, 2014; Loyau *et al.*, 2015, 2016; Piestun, *et al.*, 2015).

Cependant, le poulet n'est pas la seule espèce aviaire de rente soumise aux fortes variations de température. Chez la caille japonaise (*Cortunix japonica*), des protocoles de TM de courte durée ont été décrits (Hemid *et al.*, 2010; Alkan *et al.*, 2013) mais l'acquisition d'une tolérance potentielle à la chaleur n'a jamais été testée. Ainsi, en nous basant sur les données et les protocoles décrits chez le poulet, nous avons développé un protocole de TM chez la caille. Nous avons ensuite analysé les impacts à court et long termes sur le développement des animaux et évalué la tolérance des animaux en cas d'exposition thermique aiguë.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Protocole expérimental

Ce protocole expérimental a été approuvé par le Ministère de l'Education Nationale et le comité d'éthique Val-de-Loire (N° APAFIS#4606-201603111363124). Il a été conduit au sein de l'unité expérimentale INRA UE1295 PEAT (agrément n°C37-175-1).

Les œufs de 80 cailles de lignée fortement consanguine INRA Cons DD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMN03989050>) sont collectés pendant 12 jours et conservés à 16°C jusqu'à l'incubation. Les œufs issus de mêmes parents sont séparés de façon homogène entre les deux traitements. Dans le traitement contrôle (C), les œufs sont maintenus à 37,8°C et 56% d'humidité relative durant toute l'incubation. Dans le traitement de thermo-manipulation embryonnaire (TM), les œufs sont incubés à 39,5°C et 65% d'humidité relative depuis la mise en incubation jusqu'au jour 13 d'incubation. L'incubation des animaux C a commencé 8h avant celle des animaux TM afin de synchroniser l'éclosion. Les œufs sont inclinés de 90° toutes les heures. A l'éclosion, toutes les cailles sont élevées en groupe dans un même parquet, à 40°C. La température d'élevage est graduellement réduite jusqu'à atteindre 20°C au 23^{ème} jour de vie et est maintenue à 20°C tout le reste de l'expérimentation.

Durant toute la période d'élevage, l'état sanitaire et la mortalité sont relevés plusieurs fois par jour. De plus, durant toute la période d'élevage et d'expérimentation, les animaux ont accès à de l'eau et à de la nourriture *ad libitum*. En plus de la pesée à l'éclosion, la masse des cailles est mesurée au jour 25 et un sexage phénotypique est effectué ce même jour. Au jour 35, 36 animaux C femelles, 25 animaux TM femelles, 36 animaux C mâles et 29 animaux TM mâles subissent un coup de chaleur (CC), consistant en une exposition des animaux à 36°C pendant 7h. Ces animaux sont alors nommés C-CC (contrôles-coup de chaleur) et TM-CC (thermo-manipulés-coup de chaleur). Les animaux n'ayant pas subi de CC sont eux nommés C-C (contrôles-contrôles) et TM-C (thermo-manipulés-contrôles). A l'issue du CC et durant les semaines suivantes, les animaux sont pesés (jour 35, semaine 7, 13 et 17 pour les femelles ; jour 35, semaine 8 pour les mâles).

1.4. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R (version 3.5.1).

1.4.1. Analyse du taux d'éclosion et de la mortalité

L'impact de la TM sur le taux d'éclosion et la mortalité est analysé grâce à un test Chi2. Au total, 689 œufs et 479 cailles sont inclus respectivement dans l'analyse du taux d'éclosion et de la mortalité entre l'éclosion et le 28^{ème} jour de vie post-éclosion.

1.4.2. Analyse de la masse

Dans un premier temps, l'impact du sexe, du temps, du traitement TM et des interactions sur la masse des cailles est étudié depuis leur éclosion jusqu'au jour 35 sur 140 C (72 femelles et 68 mâles) et 127 TM (60 femelles and 67 mâles). Puis l'impact du temps, du traitement TM, du coup de chaleur et des interactions sur la masse des cailles est analysé suite au coup de chaleur soit après le 35^{ème} jour de vie, sur les femelles (36 C-C, 36 C-CC, 35 TM-C, 25 TM-CC) et sur les mâles (28 C-C, 26 C-CC, 38 TM-C, 29 TM-CC) de façon indépendante. Ces deux analyses sont menées grâce à un modèle linéaire mixte (paquet nlme version 3.1-137). Ces modèles contiennent deux effets aléatoires, le couple parental et l'animal au sein du couple. De plus, la structure de la variance-covariance est modélisée par une fonction puissance des valeurs prédites pour prendre en compte l'hétéroscédasticité des erreurs. Les effets sont estimés par la méthode du maximum de vraisemblance restreint (REML). Les effets du temps et de la TM sont testés au sein de chaque sexe.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

La TM embryonnaire est une stratégie permettant l'acquisition de la tolérance des poulets à de fortes augmentations de la température ambiante (Piestun, *et al.*, 2008; Loyau *et al.*, 2015). Cependant, les poulets ne sont pas la seule espèce aviaire de rente à être touchée par les variations climatiques et les

informations concernant l'utilisation de la TM chez d'autres espèces aviaires, notamment la caille, restent très fragmentaires (Abd El-Gawad *et al.*, 2008; Hemid *et al.*, 2010; El-Daly *et al.*, 2013). Aussi nous avons développé un modèle de TM s'appliquant dès le début jusqu'au jour 13 de l'incubation chez la caille japonaise (Figure 1) et analysé l'impact de ce traitement sur la physiologie et le développement de l'animal de l'éclosion jusqu'au 35^{ème} jour de vie.

2.1 La TM dès le début de l'incubation impacte négativement la survie des individus

Le premier paramètre que nous avons analysé est l'impact de la TM sur le taux d'éclosion ainsi que sur la survie des individus au cours des 28 premiers jours de vie post-éclosion (jamais étudiée jusqu'à présent). Dans les deux cas, la TM présente un impact négatif significatif sur ces deux paramètres, respectivement $p < 0.05$ et $p < 0.001$ (Figure 2). Ces travaux sont les premiers à référencer un tel effet de la TM sur la survie des oiseaux (Alkan *et al.*, 2013; Piestun *et al.*, 2015) sauf lorsque le traitement est appliqué de façon continue au cours de la journée (soit 24h/jour, Piestun *et al.*, 2009). Ces différences peuvent principalement être dues à la longueur du traitement et/ou à la fenêtre d'application. En effet, les études précédentes chez la caille ne concernent que des traitements relativement courts (trois jours de TM au début ou à la fin de l'incubation, Alkan *et al.*, 2013) et les études chez le poulet ont montré que la fenêtre d'application du traitement durant l'embryogenèse est un paramètre déterminant pour l'efficacité de la TM sur la physiologie de l'individu (Yahav *et al.*, 2004; Collin *et al.*, 2007; Piestun *et al.*, 2009; Loyau *et al.*, 2015). Il serait donc intéressant d'effectuer des TM sur des fenêtres variables afin de définir un traitement n'impactant pas négativement la survie des animaux.

2.2 La TM influence la croissance des cailles durant le premier mois de vie

Afin d'estimer la croissance des animaux, nous avons récolté leurs masses à différents temps de développement : à l'éclosion (jour 1), à 25 jours de vie et au 35^{ème} jour de vie (Figure 3). L'analyse statistique globale confirme l'impact attendu du temps, correspondant à l'âge des animaux ($P < 0.001$) et révèle un effet du traitement embryonnaire ($P < 0.05$) sur la masse. De plus, l'analyse des contrastes met en évidence une masse à l'éclosion plus importante chez les TM mais plus faible après 25 jours de vie (mâles et femelles) que chez les contrôles. A 35 jours de vie, l'impact du traitement embryonnaire n'est plus observable. Les autres modèles de TM chez la caille n'induisent pas de modification de masse des animaux à l'éclosion (Alkan *et al.*, 2013) tout comme chez le poulet (Loyau *et al.*, 2015). Chez la dinde, la TM induit l'augmentation de la masse embryonnaire juste avant l'éclosion mais pas à l'éclosion (Piestun *et al.*, 2015). Ainsi l'effet de la TM sur la croissance semble

dépendre de l'espèce et du modèle de TM considérés. Cependant, il est à noter que dans notre modèle nous synchronisons l'éclosion des animaux contrôles et des animaux TM. En effet, sans synchronisation, les cailles TM éclosent plus tôt que les cailles C (d'environ 8 heures) comme cela a été précédemment observé chez la dinde (Piestun *et al.*, 2015). Ainsi, dans les modèles de TM non synchronisés, ces absences d'impact de la TM sur la masse des animaux à l'éclosion pourraient être dues à une perte de masse collectée plus tard par rapport à l'éclosion chez les animaux TM éclos plus tôt que les C. Cet impact de la TM sur la masse à l'éclosion des animaux pourrait marquer un effet sur le développement et la croissance embryonnaire, et de ce fait sur le métabolisme embryonnaire des individus comme précédemment suggéré chez la dinde (Piestun *et al.*, 2015). Un suivi du développement embryonnaire pendant et après la TM serait ainsi très informatif.

2.3 Ni la TM ni le CC n'impactent la croissance des cailles après 35 jours de vie

Au cours de l'application du CC aucune modification du comportement n'est observable, nous permettant de conclure que ce CC (36°C pendant 7h) n'induit aucun mal-être chez les animaux (hyperventilation, prostration, etc.). A la suite de ce CC, aucun impact sur la masse des animaux n'est observable ($p > 0.05$, Figure 4). Au cours des semaines suivantes, aucun impact de la TM ou du CC n'est observable sur la croissance des individus. Durant cette même période, aucune modification de la prise alimentaire n'est détectée (données non montrées). Ainsi l'impact de la TM sur la masse des animaux est uniquement observable durant le premier mois de vie des cailles. Ces données sont en contradiction avec les données précédemment publiées mettant en évidence une augmentation de la masse des cailles TM au 42^{ème} jour de vie (Hemid *et al.*, 2010). Cependant, l'une des hypothèses concernant ces différentes observations serait liée au fait que les TM auxquels sont soumises les cailles diffèrent également. Il serait intéressant d'analyser l'impact de ces traitements sur d'autres paramètres zootechniques comme la ponte ou la croissance musculaire.

3. CONCLUSION

En conclusion, ces données mettent en évidence des impacts à court et long termes de la TM chez la caille japonaise, avec notamment des effets sur la survie des animaux de l'éclosion au 28 premier jours de vie et des modifications de la croissance des animaux au cours du premier mois de vie. Des données physiologiques (comme la température ou les niveaux sanguins de métabolites) sont actuellement en cours d'analyse afin de mieux caractériser l'impact de la TM sur la physiologie des cailles et la réponse des animaux face à une exposition thermique aiguë. De plus, des analyses moléculaires seront nécessaires afin

de comprendre les mécanismes moléculaires liés à la réponse physiologique des cailles à la TM.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier Tatiana Zerjal pour la lignée de caille ConsDD, Romuald Rouger et Desnoues Benoit (SYSAF, INRA, 37380 Nouzilly, France) pour leur investissement dans la sélection des animaux. Ce projet est financé par le projet ANR JCJC “QuailHeatE” [ANR-15-CE02-0009-01].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd El-Gawad, A. E. A., El-Wardany, I., El-Daly, E. F., Abd El-Azeem, N. A. and Hemid, A. H. (2008) *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(5), pp. 605–611.
- Alkan, T., Karabag, K., Galic, A., Balcioglu, M. . and S, K. (2013) *Archiv Tierzucht*, 56(78), pp. 789–796.
- Collin, A., Berri, C., Tesseraud, S., Rodon, F. E., Skiba-Cassy, S., Crochet, S., Duclos, M. J., Rideau, N., Tona, K., Buyse, J., Bruggeman, V., Decuypere, E., Picard, M. and Yahav, S. (2007) *Poult Sci*, 86(5), pp. 795–800.
- El-Daly, E. F., El-Wardany, I., El-Gawad, A. H. A., Hemid, A. E. A. and El-Azeem, N. A. A. (2013) *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 3(1), pp. 207–216.
- Hemid, A. H., El- Wardany, I., El-Dalyand, E. F., Abd El-Azeem, N. A. and El-Gawad, A. (2010) *World Journal of Agricultural Sciences*, 6(5), pp. 517–524.
- Loyau, T., Bedrani, L., Berri, C., Metayer-Coustard, S., Praud, C., Coustham, V., Mignon-Grasteau, S., Duclos, M. J., Tesseraud, S., Rideau, N., Hennequet-Antier, C., Everaert, N., Yahav, S. and Collin, A. (2015) *Animal*, 9(1), pp. 76–85.
- Loyau, T., Collin, A., Yenisey, C., Crochet, S., Siegel, P. B., Aksit, M. and Yalcin, S. (2014) *Poult Sci*, 93(8), pp. 2078–2086.
- Loyau, T., Hennequet-Antier, C., Coustham, V., Berri, C., Leduc, M., Crochet, S., Sannier, M., Duclos, M. J., Mignon-Grasteau, S., Tesseraud, S., Brionne, A., Metayer-Coustard, S., Moroldo, M., Lecardonnel, J., Martin, P., Lagarrigue, S., Yahav, S. and Collin, A. (2016) *BMC Genomics*, 17, p. 329.
- Loyau, T., Metayer-Coustard, S., Berri, C., Crochet, S., Cailleau-Audouin, E., Sannier, M., Chartrin, P., Praud, C., Hennequet-Antier, C., Rideau, N., Courousse, N., Mignon-Grasteau, S., Everaert, N., Duclos, M. J., Yahav, S., Tesseraud, S. and Collin, A. (2014) *PLoS One*, 9(9),
- Piestun, Y., Harel, M., Barak, M., Yahav, S. and Halevy, O. (2009) *J Appl Physiol (1985)*, 106(1), pp. 233–240.
- Piestun, Y., Shinder, D., Ruzal, M., Halevy, O., Brake, J. and Yahav, S. (2008) *Poult Sci*, 87(8), pp. 1516–1525.
- Piestun, Y., Shinder, D., Ruzal, M., Halevy, O. and Yahav, S. (2008) *Journal of Thermal Biology*, 33(7), pp. 413–418.
- Piestun, Y., Zimmerman, I. and Yahav, S. (2015) *Poultry Science*, 94(2), pp. 273–280.
- Yahav, S., Collin A Fau - Shinder, D., Shinder D Fau - Picard, M., Picard, M. and Poult, S. (2004) *Poultry Science*, 83

Figure 1. Schéma du protocole de thermo-manipulation chez la caille japonaise

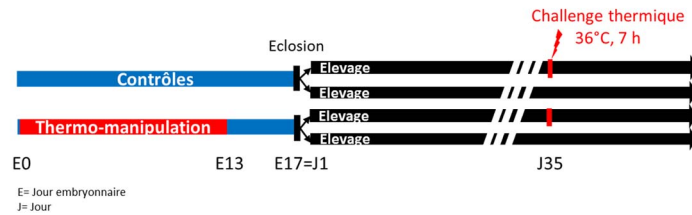


Figure 2. Impact de la thermo-manipulation embryonnaire sur les taux d'éclosion et de mortalité entre les jours 1 et 28 chez la caille japonaise. C : animaux contrôles TM : animaux thermo-manipulés. Les effectifs analysés sont indiqués au sein des histogrammes. * :p-valeur<0,05 *** :p-valeur<0,001

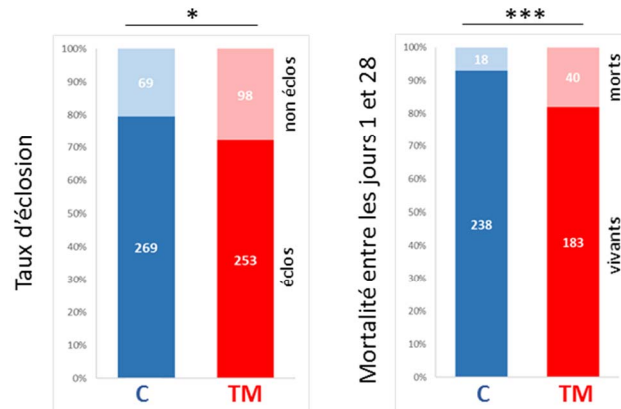


Figure 3. Impact de la thermo-manipulation embryonnaire sur l'évolution de la masse des individus entre l'éclosion (jour 1) et le 35^{ème} jour de vie. C : animaux contrôles TM : animaux thermo-manipulés. J25 : jour 25 de vie. * :p-valeur<0,05 ** :p-valeur<0,01 *** :p-valeur<0,001

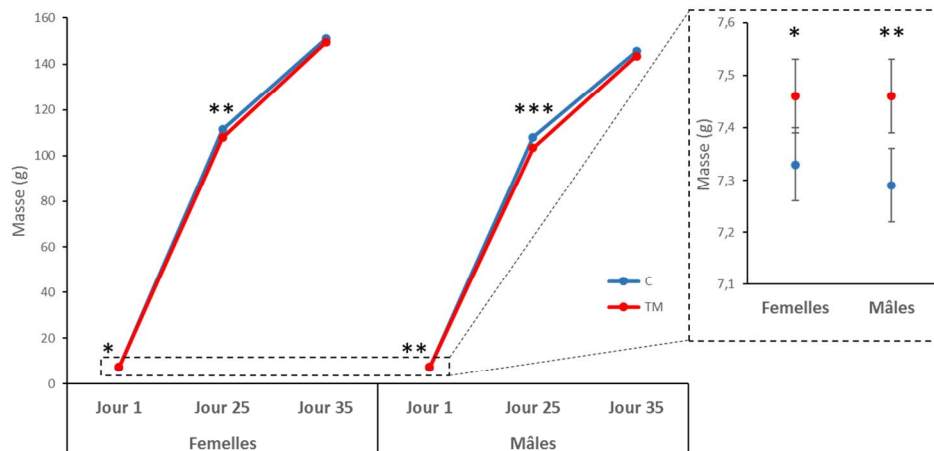
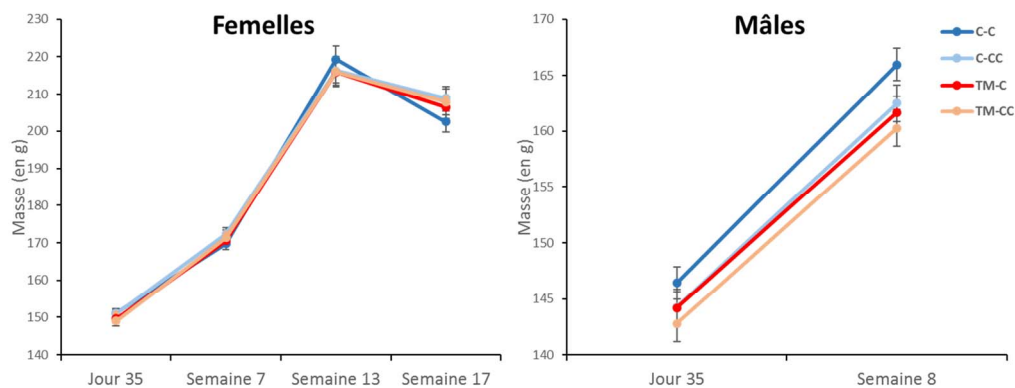


Figure 4. Impact de la thermo-manipulation embryonnaire et du coup de chaleur sur l'évolution de la masse à partir du 35^{ème} jour de vie chez les mâles et chez les femelles. C : animaux contrôles TM : animaux thermo-manipulés. CC : coup de chaleur (36°C pendant 7h). * :p-valeur<0,05 ** :p-valeur<0,01 *** :p-valeur<0,001



MISE AU POINT D'UN PIPELINE D'ANALYSE DES MARQUES D'HISTONES CHEZ LE POULET ACCLIMATÉ À LA CHALEUR

Gimonnet Coralie¹, David Sarah-Anne¹, Vitorino Carvalho Anaïs¹, Piégu Benoît², Hennequet-Antier Christelle¹, Brionne Aurélien¹, Bigot Yves², Collin Anne¹, Coustham Vincent^{1*}

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

² PRC, INRA, CNRS, IFCE, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

vincent.coustham@inra.fr

RÉSUMÉ

Les poulets de chair sélectionnés pour leur croissance rapide sont sensibles aux variations de température. L'application d'un traitement de thermo-manipulation à la chaleur (TM) pendant l'embryogenèse permet d'accroître la tolérance à la chaleur du poulet à l'âge d'abattage (J35). Nous cherchons à montrer si les changements d'expression induits par le traitement précédemment montrés pourraient être expliqués par des reprogrammations épigénétiques mises en place pendant l'incubation et persistant au cours du développement. Pour cela, nous nous sommes intéressés à deux modifications post-traductionnelles des histones : la triméthylation des lysines 4 et 27 de l'histone 3 (H3K4me3 et H3K27me3). La distribution de ces deux marques à partir d'échantillons d'hypothalamus et de muscle à J35 chez des individus contrôles et TM a été obtenue par immunoprécipitation de la chromatine suivi d'un séquençage systématique (ChIP-seq). Afin d'analyser les données de séquençage, nous avons développé une chaîne de traitements bioinformatiques intégrant la spécificité de chacune de ces marques. Suite à l'analyse biostatistique, les pics différentiels ont été associés aux gènes co-localisés. L'étude de ces marques a révélé un impact de la TM sur l'épigénome principalement dans l'hypothalamus, suggérant l'existence d'un impact épigénétique du traitement embryonnaire persistant jusqu'à 35 jours d'âge.

ABSTRACT

Development of an analysis pipeline for histone marks of broiler acclimated to heat

Broilers selected for their fast growth are sensitive to temperature variation. Cyclic increases in egg incubation temperature (TM) were shown to improve heat tolerance of broilers at slaughter age (D35). We hypothesized that TM may induce phenotype alteration through the epigenetic reprogramming of gene expression set up during incubation and persisting throughout development. To investigate the molecular basis of TM, we studied the trimethylation on histone 3 of both lysine 4 and 27 (H3K4me3 and H3K27me3). The distribution of these two marks was studied in hypothalamus and muscle samples at D35 from control and TM broilers by chromatin immunoprecipitation, followed by high throughput sequencing (ChIP-seq). To analyze the sequencing data, we developed a bioinformatic pipeline taking into account the specificity of each mark. Differential peaks were categorized according to the genomic features where they were mapped. The study of these histone marks revealed an impact of heat treatment during incubation on the hypothalamus epigenome. This suggests that an epigenetic memory persists during heat treatment in this tissue.

INTRODUCTION

Les poulets de chair ont été sélectionnés génétiquement sur des critères de performance de croissance. Cependant l'accroissement de leur masse musculaire n'a pas été accompagné par un développement des systèmes cardio-vasculaire et respiratoire (Havenstein et al., 2003), affectant ainsi leur capacité de résistance aux fluctuations de température. Pour pallier à ce manque de résistance thermique des poulets de chair, il est possible de les acclimater à la chaleur dès l'incubation en appliquant un traitement de thermo-manipulation embryonnaire à la chaleur (TM ; Figure 1). Jusqu'à l'âge d'abattage (J35), ce traitement améliore la tolérance à la chaleur des individus avec une baisse significative de la mortalité chez les mâles (Piestun et al., 2008). Une trentaine de gènes différentiellement exprimés en réponse à la TM a notamment été mise en évidence dans une étude du transcriptome du muscle *Pectoralis major* du poulet à J35 (Loyau et al., 2016). L'expression différentielle de ces gènes pourrait être liée à une modification d'une partie de l'épigénome au cours du traitement embryonnaire à la chaleur. L'épigénome est défini par l'ensemble des modifications épigénétiques impliquées dans la régulation de l'expression des gènes sans en altérer la séquence. Les modifications épigénétiques les plus étudiées sont la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones. Les histones sont des protéines liées à l'ADN. L'ajout d'une marque épigénétique (méthylation, acétylation, phosphorylation, etc) sur leur extrémité N-terminale influe sur la compaction de la chromatine (ADN + protéines) et par conséquent sur l'expression des gènes.

L'objectif de notre étude était de caractériser la distribution chez les poulets TM et contrôles (C) de deux marques d'histone (H3K4me3 et H3K27me3) dans le muscle et l'hypothalamus. Ces marques sont connues pour leur contribution dans la reprogrammation épigénétique de l'expression des gènes (Feil et Fraga, 2012). L'hypothalamus et le muscle sont deux tissus impliqués dans la thermorégulation

respectivement au niveau périphérique et central. Pour cela, la chromatine de trois échantillons TM et trois échantillons C a été immunoprécipitée pour chaque marque et chaque tissu, puis séquencée à haut débit (ChIP-seq). Cette communication décrit la mise en place des traitements bioinformatiques et biostatistiques de données ChIP-seq, dédiés à l'analyse de chaque marque d'histone étudiée.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1 ChIP-seq

La chromatine de muscle et d'hypothalamus de 3 échantillons TM et 3 C de poulets à J35 a été immuno-précipitée avec des anticorps dirigés contre les marques H3K4me3 (Anti-trimethyl-Histone H3 K4 Cat. #07-473, Millipore) et H3K27me3 (Anti-Trimethyl-Histone H3 K27 Cat. #07-449, Millipore). Des librairies des ADN immunoprécipités ont été réalisées (Kit NEB Next II, New England Biolabs) et séquencées par un séquenceur Illumina Hi-Seq 4000. Des échantillons C et TM de muscle et d'hypothalamus dont la chromatine n'a pas été immunoprécipitée (INPUT) ont également été séquencés afin de quantifier le bruit de fond présent dans nos échantillons et ainsi normaliser les résultats obtenus. À l'issue du séquençage, des fragments de 50pb non paires ont été obtenus.

1.2 Analyses bioinformatiques

La qualité des séquences obtenues après séquençage a été vérifiée avec FASTQC (Babraham bioinformatics). Les séquences ont été cartographiées sur le génome du poulet (*Gallus gallus* 5.0) avec Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012). Les duplicats de séquences ont été supprimés avec SAMtools (Li et al., 2009). Les enrichissements de marques d'histones ont été détectés séparément entre échantillons C et TM et de façon indépendante pour chaque marque et chaque tissu. L'enrichissement en H3K4me3 a été calculé par condition en tenant compte des INPUT respectifs en utilisant l'outil PePr (Zhang et al., 2014). Les enrichissements de la marque H3K27me3 ont

été calculés par échantillon relatif à leur propre INPUT avec epic/SICER (Xu et al., 2014 ; voir Résultats et Discussion partie 2.1). Suite à ces détections, pour chaque marque et chaque tissu, l'union des pics C et TM (Figure 2) a été réalisée afin d'obtenir les pics communs mais également les pics spécifiques de chaque condition pour définir les coordonnées sur lesquelles l'analyse différentielle sera effectuée. Le comptage des lectures sur ces coordonnées a finalement été réalisé avec featureCount (Liao et al., 2014).

1.3 Analyses biostatistiques

À partir du comptage, pour chaque marque et chaque tissu, une analyse différentielle a été effectuée avec le paquet R edgeR version 3.20.8 (Robinson et al., 2010, McCarthy, 2012). Les comptages de lectures des pics détectés sont normalisés (Dillies et al., 2013) par la méthode TMM (trimmed mean of M-values). Un modèle linéaire généralisé est estimé pour chaque pic afin d'identifier les pics différentiels entre les animaux C et TM. Une correction de Benjamini-Hochberg (BH) est appliquée pour contrôler le taux de faux positifs dans le cadre des tests multiples (Benjamini, Y. and Y. Hochberg, 1995). Les pics différentiels co-localisant avec des gènes ont alors été annotés avec GenomeFeatures (<https://github.com/abrionne/GenomeFeatures>).

1.4 Visualisation des pics

Pour visualiser les pics, un script utilisant les outils BEDtools (Quinlan et al., 2010) et bigwigCompare (deepTools suite, Ramirez et al., 2014) a été écrit afin de convertir les fichiers de cartographie (.bed) en fichier BigWig (.bw) représentant les profils normalisés des enrichissements des deux marques d'histones. Le profil des pics différentiels et leurs coordonnées ont ensuite été visualisés avec IGV (Integrative Genome Viewer, Robinson et al., 2011).

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Nous avons exploré différents logiciels et paramétrages afin de mieux caractériser la

distribution des marques de triméthylation de la lysine 4 et 27 de l'histone 3 (H3K4me3 et H3K27me3).

2.1 Choix de l'outil de détection de pics

Afin d'optimiser la détection de pics, nous avons d'abord sélectionné des outils de détection adaptés à chaque marque. En effet, la marque H3K4me3 est une marque connue pour être enrichie de manière très localisée sur le génome (« pics étroits ») tandis que la marque H3K27me3 est une marque présentant des profils d'enrichissement plus étalés (« pics larges » ; Figure 3, Barski et al., 2007). Ainsi, la détection des pics H3K4me3 a été réalisée avec l'outil PePr (Zhang et al., 2014) adapté aux pics étroits alors que la détection des pics H3K27me3 a été réalisée avec l'outil epic (basé sur SICER, Xu et al., 2014) adapté à la détection de pics larges. La détection des pics H3K27me3 a également été réalisée avec MACS2 (Zhang et al., 2008), outil largement utilisé, l'outil epic obtient cependant de meilleurs résultats en termes de détection de pics (David et al., 2017).

2.2 Impact de la déduplication

Alors que la taille moyenne des pics obtenus pour la marque H3K27me3 du muscle et de l'hypothalamus était conforme à la taille moyenne attendue, la taille moyenne des pics obtenus pour la marque H3K4me3 dans le muscle (3kb), était supérieure à la taille de pics attendue (1 kb, Barski et al., 2007). Nous avons donc testé l'impact de la déduplication avec l'outil SAMtools, consistant en la suppression de duplicats de PCR, sur la détection des pics avec PePr. En effet, la comparaison des visualisations des cartographies dédupliquées et non dédupliquées laissait suggérer un écrasement des pics après déduplication. Cet écrasement des pics après déduplication pourrait être lié à la très grande profondeur de séquençage utilisée pour la marque H3K4me3 jusqu'à trois fois supérieure aux recommandations ENCODE (Landt et al., 2012). Ainsi, l'étape de déduplication pourrait mener à une suppression artéfactuelle de séquences identiques liées à l'étroitesse du pic. Dans

notre étude, après avoir effectué la détection des pics H3K4me3 dans le muscle, le retrait de l'étape de déduplication a réduit la largeur des pics à la taille attendue (Tableau 1). L'étape de déduplication reste cependant recommandée pour les techniques de séquençage haut débit (Ebbert et al., 2016). Nous avons donc cherché d'autres alternatives pour réduire la taille des pics.

2.3 Mise au point de la taille de fenêtre de détection de pics

Par défaut, la taille de fenêtre de détection de pics est un paramètre calculé automatiquement par l'outil PePr. Elle a été définie pour la marque H3K4me3 à 240 pb dans l'hypothalamus et 1000 pb dans le muscle, ce qui pourrait expliquer les différences de tailles de pics entre ces deux tissus. Afin de comprendre l'impact de la taille de fenêtre de détection de pics sur la taille moyenne des pics détectés, nous avons testé différentes tailles de fenêtre. Une taille de fenêtre de détection des pics fixée à 240 pb produit une taille moyenne de pics d'environ 1kb, ce qui est cohérent avec ce qui était attendu et l'observation des profils des pics (Figure 4). Nous avons donc fixé la taille de fenêtre de détection de pics pour la marque H3K4me3 dans le muscle à 240 pb dans l'outil PePr pour la suite des analyses.

2.4 Analyses différentielles

Après union des pics C et TM, le comptage des lectures sur les coordonnées de l'union des pics a été réalisé afin de permettre

d'effectuer une analyse différentielle entre pics C et TM. L'analyse différentielle des marques H3K4me3 et H3K27me3 entre échantillons C et TM a révélé un impact de la TM principalement sur les marques H3K4me3 au niveau de l'hypothalamus avec plus de 700 pics différentiels (p-valeur ajustée par BH < 0,05) contre environ 150 pics différentiels pour la marque H3K27me3. Au contraire, les marques H3K4me3 et H3K27me3 semblent peu impactées dans le muscle avec une cinquantaine de pics différentiels pour les deux marques. L'analyse fonctionnelle des gènes sur lesquels ont été trouvés des pics différentiels est en cours afin de mettre en évidence des voies biologiques d'intérêt. Ces résultats suggèrent qu'une mémoire épigénétique de la TM pourrait persister dans l'hypothalamus. D'autres mécanismes peuvent être à l'origine de la réponse physiologique et métabolique dans le muscle.

CONCLUSION

L'exploration des outils et de leurs paramètres a permis de mettre au point un pipeline d'analyse des marques d'histone H3K4me3 et H3K27me3 chez le poulet en cours de développement avec le gestionnaire Nextflow. L'utilisation de ce pipeline pour l'analyse différentielle entre poulet C et TM suggère qu'il pourrait exister une mémoire épigénétique du traitement embryonnaire dans l'hypothalamus. D'autres mécanismes peuvent être impliqués dans la réponse à la TM du muscle.

Remerciements

Cette étude a été financée par un projet INRA PHASE CI STRESSEPIMARK et de l'ANR JCJC QuailHeatE (ANR-15-CE02-0009-01). Les auteurs remercient l'équipe MOQA pour l'aide technique et l'UE PEAT pour l'élevage des animaux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Barski, Artem, Suresh Cuddapah, Kairong Cui, Tae-Young Roh, Dustin E. Schones, Zhibin Wang, Gang Wei, Iouri Chepelev, et Keji Zhao. 2007. *Cell* 129 (4): 823-37.
Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995). *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* 57(1): 289-300.

- David S-A, Piégu B, Hennequet-Antier C, Pannetier M, Aguirre-Lavin T, Crochet S, Bordeau T, et al. 2017. *Biological Procedures Online*
- Dillies M.-A., et al. 2013. *Briefings in Bioinformatics* 14(6): 671-683.
- Ebbert, Mark T. W., Mark E. Wadsworth, Lyndsay A. Staley, Kaitlyn L. Hoyt, Brandon Pickett, Justin Miller, John Duce, John S. K. Kauwe, et Perry G. Ridge. 2016. *BMC Bioinformatics* 17 (Suppl 7).
- Feil, Robert, et Mario F. Fraga. 2012. *Nature Reviews Genetics* 13 (2): 97-109.
- Havenstein, G. B., P. R. Ferket, et M. A. Qureshi. 2003. *Poultry Science* 82 (10): 1500-1508.
- Landt, Stephen G., Georgi K. Marinov, Anshul Kundaje, Pouya Kheradpour, Florencia Pauli, Serafim Batzoglou, Bradley E. Bernstein, et al. 2012. *Genome Research* 22 (9): 1813-31.
- Langmead, Ben, et Steven L. Salzberg. 2012. *Nature Methods* 9 (4): 357-59.
- Li, Heng, Bob Handsaker, Alec Wysoker, Tim Fennell, Jue Ruan, Nils Homer, Gabor Marth, Goncalo Abecasis, Richard Durbin, et 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (16): 2078-79.
- Liao, Yang, Gordon K. Smyth, et Wei Shi. 2014. *Bioinformatics (Oxford, England)* 30 (7): 923-30.
- Loyau T, Hennequet-Antier C, Coustham V, Berri C, Leduc M, Crochet S, Sannier M, et al. 2016. *BMC Genomics* 17: 329.
- McCarthy, DJ, Chen, Y, Smyth, GK. 2012. *Nucleic Acids Research* 40, 4288-4297
- Piestun, Y., D. Shinder, M. Ruzal, O. Halevy, J. Brake, et S. Yahav. 2008. *Poultry Science* 87 (8): 1516-25.
- Quinlan, Aaron R., et Ira M. Hall. 2010. *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (6): 841-42.
- Ramírez, Fidel, Dündar F, Diehl S, Björn A. Grüning, et Manke T. 2014. *Nucleic Acids Research* 42 (Web Server issue): W187-191.
- Robinson, Mark D., Davis J. McCarthy, et Gordon K. Smyth. 2010. *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (1): 139-40.
- Robinson, James T., Helga Thorvaldsdóttir, Wendy Winckler, Mitchell Guttman, Eric S. Lander, Gad Getz, et Jill P. Mesirov. 2011. *Nature Biotechnology* 29 (1): 24-26.
- Xu, Shiliyang, Sean Grullon, Kai Ge, et Weiqun Peng. 2014. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1150: 97-111.
- Zhang, Yong, Tao Liu, Clifford A Meyer, Eeckhoutte J, David S Johnson, Bradley E Bernstein, Chad Nusbaum, et al. 2008. *Genome Biology* 9 (9): R137.
- Zhang, Yanxiao, Yu-Hsuan Lin, D. Johnson T, S. Rozek L, et A. Sartor M. 2014. *Bioinformatics* 30 (18): 2568-75.

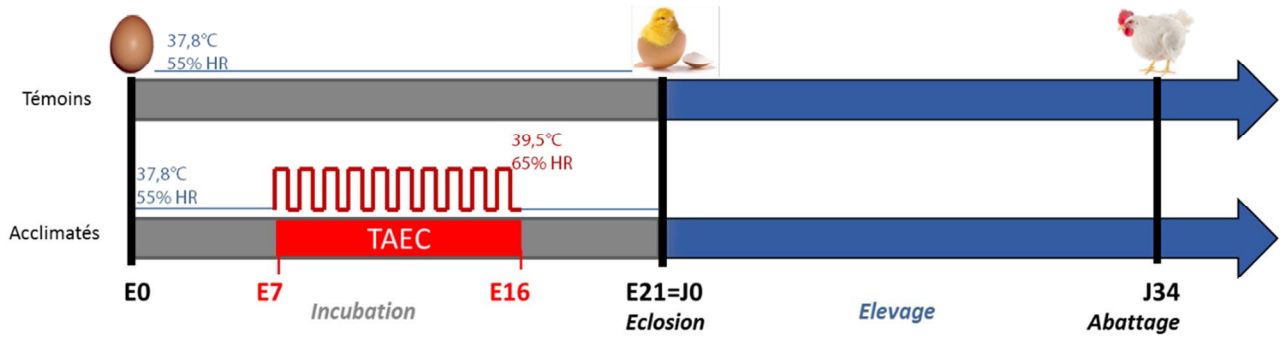
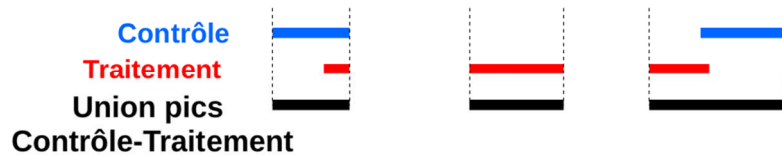
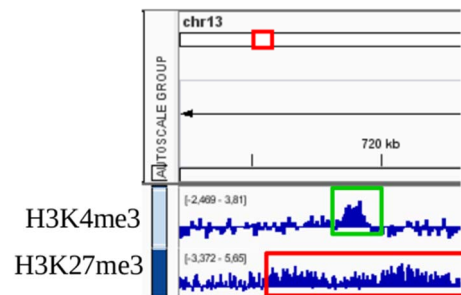
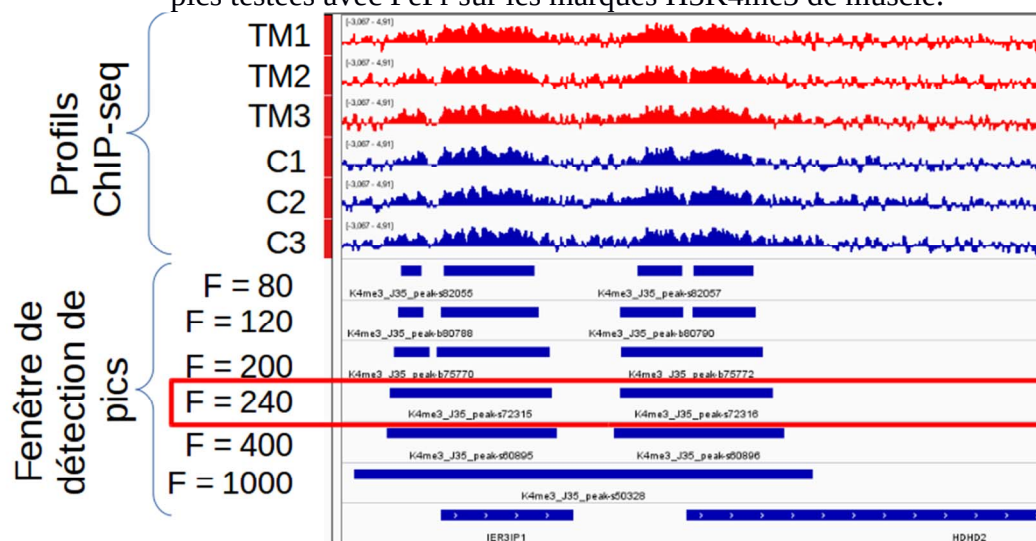
Figure 1. Protocole expérimental d'acclimation embryonnaire à la chaleur.**Figure 2.** Union entre les pics contrôles et les pics thermo-manipulés.**Figure 3.** Enrichissement des différentes marques. Les pics sont encadrés en vert pour H3K4me3 (pic étroit) et rouge pour H3K27me3 (pic large).**Figure 4.** Visualisation des profils ChIP-seq des échantillons contrôles (C) et thermo-manipulés (TM) et des coordonnées des pics détectés selon les différentes tailles de fenêtre de détection de pics testées avec PePr sur les marques H3K4me3 de muscle.

Tableau 1. Tailles moyennes de pics H3K4me3 détectés avec PePr sur des cartographies dédupliquées ou non-dédupliquées.

	Taille moyenne des pics
Théorie (Barski et al., 2007)	1kb
H3K4me3 – Hypothalamus Dédupliquées (N = 3)	1,15kb
H3K4me3 – Muscle Dédupliquées (N=3)	3,07kb
H3K4me3 – Muscle Non-dédupliquées (N=3)	1,01kb

EFFETS D'EXTRAITS DE PEPINS DE RAISINS SUR LES PERFORMANCES DE REPRODUCTION DES POULES REPRODUCTRICES DE SOUCHE CHAIR

Barbe Alix¹, Mellouk Namya¹, Ramé Christelle¹, Grandhayé Jérémy¹, Staub Christophe², Cirot Marine², Venturi Eric², Petit Angélique¹, Anger Karine³, Chahnamian Marine³, Rat Christophe³, Delaveau Joël³, Mairiel François⁴, Riva Antonella⁴, Froment Pascal¹, Dupont Joëlle¹

¹INRA, UMR085 Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements PRC - 37380 NOUZILLY,

²INRA, Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfasière UEPAO - 37380 NOUZILLY

³INRA, Unité Expérimentale du Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours UEPEAT – 37380 NOUZILLY

⁴INDENA – 37095 TOURS
joelle.dupont@inra.fr

RÉSUMÉ

Les poules reproductrices de type chair, sélectionnées pour une croissance rapide, alimentées à volonté, présentent un engraissement excessif entraînant des problèmes de fertilité dont des ovulations multiples et une mauvaise qualité de coquille. Pour éviter ces effets délétères, une restriction alimentaire est pratiquée en élevage. Cependant, cette pratique alimentaire est source de stress et génère de l'agressivité. Afin de réduire l'engraissement et le stress oxydatif, les extraits végétaux riches en polyphénols tels que les Extraits de Pépins de Raisins (EPR) ont été envisagés dans notre étude comme complément alimentaire. Ainsi, 4 groupes ont été constitués : témoin (A), supplémenté avec 0,5% (B) ou 1% (C) d'EPR dès 4 semaines et supplémenté avec 1% dès l'éclosion (D). Nous montrons que la supplémentation en EPR diminue significativement le nombre d'œufs doubles et augmente la taille des œufs alors qu'elle n'affecte ni le nombre d'œufs pondus, ni leur poids. D'autre part, cette supplémentation améliore l'élasticité de la coquille alors qu'elle n'a aucun effet sur différents paramètres de fertilité.

ABSTRACT

The breeding hens fed ad libitum and selected for rapid growth, exhibit excessive fattening leading to fertility problems including multiple ovulations and poor shell quality. To avoid these deleterious effects, a food restriction is practiced in breeding. However, this food practice is a source of stress and generates aggressive behaviors. To reduce fattening and oxidative stress, plant extracts rich in polyphenols such as grape seed extract (EPR) were considered in our study as a dietary supplement. Thus, four groups were constituted: control (A), supplemented with 0.5% (B) or 1% (C) of EPR from 4 weeks and supplemented with 1% from birth (D). We show that supplementation with EPR significantly decreases the number of double eggs and increases the size of the eggs while it does not affect the quantity of eggs laid. On the other hand, this supplementation improves the elasticity of the shell while it has no effect on different fertility parameters.

INTRODUCTION

L'élevage intensif des poules reproductrices de type chair est issu d'une sélection génétique drastique tournée vers la recherche d'une croissance de plus en plus rapide et vers l'amélioration de l'efficacité alimentaire. Une alimentation à volonté de ces animaux entraîne un fort engraissement ainsi qu'une maturité sexuelle plus précoce. Il en résulte également des problèmes d'ovulations multiples, une baisse de fertilité des poules et une moins bonne qualité des œufs (Heck *et al.*, 2004).

Une restriction alimentaire permet de résoudre en partie ces différents problèmes. Il a déjà été démontré que la restriction alimentaire permettait d'augmenter la fertilité, comparé à un régime *ad libitum* (Yu *et al.*, 1992). De plus, le stress oxydatif, problème récurrent en élevage, entraîne aussi des perturbations du développement de l'embryon. L'équilibre oxydatif est nécessaire pour les mécanismes de lutéinisation et d'implantation chez les Mammifères mais joue également un rôle dans l'ovulation (Ruder *et al.*, 2009).

Les polyphénols sont connus pour réduire l'engraissement et pour leurs propriétés antioxydantes. Les extraits végétaux sont aujourd'hui utilisés comme complément alimentaire chez l'humain, en raison de leur forte concentration en polyphénols antioxydants. Dans une étude précédente, nous avons étudié les effets *in vitro* des EPR (Extraits de Pépin de Raisin) et de leur principal composé phénolique, la proanthocyanidine sur les cellules ovariennes humaines. Nous avons observé une augmentation de la progestérone. *In vivo*, les EPR ont déjà été utilisés comme supplémentation chez la poule reproductrice afin de tester l'effet sur la fonction immunitaire et les performances de croissance (Ali Rajput *et al.*, 2017). Cependant, leurs effets sur les performances de reproduction n'ont jamais été évalués.

Dans notre étude, nous avons envisagé l'utilisation d'EPR en supplémentation alimentaire afin de réduire l'engraissement des poules reproductrices, diminuer le stress oxydatif tout en améliorant la fertilité des animaux.

Dans un premier temps, les effets des EPR sur la viabilité des cellules et la sécrétion de progestérone ont été étudiés *in vitro* sur les cellules ovariennes (cellules de la granulosa) de poule. Dans un deuxième temps, les effets de concentrations différentes d'EPR, appliquées à 2 stades de croissance, ont été évalués sur la fertilité et mortalité embryonnaire, ainsi que la production et la qualité des œufs.

1. MATERIELS ET METHODES

Le protocole mis en place a reçu un avis favorable par le comité d'éthique (CEEA VdL, n°019) sous le numéro APAFIS #10237-201706151202940 v3.

1.1. Protocole *in vitro*

Des cellules de la granulosa des follicules F1, F2 et F3/4, issues de plusieurs poules Cobb 500, ont été collectées et mises en culture dans un milieu composé de DMEM + 10 % SVF (sérum de veau fœtal) supplémenté avec des antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Après 24h de culture, le milieu est changé pour un milieu sans sérum. Les cellules sont ensuite stimulées avec 0, 0,01, 0,1, 1, 50 et 100 µg/ml d'EPR pendant 24h. La viabilité a été évaluée par le kit CCK8 (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) et la sécrétion de progestérone par un dosage ELISA comme décrit précédemment (Canepa *et al.*, 2008).

1.2. Protocole *in vivo*

Trois cent vingt-quatre poussins femelles de type chair (Cobb500) âgés de un jour ont été élevés au sein de l'Unité Expérimentale du Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours (UE PEAT). Les animaux ont été répartis en groupes homogènes de 12 individus dans 27 parquets de 3m².

1.3. Les régimes alimentaires

De l'éclosion à la 4^{ème} semaine (période Démarrage), tous les animaux sont alimentés à volonté avec le régime témoin ou EPR incorporé à 1% dans l'aliment. A partir de la 4^{ème} semaine (période de Croissance), tous les animaux sont restreints selon les courbes du fournisseur. Le lot supplémenté en EPR 1% depuis la naissance reste supplémenté à la même concentration (D, 5 parquets, n= 72) tandis que les animaux du lot témoin sont séparés en 3 lots : témoin (A, 8 parquets, n=92), supplémentés en EPR à 0,5% (B, 7 parquets, n=80) ou à 1% (C, 7 parquets, n=80) dans l'aliment. La croissance s'achève à la 18^{ème} semaine, la pré-ponte s'étend de 18 à 21 semaines et la ponte, de 21 à 40 semaines. La quantité d'aliment donnée a été ajustée toutes les semaines par rapport à la croissance des animaux de 3 parquets de référence. Les EPR sont conditionnés sous forme de poudre et mélangés ensuite à l'aliment habituel, selon les concentrations décrites précédemment. La composition des EPR a été évaluée par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) et spectrophotométrie UV-visible. Il en ressort une teneur à plus de 90% en proanthocyanidines.

1.4. Mesure de la production et de la qualité des œufs

De la 23^{ème} semaine à la 40^{ème} semaine, les œufs de chaque parquet ont été collectés 2 fois par jour, comptés et pesés. Les œufs cassés et les œufs doubles ont été dénombrés. A la 26^{ème} et 33^{ème} semaine, les œufs ont été caractérisés (poids, longueur et largeur).

La résistance, l'épaisseur et l'élasticité (module de Young, exprimé en N/mm²) de la coquille ont été évaluées à l'aide d'un Instron (Instron type 5543, UK527, Hahn *et al.*, 2017). Après casse des œufs, le jaune et le blanc ont été pesés séparément. Les coquilles ont été séchées puis pesées.

1.5. Mesures de la fertilité et de la mortalité embryonnaire

La semence de 48 coqs (Cobb500) a été collectée et regroupée pour former un unique pool. Les poules ont été inséminées 2 fois, à la 28^{ème} semaine et à la 33^{ème} semaine. Une concentration de 200 millions de spermatozoïdes a été utilisée. Les œufs ont ensuite été collectés tous les jours pendant 3 semaines et mis en incubation tous les 7 jours. Les œufs clairs, la mortalité embryonnaire précoce (M1) et tardive (M2) ont été évalués par mirage au 7^{ème} et 14^{ème} jour d'incubation et cassage des œufs. Le pourcentage de fertilité a été calculé à l'aide du ratio du nombre d'œufs fertiles sur le nombre d'œufs incubés. L'éclosabilité a été calculée avec le nombre de poussins éclos divisé par le nombre d'œufs incubés. L'éclosabilité des œufs fertiles a été calculée à partir du nombre de poussins nés divisé par le nombre d'œufs fertiles.

1.6. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne par groupe \pm SEM. Un test ANOVA a été réalisé pour comparer les moyennes des caractéristiques des œufs. Les logiciels StatView (version 4.5) et SAS ont été utilisés.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Partie *in vitro*

Avec des concentrations croissantes d'EPR, nous observons une diminution significative de la viabilité cellulaire à partir de 50 μ g/mL. A l'inverse, la sécrétion de progestérone augmente de façon constante (figure 1). Sur les cellules de granulosa de truie, des extraits de rooibos et de ginkgo, riches en polyphénols, inhibent la prolifération et favorise l'apoptose (Stochmalova *et al.*, 2018).

2.2. Partie *in vivo* : Effet de la supplémentation sur la quantité et la qualité des œufs pondus

La ponte commence à la 23^{ème} semaine. Le premier groupe à pondre est le groupe D, le groupe témoin entre en ponte 3 jours plus tard. Nous n'observons pas d'effet des EPR sur la masse des œufs (lot A : 36,25 g \pm 1,34, lot B : 37,32 g \pm 1,58, lot C : 36,33 g \pm 1,49, et lot D 34,55 g \pm 1,71) ni sur le nombre d'œufs pondus par poulet par semaine (lot A : 59,35 \pm 2,12, lot B : 59,5 \pm 2,4, lot C : 57,86 \pm 2,26, et lot D : 54,6

\pm 2,56). Cependant, nous constatons un effet significatif sur le taux d'ovulation double ($p = 0,025$). En effet, le nombre d'œufs doubles est significativement diminué pour les 3 groupes supplémentés. De plus, à la 26^{ème} semaine, nous observons un effet significatif sur certaines caractéristiques, notamment la longueur et la largeur ($p < 0,0001$) de l'œuf, et l'élasticité de la coquille ($p < 0,05$). Plus précisément, les œufs des 3 lots supplémentés sont à la fois plus longs (lot B : 54,79 mm \pm 0,42, lot C : 55,33 mm \pm 0,26, et lot D 54,84 mm \pm 0,27) et plus larges (lot B : 42,01 mm \pm 0,29, lot C : 41,74 mm \pm 0,23, et lot D 41,72 mm \pm 0,3) que les œufs du groupe témoin (longueur 50,79 mm \pm 0,5 et largeur 38,09 mm \pm 0,4), sans que le poids ne soit modifié. Les œufs des lots B et C ont également une élasticité de coquille plus importante que les témoins ($p = 0,0017$). La proportion de jaune et d'albumen par rapport au poids de l'œuf n'est pas modifiée avec la supplémentation. A la 33^{ème} semaine, un effet sur le poids du jaune ($p = 0,031$) et de l'albumen ($p = 0,013$) est observé. Le poids de l'albumen est plus élevé pour les groupes supplémentés (lot A : 35,1 g \pm 0,46, lot B : 37,08 g \pm 0,43, lot C : 36,95 g \pm 0,56, et lot D : 37 g \pm 0,48). La proportion d'albumen est également plus élevée pour les lots B et C comparé au témoin ($p = 0,005$). Le profil ne suit pas les résultats obtenus sur le poids de l'albumen pour lequel les lots B et D étaient supérieurs. Cela signifie que la composition du blanc a pu être modifiée. Le poids du jaune est plus élevé pour le groupe D comparé au groupe C, mais il n'y a pas de différence avec le groupe témoin (18,46 g \pm 0,18). De plus, les œufs des lots B et D sont plus longs ($p = 0,004$). Les œufs des lots B et D montrent une élasticité significativement plus importante ($p < 0,0001$) (tableau 1). Un effet bénéfique des polyphénols des feuilles d'Eucalyptus a déjà été démontré. Avec une concentration de 0.8 g/kg, l'épaisseur de la coquille était augmentée (Chen *et al.*, 2018). Dans une autre étude, une supplémentation de 4% de moût de raisin n'affecte ni la quantité des œufs, ni l'épaisseur de coquille mais induit une augmentation du poids de l'œufs (Kara *et al.*, 2015).

2.3. Effet de la supplémentation sur la fertilité

Nous avons calculé le pourcentage d'œufs clairs, la mortalité embryonnaire précoce et tardive, l'éclosabilité et le pourcentage de fertilité. Il n'y a pas d'effet significatif de la supplémentation sur l'ensemble de ces paramètres. Cependant, il semblerait que les EPR aient tendance à diminuer l'éclosabilité des œufs fertiles ($p = 0,069$). Les EPR pourraient avoir un effet délétère sur l'éclosabilité. Une étude montre qu'une supplémentation en vitamine E ou en polyphénols à une concentration de 0,008 ou 0,004 g/kg n'impactait pas ni l'éclosabilité, ni la fertilité (Koedijk *et al.*, 2015).

CONCLUSION

Les résultats *in vitro* montrent qu'une concentration élevée d'EPR a un effet délétère sur la viabilité cellulaire mais permet une augmentation de la sécrétion de progestérone. Ainsi, une concentration moyenne de 10 µg/mL permet d'augmenter la production de progestérone tout en maintenant la viabilité des cellules.

In vivo, les EPR n'ont pas d'effet sur la quantité d'œufs pondus, mais à la 26^{ème} semaine, la qualité des œufs est meilleure pour les œufs des lots supplémentés. Notamment, une supplémentation à partir de la croissance permet d'augmenter l'élasticité de la coquille. Les EPR jouent également un rôle important dans l'ovulation car nous constatons une diminution significative d'œufs doubles pour tous les lots supplémentés.

Sur les paramètres de fertilité, les EPR ont un effet délétère sur l'éclosabilité des œufs fertiles. L'équilibre oxydatif dans l'ovaire est complexe et s'organise autour d'une balance régulière entre production de ROS et antioxydants. Le mécanisme de dominance permettant l'obtention du follicule pré-ovulatoire s'effectue grâce à une augmentation de la production de ROS. Enfin, le follicule pré-ovulatoire produit des ROS nécessaires à l'ovulation (Behrman *et al.*, 2001). La supplémentation diminue le stress oxydatif, perturbant ainsi les mécanismes dans

l'ovaire. Cependant, l'effet semble survenir après l'ovulation et probablement pendant le développement embryonnaire. Une étude préliminaire a permis de doser le statut antioxydant total dans le jaune d'œuf. A la 26^{ème} semaine, une diminution significative a été observée pour tous les lots supplémentés ($n=5$, $p < 0,05$). Cependant, le dosage est en cours pour évaluer le stress oxydatif à la 33^{ème} semaine. La concentration en polyphénol et en cholestérol sera également évaluée. Il a déjà été démontré qu'un important niveau de polyphénol d'huile d'olive améliorait la qualité des acides gras du jaune d'œuf et diminuait le cholestérol (Laudadio *et al.*, 2015). De plus, des cellules de granulosa des 4 groupes ont été collectées, mises en culture et stimulées par IGF-1 (Insulin Growth Factor) et LH (Luteinizing Hormone). La sécrétion de progestérone dans le milieu de culture et les voies de signalisation sont en cours d'étude. Enfin, les stéroïdes comme la testostérone, la progestérone et l'androsténone dans le jaune sont actuellement en cours d'analyse.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à l'aide du financement PREVADI financé par la région Centre Val de Loire (convention 2016-00108493)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Behrman HR., 2001. J Soc Gynecol Investig., 8, S40-S42.
 Canépa S., 2008. Cahier des Techniques de l'INRA. 64, 19-30.
 Hahn EN., 2017. J The R Soc Interface., 14 (126).
 Heck A., 2004. Br Poult Sci., 45 (5), 695-703.
 Kara K., 2015. J Appl Anim Res. 44 (1), 303-310.
 Koedijk RM., 2015. ZooTecnica Intern. 26, 194-197
 Laudadio V., 2015. Lipids Health Dis., 7, 14-5.
 Mellouk N., 2018. Reproduction., 155 (4), 321-331.
 Ali Rajput S., 2017. Toxins. 9 (11), 371.
 Ruder EH., 2009. Curr Opin Obstet and Gynecol., 21, 219-222.
 Stochmalova A., 2018. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl.), 102 (2), e550-e557.
 Yu MW., 1992. Poult Sci. 71 (10), 1750-1761.

Figure 1. Effets *in vitro* des EPR sur la viabilité et la sécrétion de progestérone des cellules de granulosa.

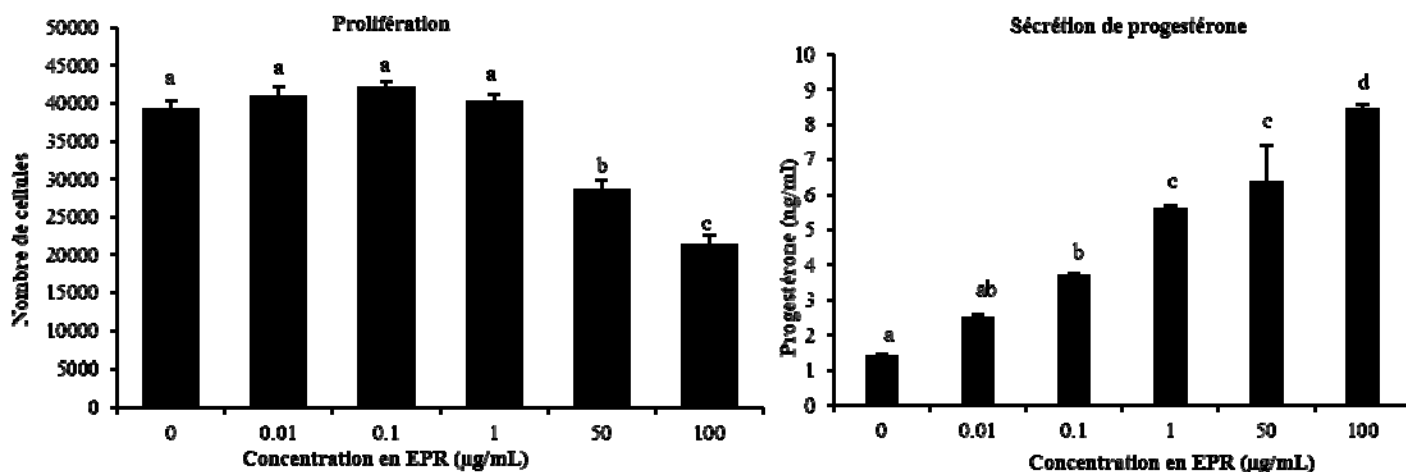


Tableau 1. Effet de la supplémentation en EPR sur le poids et la taille des oeufs et sur la qualité de la coquille à 26 et 33 semaines (n=30 oeufs analysés par régime et par semaine)

Semaine 26					
Régime	A	B	C	D	P-value
Poids de l'œuf (g)	52.37 ± 0.57	54.31 ± 1	54.28 ± 0.68	53.39 ± 0.95	0.16
Poids du jaune (g)	14.02 ± 0.15	14.35 ± 0.23	14.39 ± 0.21	14.13 ± 0.24	0.31
Poids du blanc (g)	30.27 ± 0.43	31.12 ± 0.84	31 ± 0.53	30.51 ± 0.63	0.63
Longueur (mm)	50.79 ± 0.5 ^a	54.79 ± 0.42 ^b	55.33 ± 0.26 ^b	54.84 ± 0.27 ^b	< 0.0001
Largeur (mm)	38.09 ± 0.40 ^a	42.01 ± 0.29 ^b	41.74 ± 0.23 ^b	41.72 ± 0.3 ^b	< 0.0001
Epaisseur (mm)	0.319 ± 0.01	0.322 ± 0.01	0.322 ± 0.004	0.312 ± 0.01	0.55
Résistance (N/mm ^{3/2})	486.01 ± 7.7	481.05 ± 8.66	470.37 ± 10.78	463.17 ± 11.14	0.3
Elasticité (N/mm ²)	16640 ± 357.55 ^a	18748 ± 510.1 ^b	18659 ± 450.15 ^b	17738 ± 507.53 ^{a, b}	0.002
Semaine 33					
Régime	A	B	C	D	P-value
Poids de l'œuf (g)	63.84 ± 0.51	63.98 ± 0.4	63.28 ± 0.67	64.69 ± 0.53	0.36
Poids du jaune (g)	18.46 ± 0.18 ^{a, b}	18.36 ± 0.17 ^{a, b}	17.92 ± 0.29 ^a	18.84 ± 0.17 ^b	0.03
Poids du blanc (g)	35.1 ± 0.46 ^a	37.08 ± 0.43 ^b	36.95 ± 0.56 ^b	37 ± 0.48 ^b	0.013
Longueur (mm)	56.66 ± 0.25 ^a	58.16 ± 0.29 ^b	57.39 ± 0.26 ^{a, b}	57.75 ± 0.34 ^b	0.0035
Largeur (mm)	44.47 ± 0.22	44.21 ± 0.14	44.41 ± 0.2	44.83 ± 0.2	0.11
Epaisseur (mm)	0.34 ± 0.004	0.33 ± 0.005	0.33 ± 0.004	0.312 ± 0.005	0.19
Résistance (N/mm ^{3/2})	453.2 ± 8.62	463.4 ± 8.46	455.3 ± 11.13	469.71 ± 11.45	0.65
Elasticité (N/mm ²)	17652 ± 295.25 ^a	19687 ± 276 ^b	18634 ± 226 ^c	19565 ± 220 ^b	< 0.0001

ETUDE DES EFFETS D'UN MELANGE D'ACIDES ORGANIQUES SUR LA PERFORMANCE DES REPRODUCTEURS CHAIR ET DE LEUR PROGENITURE

Harrington David¹, Araújo Lúcio², Araújo Cristiane², Wakeman Wendy¹

¹ Anpario plc, Manton Wood, Worksop, Nottinghamshire, S802RS, UK,

² University of Sao Paulo, State of São Paulo, 03178-200, Brazil

wendy.wakeman@anpario.com

RESUME

L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets d'un mélange d'acide propionique et d'acide formique sur un support minéral sur les performances des reproductrices de poulets de chair et de leur progéniture. À l'âge de 25 semaines, 64 reproductrices de poulets Cobb 500 ont été réparties aléatoirement en deux groupes de traitement, avec 8 répétitions de 4 oiseaux par traitement. Les traitements consistaient en un régime reproducteur de poulets de chair standard (témoin) comparé à l'ajout d'un mélange d'acides organiques (2 kg/t) (OAB). À l'âge de 45 semaines, les reproductrices ont été inséminées artificiellement et les œufs ont été collectés entre le troisième et le dixième jour suivant l'insémination et incubés. Le mirage a été effectué 10 jours après l'incubation pour la détection des œufs infertiles. Les poulets de chair mâles âgés d'un jour des deux groupes de traitement ont été suivis jusqu'à l'âge de 42 jours, tous les oiseaux recevant les mêmes régimes de départ, de croissance et de finition (c'est-à-dire sans supplémentation en OAB). La supplémentation en OAB a amélioré la fertilité des reproducteurs (96,64% contre 94,32%, $p=0,038$). La production et la capacité d'éclosion des œufs fertiles n'étaient pas différentes entre les traitements. Les poulets de chair issus de reproducteurs recevant un supplément OAB ont eu un meilleur gain de poids à 42 jours (2934 vs 2842g, respectivement; $p=0,024$) et une IC (1,74 contre 1,80, respectivement; $p=0,033$). La consommation d'aliment n'a pas différée entre les traitements (5.118 vs 5.127, OAB vs contrôle respectivement). En conclusion, l'inclusion de l'OAB dans les régimes des reproducteurs de poulets de chair a amélioré la fertilité des reproducteurs de poulets de chair et la performance ultérieure de leur progéniture.

ABSTRACT

A unique carrier-based organic acid blend improves the performance of broiler breeders and their progeny

The objective of this study was to evaluate the effects of a blend of propionic and formic acid on a mineral carrier on the performance of broiler breeders and their progeny. At 25 weeks of age, 64 Cobb 500 broiler breeders were randomly allocated to treatments, with 8 replicates of 4 birds per treatment. The treatments were a standard broiler breeder diet (control) compared with the addition of an organic acid blend (2kg/t) (OAB). At 45 weeks of age, the birds were artificially inseminated and eggs were collected between the third and tenth day following insemination and incubated. Candling was performed 10 days after incubation for the detection of infertile eggs. 1 day old male broilers from both treatment groups were followed through to 42 days of age, with all birds receiving the same starter, grower and finisher diets (i.e. no OAB supplementation). OAB supplementation improved breeder fertility (96.64 vs. 94.32%, $P=0.038$). Egg production and hatchability of fertile eggs were not different between treatments. Broilers from OAB supplemented breeders had better weight gain to 42 days (2934 vs. 2842g, respectively; $P=0.024$) and feed conversion ratio (FCR) (1.74 vs. 1.80g/g, respectively; $P=0.033$). Feed intake did not differ between treatments (5,118 vs 5,127, OAB vs control respectively). In conclusion, inclusion of the OAB in broiler breeder diets improved both broiler breeder fertility and subsequent performance of their progeny.

INTRODUCTION

L'effet antimicrobien des acides organiques est bien étudié et leur supplémentation dans l'alimentation des volailles est reconnue comme méthode efficace pour contrôler la croissance microbienne (Broom, 2015), contribuant à une amélioration des performances et à la sécurité alimentaire (Mani-Lopez *et al.*, 2012). Leur mode d'action pour l'inhibition des bactéries est due surtout, mais pas uniquement, à l'accumulation intracellulaire d'ions hydrogènes, qui augmentent les dépenses d'énergie et perturbent les fonctions intracellulaires (Van Immerseel *et al.*, 2006). En outre, les acides organiques améliorent la digestibilité des nutriments, l'absorption des minéraux et la réponse immunitaire (Partanen et Croz, 1999). Plus précisément, l'acide formique a récemment reçu l'approbation de l'Union Européenne comme additif améliorant l'hygiène alimentaire via ses effets antibactériens sur les bactéries à gramme négative, et en particulier, les Salmonelles (EC 2017/940).

Le but de cette étude était d'évaluer l'effet d'un additif à base d'acides organiques sur la productivité des reproductrices chair et la croissance de leur progéniture après le pic de production.

MATERIELS ET METHODES

A 25 semaines d'âge, 64 femelles reproductrices chair de souche lourde (Cobb 500, Cobb Vantress, Siloam Springs, AR, USA), issues de la même lignée génétique et ayant un poids +/- 10% du standard Cobb 500 pour leur âge, ont été réparties de façon aléatoire en deux groupes de traitement à 25 semaines d'âge : un avec un mélange concentré des acides organiques (OAB) formiques et propioniques (ratio 4 : 1) sur un support minéral (Salkil™, Anpario plc) à 2kg/t, et un sans, avec 8 répétitions de 4 poules reproductrices, en cages. Les sujets ont tous reçu la ration standard des reproducteurs chair de 25 à 45 semaines d'âge, et l'accès à l'eau était *ab libitum*.

L'insémination (0,03- 0,05mL de sperme frais) a eu lieu à semaine 45, et les œufs ont été recueillis quotidiennement pendant une semaine. Les œufs endommagés ont été enlevés, et les œufs restant ont été mirés 10 jours post-insémination avec une lumière à 60W d'environ 2,5cm de diamètre pour confirmer leur fertilisation. Les œufs non-fertilisés ont été supprimés, et les œufs fertiles restants incubés. La production d'œufs (%) est définie comme le nombre d'œufs collectés pendant sept

jours suivant l'insémination. La fertilité (%) est le nombre d'œufs fertiles comparés au nombre d'œufs total pondus. Puisque uniquement les œufs fertiles étaient incubés, le taux de survie des embryons est catégorisé comme le pourcentage éclos des œufs fertiles.

240 poussins males issus de ces œufs ont été ensuite divisés en deux enclos au sol séparés : le premier constitué des poussins venant des reproducteurs ayant reçu l'OAB et le deuxième, par le groupe contrôle. Il y a eu 8 répétitions de 15 poussins de chair par groupe. Ces poussins ont été élevés jusqu'à 42 jours. La formulation des rations a suivi la recommandation de Rostagno *et al.* (2011), sans addition d'additifs alimentaires. Les sujets ont reçu la ration de démarrage de 0 à 21 jours, la ration de croissance de 22 à 35 jours et la ration de finition de 36 à 42 jours. L'indice de consommation a été calculé en enlevant et pesant l'aliment restant dans les mangeoires. L'accès à l'eau était *ab libitum*, et le régime de lumière et de ventilation standard Cobb a été suivi. La croissance (gain de poids et prise d'aliment) ont été suivis pendant toute la période de croissance, et l'indice de consommation (IC) a été calculé pour chaque traitement en divisant la consommation totale par le gain de poids total. La qualité de la carcasse (% carcasse, % filet et % cuisse) a été noté au moment de l'abattage à 42 jours.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'inclusion d'OAB dans l'alimentation des reproducteurs n'a pas eu d'incidence sur la production d'œuf au quotidien (Tableau 1), mais une augmentation dans le pourcentage des œufs fertiles à partir de 45 semaines d'âge a été noté (96,64% pour l'OAB contre 94,32% pour le contrôle, $p=0,038$). Le taux d'éclosion des œufs fertiles n'a pas été modifié.

Il n'y a pas eu de différence entre la consommation des deux groupes (Tableau 2), mais le groupe OAB a eu une augmentation dans leur gain de poids de façon significative (2934g contre 2842g, $p=0,024$). Ceci s'est traduit dans un meilleur indice de consommation (IC) pour le groupe OAB (1,74g/g vs 1,80g/g, $p=0,033$). La qualité de la chair était similaire entre les deux groupes en termes de pourcentage de carcasse, filet et cuisses. (Données non-incluses).

CONCLUSION

Dans cette étude, les sujets ont été mis en cage et inséminés artificiellement, ce qui explique le taux de fertilité plus faible comparé au standard commercial (Cobb 500). Cependant, l'utilisation d'OAB chez des reproductrices chair a amélioré le taux de fertilité, résultant en une augmentation de 2% de poussins éclos. Nous ne nous attendions pas à voir le taux d'éclosion modifié dans le groupe OAB puisque les conditions du couvoir et d'incubation ont plus d'influence que la qualité de l'œuf. Il n'est pas évident de faire une corrélation aux résultats commerciaux puisque le taux d'éclosion était calculé utilisant des œufs confirmés fertiles, plutôt que tous les œufs collectés et classés, mais les résultats sont similaires à la cible de 88%, telle que indiqué dans le guide des reproducteurs pour les Cobb 500.

L'OAB utilisé dans cette étude a préalablement démontré une capacité à améliorer la performance des poulets de chair à la suite d'un challenge *E.coli*, résultant dans une meilleure croissance et une meilleure morphologie gastro-intestinale (Emami *et al.*, 2017). Des améliorations dans le métabolisme des minéraux (Partanen et Mroz, 1999) et une amélioration dans l'intégrité de l'intestin pourraient se traduire par une amélioration dans le métabolisme de l'énergie chez les reproductrices et donc une meilleure qualité de l'œuf.

La performance observée des poulets de chair était similaires au standard attendu pour les Cobb 500 pour la prise d'aliment, mais le gain de poids total et l'IC se sont finis en-dessous. Ceci pourrait être lié à l'environnement du site d'élevage et la qualité de l'aliment, puisque l'essai a eu lieu dans des conditions commerciales au Brésil ; la température élevée du bâtiment et le pourcentage d'humidité élevé ont peut-être eu un effet négatif.

Les poulets de chair issus des reproductrices ayant consommé l'OAB ont cependant eu une amélioration dans le gain de poids total et l'IC pendant les 42 jours d'élevage, comparés au groupe contrôle. Ceci pourrait être le résultat d'une amélioration dans la qualité des poussins venant des reproductrices ayant consommé l'OAB.

Il serait intéressant d'étudier si l'utilisation des acides organiques dans l'aliment des reproductrices pourrait conférer d'autres avantages à la performance de leur progéniture.

Tableau 1- Données de Performance des Reproductrices à 45 semaines d'âge

	Contrôle	OAB	SEM	P-Value
Production (%)	71,27	71,85	12,57	0,894
Fertilité (%)	94,32 ^b	96,64 ^a	1,41	0,038
Tx d'Eclosabilité (%)	86,04	86,26	13,98	0,660

*Un exposant dans la même ligne dénote une différence statistiquement significative.

Tableau 2- Performance de la progéniture à 42 jours

	Contrôle	OAB	SEM	P-Value
Consommation (g)	5127	5118	57	0,326
Gain de poids (g)	2842 ^b	2934 ^a	26	0,024
IC (g/g)	1,80 ^b	1,74 ^a	0,04	0,033

*Un exposant dans la même ligne dénote une différence statistiquement significative.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Broom L.J, 2015. Poult. Sci., (71) 630- 642.
- Cobb 500 Breeder Management Guide. Revised 2016 cobb-vantress.com
- Cobb 500 Broiler Management guide. Revised 2013 cobb-vantress.com
- Emami N.K., Daneshmand A., Naeini S.Z., Graystone E.N., Broom L.J., 2017. Poult. Sci., 96(9), 3254-3263.
- Mani-Lopez, E., García, H.S. and López-Malo, A., 2012. Food Res. Int., 45(2), pp.713-721.
- Partanen K.H., Mroz Z., 1999. Nutrition Research Reviews 12(1), 117-145.
- Rostagno H.S., Albino L.F.T., Donzele J.L., Gomes P.C., de Oliveira R.F., Lopes D.C., Ferreira A.S., de Toledo Barreto S.L., Euclides R.F., 2011. In: Brazilian Tables for Poultry and Swine, 3rd Edition, Universidade Federal de Viçosa-Departamento de Zootecnia, Brazil.
- Van Immerseel, F., Russell, J.B., Flythe, M.D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R., 2006. Avian Pathol., 35(3), pp.182-188.

UTILISATION D'UN SYSTEME D'ANALYSE DE SEMENCE ASSISTE PAR ORDINATEUR POUR LA PREDICTION DE LA FERTILITE EN POULE PONDEUSE

Belletante Stéphane¹, Camus Agnès², Fablet Julien¹, Faure Mailys¹

¹*HENDRIX GENETICS – 1 rue Jean Rostand - 22440 PLOUFRAGAN,*

²*IMV Technologies – ZI 1 Est - 61300 L'AIGLE*

Stephane.belletante@hendrix-genetics.com

RÉSUMÉ

La réussite d'inséminations artificielles dépend de la qualité de la semence. La semence de volaille est aujourd'hui moins caractérisée en routine que celle d'autres espèces. Les systèmes d'analyse de semence assisté par ordinateur (CASA- Computer Assisted Semen Analysis) constituent une méthode objective et standardisée pour caractériser la semence. Cependant les algorithmes ne sont pas encore totalement adaptés pour les spermatozoïdes (spz) de volailles.

Cette étude a pour but d'une part d'évaluer la corrélation entre les paramètres in vitro de la semence de coqs par le système CASA et la fertilité et d'autre part, de déterminer une notation synthétique individuelle de qualité de semence en tant qu'outil d'aide à la prédiction de la fertilité des coqs.

Lors de cette étude, 2 groupes de 115 et 120 coqs ont été utilisés. À partir de la troisième collecte, la semence des différents coqs a servi pour inséminer individuellement différents lots de poules. La mise en incubation des œufs a permis d'obtenir la fertilité apparente et la fertilité vraie. Les paramètres obtenus par le système CASA ont été comparés en fonction de ces fertilités (proportion de différents types de spermatozoïdes, vitesse, taille, etc.). L'analyse statistique a été effectuée grâce à des tests de corrélation en utilisant les résultats pour chaque coq.

L'étude a permis de démontrer que certains paramètres sont corrélés à la fertilité vraie (proportion des différentes catégories de spermatozoïdes, fréquence moyenne des mouvements de tête et surface des spermatozoïdes). Une notation corrélée à la fertilité a ainsi pu être obtenue ($R^2 = 0,8$ pour la fertilité vraie et $R^2 = 0,7$ pour la fertilité apparente).

Cette étude a permis de confirmer que les systèmes CASA peuvent être des outils d'aide à la prédiction de la fertilité des coqs utilisés pour l'insémination artificielle des lignées de poules pondeuses.

ABSTRACT

Use of computer assisted semen analysis (CASA) for predicting layer fertility

The success of artificial inseminations depends on the quality of semen. Poultry semen is nowadays less analysed routinely than other species. Automatic semen analysers (CASA- Computer Assisted Semen Analysis) are therefore an objective and standardised alternative for characterizing semen. However, these are parameterized for the morphology of mammalian spermatozoa nevertheless those of poultry are very different.

In this study, the objectives are first to determine the characters correlated with fertility and then to determine a predictive notation of fertility.

As part of the study, 2 groups of 115 and 120 roosters have been used. From the different third harvest, the semen of the various roosters was also used to inseminate individually different pools of hens. Eggs incubated allowed us to obtain apparent fertility and true fertility. The different characters obtained by the analyser were compared according to these fertilities. The statistical analysis was conducted through correlation tests using the results for each rooster.

The study demonstrated that some traits were correlated with true fertility (proportion of different types of sperm, average frequency of head movements and surface area of sperm). A correlated rating with fertility was thus obtained: $R^2 = 0,8$ with true fertility and $R^2 = 0,7$ with apparent fertility.

This study allows us to confirm that semen analysers could predict the fertility of rooster on laying hen lines for artificial insemination.

INTRODUCTION

Les insémination artificielles (IA) en volaille sont majoritairement réalisées à partir de doses issues de pool de semence. Dans le cadre de la sélection des lignées pures, les IA sont réalisées à partir de doses issues d'éjaculats individuels. Différentes méthodes existent pour qualifier la semence des coqs. Cependant, celles-ci ne sont pas répétables et sont dépendantes du facteur humain. Cette étude propose de déterminer les meilleurs coqs de manière précoce pour la reproduction afin de maximiser le nombre d'œufs fécondés. Il existe aujourd'hui un système CASA constitué d'un microscope relié à un logiciel d'acquisition et traitement des images permettant une qualification objective de la semence. Cette machine est principalement utilisée en routine dans les centres de production de semence bovin, porcin et équin, et dans les centres de recherches. Le paramétrage du logiciel en semence avicole permet une bonne analyse des cinétiques et de la concentration toutefois n'est pas encore aussi abouti que celui en mammifère pour l'analyse morphologique.

De nombreux critères environnementaux peuvent faire varier la qualité de la semence comme l'âge, l'alimentation, la durée de lumière, le nombre de prélèvements, les entraînements, etc. (Sauveur, 1988). Avant l'âge de 37 semaines, la qualité de la semence n'est pas stable (Cooper, 1965; Weil et al., 1999; Parker et al., 2002).

Par ailleurs, les entraînements constituent une partie très importante dans la vie d'un coq reproducteur en insémination artificielle (Cooper, 1965; Sauveur, 1988). Les animaux vont pouvoir s'habituer à cette manipulation et leur semence analysée permettra d'identifier les animaux capables de produire le maximum de semence de bonne qualité. Des études similaires ont été réalisées sur d'autres espèces avicoles et ont donné des résultats satisfaisants notamment sur le pigeon, la caille et la dinde (King et al., 2000; Klimowicz et al., 2008; Farooq et al., 2018). L'objectif de cette étude est d'évaluer la corrélation entre les paramètres du CASA et la fertilité des coqs permettant ainsi de créer un outil d'aide à la prédiction de la fertilité via une notation synthétique individuelle de qualité de semence.

MATERIEL ET METHODES

Pour cette étude, deux groupes de coqs ont été utilisés, le premier de 115 et le second de 120 animaux âgés de 23 semaines chacun. Les coqs ont tous été identifiés avec un numéro individuel. La semence des individus du premier groupe a été analysée à partir de la première récolte jusqu'à la troisième. Les analyses des premières récoltes ont permis de démontrer que la qualité de semence était optimale à partir de la

troisième récolte. La quatrième, la septième et la huitième récolte ont été analysées et utilisées pour les calculs des corrélations. Pour le second groupe, seules les données de la sixième et la septième récolte ont pu être analysées et utilisées pour les calculs des corrélations.

Pour chaque analyse, la semence a été conservée à température ambiante.

L'analyse de la qualité de la semence a été effectuée grâce à l'analyseur CEROS II (Hamilton Thorn, Boston USA). Pour cela, la semence a été diluée avec le milieu de conservation de semence (réf 020070 IMV, l'Aigle -France) à 50/50. Un échantillon de 10 microlitres a été prélevé après dilution. Enfin, ce mélange a été dilué dans 2 millilitres de dilueur (Embryo Holding medium ref 019449 IMV, l'Aigle France). Chaque échantillon dilué (3 microlitres) est monté par capillarité dans une chambre d'analyse d'une lame Leja de 20 µm de profondeur, préchauffée à 37°C. Pour chaque échantillon, un minimum de 400 spermatozoïdes (spz) ou 8 champs a été analysé. Pour chaque capture le playback a été vérifié pour s'assurer de la bonne détection des spz afin de garantir sa qualité et sa fiabilité.

La semence des coqs a été utilisée pour inséminer individuellement un lot de poules 2 fois par semaine en suivant la méthode classique (Burrows, Quinn, 1937). Brièvement, les coqs ont été massés sur la partie cloacale puis une pression sur le cloaque a été appliquée pour récolter la semence dans un tube annoté et préalablement rempli de milieu pour semence (réf 020070 IMV, l'Aigle -France).

Les œufs ont été numérotés lors du ramassage avec l'identifiant correspondant à chaque coq.

Par la suite, les œufs ont été incubés 18 jours. Lors du 18^{ème} jour, les œufs ont été mirés et les œufs fécondés ont été placés en éclosiers. Cela a permis d'obtenir la fertilité apparente.

$$\text{taux de fertilité apparente} = \frac{\text{nombre d'œufs gardés au mirage}}{\text{nombre d'œufs total}}$$

Les œufs non gardés ont été analysés un par un. Les œufs fécondés avec morts embryonnaires ont été ainsi additionnés aux autres œufs fécondés pour obtenir la fertilité vraie. Les œufs non éclos ont aussi été vérifiés afin de savoir si certains pouvaient être non fécondés.

L'analyseur nous a permis d'obtenir les données suivantes :

- La proportion de spz progressifs qui sont caractérisés par une vitesse élevée avec une trajectoire linéaire. Ce sont les plus importants pour la fécondation. En effet lors de compétition de semence, ce sont les spz les plus motiles qui vont pouvoir migrer vers les SST (sperm storage tubule) ; (Birkhead et al., 1999).
- La proportion de spz motiles, ayant une vitesse intermédiaire.
- La proportion de spz lents.
- La proportion de spz statiques.

- La proportion de spz avec un défaut de trajectoire.
- La proportion de spz avec des défauts de morphologie (5 catégories).
- La fréquence de mouvement des spz.
- La taille des spz.

Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée sous XLSTAT (Data Analysis and Statistical Solution for Microsoft Excel; Addinsoft, Paris, France, 2017.6). Pour toutes les données mesurées, les moyennes, les médianes et les écarts-types ont été calculés. Une analyse de la variance a été réalisée sur les résultats des 2 groupes de coqs. Des tests de corrélation entre les différents caractères et la fertilité vraie et apparente ont été réalisés. Par la suite, des régressions linéaires ont été réalisées entre la note synthétique obtenue à l'issue des résultats de l'analyse de semence et les taux de fertilité.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les corrélations entre les principaux caractères retenus et la fertilité vraie des différents coqs sont présentées dans le tableau 1. Les caractères sélectionnés étaient ceux présentant les corrélations les plus élevées ou avec une importance particulière vérifiée dans la bibliographie. L'un d'eux est la proportion des différents spz. En effet, plus un spz est motile, plus il a de chance d'être stocké dans les tubules des SST (Birkhead et al., 1999) et donc d'être utilisé pour la fécondation contrairement aux statiques ou aux lents. Le nombre total de spz est également primordial puisque plus il y a de spz, plus il y a de chance d'obtenir une fécondation jusqu'à un certain seuil (Sauveur, 1988). La proportion de spz présentant des anomalies morphologiques est utile puisqu'ils ne pourront atteindre les SST.

Les caractères importants pour la fécondation sont corrélés entre la fertilité et l'analyse du système CASA (de 0,218 à 0,562).

Dans le but de simplifier l'indication de qualité de semence pour chaque coq, une méthode de notation a été déterminée. Le tableau 2 récapitule la manière de noter la qualité de la semence (note sur 40 points). Cette notation a été effectuée pour le premier groupe à partir des données issues des récoltes 4, 7 et 8 ; et pour le second groupe des récoltes 6 et 7.

L'équation de la note totale est la suivante :

$$\begin{aligned}
 &\text{note totale} \\
 &= \text{note spermatozoïdes motiles} + 2 \\
 &\quad * \text{note spermatozoïdes progressifs} \\
 &\quad + \text{note spermatozoïdes lents} \\
 &\quad + \text{note spermatozoïdes statiques} + 2 \\
 &\quad * \text{note compte de spermatozoïdes} \\
 &\quad + \text{note spermatozoïdes présentant des malformations} \\
 &\quad + \text{note fréquence de mouvement} \\
 &\quad + \text{note taille des spermatozoïdes}
 \end{aligned}$$

Le coefficient 2 a été attribué aux caractères considérés comme les plus importants : la proportion de spz progressifs et le nombre total de spz.

Afin de prédire la fertilité, les corrélations entre cette notation et la fertilité vraie, ainsi que la fertilité apparente de chaque coq ont été calculées et sont présentées sur la figure 1 et la figure 2. Les notes sont corrélées avec la fertilité vraie ($R^2 = 0,8$) et la fertilité apparente ($R^2 = 0,7$). La notation liée à la fertilité vraie permet ainsi de prédire précocement la fertilité des coqs après des entraînements.

La figure 3 représente les notes des deux groupes de coqs en fonction de leur fertilité. Les deux groupes étaient différents. Le second groupe de coq a présenté en moyenne une semence de meilleure qualité (anova $p < 0,0001$).

Cette méthode permet de déterminer des effets inter groupe et intra groupe.

Les résultats confirment que plus la semence est de bonne qualité, plus la fertilité sera élevée au couvoir. Cependant, des améliorations pourraient être réalisées sur l'analyseur. En effet, il serait logique que la fréquence de mouvement soit corrélée positivement avec la fertilité alors que l'inverse a été observé. Le paramétrage du logiciel en semence avicole n'est pas encore aussi abouti que celui en mammifère pour l'analyse morphologique. Les spz de volailles ont en effet de nombreuses différences de morphologie avec ceux de mammifères. Ainsi tous les spz avec des malformations ne sont pas détectés et certaines malformations des mammifères ne sont pas présentes chez les oiseaux.

Après ces améliorations, la prédiction de la fertilité pourra sans doute être améliorée.

CONCLUSION

La fertilité des coqs peut être prédite précocement grâce à l'utilisation d'un système CASA et la détermination d'une notation. Cela permettrait de mieux utiliser les coqs pour les inséminations individuelles artificielles. Les paramètres utilisés sont fiables pour l'analyse, bien que des améliorations soient souhaitables pour l'analyse de la morphologie des spz.

Des essais additionnels pourraient permettre d'évaluer si cette notation est fiable tout au long de la vie des coqs sur des cycles plus longs et une utilisation non continue.

REMERCIEMENTS

Ce projet a été mené à bien grâce à la participation de Clément Duquenoy d'IMV Technologies ainsi que ses collègues. Je souhaite aussi remercier tous les collaborateurs d'Hendrix Genetics qui ont participé aux essais, que ce soit dans les fermes ou dans le département Recherche et Développement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Birkhead T. R., Martínez J. G., Burke T., Froman D. P., 1999. Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society 266(1430): 1759–1764.
- Burrows, W. H., and Quinn J. P., 1937. Poult. Sci. 16(1): 19–24.
- Cooper, D. M., 1965. World's Poult. Sci. J. 21(1): 12–22.
- Farooq U., Malecki I., Mahmood M., Martin G. B., 2018. Theriogenology 115: 23–29.
- King L. M., Holsberger D. R., Donoghue A. M., 2000. Journal of Andrology 21(1): 65–71.
- Klimowicz, M. D., Nizanski W., Batkowski F., Savic M. A., 2008. Theriogenology 70(1): 77–82.
- Parker H. M., Karaca A. G., Yeatman J. B., Frank L. R., McDaniel C. D., 2002. Poult. Sci. 81(2): 239–245.
- Sauveur B., 1988. In : Reproduction des volailles et production d'oeufs. Paris.
- Weil S., Rozenboim I., Degen A. A., Dawson A., Friedländer M., Rosenstrauch A., 1999. General and Comparative Endocrinology 115(1): 23–28.

Tableau 1 : Corrélation entre les différents caractères retenus et la fertilité vraie

Données recueillies	Unités	Corrélation avec la fertilité vraie
Proportion de spermatozoïdes motiles totale	%	0,562
Proportion de spermatozoïdes progressifs	%	0,305
Proportion de spermatozoïdes lents	%	0,425
Proportion de spermatozoïdes statiques	%	- 0,562
Compte total de spermatozoïdes	Nombre	0,218
Proportion de spermatozoïdes avec malformations	%	0,047
Moyenne fréquence de mouvements	Nombre	- 0,348
Moyenne taille spermatozoïdes motiles	Nombre	0,331

Tableau 2 : Notation de la qualité de semence de coq

Données recueillies		
Unité	Note	Coefficient
Proportion de spermatozoïdes motiles totale		
%	1 : de 0% à 25% - 2 : de 25,1% à 50% - 3 : de 50,1% à 75% - 4 : de 75,1 à 100%	1
Proportion de spermatozoïdes progressifs		
%	1 : de 0% à 25% - 2 : de 25,1% à 50% - 3 : de 50,1% à 75% - 4 : de 75,1% à 100%	2
Proportion de spermatozoïdes lents		
%	1 : de 0% à 25% - 2 : de 25,1% à 50% - 3 : de 50,1% à 75% - 4 : de 75,1% à 100%	1
Proportion de spermatozoïdes statiques		
%	1 : de 75,1% à 100% - 2 : de 50,1% à 75% - 3 : de 25,1% à 50% - 4 : de 0% à 25%	1
Compte total de spermatozoïdes		
Nombre	1 : de 0 à 100 - 2 : de 101 à 200 - 3 : de 201 à 300 - 4 : 301 ou plus	2
Proportion de spermatozoïdes avec malformations		
%	1 : 3,1% ou plus - 2 : de 2,1% à 3% - 3 : 1,1% à 2% - 4 : de 0% à 1%	1
Moyenne fréquence de mouvements		
Nombre	1 : 32 ou plus - 2 : de 30 à 31,9 - 3 : de 28 à 29,9 - 4 : 27,9 ou moins	1
Moyenne taille des spermatozoïdes		
Nombre	1 : 15,9 ou moins - 2 : de 16 à 16,9 - 3 : de 17 à 17,9 - 4 : 18 ou plus	1
Total	40	

Figure 1 : Taux de fertilité vraie en fonction de la note totale

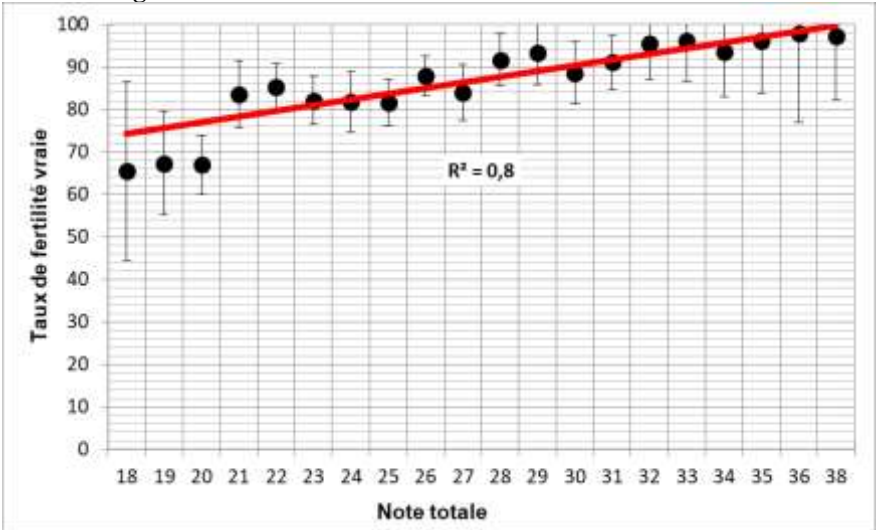


Figure 2 : Taux de fertilité apparente en fonction de la note totale

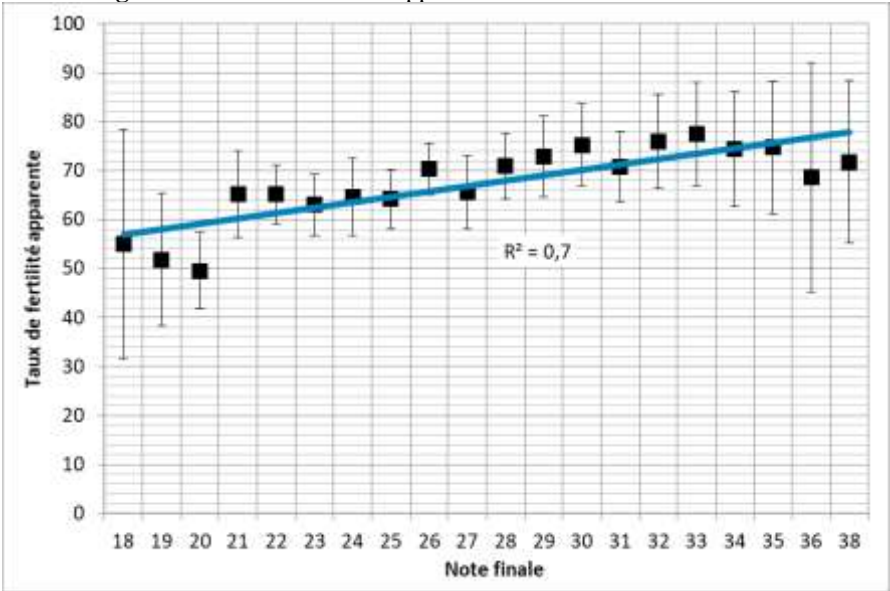
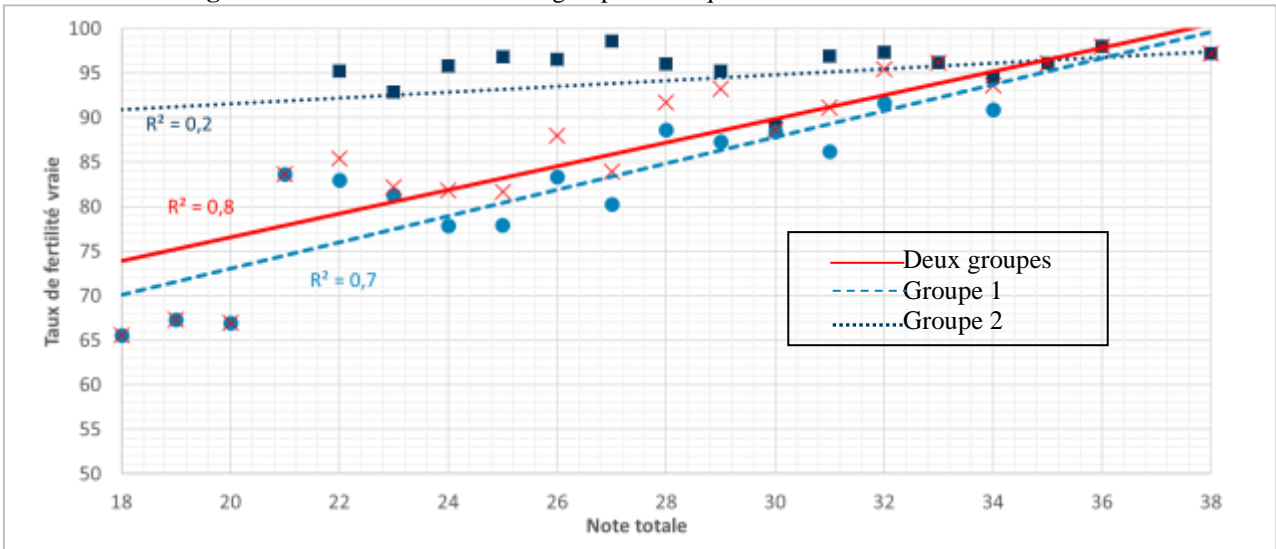


Figure 3 : Fertilité vraie des deux groupes de coqs en fonction de la note totale



CRYOPRESERVATION DE SEMENCES DES ESPÈCES AVICOLES ET ILLUSTRATION D'UN EXEMPLE DE VALORISATION.

**Reverchon Maxime¹, Bailliard Amélie¹, Seigneurin François¹, Gourichon David²,
Baumard Yannick², Zerjal Tatiana³, Duclos Delphine⁴, Grasseau Isabelle⁵, Blesbois
Elisabeth⁵, Tixier-Boichard Michèle³, Guémené Daniel¹, Thélie Aurore⁵**

¹*SYSAAF, Centre INRA Val de Loire, UMR BOA, 37380 NOUZILLY*

²*INRA, UE PEAT, Centre Val de Loire, 37380 NOUZILLY*

³*INRA, UMR GABI, 78352 JOUY-EN-JOSAS*

⁴*Secrétariat exécutif de la Cryobanque Nationale, IDELE, 149 rue de Bercy, 75595 PARIS
CEDEX 12*

⁵*INRA, UMR PRC, Centre Val de Loire, 37380 NOUZILLY*

maxime.reverchon@inra.fr

RESUME

Le programme d'infrastructure CRB-Anim soutient l'enrichissement des collections de la cryobanque nationale, dont la cryoconservation de ressources génétiques aviaires. Les collections d'espèces avicoles stockées dans la cryobanque nationale sont majoritairement constituées de semence de coqs de l'espèce Gallus, mais concernent aussi 4 autres espèces, la pintade, le canard de Barbarie, le canard Pékin et l'oie. La collection de semence aviaire compte aujourd'hui 47 383 paillettes. Les procédures de congélation de la semence avicole sont régulièrement testées et optimisées par les acteurs de la cryobanque. Dans cette étude, le taux (1/3 ou 1/4) de dilution de la semence avant congélation et la quantité (100, 200 ou 400 millions) de spermatozoïdes utilisés lors des inséminations artificielles (IA) ont été ré-évalués. Les résultats obtenus montrent de meilleurs taux de fertilité pour une dilution au 1/4. Les concentrations de 200 millions et de 400 millions de spermatozoïdes donnent des résultats de fertilité équivalents ; il est donc dorénavant recommandé d'utiliser la dose de 200 millions de spermatozoïdes pour des inséminations de sperme congelé. Les différentes améliorations apportées aux procédures de congélation du sperme de coq permettent aujourd'hui l'obtention de taux de fertilité par IA après décongélation compris entre 70 et 90%, en fonction des populations. L'intérêt de constituer ces collections est illustré par un exemple consistant en une réintroduction de diversité génétique au sein d'une population expérimentale ; la lignée INRA R+.

ABSTRACT

The CRB-Anim infrastructure program support the enrichment of the national cryobank collections for domestic species, including the poultry genetic resources cryopreservation. The poultry collections is mainly constitute of Gallus species samples, however collection from 4 others poultry species, namely Guinea fowl, Muscovy duck, Pekin duck and geese are also present. The National Cryobank collection of poultry species sperm samples count nowadays 47 383 straws. Poultry semen freezing and defrosting prior AI procedures are regularly tested in order to optimized collection stock use and management. In this study the sperm dilution rate (1/3 or 1/4) before freezing and sperm number (100, 200 ou 400 millions) used for artificial insemination (AI) have been re-evaluated within the CRB-Anim program. Thus fertility rate of hens inseminated either with frozen/thawed semen diluted prior freezing at 1/3 or 1/4 or at final concentrations (100, 200 or 400 million of spermatozoas/ml) has been determinated. Results show that the best fertility rate were obtained for the 1/4 sperm dilution. On the other hand, the concentration of 200 million and 400 million spermatozoa give equivalent fertility results, so the 200 millions spermatozoa dose is recommended for artificial insemination with frozen sperm. Consequently, rooster sperm freezing process and usage procedure improvement currently allow for fertility rates after thawing ranging between 70 to 90%, depending upon the genotype. One value of compiling these collections is illustrated by an example consisting in a genetic diversity reintroduction within an experimental population; the INRA R+ line.

INTRODUCTION

L'objectif du programme CRB-Anim est d'intégrer et de renforcer les Centres de Ressources Biologiques (CRB) conservant du matériel reproductif et du matériel génomique pour les espèces d'animaux domestiques élevées en France, mammifères, oiseaux, poissons et coquillages. Le réseau CRB-Anim associe des organismes publics de recherche et deux plateformes privées. Cette infrastructure nationale conserve aujourd'hui environ 530 000 échantillons biologiques (semence, embryons, cellules, tissus, ADN et ARN).

Dans le cadre du projet CRB-Anim, une collection de semence de volailles d'intérêt agronomique issues de populations expérimentales ou commerciales, ainsi que de races locales a été constituée et stockée dans la cryobanque nationale. Aujourd'hui, cette collection de semence concerne 5 espèces de volailles (Gallus, pintade, canard de Barbarie, canard Pékin et oie).

La procédure de congélation de la semence de coqs Gallus a été établie en 1995 (Seigneurin et Blesbois, 1995). Elle assure la qualité et la traçabilité des échantillons collectés. Grâce à la mise au point de méthodes de congélation spécifiques de la semence du jar, des canards Pékin et de Barbarie, puis de celle des pintades, la collection a été élargie à ces 4 autres espèces avicoles (Lemoine *et al.*, 2011 ; Seigneurin *et al.*, 2013). Afin d'optimiser la qualité de la semence cryopréservée, deux paramètres du protocole ont été ré-évalués ; le taux de dilution de la semence lors de la congélation et la quantité de spermatozoïdes utilisés lors des inséminations artificielles (IA).

Les utilisateurs réguliers de la congélation de sperme diluent l'éjaculat au 1/4 avant congélation. Ils ont souvent fait remarquer qu'une réduction du taux de dilution du sperme de 1/4 à 1/3 présenterait de nombreux avantages pour des raisons pratiques (diminution du nombre de paillettes, diminution du coût du processus ...). Etant donné que la quantité de cryopréservateur utilisée pour la congélation de semence est dépendante du volume final (11% du volume final), si le taux de dilution final est diminué, la quantité de cryoprotecteur sera également réduite. Ainsi, les taux de fertilité obtenus avec du sperme congelé/décongelé aux dilutions de 1/4 et 1/3 ont été comparés.

La quantité de sperme inséminé affecte le nombre de spermatozoïdes stockés dans les glandes utéro-vaginales du tractus femelle, une augmentation de cette quantité entraîne une baisse

de la fertilité et une diminution de la durée de la période fertile (Taneja et Gowe, 1962; Blesbois et Brillard, 2007). Avec de la semence fraîche, l'optimum de fertilité est obtenu avec 100 à 200 millions de spermatozoïdes par insémination (Brillard, 1986; Brillard *et al.*, 1989). Il est estimé que la moitié du sperme meurt lors des étapes de congélation/décongélation et Lofti *et al.* (2017) ont mis en évidence que le nombre de 100 millions de spermatozoïdes congelés/décongelés par IA induit un taux de fertilité inférieur (40%). A l'inverse, une forte concentration en spermatozoïdes inséminés frais ou décongelés (500 à 700 millions) peut être problématique, car elle cause un rejet partiel de la semence par la femelle après IA et se solde par un faible taux de fertilité. La dose habituellement recommandée lors des IA avec de la semence congelée/décongelée étaient de 400 millions de spermatozoïdes. Cette dose a été comparée avec les doses de 100 et 200 millions afin d'étudier quelle quantité permettrait d'obtenir les meilleurs résultats de fertilité.

L'intérêt de constituer cette banque est illustré par un exemple de l'utilisation de semences cryopréservées qui a eu lieu en 2016. Il s'agissait de sauvegarder la lignée INRA R+, une population expérimentale précieuse, mais fortement consanguine et, pour ce motif, difficile à maintenir *in vivo*. Afin de pallier à ces difficultés de reproduction, il a été décidé de réintroduire de la diversité génétique en utilisant des paillettes de semence cryopréservées depuis 2003.

L'objectif de cet article est d'informer sur l'état des stocks de semences des espèces avicoles présents dans les collections de la cryobanque nationale et de présenter quelques évolutions récentes des modalités techniques d'utilisation.

MATERIELS ET METHODES

Cryopréservation de semences aviaires

Avant collecte de la semence pour cryopréservation, les mâles sont sélectionnés sur différents critères de qualité (pourcentage de spermatozoïdes viables, motiles, morphologiquement normaux et la motilité massale). Ces données ont une valeur prédictive quant à l'aptitude des spermatozoïdes à la cryopréservation (Blesbois *et al.*, 2008).

La récolte du sperme est effectuée par un massage dorso-abdominal (Burrows et Quinn, 1935). Le sperme est déposé dans un tube collecteur contenant 200 µl de dilueur Lake PreCongélation (LPC ; Lake et Stewart, 1978). Il est recommandé de ne pas

collecter plus de 8 coqs par série de congélation car le sperme de coqs se dégrade très rapidement. Le sperme est ensuite dilué au 1/2 puis placé à 4°C sous agitation pendant 10 minutes. Il est alors dilué au 1/4 et mélangé au cryoprotecteur glycérol sous agitation à 4°C pendant 10 minutes. Pour finir, le sperme est introduit par aspiration dans des paillettes de 500µl. Ces paillettes sont préalablement gravées avec un identifiant intégrant le numéro du coq, l'espèce, la lignée et l'année de naissance. Après remplissage des paillettes, une bulle d'air est placée à l'extrémité de chacune d'entre elles grâce à un peigne à bulle sur lequel elles sont déposées. Les paillettes sont ensuite scellées avec de la poudre d'alcool polyvinylique, puis placées sur un rack, prêtes à être congelées. La vitesse de congélation est égale à 7°C/min de 4°C à -35°C, puis à 60°C/min de -35°C à -140°C. La température du congélateur est ensuite descendue manuellement jusqu'à -160°C et les paillettes stockées dans un container d'azote liquide. Une fois la collection de paillettes terminée, ces dernières sont transférées vers les sites de stockage primaire et secondaire (Thélie *et al.*, 2018).

Optimisation de la procédure de congélation/décongélation de la semence de coq

La procédure de congélation/décongélation décrite par Thélie *et al.*, (2018), a été reprise et deux dilutions de la semence juste avant congélation ont été testées (1/3 et 1/4). Le taux de fertilité obtenu avec ces paillettes après décongélation et IA a été mesuré.

La quantité de spermatozoïdes cryopréservés optimale à utiliser lors des IA a également été réévaluée. La dose habituellement préconisée de 400 millions de spermatozoïdes par IA a été comparée aux doses 100 et 200. Des poules T55 (SASSO) ont été inséminées deux fois, à 72h d'intervalle, avec du sperme congelé-décongelé en intravaginale (4cm de profondeur). Les œufs ont été collectés à partir des jours 2 à 5 après insémination. Les taux de fertilité (œufs fertiles / œufs incubés × 100) ont été évalués par un mirage des œufs 7 jours après le début de l'incubation.

Exemple d'utilisation de la cryobanque : réintroduction de diversité génétique dans la lignée expérimentale de Gallus INRA R+

Des coqs adultes de la lignée expérimentale R+ de l'INRA (Bordas *et al.*, 1992, Morisson *et al.*, 1997) ont été hébergés au sein de l'unité UE-PEAT (Centre INRA Val de Loire, Nouzilly, France) selon les modalités décrites précédemment (Thélie *et al.*, 2018). Afin de préserver cette lignée, des IA

ont été effectuées avec de la semence de coqs R+ congelée antérieurement (Thélie *et al.*, 2018).

RESULTATS ET DISCUSSION

La collection du site primaire de la cryobanque nationale de sperme de coqs Gallus contient 44 populations, correspondant à la semence de 894 coqs, soit 21426 paillettes. Une collection miroir équivalente est stockée à des fins de sécurisation sur le site secondaire du Centre INRA Val de Loire à Nouzilly. Le stock global, pour les 2 sites, représente 43207 paillettes de semences individuelles de coqs Gallus. Cette collection est complétée par de la semence de 4 autres espèces avicoles (canards de Pékin et de Barbarie, pintade et oie), ce qui fait un stock total de 47 383 paillettes de semence aviaire cryopréservées (Tableau 1).

L'amélioration des procédures de congélation du sperme de coq avec glycérol permet d'obtenir aujourd'hui des taux de fertilités par IA après décongélation très encourageants, puisqu'ils sont compris entre 70 et 90%, suivant les populations (Thélie *et al.*, 2018). Les améliorations récemment apportées au protocole concernent la dilution finale de la semence avant cryopréservation et la quantité de spermatozoïdes inséminés.

De meilleurs taux de fertilité après IA, mais non significativement différents, ont été obtenus avec la dilution au 1/4 (93%) comparée à la dilution au 1/3 (80%). Un tel résultat était inespéré et même s'il nécessite d'être confirmé, il permet cependant d'envisager l'utilisation de cette dilution au 1/4 en routine afin d'optimiser les stocks présents en cryobanque. Il suggère néanmoins la forte sensibilité du sperme de coq à l'environnement physicochimique. Il a été montré que le glycocalyx qui entoure et protège le sperme lors de l'éjaculation est en quantité moindre chez les oiseaux par rapport aux mammifères (Froman et Engel, 1989 ; Tecle et Gagneux, 2015). Cela pourrait contribuer à expliquer la grande sensibilité du sperme de coq. Une autre hypothèse est que la disponibilité d'agent cryoprotectant serait plus élevée avec une dilution de 1/4 comparé à 1/3, permettant un niveau de protection des spermatozoïdes plus élevé pendant le processus de congélation (Thélie *et al.*, 2018).

Après insémination aux doses 100, 200 et 400 millions de spermatozoïdes cryopréservés par femelle, un taux de fertilité similaire a été obtenu lorsque la quantité de spermatozoïdes était divisée

par deux, de 400 à 200 millions (Thélie *et al.*, 2018). L'utilisation de cette dose de 200 millions de spermatozoïdes est donc maintenant recommandée par la cryobanque nationale. C'est un avantage notamment pour les populations à petits effectifs pour lesquelles le nombre de paillettes de semence disponibles peut-être limité. Les résultats de cette étude montrent qu'il est possible d'optimiser les conditions d'usage de la semence cryopréservée de coq tout en obtenant des taux de fertilité proches de ceux obtenus avec de la semence fraîche lors des IA. Néanmoins, il conviendra de s'assurer que ce résultat est reproductible avec des races locales de volailles dont la fertilité est plus faible.

Un exemple concret d'utilisation de la cryobanque a été réalisé grâce à l'opération de sauvegarde de la lignée expérimentale INRA R+. Pour réintroduire de la diversité génétique, la semence de 6 coqs cryopréservée en 2003 avec la méthode glycérol, représentant deux des trois familles perdues a été utilisée. Après IA de poules R+ âgées de 40 à 50 semaines, 23 poussins ont été obtenus en dépit d'un taux de fertilité très faible (8,7%), les 2 familles de la lignée R+ ont été récupérées. Ce faible taux de fertilité était attendu puisqu'il n'était que de 35 à 50% en sperme frais et s'explique par la forte consanguinité de cette lignée. Cette étude fait pour la première fois la preuve que les paillettes de semence peuvent être stockées plusieurs années et le sperme conserver son pouvoir fécondant chez l'espèce Gallus. Cet exemple, illustre bien l'intérêt de sécuriser les populations d'intérêt en cryobanque, mais montre une très forte variabilité individuelle de la fertilité de la semence décongelée (entre 1,8% et 16,2% pour l'exemple cité). Il est donc nécessaire de continuer les recherches pour mieux maîtriser la fertilité après décongélation, en particulier chez les populations consanguines, ou alors développer des méthodes de prédiction permettant de choisir les coqs sur leur aptitude à la cryopréservation.

CONCLUSION

La constitution de collections n'étant pas une fin en soi pour les gestionnaires de la cryobanque, les objectifs de leur valorisation potentielle sont de (1) sécuriser des populations d'intérêts, (2) reconstituer des races ou des populations avec de la semence « ancienne », éventuellement pour retrouver des gènes d'intérêts perdus, (3) réintroduire de la variabilité génétique au sein de populations d'intérêt menacées de disparition, (4) ou encore constituer un éventuel mode de transport pour une utilisation à distance ou décalée temporellement.

L'exemple d'utilisation des stocks de la cryobanque mis en œuvre en 2016 pour la population INRA R+, illustre bien l'un de ces objectifs. Des collections de semence ont également été constituées, parfois dans l'urgence, pour des populations commerciales de l'espèce Gallus et pintade, ou encore pour des races locales comme la Géline de Touraine et la Coucou de Rennes, alors que leur renouvellement a été interrompu ou potentiellement menacé lors de la crise de l'influenza aviaire. En parallèle de chaque collecte de semence stockée en cryobanque, un échantillon de sang est collecté pour chaque donneur et stocké au CRB@BRIDGE localisé sur le Centre INRA de Jouy-en-Josas. Cette échantillon peut permettre au besoin la réalisation d'analyses génomiques sans nécessiter l'utilisation d'une paillette de semence pour extraire de l'ADN. En complément du programme CRB-Anim, les programmes, BioDivA (Financement CASDAR) et ValBioDi (Financement Région Centre) ont permis d'entrer en collection 12435 échantillons de sang, d'ADN et de tissus issus de 3953 animaux de 3 espèces (Gallus, dinde, pintade).

Les travaux méthodologiques conduits dans le cadre du programme CRB-Anim permettront d'optimiser les conditions d'utilisation de ces collections (dilution finale 1/4, dose inséminée 200 millions de spermatozoïdes par femelle). D'autres travaux s'orientent vers le développement de critères d'évaluation de la qualité de semence plus précis et plus fiables, notamment avec des analyses diagnostiques ICM-MS (Intact Cell MALDI-TOFF Mass Spectrometry). Ainsi, les travaux de Soler *et al.* (2016) montrent qu'il est possible de diagnostiquer la fertilité des mâles par une analyse ICM-MS par l'identification de marqueurs prédicteurs de la fertilité qui dispense de la réalisation d'un test de fertilité chronophage et coûteux avant congélation. Des travaux complémentaires vont être conduits pour explorer un potentiel caractère prédictif précoce de ces marqueurs. D'autres travaux à vocation finalisée visent à développer des méthodologies de cryopréservation qui puissent être déployées sur le terrain, alors que le stockage en paillettes individuelles nécessite actuellement un dispositif expérimental. Par ailleurs, les techniques de congélation de semence restent à développer pour plusieurs espèces avicoles comme la dinde, la caille, le faisan, les perdrix rouge et grise, ou encore le pigeon, autant d'espèces dont des populations font l'objet de programmes de sélection ou de gestion génétique et de production en France. Enfin, d'autres approches de sécurisation de la diversité génétique, comme par exemple la cryopréservation de cellules germinales

primordiales (PGCs) permettant également de parallèlement (Tonus C *et al.*, 2017).
préserver le chromosome W sont explorées

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Blesbois E, Seigneurin F, Grasseau I, Limouzin C, Besnard J, Gourichon D, Coquerelle G, Rault P, Tixier-Boichard M., 2007. Poult. Sci. 86(3):555-564.
- Blesbois, E, et J. P. Brillard., 2007. Animal. 1(10):1472–1481.
- Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F, Mignon-Grasteau S, Saint Jalme M, Mialon-Richard MM., 2008. Theriogenology. 69(2):252-261.
- Bordas A, Tixier-Boichard M, Merat M., 1992. Br. Poult. Sci. 33:741-754.
- Brillard, JP, 1986. Poult. Sci. 65(2):369– 374.
- Brillard, JP, McDaniel GR, De Reviers M, and Drane JW., 1989. Poult. Sci. 68(4):558–563.
- Burrows, WH, et JP Quinn., 1937. Poult. Sci. 16(1):19–24.
- Froman DP, et Engel H. N. Jr, 1989. Biol. Reprod. 40(3):615-621.
- Lake PE, Stewart JM., 1978. Br Poult. Sci. 19(2):187-94.
- Lake PE, et Ravie O, McAdam J., 1981. Br Poult. Sci. 22(1):71-7.
- Lemoine M, Mignon-Grasteau S, Grasseau I, Magistrini M, Blesbois E., 2011. Theriogenology. 75(1):122-30.
- Lofti S, Mehri M, Sharafi M. et Masoudi R., 2017. Anim. Reprod. Sci. 184:204–210.
- Morisson M, Bordas A, Petit J.M, Jayat-Vignoles C, Julien R, Minvielle F., 1997. Poult. Sci.76(3):425-431.
- Seigneurin F, et E Blesbois., 1995. Theriogenology. 43(8):1351-1358.
- Seigneurin F, Grasseau I, Chapuis H, Blesbois E., 2013. Poult Sci. 2013. 92(11):2988-96.
- Soler L, Labas V, Thélie A, Teixeira-Gomes AP, Grasseau I, Bouguereau L, Blesbois E., 2016. Mol. Cell. Proteomics. 15(6):1998-2010.
- Taneja GC, et RS Gowe., 1962. J. Reprod. Fertil. 4:161–174.
- Tecle E, et Gagneux P., 2015. Mol. Reprod. Dev. 82(9) :635-650.
- Thélie A, Bailliard A, Seigneurin F, Zerjal T, Tixier-Boichard M, Blesbois E., 2018. Poult Sci. 98(1) :447-455.
- Tonus C, Connan D, Waroux O, Vandenhove B, Wayet J, Gillet L, Desmecht D, Antoine N, Ectors FJ, Grobet L., 2017. Theriogenology. 15;88:197-206.

Espèce	Nombre de populations	Nombre de mâles	Nombre de paillettes	Modalité de stockage du sperme
Coq Gallus	44	894	43207	individuel
Pintade	2	96	1614	mélangé
Canard Pékin	5	155	1031	individuel
Canard de Barbarie	9	325	1164	individuel
Oie	2	102	367	mélangé

Tableau 1 : Bilan actualisé des collections de semence aviaire conservées dans la cryobanque nationale aviaire