

IDENTIFICATION DE GENES IMPLIQUES DANS LES VARIATIONS DE LA QUALITE DES VIANDES DE VOLAILLES : ETUDE DU TRANSCRIPTOME MUSCULAIRE CHEZ LE POULET

**Sibut Vonick^{1,2}, Hennequet Christelle¹, Le Bihan-Duval Elisabeth¹, Duclos Michel¹,
Berri Cécile¹**

¹INRA, UR83 Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly

²ITAVI, 37380 Nouzilly

RÉSUMÉ

Chez le poulet, les réserves musculaires en glycogène disponibles au moment de la mort, estimées par la mesure du Potentiel Glycolytique (PG), constituent un élément déterminant de la qualité technologique *via* leur effet sur le pH ultime (pHu) de la viande. L'objectif de cette étude est d'identifier grâce à des approches de génomique fonctionnelle les gènes à l'origine des variations de PG et donc de qualité de viande chez le poulet. L'étude a porté sur 3 dispositifs différents : des individus issus des lignées dites « maigre » (M) et « grasse » (G) sélectionnées pour diminuer ou augmenter le niveau d'adiposité abdominale et variant pour le PG ; des individus issus du croisement de seconde génération (F2MG) établi entre ces 2 lignées ; et des individus issus d'une souche commerciale de poulets lourds. Le transcriptome musculaire d'animaux à fort ou faible PG a été comparé au sein de chacun de ces dispositifs sur puces à oligonucléotides. L'analyse a révélé des différentiels d'expression pour 197, 254 et 52 gènes pour les populations MG, F2MG et Lourde, respectivement. La comparaison des 3 listes a mis en évidence une faible proportion de gènes communs ce qui suggère que les voies de régulation sous-jacentes aux variations de glycogène musculaire sont spécifiques à chaque modèle. Parmi ces gènes, environ 80% présentaient un orthologue humain et ont donc pu être inclus dans des études d'annotations. Celles-ci ont principalement mis en évidence des réseaux de gènes impliqués dans le contrôle des métabolismes glucidique, lipidique mais aussi protéique. Pour les gènes dont le différentiel d'expression aura été validé par qRT-PCR, des études de type e-QTL seront ensuite mises en œuvre sur le croisement F2MG afin de vérifier la relation entre l'expression du gène et la qualité de la viande. Cette étude constitue une première étape pour l'identification des gènes impliqués dans les variations de qualité de la viande chez le poulet. Les perspectives portent d'une part sur la recherche de polymorphisme au sein des gènes identifiés mais aussi sur l'étude de leur régulation par des facteurs d'élevage.

ABSTRACT

In chicken, the muscle glycogen content at death, estimated through the measure of the glycolytic potential (GP), constitutes a determining factor of the meat technological quality *via* its effect on the ultimate pH (pHu). The objective of this study is to identify the genes involved in variations of GP and more generally in meat quality by developing functional genomic approaches. The study was conducted on 3 different animal models: individuals from the 'Fat' and 'Lean' lines divergently selected for or against abdominal fatness and that also diverge on GP; individuals from the F2 crossing between these two lines (F2MG); and individuals from a commercial heavy line of chicken (Heavy). The gene expression profiles of the *Pectoralis major* muscle from chicken exhibiting high or low GP were compared within each population using microarrays. The analyses showed that 197, 254, and 52 genes were differentially expressed between low and high GP muscles for F2MG, MG and Heavy populations, respectively. A rather low number of differentially expressed genes was common between the 3 populations suggesting different pathways for controlling muscle glycogen content. Among the differential genes, about 80% had a human ortholog and were considered for further annotation analyses which principally identified pathways involved in the regulation of carbohydrate, fatty-acid and protein metabolism. For genes whose differential of expression would be validated by qRT-PCR, e-QTL analyses on the F2MG population will be performed to verify the relation between their expression and the meat quality variations. This study is a first stage for the identification of genes implied in the variations of poultry meat quality which would need further researches in particular on the polymorphism of genes identified but also on the study of their regulation by rearing factors.

INTRODUCTION

Dans un contexte où la consommation des produits de découpe et élaborés de volaille ne cesse d'augmenter, la maîtrise de l'aptitude à la conservation et à la transformation de la viande est un enjeu majeur pour les espèces avicoles. Chez le poulet, les réserves musculaires en glycogène disponibles au moment de la mort, estimé par la mesure du Potentiel Glycolytique (PG), constituent un élément déterminant de la qualité technologique *via* leur effet sur le pH ultime (pHu) de la viande. En effet, il existe une très forte corrélation génétique (-0,97) entre le PG et le pH ultime, lui-même fortement corrélé avec plusieurs indicateurs de qualité des viandes (couleur, pouvoir de rétention en eau, texture) (Berri *et al.*, 2007 ; Le Bihan-Duval *et al.*, 2008b). L'objectif de la présente étude était d'identifier grâce à une approche de génomique expressionnelle l'expression des gènes associés à des variations de PG et donc de la qualité. Ces approches, réalisées conjointement à une démarche de recherche de QTL, devraient à terme permettre d'optimiser les pratiques d'élevage des animaux pour améliorer la qualité des viandes de volaille, mais aussi de développer des outils d'aide à la sélection.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Dispositifs

L'étude a porté sur des animaux issus de différentes populations : les lignées de poulet dites « maigre » (M) et « grasse » (G) sélectionnées de façon divergente sur le niveau d'adiposité abdominale et variant pour le PG (Sibut *et al.*, 2008), le croisement de seconde génération (F2MG) entre les lignées M et G dont l'ensemble des individus a été caractérisé en termes de composition corporelle, de PG et de qualité du filet (Le Bihan-Duval *et al.*, 2008a), et une souche commerciale de poulets lourds (Berri *et al.*, 2007 ; Le Bihan-Duval *et al.*, 2008b). Le transcriptome du muscle *Pectoralis major* d'animaux à fort ou faible PG a été comparé entre les animaux des lignées maigre et grasse (dispositif MG), d'une part, et des animaux extrêmes en terme de PG issus du croisement F2MG (dispositif F2MG) et de la population commerciale lourde (dispositif lourd). Les caractéristiques musculaires et de qualité de la viande des groupes d'animaux étudiés sont rapportées dans le Tableau 1.

1.2. Préparation des échantillons

Au sein de chaque dispositif, deux groupes d'animaux extrêmes en terme de PG (PG- et PG+) ont été formés, avec n=8 par groupe pour les dispositifs F2MG et MG et n=10 pour le dispositif de poulets lourds. Pour chaque individu, les ARN ont été extraits

(RNeasy Midi Kit, Qiagen) à partir de 200 mg de muscle *Pectoralis major* préalablement broyé. Les ARN ont été quantifiés à l'aide du NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). Leur qualité a été estimée en évaluant les rapports d'absorbances 260/280 et 230/280 et le rapport des ARN ribosomiaux 28S/18S (Bio-Analyseur 2100, Agilent). Une transcription inverse a été réalisée à partir de 50µg d'ARN afin d'obtenir de l'ADNc selon le protocole « SuperScript™ PlusIndirect cDNA Labeling System » (Invitrogen). Afin d'éviter la confusion des effets entre le niveau (faible ou fort) de potentiel glycolytique (PG) et le marquage, chaque condition (PG+ et PG-) a été marquée alternativement avec un fluorophore vert (Alexa 555, Molecular Probes) et avec un fluorophore rouge (Alexa 647, Molecular Probes) selon un schéma en « dye-switch ». Les ADNc fluoromarkés ont ensuite été purifiés et dosés à l'aide du NanoDrop afin de quantifier le niveau d'incorporation des fluorophores.

1.3. Hybridation et Lecture

Les ADNc fluoromarkés de muscle pectoral ont été hybridés de façon dynamique, à l'aide du SlideBooster (Olympus Advantix), sur des lames à oligonucléotides ARK Genomics. Celles-ci ont été fournies par le CRB GADIE (INRA Jouy-en-Josas) et sont composées de 22000 dépôts uniques. La lecture, effectuée à l'aide d'un scanner GenePix Pro 6.0 (Axon Instrument), a permis d'obtenir une image composite de chaque puce. Sur cette image, la couleur des « spots » varie du vert au rouge en passant par le jaune, en fonction du niveau d'expression relatif pour chaque gène entre deux individus. Ainsi, un spot rouge indique une expression génique préférentielle dans l'échantillon marqué en rouge ; de même pour un spot vert. Un spot jaune indique quant à lui une expression génique équivalente dans les deux conditions. Ce logiciel crée pour chaque puce un tableau de type Excel® comprenant les valeurs brutes des intensités pour chaque fluorophore, corrigées ou non par le bruit de fond, et les rapports des intensités exprimés en log2, sur lesquels la suite de l'analyse des données est basée.

1.4. Traitement des données

Une étude descriptive sur les données d'expression de chaque lame a été réalisée sous le logiciel statistique R 2.6.1 afin d'apprécier la qualité des lames et la reproductibilité des expériences. La normalisation, de type Lowess par lame suivie d'une correction de la médiane par bloc, et l'analyse différentielle ont été effectuées sous R à l'aide du package Anapuce 2.0 (www.inapg.fr/ens_rech/maths/outil.html). L'analyse différentielle est basée sur un test de Student sur données appariées utilisant une variance estimée commune à tous les gènes. Elle a été réalisée sur les 3 dispositifs (MG, F2MG et Lourd). Les valeurs de « p- »

value » ont été corrigées par la procédure de tests multiples de Benjamini-Hochberg (BH) à 5%. Afin d'identifier les voies métaboliques et de signalisation impliquées dans le contrôle du glycogène musculaire, l'annotation des gènes différentiellement exprimés entre les 2 conditions (PG+ et PG-) et ayant un orthologue humain a été réalisée avec le logiciel « Ingenuity Analysis Pathways 6 » (Ingenuity System®, www.ingenuity.com).

2. RESULTATS & DISCUSSION

L'étude sur le transcriptome musculaire a été réalisée sur des animaux extrêmes en terme de PG issus de 3 populations de poulets présentant des caractéristiques de croissance et de composition corporelle différentes : une vitesse de croissance nettement supérieure pour les animaux du dispositif Lourd (abattus à 6 semaines) par rapport à celle des animaux MG et F2MG (abattus à 9 semaines) et une adiposité supérieure pour les animaux PG+ par rapport aux PG- dans les dispositifs MG et F2MG (Tableau 1). Par ailleurs les différences en terme de PG entre les groupes PG+ et PG- se traduisent par des variations cohérentes de pH ultime et de qualité (couleur et exsudat).

L'analyse du transcriptome a révélé 197 gènes différentiellement exprimés entre les animaux PG- et PG+ chez le modèle MG, 254 gènes chez le modèle F2MG et 52 gènes chez le modèle Lourd (Tableau 2). Les ratios d'expression entre les animaux PG+ et PG- sont compris entre 0,26 et 2,69. Parmi ces gènes différentiellement exprimés, assez peu étaient communs entre les différents modèles (Figure 1), ce qui suggère des mécanismes de régulation des réserves énergétiques musculaires spécifiques à chacun d'entre eux.

Actuellement, la validation par qRTPCR des différentiels d'expression observés sur puce est en cours. Cette validation concerne une vingtaine de gènes sélectionnés parmi les listes issues de l'analyse du transcriptome : ceux présentant les plus forts différentiels d'expression ou une fonction d'intérêt pour cette étude et les gènes communs entre au moins deux modèles. A cette liste s'ajoutent un certain nombre de gènes étudiés spécifiquement dans le cadre d'une approche « ciblée » sur le modèle des lignées maigre et grasse (Sibut *et al.*, 2008) et qui sont connus pour intervenir directement dans le contrôle des réserves en glycogène musculaire (AMPK, glycogène synthase, glycogène phosphorylase, phosphorylase kinase, etc.). Les premiers résultats de qRTPCR confirment l'existence de différentiels d'expression entre animaux PG+ et PG- pour plusieurs gènes. Parmi les gènes issus de l'approche ciblée (Sibut *et al.*, 2008), nous confirmons dans le modèle F2MG la sous-expression des sous-unités régulatrices $\beta 1$ et $\gamma 2$ de l'AMPK ainsi que de la sous-unité δ de la glycogène phosphorylase kinase (PHK δ) chez les

animaux présentant les réserves en glycogène les plus fortes (PG+). De même concernant les gènes issus de l'analyse du transcriptome, les premiers gènes validés sont pour la plupart sous-exprimés chez les animaux PG+ à fort potentiel glycolytique (Tableau 3).

Afin d'identifier les voies métaboliques, l'annotation à partir des gènes différentiellement exprimés a été réalisée. Pour cela, une recherche d'orthologues humains a permis d'annoter environ 80% des gènes différentiels. Nous avons pu identifier un certain nombre de voies intervenant notamment dans la régulation du métabolisme des glucides (glycolyse, néoglucogenèse, métabolisme du glycogène, des pentoses phosphate, du pyruvate, etc.) et des acides gras (Figure 2). Certaines voies de signalisation ont aussi été identifiées comme celles d'AKT, de mTOR, de PTEN, de la p70S6 Kinase et de l'insuline, qui contrôlent à la fois le métabolisme glucidique, lipidique et protéique.

CONCLUSION

Cette étude est la première à relier des expressions de gènes à des caractères de qualité de viande chez la volaille. Parallèlement à cette approche fonctionnelle, une recherche de QTL a été initiée sur le dispositif F2MG et a révélé des premières régions significatives pour la qualité. L'étape suivante sera l'intégration de l'ensemble des résultats obtenus *via* l'étude du transcriptome et la recherche de QTL afin d'établir une liste restreinte de gènes d'intérêt pour la qualité. La sélection de ces gènes se fera en prenant en compte différents critères, comme le niveau de différentiel d'expression entre animaux PG+ et PG-, les informations disponibles sur leur fonction chez différentes espèces ou leur éventuelle co-localisation avec les régions QTL de qualité. Pour les gènes sélectionnés, des approches de type e-QTL seront réalisées dans un premier temps dans le croisement F2MG, puis pour valider leur intérêt dans la population commerciale Lourde. Par la suite des études de polymorphisme seront envisagées afin d'identifier d'éventuelles mutations causales. A terme l'ensemble de ces études devrait permettre de développer des marqueurs génétiques utilisables pour la sélection et physiologiques pour améliorer des conditions d'élevage.

Remerciements : Cette étude a été développée dans le cadre du programme Genanimal QUALVIVOL (2006-2008) co-financé par l'ANR et le GIS AGENAVI. Mademoiselle Vonick Sibut bénéficie par ailleurs d'une bourse CIFRE.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Berri C., Le Bihan-Duval E., Debut M., Sante-Lhoutellier V., Baéza E., Gigaud V., Jégo Y., Duclos M.J. 2007. Journal of Animal Science, 85: 2005-2011.
- Le Bihan-Duval E., Berri C., Pitel F., Nadaf J., Sibut V., Gigaud V., Duclos M.J. 2008a. INRA Productions Animales, 21 : 159-166.
- Le Bihan-Duval E., Debut M., Berri C., Sellier N., Santé-Lhoutellier V., Jégo Y., Beaumont C. 2008b. BMC Genetics, 9 : 53.
- Sibut V., Le Bihan-Duval E., Tesseraud S., Godet E., Bordeau T., Cailleau-Audouin E., Chartrin P., Duclos M. J., Berri C. Journal of Animal Science , 86 : 2888-2896.

Tableau 1 : Caractéristiques du muscle *Pectoralis major* pour les trois dispositifs animaux

	MG (n= 8)		F2MG (n= 8)		LOURD (n= 10)	
	PG+	PG-	PG+	PG-	PG+	PG-
Poids vif (g)*	1765	1700	1891	1979	1890	2107
% filet	12,4b	13,4a	12,0	12,1	17,8	17,5
% gras abdominal	5,2a	2,6b	3,8a	2,9b	2,7	2,9
PG (µM/g équivalent lactate)	122a	91b	126a	78b	147a	80b
pH ultime	5,66b	5,84a	5,55b	5,88a	5,45b	5,91a
Luminance L*	49,7a	44,1b	50,6a	48,3b	57,8a	51,5b
Exsudat (%)	1,7a	1,0b	1,2	1,1	2,6a	0,9b

PG = potentiel glycolytique, PG+ et PG- : poulets présentant un potentiel glycolytique élevé et faible, respectivement.

*Poids vif à 9 semaines pour les dispositifs MG et F2MG et 6 semaines pour le dispositif Lourd

^{a,b} Au sein d'un dispositif et pour une variable donnée, les moyennes présentant des lettres différentes sont significativement différentes (P<0,05)

Tableau 2 : Nombre de gènes exprimés de façon différentielle entre les animaux PG+ et PG-, ratio d'expression et pourcentage de gènes ayant un orthologue humain

	MG (n= 8)	F2MG (n = 8)	LOURD (n = 10)
Nombre de gènes différentiels entre PG+ et PG-	197	254	52
Différentiel d'expression	0.479 <PG+/PG-< 2.233	0.410 <PG+/PG-< 2.692	0.264 <PG+/PG-< 1.907
% de gènes annotés	81%	69%	87%

Tableau 3 : Validation par qRT-PCR des différentiels d'expression dans les différents dispositifs

Modèle	Gène	Différentiel	Significativité
F2MG	AMPKβ1	PG+ < PG-	†
	AMPKγ2	PG+ < PG-	*
	PHKD	PG+ < PG-	†
	CEBPB	PG+ > PG-	*
	SRF	PG+ < PG-	*
	EDG2	PG+ < PG-	*
	UGDH	PG+ < PG-	†
MG	PPP1R12B	PG+ < PG-	*
	RGS2	PG+ < PG-	*
	RPS6	PG+ < PG-	†
	PDK4	PG+ > PG-	*
F2MG+MG	UCP3	PG+ < PG-	*
	SRF	PG+ < PG-	*
Lourd	CEBPB	PG+ < PG-	†
	RGS2	PG+ < PG-	*
	ETFA	PG+ < PG-	†

* P ≤ 0,05 et † ≤ 0,01

Figure 1 : Représentation du nombre de gènes communs entre les trois dispositifs

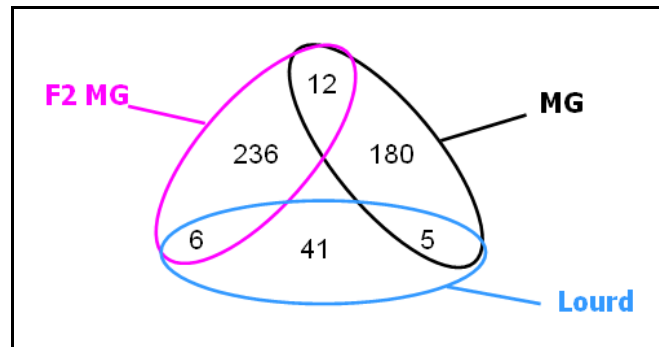
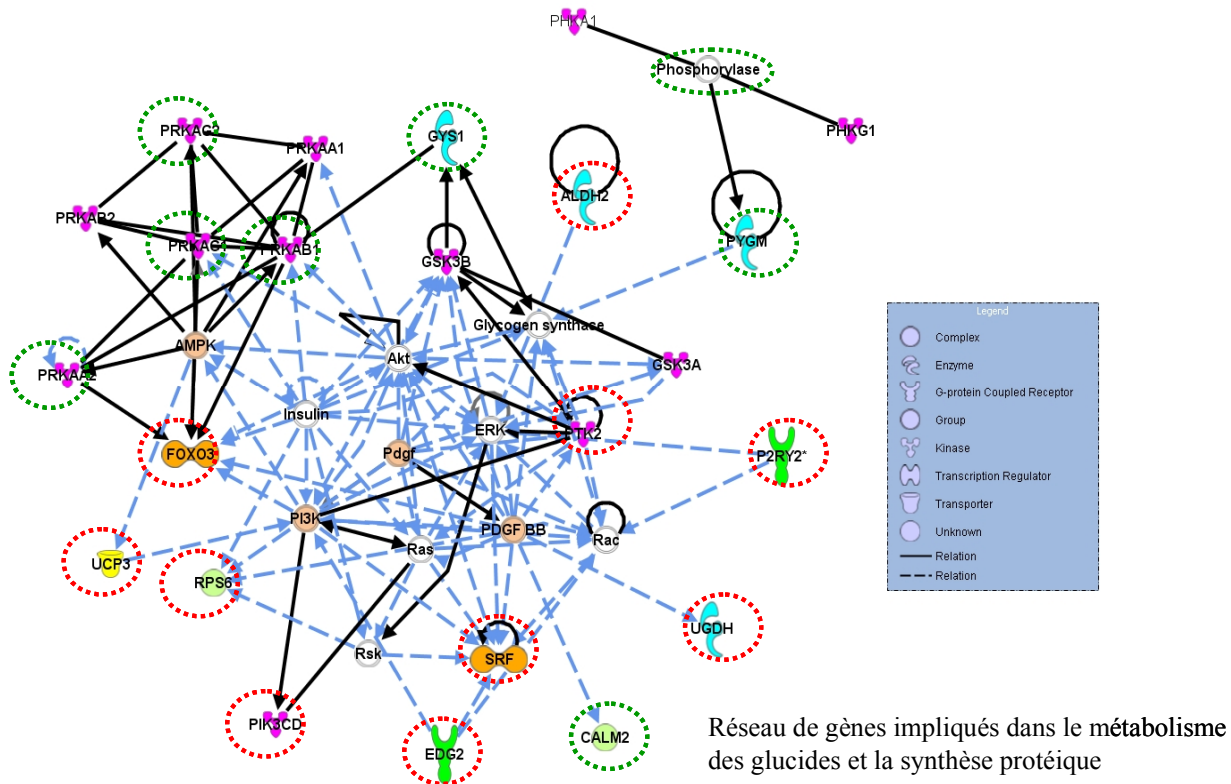


Figure 2 : Exemple de réseau de gènes impliqués à la fois dans le métabolisme des glucides et la synthèse protéique. Les gènes entourés par une ligne discontinue sont différentiels entre les conditions PG⁺ et PG⁻.

List_genes_validate_Network 1_Color



© 2000-2008 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.