

# IDENTIFICATION DE REGIONS GENOMIQUES CANDIDATES POUR LE PH ULTIME DE LA VIANDE PAR DETECTION DE SIGNATURES DE SELECTION ET DE QTL AU SEIN DE LIGNEES DIVERGENTES DE POULET DE CHAIR.

**Le Bihan-Duval Elisabeth<sup>1</sup>, Hennequet-Antier Christelle<sup>1</sup>, Berri Cécile<sup>1</sup>, Beauclercq Stéphane<sup>1</sup>, Bourin Marie<sup>2</sup>, Boulay Maryse<sup>3</sup>, Demeure Olivier<sup>4,5</sup>, Boitard Simon<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>URA – INRA – 37380 Nouzilly, France,

<sup>2</sup>Institut Technique de l'Aviculture (ITAVI) - Centre INRA Val de Loire - 37380 Nouzilly, France,

<sup>3</sup>Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français (SYSAAF) - Centre INRA Val de Loire, Unité de Recherches Avicoles - 37380 Nouzilly, France,

<sup>4</sup>PEGASE - Agrocampus Ouest, INRA – 35590 Saint-Gilles, France,

<sup>5</sup>Groupe Grimaud - La Corbière - 49450 Roussay, France,

<sup>6</sup>GenPhySE - Université de Toulouse, INRA, INPT, INP-ENVT - 31320, Castanet Tolosan, France.

[elisabeth.duval@inra.fr](mailto:elisabeth.duval@inra.fr)

## RÉSUMÉ

Le pH ultime (pHu) est un déterminant majeur des propriétés technologiques et sensorielles de la viande de poulet. Il semble également associé au développement de défauts musculaires tels que les striations blanches ou le Wooden Breast. Alors qu'une forte composante génétique de ce caractère a été mise en évidence, les gènes contrôlant le pHu restent inconnus. L'objectif de notre étude était de rechercher des régions génomiques candidates en exploitant un modèle unique de deux lignées divergentes sélectionnées pour le pH ultime du filet à partir d'une souche commerciale à croissance rapide. Deux approches complémentaires ont été mises en œuvre : la détection de signatures de sélection à chacune des 5 premières générations de sélection (G1 à G5) et la détection de QTL à la sixième génération (G6). Le génotypage grâce à la puce SNP Illumina 57K de 288 pères des générations G0 à G5 a conduit à l'identification de plus d'une centaine de signatures de sélection. Elles déterminent 63 régions candidates dont quelques-unes sont sélectionnées dès la première génération puis tout au long du processus de sélection. L'analyse GWAS de 558 animaux phénotypés et génotypés a mis en évidence 24 régions QTL pour le pHu du filet et 10 pour le pHu de la cuisse. L'ensemble de ces résultats va dans le sens d'un déterminisme polygénique du pH ultime de la viande tout en révélant le rôle important de plusieurs régions candidates.

## ABSTRACT

### **Identification of candidate genomic regions for chicken meat ultimate pH by combined selective sweeps and QTL mapping in chicken divergent lines.**

The ultimate pH (pHu) is a major determinant of the technological and sensory properties of chicken meat. It seems also to be associated with the development of muscular defects such as White Striping or Wooden Breast. While a strong genetic component of this trait has been demonstrated, genes controlling pHu remain unknown. The aim of the present study was to look for candidate genomic regions by taking advantage of a unique resource population of two divergent lines selected for the breast meat ultimate pH from a commercial fast-growing line. Two complementary approaches were applied: detection of selection signatures at each of the first 5 generations of selection (G1 to G5) and QTL mapping by genome-wide association study at the sixth generation (G6). Thanks to genotyping with the 57K Illumina SNP array of 288 sires from generations G0 to G5, we identified more than one hundred selection signatures. They determined 63 candidate regions, among which some were selected from the first generation and remained significant throughout the selection process. GWAS analysis of 558 phenotyped and genotyped animals revealed 24 QTL regions for breast meat pHu and 10 QTL for thigh meat pHu. Our results indicated a polygenic determinism of the ultimate pH as well as the important role of several candidate regions.

## INTRODUCTION

Chez le poulet, le pH ultime (pHu) est un déterminant majeur des propriétés technologiques et sensorielles de la viande. Alors que le pHu se situe généralement entre 5,8 et 5,9 dans le filet, une déviation de cette valeur moyenne entraîne une détérioration de la qualité et l'apparition de viande de type « acide » ( $\text{pHu} < 5,7$ ) caractérisée par une couleur pâle, une texture dure après cuisson et une faible aptitude à la transformation, ou de type « DFD » ( $\text{pHu} > 6,1$ ) caractérisée par une couleur sombre et une texture sèche en bouche ainsi qu'une moindre aptitude à la conservation (Zhang et Barbut, 2005; Harford *et al.*, 2014). Le pH ultime du filet est déterminé génétiquement par le niveau des réserves du muscle en glycogène, avec une corrélation génétique de -0,97 entre les deux caractères (Le Bihan-Duval *et al.*, 2008). La diminution de ces réserves énergétiques semble être un facteur prédisposant ou en tout cas un indicateur de la sensibilité aux myopathies, de type White Striping et Wooden Breast, en recrudescence chez le poulet (Alnahhas *et al.*, 2016 ; Abasht *et al.*, 2016). Même si le pH ultime présente une héritabilité plutôt élevée (entre 0,3 et 0,5 selon les études), les gènes impliqués dans son déterminisme restent méconnus. Dans cette étude, nous avons tiré parti d'un modèle unique de deux lignées sélectionnées de façon divergente pour le pHu du filet afin d'identifier les régions génomiques associées à la variation génétique de ce caractère. L'étude a porté sur la détection combinée de signatures de sélection et de QTL pour le pHu du filet et de la cuisse.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Présentation des lignées divergentes

En 2009, l'INRA a initié un programme de sélection divergente pour le pH ultime du filet à partir d'une souche grand-parentale de poulet standard à croissance rapide. Cette sélection s'est avérée très efficace puisqu'après 6 générations, le pHu du filet est en moyenne de 5,67 dans la lignée basse (pHu-) et de 6,16 dans la lignée haute (pHu+), soit une différence de 1,8 écart-type phénotypique entre lignées (Figure 1). Ceci signifie qu'environ 61% des filets des animaux pHu- sont de type « acide » et 63% des filets des animaux pHu+ de type « DFD ». Ces fortes variations de pHu reflètent une différence de Potentiel Glycolytique du filet, qui est augmenté d'environ 17% dans la lignée pHu- par rapport à la lignée pHu+ (Alnahhas *et al.*, 2015). L'effet de la sélection sur le métabolisme musculaire semble général plutôt que spécifique du filet, puisque l'on observe également une variation du pHu de la cuisse (en moyenne de 6,20 chez les animaux pHu- et 6,53 chez les pHu+ à la 6<sup>ème</sup> génération de sélection). La sélection a conduit à des modifications notables de la qualité de la viande, avec un filet moins pâle, moins rouge et moins jaune

dans la lignée pHu+. Le rendement technologique et le pouvoir de rétention d'eau du filet sont également nettement plus élevés chez les pHu+ (Alnahhas *et al.*, 2014). Si la croissance globale et l'engraissement des animaux ne varient pas entre les deux lignées, on observe une augmentation des rendements en filet et en cuisse ainsi que de l'occurrence du défaut White Striping dans la lignée pHu+ (Alnahhas *et al.*, 2016).

### 1.2 Détection des signatures de sélection.

L'objectif était de rechercher les haplotypes (méthode hapFLK ; Fariello *et al.*, 2013) ou marqueurs SNP (méthode FLK ; Bonhomme *et al.*, 2010) dont la fréquence varie significativement entre lignées, une fois pris en compte l'effet de la dérive génétique. Si tel est le cas, on peut supposer que les régions génomiques mises en évidence contribuent à la variabilité observée du critère de sélection (i.e., le pH ultime). Afin d'analyser la dynamique de sélection des régions, la recherche des signatures de sélection a été réalisée à chacune des 5 premières générations de sélection (G1 à G5). Les analyses ont porté sur l'évolution des fréquences haplotypiques ou alléliques chez les reproducteurs mâles pour lesquels la pression de sélection est la plus importante (autour de 20%). Au total, 288 mâles ont été génotypés avec la puce SNP Illumina 57K. Ils représentaient la quasi-totalité (plus de 91% en moyenne) des reproducteurs des générations G0 à G5, à l'exception de la G1 où une plus faible proportion (60%) des mâles a été génotypée. La détection des signatures de sélection a été réalisée à l'aide du logiciel hapFLK (<https://forge-dga.jouy.inra.fr/projects/hapflk>). Seuls les marqueurs localisés sur les autosomes, avec un call rate > 0,95 et présentant une informativité suffisante (fréquence de l'allèle minoritaire calculée pour l'ensemble des générations > 5%) ont été retenus pour les analyses, soit un total de 42026 SNP représentant 72,9% des marqueurs initialement génotypés sur la puce.

### 1.3 Détection des QTL

En complément de la détection des signatures de sélection basée sur l'analyse génotypique des reproducteurs, une recherche de QTL pour le pH ultime du filet et de la cuisse a été réalisée par une étude de génétique d'association à l'échelle du génome (GWAS) sur 558 animaux (278 pHu+ et 280 pHu-) génotypés et phénotypés de la 6<sup>ème</sup> génération. Ces animaux ont été produits en deux lots d'abattage. L'analyse GWAS a été mise en œuvre grâce au logiciel GS3 (Legarra *et al.*, 2012) avec la méthodologie Bayes C $\pi$  (Habier *et al.*, 2011). Celle-ci utilise un modèle multi-marqueurs en faisant l'hypothèse qu'une faible proportion ( $1-\pi$ ) d'entre eux (fixée dans notre cas à 0,005) est associée au caractère. Sont déclarés comme « forts » ou « très forts » les marqueurs pour lesquels la statistique du Bayes Factor (BF) est comprise entre 20 et 150 ou supérieure à 150, respectivement (Vidal *et al.*, 2005).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Mises en évidence de signatures de sélection.

Du fait du fort niveau d'héritabilité du pHu ( $h^2=0,57$ ) et des réponses observées à la sélection, le dispositif des lignées divergentes apparaissait particulièrement adapté à la recherche de signatures de sélection. En effet, l'analyse en haplotypes (hapFKL) menée à chacune des générations (G1 à G5) a conduit à l'identification de 107 régions significatives. En regroupant des régions chevauchantes nous avons défini 53 régions candidates, retrouvées à une ou plusieurs générations. Ces régions sont localisées sur l'ensemble du génome et de taille très variable (de 30kb à plus de 11 Mb). L'analyse par SNP (FLK) a permis de confirmer 4 de ces régions et d'en identifier 10 nouvelles. A la fois le nombre (53 vs 14) et le niveau de signification (jusqu'à  $10^{-16}$  pour hapFLK et  $10^{-8}$  pour FLK) montre la supériorité de l'approche haplotypique déjà démontrée dans d'autres études (Fariello *et al.*, 2013). La combinaison des deux approches permet néanmoins une détection plus exhaustive des régions génomiques différenciant les deux lignées.

Des lignées divergentes de poulet ont déjà servi de modèles d'étude pour la recherche de signatures de sélection associées notamment à l'engraissement (Zhang *et al.*, 2012; Roux *et al.*, 2015) ou au poids vif (Johansson *et al.*, 2010) des animaux. Ces études font une photographie des régions sélectionnées au bout de plusieurs générations (entre 11 et 50 selon les études). Dans notre étude, nous avons pu établir la dynamique de sélection des régions dès l'initiation du processus de sélection divergente. Comme illustré sur la Figure 2 pour le chromosome 1, la dynamique de sélection varie en fonction des régions. Sur les 10 régions les plus significatives (comme les régions 1b et 1c de la Figure 1), quatre sont détectées dès la première génération (G1) puis à chacune des générations suivantes (G2 à G5). Quatre autres régions correspondent à des événements de sélection plus tardifs qui ne sont détectés qu'en G5 (cas de la région 1f de la Figure 2). Pour les régions les moins significatives, elles présentent des profils de sélection variables mais la plupart ne sont détectées qu'à une seule des 5 générations analysées.

### 2.2 Détection des régions QTL

Au total, 33 SNP associés au pHu du filet ont été détectés. Ils définissent 24 régions QTL sur 15 chromosomes. Comme illustré sur la Figure 3, un SNP très fort est détecté sur le chromosome 1 (BF=300). D'autres pics d'intérêt sont mis en évidence au niveau notamment des chromosomes 2 (BF=107) ou 24 (BF= 110). Concernant le pH ultime de la cuisse, un total de 18 SNP regroupés au sein de 10 régions a été détecté. Un SNP très fort (BF=257)

est mis en évidence sur le chromosome 4, alors que les autres QTL restent à des niveaux de signification plus modérés ( $22 < BF < 50$ ). Malgré une corrélation génétique positive entre pH ultime du filet et de la cuisse ( $rg=0,54$ , Alnahhas *et al.*, 2014), peu de co-localisations de QTL pour ces deux caractères sont observées. Ceci suggère que les gènes sous-jacents aux QTL détectés modifient spécifiquement le métabolisme de l'un ou l'autre muscle.

Les SNP présents au sein des régions sous sélection présentent en moyenne une statistique BF supérieure à celle des marqueurs localisés ailleurs dans le génome (p-value de 0.0027 avec un test t bilatéral), suggérant un enrichissement en QTL des régions sous sélection. Néanmoins, les deux approches ne conduisent qu'à des résultats partiellement concordants puisque seulement 7 des 24 régions QTL identifiées pour le pH ultime du filet co-localisent avec les signatures de sélection. Ceci peut notamment s'expliquer par la nature polygénique du pH ultime pour lequel l'ensemble des QTL ne peut être efficacement sélectionné au bout de seulement 6 générations. De plus, la méthodologie de détection des signatures de sélection par analyse haplotypique étant particulièrement puissante, elle permet d'identifier de faibles variations entre lignées plus difficiles à mettre en évidence par analyse d'association entre phénotype et marqueur. Enfin, on ne peut exclure que la sélection divergente ait modifié des caractères ou fonctions sans lien direct avec le critère de sélection et dont le déterminisme serait porté par certaines régions sous sélection.

De façon fort intéressante, la détection de QTL a permis de confirmer mais aussi de préciser la localisation de la plus significative des signatures de sélection, correspondant à la région 1c du chromosome 1 (Figure 2). L'information au marqueur génétique le plus fort au sein de cette région (BF=300) permet de prédire l'appartenance des animaux à l'une ou l'autre des deux lignées, un animal de génotype AA ayant plus de 99% de chance d'appartenir à la lignée pHu- et un animal de génotype GG plus de 98% de chance d'appartenir à la lignée pHu+. Ce marqueur est donc très certainement en déséquilibre de liaison avec une ou plusieurs mutations modifiant le pH ultime de la viande dans ces lignées.

## CONCLUSION

L'analyse de ce dispositif unique apporte des résultats originaux sur le contrôle génétique du pH ultime de la viande chez le poulet. Elle confirme une nature polygénique du caractère tout en révélant l'implication de plusieurs régions d'intérêt, dont une particulièrement significative sur le chromosome 1. Ces travaux vont se poursuivre afin de rechercher des gènes candidats ainsi que des mutations dont l'étude

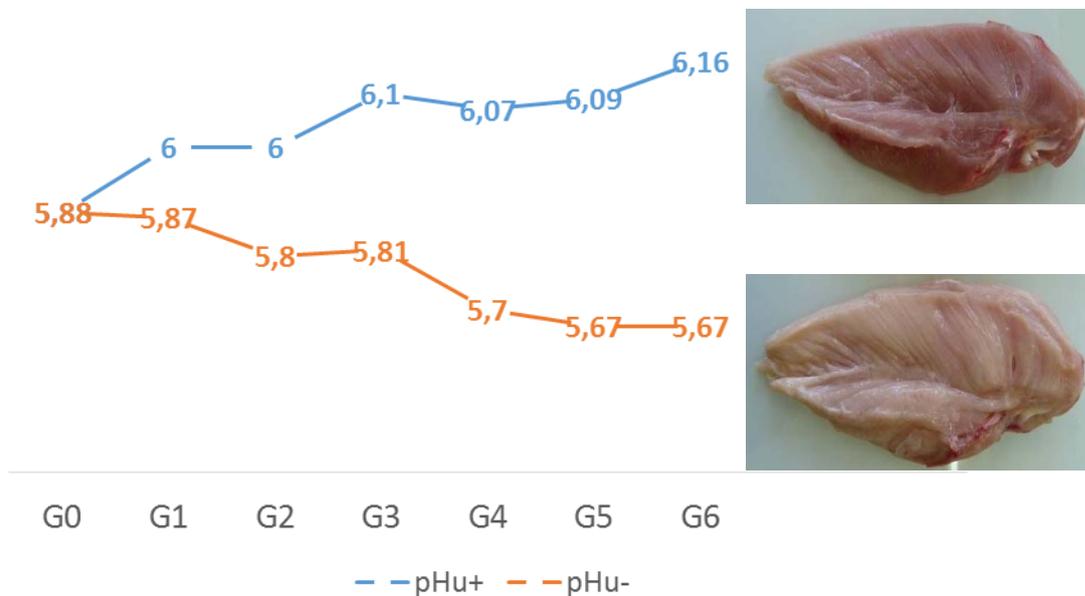
permettra de mieux comprendre le déterminisme des réserves énergétiques musculaires et de développer

des marqueurs génétiques de la qualité de la viande chez le poulet.

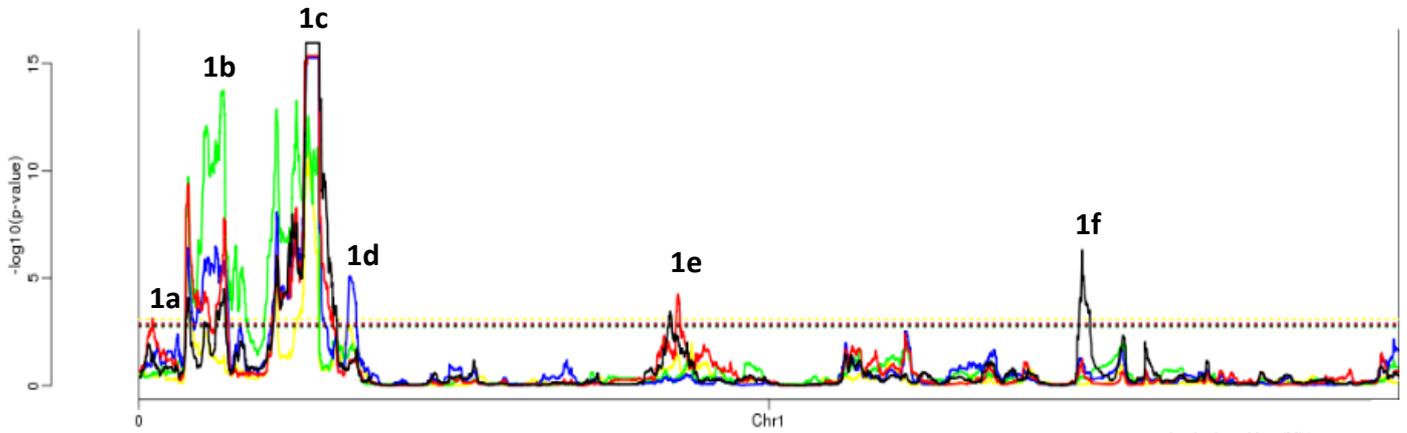
## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abasht B., Mutryn M.F., Michalek R.D., Lee W.R., 2016. PLoS ONE, 11(4), e0153750. doi:10.1371/journal.pone.0153750.
- Alnahhas N., Berri C., Boulay M., Baéza E., Jégo Y., Baumard Y., Chabault M., 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., (3), 4524-4531.
- Alnahhas N., Berri C., Chabault M., Chartrin P., Boulay M., Bourin M.C., Le Bihan-Duval E., 2016. BMC Genetics, (17), 61.
- Bonhomme M., Chevalet C., Servin B., Boitard S., Abdallah J., Blott S., San Cristobal M., 2010. Genetics, (186), 241-26
- Fariello M., Boitard S., Naya H., SanCristobal M., Servin B., 2013. Genetics, (193), 929-941.
- Habier D., Fernando R.L., Kizilkaya K., Garrick D.J., 2011. BMC Bioinformatics, (12), 186.
- Harford I.D., Pavlidis H.O., Anthony N.B., 2014. Poult. Sci., (93), 1059-1066.
- Johansson A.M., Pettersson M.E., Siegel P.B., Carlborg O., 2010, PloS Genetics, 6(11), e1001188.
- Le Bihan-Duval E., Debut M., Berri C.M., Sellier N., Santé-Lhoutellier V., Jégo Y., Beaumont C., 2008. BMC Genetics, (18), 53.
- Legarra A., Ricard A., Filangi O., 2012. User Manual, [http://snp.toulouse.inra.fr/~alegarra/manualgs3\\_last.pdf](http://snp.toulouse.inra.fr/~alegarra/manualgs3_last.pdf)
- Roux P.-F. et al., 2015. G3 - Genes Genomes Genetics, (5), 517-529.
- Vidal O., Noguera J.L., Amills M., Varona L., Gil M., Jimenez N., Davalos G., Folch J.M., Sanchez A., 2005. J. Anim. Sci., (83), 293-300.
- Zhang L., Barbut S., 2005. Br Poult Sci., (46), 687-93
- Zhang et al., 2012. BMC Genomics, (13), 704.

**Figure 1.** Evolution phénotypique du pH ultime du filet dans les deux lignées divergentes.



**Figure 2.** Détection des signatures de sélection : exemple du chromosome 1. Les courbes représentent l'évolution de la p-value du test HapFLK de détection des signatures de sélection en fonction de la position sur le chromosome. Chaque couleur représente une génération différente (jaune pour G1, vert pour G2, bleu pour G3, rouge pour G4, noir pour G5). Les lignes pointillées horizontales indiquent le seuil correspondant à un FDR de 5%.



**Figure 3.** Manhattan plot de la statistique BF du test d'association entre marqueur et pH ultime du filet : la valeur de BF est indiquée pour chaque SNP selon sa position sur chaque chromosome (1 couleur = 1 chromosome). Une valeur comprise entre 20 et 150 indique une relation forte et supérieure à 150 une relation très forte (lignes pointillées horizontales).

