

Optimisation d'une population expérimentale de canes communes (*Anas platyrhynchos*) et de leurs descendants mulards : utilisation de données de QTL

**François Yoannah^{4,1,2,3}, Marie-Etancelin Christel², Molette Caroline^{1,3}, Vignal Alain³,
Davail Stéphane⁴**

¹ INRA, INPT-ENSAT, INPT-ENVT, UMR TANDEM, chemin de Borde Rouge – 31326
CASTANET-TOLOSAN

² INRA, UR 631, Station d'Amélioration Génétique des Animaux, chemin de Borde Rouge -
31326 CASTANET-TOLOSAN

³ INRA, INPT-ENVT, UMR444 Laboratoire de Génétique Cellulaire, chemin de Borde Rouge -
31326 CASTANET-TOLOSAN

⁴ IPREM-EEM, IUT des Pays de l'Adour- 371 Rue du Ruisseau, BP 201-40004 MONT DE
MARSAN

yoannah.francois@toulouse.inra.fr

RÉSUMÉ

En France, 95 % de la production de foie gras provient du canard mulard, un hybride stérile issu d'un croisement entre une cane commune et un canard de Barbarie. Un dispositif animal de canes backcross, composé de 7 familles de 382 canes backcross dont le phénotype est estimé à partir des performances de leurs 1552 fils mulards a permis la détection de 17 QTL (Quantitative Trait Loci) liés à 8 caractères de qualité du foie gras. Afin de comprendre l'influence de l'expression des gènes du mulard sur les caractères de qualité du foie gras, une approche de détection des eQTL et pQTL colocalisés avec les QTL est programmée. La mise en œuvre des analyses transcriptomiques et protéomiques n'étant possible que sur un maximum de 300 mulards, le choix optimisé d'une sous-population a été effectué. Une sélection progressive des canes, selon la localisation des QTL d'intérêt et l'informativité des canes pour ces QTL, a réduit la population initiale de 382 canes à 98. Pour réduire d'avantage la population, un choix de 3 mulards parmi N par cane backcross a d'une part été effectué par tirages aléatoires de ces mulards pour apprécier l'impact du choix sur la puissance de détection des QTL, puis d'autre part par un choix orienté des mulards visant à conserver la performance moyenne attribuée à la cane BC. Les résultats des détections de QTL, entreprises à chaque étape d'élimination, valident la sélection de 294 mulards, population permettant de détecter 8 des 11 QTL initialement identifiés.

ABSTRACT

Optimization of a common female duck population and of their mule progeny: use of QTL data

In France, 95 % of fatty liver production comes from the mule duck, a sterile hybrid stemming from a cross between a common female duck and a Muscovy drake. A common duck backcross design composed of 7 families and a total of 382 backcross females, whose phenotype is estimated through the measure of a total of 1552 their mule ducks sons, enabled the detection of 17 QTL (Quantitative Trait Loci) linked to 8 fatty liver quality traits. In order to understand the influence of gene expression in the mule duck on fatty liver quality traits, a project aiming at the detection of eQTL and pQTL colocalized with the phenotypic QTL is carried out. For practical reasons, no more than 300 out of the 1552 mule ducks can be used for transcriptomics and proteomics analyzes and an optimized choice of a sub-population to be studied was necessary. First, a progressive selection of backcross females according to their contribution to the QTL of interest and to its position reduced the number of backcross females in the population from 382 to 98. To further reduce the sampling, the limited choice of 3 mule ducks per backcross female was first done randomly in order to evaluate its impact on the QTL detection power. It was thereafter done by making an oriented choice of the mule ducks in order to keep the mean value of mule duck performances attributed each mother family unchanged. QTL detections results performed along the selection process validate the selection of 294 mule ducks; this population permits the detection of 8 out of the 11 initially identified.

INTRODUCTION

En France, 95 % de la production de foie gras de canard provient du canard mulard. Celui-ci est un hybride stérile issu d'un croisement entre une cane commune (*Anas Platyrhynchos*) et un canard de Barbarie (*Cairina Moschata*). Aujourd'hui, les acteurs de la filière cherchent prioritairement à améliorer la qualité technologique du foie gras. Le mulard étant stérile, l'amélioration par voie génétique de ses caractères ne peut se faire que via la sélection des espèces parentales. Connaître l'influence de l'expression des gènes sur les caractères de qualité du foie gras pourrait permettre d'orienter la sélection. A partir d'une primo-détection de QTL (Quantitative Trait Loci), des analyses par protéomique et transcriptomique vont être mises en place pour étudier l'influence de ces gènes à ces deux niveaux, via une recherche de eQTL et de pQTL (QTL de transcrits et de protéines, respectivement). Le projet se fonde sur le dispositif « GeneCan » de recherche de QTL financé par l'ANR GENANIMAL 2006-2010, composé de 1552 mulards phénotypés. L'approche protéomique se fera par réalisation de gels d'électrophorèse bi-dimensionnelle afin de quantifier l'expression des protéines hépatiques. L'approche transcriptomique consiste à quantifier l'expression de transcrits de gènes par PCR quantitative. Pour mener à bien les analyses, ces deux approches nécessitent une réduction drastique des effectifs à étudier puisqu'un maximum de 300 mulards est envisagé. Les différentes étapes d'optimisation de l'échantillonnage de cette sous-population et la puissance de détection de QTL obtenue à chaque étape sont présentées dans ce papier.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Description du dispositif expérimental

Le dispositif animal utilisé est un croisement en retour (ou backcross - BC) de canes communes (Figure 1) produit pour rechercher des QTL (programme « GeneCan » (Marie-Etancelin et al., 2008)). Sept pères F1 issus du croisement entre deux lignées de canards communs (INRA37 et INRA444), ont été croisés avec des canes communes INRA444 et ont permis l'obtention de 382 canes backcross. Ces canes ont été testées sur descendance, c'est-à-dire qu'elles ont été croisées avec des canards de Barbarie et ont engendré 1552 mâles mulards, soit entre 1 et 8 mulards par cane BC. Les canards mulards ont fait l'objet de nombreuses mesures phénotypiques relatives à la croissance, à la qualité du foie, à leur aptitude au gavage et au métabolisme hépatique en gavage. A partir de ces performances, des valeurs phénotypiques ont été attribuées à leurs mères BC. Grâce au génotypage des individus du dispositif expérimental à l'aide d'une centaine de microsatellites agrégés en 16 groupes de liaison (GL) (Fève et al., 2009), des détections de QTL ont été entreprises avec une méthodologie adaptée au dispositif (Kileh-Wais et Elsen, 2012a) sur les canes BC pour l'ensemble des

caractères mesurés chez les mulards : 74 QTL ont été mis en évidence (Kileh-Wais et al., 2012b).

1.2. Identification des familles d'intérêt

Huit des caractères mesurés sur les mulards sont liés à la qualité du foie gras : le poids de foie, le taux de fonte, les taux de lipides, de protéines et de collagène, les indices de rouge et jaune et la luminance du foie. Sur les 74 QTL identifiés, 17 concernent ces 8 caractères dont 11 se répartissent sur 2 groupes de liaison (6 QTL sur le GL2c et 5 sur le GL9 - tableau 1). Des détections de QTL multi-caractères ont par ailleurs confirmé l'existence de QTL très significatifs ($P < 0.5\%$) et impactant plusieurs caractères sur ces 2 groupes de liaisons : ainsi, 2 QTL pléiotropiques ont été détectés sur le GL2c grâce aux combinaisons du taux de fonte avec le taux de protéines d'une part et avec le taux de collagène d'autre part, et sur le GL9, c'est en combinant le taux de protéines avec le taux de lipides qu'un 3^{ème} QTL pléiotropique est identifié (Kileh-Wais et al., 2012b).

L'identification de QTL significatifs est réalisée en comparant, pour chaque caractère et groupe de liaison, les rapports de vraisemblances (entre l'hypothèse nulle d'absence de QTL et l'alternative qu'il existe un QTL) le long de ces GL avec des valeurs seuils (à 5 % et 1 %). Les rapports de vraisemblances calculés correspondent à la somme des rapports de vraisemblances de chaque famille de père F1, chaque famille pouvant avoir un taux de contribution à la vraisemblance globale différent. Pour nos caractères d'intérêt, l'étude des effets QTL par famille de pères F1 (tableau 1) met en évidence deux familles de père F1 pour chacun des deux groupes de liaison (familles A et G pour GL2c et familles A et F pour GL9), avec la famille A commune aux 2 GL.

1.3. Optimisation de la population à étudier

Les détections de QTL se faisant sur les canes BC, les premiers critères de sélection ont porté sur ces dernières : i) afin d'avoir une estimation de la performance de la BC suffisamment robuste, les BC ayant moins de 3 mulards phénotypés dans leur descendance ($N=1$ ou 2) ont été écartées. ii) Seules les BC informatives (dont les allèles reçus du père sont connus à $p > 0.95$) et donc utiles à la détection de QTL, sont conservées. iii) Les BC appartenant à une fratrie d'au moins 3 sœurs BC sont conservées afin de ne pas introduire de biais qui correspondrait à un effet grand-maternel des BC.

Les performances des mulards gavés permettant d'attribuer une valeur de performance à la cane BC, nous avons considéré qu'il était nécessaire de garder 3 descendants mulards par BC. Afin d'évaluer l'impact du choix de ces 3 mulards sur la puissance de détection des QTL, 100 tirages aléatoires de 3 mulards parmi N ($N=3$ à 8) de chaque BC ont été effectués, chacun suivi d'une détection de QTL pour les deux GL. En parallèle, un choix orienté de ces

3 mulards a été effectué en suivant deux règles. i) Conserver les mulards présentant des valeurs de performances extrêmes et un mulard aux performances moyennes, afin de conserver la variabilité phénotypique existante intra mère sans réduire l'effectif aux seuls individus extrêmes. ii) Rester au plus proche des performances attribuées initialement aux BC, c'est-à-dire que la moyenne sur les 3 mulards soit comparable à celle sur les N mulards.

Les caractères pris en compte pour cette comparaison des performances moyennes sont les taux de protéines et de lipides du foie ainsi que le taux de fonte, car ce sont les trois caractères les plus cruciaux pour la qualité du foie gras.

1.4. Détection de QTL

Les détections de QTL sont réalisées au niveau de la cane BC, à qui l'on attribue comme performance la valeur moyenne des performances de ses fils mulards. La contribution à la vraisemblance de chaque BC est fonction de la précision du phénotype, c'est-à-dire fonction du nombre de descendants mulards par cane et de l'héritabilité du caractère (Kileh-Wais et al., 2012a). Le logiciel QTLMAP, développé par l'INRA (Elsen et al., 1999) a été implémenté afin de prendre en compte ce développement méthodologique.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'application des critères retenus à la population BC, en nous focalisant sur les 3 familles d'intérêt, a permis de réduire le nombre de canes BC de 382 (phénotypées à l'aide de 1552) à 98 (phénotypées à l'aide de 476 mulards). La sélection de 3 mulards parmi N, nous a permis de réduire le pool de mulards de 476 à 294 animaux.

2.1. Réduction de la population BC et puissance de détection des QTL

Les résultats des détections successives de QTL sont représentés par le niveau de significativité atteints par ceux-ci (Figure 2). Ainsi, lorsque l'on passe d'une détection avec l'ensemble des 7 familles du dispositif à une détection avec les 3 familles d'intérêt (Figure 2, étapes 1 à 2), la puissance de détection de chaque QTL se trouve accrue par la suppression des familles ne contribuant pas et/ou apportant des effets parasites. Seul le QTL de l'indice de jaune du foie sur GL2c disparaît à cette étape, car il ne ségrégeait pas dans les familles A et G retenues. Les étapes 3, 4 et 5 de sélection des canes BC n'impactent que très peu la puissance de détection, puisque dans la plupart des cas il y a pas d'évolution du seuil de significativité atteint. Seuls les QTL de taux de fonte sur GL9 et de taux de collagène en GL2c ne sont détectables qu'au seuil de 5% au niveau du chromosome, après

sélection des 98 BC (étape 5): les 8 autres QTL dépassent le seuil de 1%.

2.2. Choix des 3 mulards fils des canes BC et puissance de détection des QTL

Afin d'objectiver l'impact du choix des 3 mulards parmi N d'une même mère BC pour déterminer sa valeur de phénotype, les 100 détections de QTL de 100 tirages aléatoires de 3 mulards effectuées sont présentées à la figure 3. Pour le caractère « indice de jaune » du foie, caractère pour lequel il n'y a pas de QTL détecté avec la population de 98 BC, aucun des tirages aléatoires ne conduit à la détection d'un QTL quelque soit le GL. Pour les QTL dépassant le seuil de significativité à 1% avec la population de 98 BC, le QTL reste détecté au seuil de 5% dans 97% des tirages aléatoires pour le taux de protéines sur GL2c, dans 91% des tirages aléatoires pour le taux de fonte sur GL2c et dans 89% des tirages aléatoires pour le taux de protéines sur GL9. Pour un QTL significatif seulement au seuil de 5% (par exemple le taux de fonte sur GL9), les tirages aléatoires montrent que dans 57% des cas, le QTL disparaît. Donc pour un QTL initialement très significatif, le choix des mulards ne devraient pas conduire à la disparition de celui-ci, mais la puissance de détection reste néanmoins très variable. Par contre, le risque de ne plus détecter un QTL à 5% est très important.

Le choix orienté de 3 mulards par BC en maintenant autant que possible la performance moyenne attribuée à la BC, est présenté à la figure 2, étape 6. Parmi les 11 QTL initiaux, 8 sont toujours détectés après sélection de ses 3 mulards : seuls 2 QTL sur GL2c liés au poids de foie et au taux de collagène (caractères non pris en compte dans le choix des 3 mulards) présents à l'étape 5 disparaissent à l'étape 6. La puissance de détection finale des 8 QTL apparaît légèrement amoindrie (les seuils de signification atteints avec les 294 mulards sont plus faibles qu'avec les 476 mulards) probablement due à l'homogénéisation de la contribution à la vraisemblance de chaque BC, qui ont au final toutes le même nombre de mulards.

CONCLUSION

La sélection par étape des canes BC et de leurs fils mulards nous a permis de réduire la population à étudier de 1552 à 294 mulards, tout en maintenant une puissance de détection de 8 des 11 QTL de caractères de qualité situés sur les GL2c et 9. Les approches protéomique et transcriptomique visant à détecter des pQTL et des eQTL peuvent donc maintenant être mises en œuvre sur cette population optimisée. Les relations QTL-eQTL-pQTL recherchées permettront, à terme, d'identifier des régions génomiques et des voies métaboliques impliquées dans les caractères de qualité du foie gras.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Elsen J.M., Mangin B., Goffinet B., Boichard D., Le Roy P., 1999, Genet. Sel. Evol., 31, 213-224.
- Fève K., Bounet M., Vignoles F., Leroux S., Bardes S., Vignal A., Marie-Etancelin C., 2009. 8èmes JRA, St Malo, 25-26 mars 2009, 599-603.
- Kileh-Wais M. et Elsen J.M., 2012a J. Anim Breed. Genet. 129 (4) 336-342.
- Kileh-Wais M., Elsen J.M., Vignal A., Fève K., Vignoles F., Fernandez X., Manse H., Davail S., André J.M., Bastianelli D., Bonnal L., Filangi O., Baéza E., Guéméné D., Genêt C., Bernadet M.D., Dubos F., Marie-Etancelin C., 2012b J. Anim. Sci.
- Marie-Etancelin C., André J.M., Baéza E., Basso B., Bastianelli D., Bernadet M.D., Brun J.M., Davail S., Dubos F., Fernandez X., Gontier K., Guéméné D., Guy G., Manse H., Mialon M.M., Larzul C., 2008. 8èmes JRPFG, Arcachon, 30-31 octobre 2008, 17-20.

Figure 1. Dispositif expérimental de recherche de QTL issu du programme ANR "GeneCan"

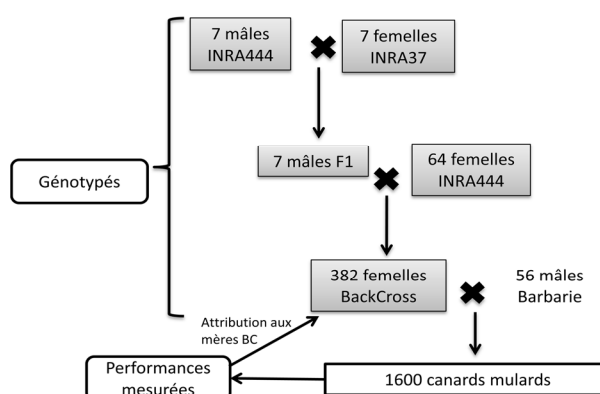
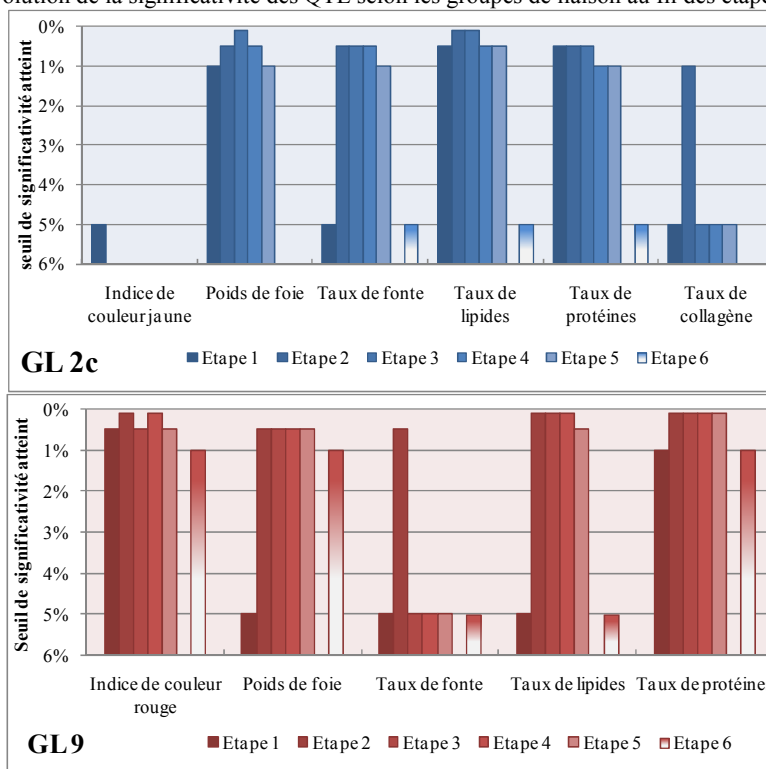


Figure 2. Evolution de la significativité des QTL selon les groupes de liaison au fil des étapes de sélection.



Pour chaque caractère, chaque histogramme correspond à une étape de sélection. De droite à gauche : Etape 1 : Significativité des QTL initiaux (7 familles). Etape 2 : 3 familles informatives (2 par groupe de liaison). Etape 3 : BC avec au moins 3 descendants mulards. Etape 4 : BC avec au moins 3 descendants mulards et allèles paternels connus. Etape 5 : BC avec au moins 3 descendants mulards, allèles paternels connus et d'une fratrie d'au moins 3 BC (476 mulards). Etape 6 : BC avec exactement 3 descendants mulards choisis, allèles paternels connus et d'une fratrie d'au moins 3 BC (294 mulards).

Tableau 1. QTL concernant les caractères de qualité du foie gras

| GL | Caractère | Seuil de significativité atteint | Marqueur flanquant / Position (cM) | Effets du QTL de chacun des 7 pères F1 (2 extrêmes en gras) | | | | | | |
|----|---------------------|----------------------------------|------------------------------------|---|-------------|------|-------------|------|-------------|-------------|
| | | | | A | B | C | D | E | F | G |
| 2c | Poids du foie | 1 % | APH012 / 0 | 46 | -6 | -1 | 11 | * | -12 | -20 |
| | Taux de lipides | 1 % | APH012 / 0 | 1.2 | -0.2 | -0.4 | 0.5 | * | -0.3 | -1.1 |
| | Taux de protéines | 1 % | APH012 / 0 | -0.3 | 0.0 | 0.1 | -0.2 | * | 0.1 | 0.3 |
| | Indice de jaune | 5 % | CAM005 / 1 | 0.5 | -0.5 | -0.1 | -0.2 | * | 0.6 | 0.1 |
| | Taux de fonte | 5 % | APH012 / 0 | 2.2 | -0.1 | -0.7 | -0.1 | * | -1.0 | -3.8 |
| | Taux de collagène | 5 % | APH012 / 0 | -0.1 | 0.0 | 0.0 | -0.1 | * | 0.0 | 0.1 |
| 9 | Indice de rouge | 1 % | CAU088 / 0 | -0.5 | -0.2 | -0.1 | -0.2 | 0.1 | 0.4 | 0.3 |
| | Teneur en Protéines | 1 % | CAU038 / 20 | -0.3 | 0.1 | -0.1 | 0.0 | 0.1 | 0.3 | -0.0 |
| | Poids du foie | 1 % | CAU038 / 20 | 35 | -6 | 16 | -3 | -8 | -29 | 11 |
| | Taux de fonte | 5 % | CAU088-AMU068 / 5 | 3.4 | 1.4 | 1.4 | 1.0 | -0.4 | -2.8 | 1.0 |
| | Teneur en lipides | 5 % | CAU088 / 0 | 1.7 | 0.3 | 0.5 | 0.4 | -0.1 | -1.1 | 0.1 |

* marqueurs du GL non informatifs

Figure 3. Valeurs des LRT (Likelihood Ratio Test) obtenues pour chacune des 100 simulations de détection de QTL. Exemples sur 3 caractères.



Chaque point rouge correspond au LRT maximum obtenu pour une simulation ; chaque simulation étant effectuée à partir de la population des 98 canes BC, après tirage aléatoire de 3 mulards parmi N d'une mère BC. Les traits en pointillés représentent les LRT des seuils de signification respectivement à 5%, 1%, 0,5% et 0,1%.