

VERS L'UTILISATION DE MARQUEURS MOLECULAIRES POUR L'ASSIGNATION DES PARENTES EN CANARD GRACE AU PROGRAMME APACHE.

Chapuis H.¹, Faugeras R.², Rossignol Marie-Noelle², Feve Katia³, Genestout Lucie², Chantry-Darmon Céline², Guémené D.^{1,4}

¹ SYSAAF, Centre INRA de Tours Nouzilly – UR83, 37380 NOUZILLY, France

² LABOGENA, Domaine de Vilvert – 78350 JOUY EN JOSAS, FRANCE

³ UMR Génétique Cellulaire, INRA-ENVT - 31326 CASTANET-TOLOSAN, FRANCE

⁴ INRA, UR83 Unité de Recherches Avicoles – 37380 NOUZILLY, France

APACHE : un panel de marqueurs microsatellites pour l'assignation des parentés en canards. L'utilisation des marqueurs moléculaires, afin de reconstituer les pedigrees *a posteriori*, est couramment utilisée en aquaculture. En volaille, où d'autres moyens existent pour s'assurer des filiations, cette pratique encore peu répandue, modifierait profondément les schémas de sélection et permettrait d'envisager cette sélection dans des conditions similaires à celles observées aux étages de multiplication et de production. Le programme APACHE, financé par FranceAgriMer au titre des Actions Innovantes, vise à produire un panel de marqueurs microsatellites, utilisable pour la réassignation chez le canard de Barbarie, le canard commun et leur hybride mulard. Un panel de 15 marqueurs utilisable en routine a été développé.

Introduction

En aquaculture, il est maintenant commun d'utiliser la réassignation de parenté pour reconstruire une généalogie exploitable en sélection. Dans les espèces concernées, les jeunes alevins issus de différentes familles sont mélangés avant d'avoir atteint une taille permettant l'identification individuelle. La reconstitution du pedigree *a posteriori* est par conséquent la seule alternative à l'élevage des familles en bassins séparés, solution très onéreuse et génératrice d'effets d'environnement préjudiciable à l'exploitation des résultats. Depuis les années 1990, LABOGENA effectue en routine des réassignations de parenté chez la truite arc-en-ciel, le bar, la daurade et le turbot pour les entreprises de sélection aquacoles adhérentes du SYSAAF en utilisant des panels de marqueurs microsatellites. L'insertion d'un tel dispositif dans un schéma de sélection a été validée par de nombreux travaux, que ce soit par simulation (Dupont-Nivet et al., 2006) pour l'amélioration des caractères de croissance, de qualité, et de reproduction, ou par l'étude de la réponse à la sélection (Saillant et al., 2006 ; Vandeputte et al., 2009). *A contrario*, les espèces avicoles, jusqu'à présent, n'utilisent pas de tels outils de génétique moléculaire car il existe d'autres moyens pour suivre les généalogies : insémination en sperme individuel, logement des femelles en cages individuelles ou au sol dans des parquets de petite taille et équipés de nid-trappes, marquage des œufs, éclosiers équipés de casiers permettant de séparer les jeunes par origine maternelle. Une telle organisation nécessite des investissements initiaux lourds pour l'aménagement des bâtiments, qui

constituent un environnement sensiblement différent de celui où seront élevés les animaux des étages de multiplication et de production. Par conséquent, des interactions Génétique x Environnement qui réduiraient l'efficacité de la sélection peuvent être suspectées. Par ailleurs, nous ne disposons pas d'information sur la représentativité réelle des mâles utilisés à l'étage de multiplication, ce qui n'est pas optimal pour la gestion de la diversité génétique utile dans les populations sélectionnées.

Le programme APACHE, financé par FranceAgriMer au titre des Actions Innovantes, vise la mise au point d'un panel de marqueurs moléculaires utilisables pour l'assignation de parenté chez les canards de Barbarie (*Carina moschata*), les canards Pékins (*Anas platyrhynchos*) ou communs et leur hybride stérile Mulard. L'objectif de cet article est de présenter la démarche utilisée ainsi que les performances théoriques du panel microsatellite développé.

Matériel et méthodes

Origine des échantillons.

Un échantillonnage aussi large que possible des populations commerciales de canards a été réalisé auprès des entreprises adhérentes du SYSAAF qui ont fourni des prélèvements sanguins de différentes lignées de canards Pékins, de canards Colvert et de canards de Barbarie. Les échantillons de Mulards provenaient d'une entreprise de sélection et d'un dispositif expérimental INRA. L'objectif de cette collecte était de refléter le polymorphisme entre

populations, de façon à mettre au point un panel de microsatellites qui soit utilisable dans un grand nombre de situations. Pour l'étude du polymorphisme des marqueurs, 96 échantillons Mulards, Barbaries et Pékins non apparentés ont été utilisés. Un premier test d'assignation inter-espèce,

a été réalisé sur 91 Mulards répartis dans 4 parcs de 10 males barbaries. Puis une seconde assignation de parenté sur un plus grand nombre d'animaux a été testée pour 711 Mulards en comparaison paternelle.

TABEAU 1 : Composition du panel microsatellites canards

| Multiplex | Marqueur | Amorce directe | Amorce reverse | Marquages | Tailles (pb) |
|-----------|----------|-----------------------|----------------------------|-----------|--------------|
| MP1 | APH04 | TAGCCCTACAACAAGCCAAG | GTCATGGTGCAGCTATCGAG | HEX | 130-175 |
| MP1 | CAM073 | AGGATGCAGTCTACATTGCA | CCAGTTTCACCAGTTGAGAAG | HEX | 190-220 |
| MP1 | CAM155 | GGCAGCAAATTAAGGTTGAC | GACAAGGCTATCCTGGCTTA | HEX | 250-280 |
| MP1 | CAUD102 | CTGGAGGATGCAGGAGAC | CTCAGCCCCAGTCACAAG | 6-FAM | 105-145 |
| MP1 | CAUD120 | CTCCCAAGGAAGTCTCTGC | GTGTGTGGAGGGGAATCATC | 6-FAM | 185-220 |
| MP1 | CAUD065 | TGAAACCTCTGTGCCATTCC | TGCAAGCCCTTTTATCCTG | NED | 160-208 |
| MP1 | CAUD064 | AACACTTGGAGCCCACAGAC | TCAGCAGAGAGTGGCTTTTTC | NED | 210-230 |
| MP1 | CAUD111 | CATCCCTGCTCCTGTTTTG | TGTGATGGTATGGCTGTTTTTC | NED | 245-295 |
| MP2 | CAM053 | GCCATGGCTCCACAGCAG | ATCTCCACATTGGGTCACG | HEX | 155-185 |
| MP2 | CAUD127 | AGCAAGCAATCTCACCTTCC | TCAACCAGATAAAACAATAGATCCAG | HEX | 195-230 |
| MP2 | CAUD026 | TCACCTACTCCCAAACAGCAC | GGTCCAAGGAAGCAAGAGC | 6-FAM | 120-150 |
| MP2 | CAM044 | GCATGGGAAGCCAATGTTTT | CGCATGATTTCTGCTTCTCTAT | 6-FAM | 170-220 |
| MP2 | CAM042 | CTGTGTCTGTGTGAAGCCTA | CCCCATGGAAAGAACTGACAAA | 6-FAM | 230-260 |
| MP2 | APT015 | TGACACCATGTTTGGATTAGC | ACCTCTACCCTCCTCACTGG | NED | 175-220 |
| MP2 | CAUD059 | CCCCATTCCAAGTCTGTC | ACGCTATCCCTGCTCTCTTG | NED | 270-310 |

Choix des marqueurs.

Une première liste de 148 marqueurs microsatellites, a été établie sur plusieurs critères, parmi les 257 développés et mis au point au laboratoire INRA de Génétique Cellulaire (Fève et al., 2008). L'origine de la séquence de ces marqueurs était double : d'une part 161 marqueurs microsatellites issus d'une banque construite au laboratoire (Genet et al., 2003); et d'autre part un grand nombre de marqueurs dont les séquences avaient été récemment rendues disponibles dans les bases de données internationales de séquences nucléotidiques. Les principaux critères de sélection pour ces marqueurs ont été 1) la capacité à amplifier les deux espèces de canard, 2) leur taux de polymorphisme défini chez les 7 individus canard commun F1 du dispositif GENECAN (Croisement Pk37x Pk 444) et chez 8 individus Barbarie, ainsi que 3) leur position sur le génome. Afin d'optimiser la répartition des marqueurs le long du génome du canard, nous avons utilisé plusieurs sources d'informations pour estimer leur

position sur le génome : d'une part la carte génétique établie (C.Marie-Etancelin 2009, communication personnelle) et d'autre part une étude de similarité avec la poule. A partir de ces informations, 99 couples d'amorces ont été testés par LABOGENA sur l'échantillonnage de 96 animaux d'origines diversifiées afin d'obtenir un panel final de 15 à 20 marqueurs microsatellites répartis en deux multiplexes.

Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée par une technique de lyse alcaline. Le sang est préalablement incubé avec du NE (NaCl /EDTA) 10mM pH7 pendant une nuit à 4°C. Après deux autres lavages au NE, la lyse est pratiquée avec du NaOH 200mM, pendant 3 heures à 60°C sous agitation. L'échantillon est ensuite neutralisé avec un tampon HCl 200 mM-Tris HCl 100 mM. La neutralité du pH final est vérifiée et la concentration d'ADN est ajustée pour atteindre en moyenne 50 ng/µl.

Génotypage des animaux.

Les échantillons ont été génotypés par PCR avec des amorces fluorescentes (Eurogentec et Applied Biosystem) spécifiques de chaque marqueur microsatellite étudié, dont la concentration est ajustée entre 0,03µM et 0,2µM. La PCR est réalisée en plaque 384 dans un volume final de 5µl avec du MasterMix Multiplex PCR (QIAGEN) contenant des dNTPs, de la Taq Polymérase et du tampon enrichi en MgCl₂ sur des machines PCR (384-Well GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystem). Les échantillons après PCR sont déposés avec du standard de taille (GeneScan™-500 ROX™ Applied Biosystem) sur un séquenceur 96 capillaires (96-capillary 3730xl DNA Analyzer, Applied Biosystems) et analysés avec le logiciel GeneMapper® (Applied Biosystem).

Résultats et discussion

Etude du polymorphisme des microsatellites.

Parmi la liste de 148 microsatellites, 99 ont été sélectionnés en fonction du nombre d'allèles observés dans les deux espèces, Barbarie et Pékin. Ces marqueurs ont ensuite été testés sur les 96 échantillons d'origines très diversifiées, Mulards, Barbaries et Pékins non apparentés afin de sélectionner les marqueurs les plus informatifs. Le

choix des 15 marqueurs finaux a ainsi été fait sur plusieurs critères : amplification des différentes espèces de canard, taux de polymorphisme, robustesse, facilité de lecture. Ils ont ensuite été répartis, en fonction de leurs tailles d'allèles, en deux multiplexes (MP1 et MP2), respectivement de 8 et 7 marqueurs (Tableau 1).

Etude des performances des marqueurs.

Les performances théoriques des marqueurs ont été étudiées dans chaque espèce (96 canards de Barbarie et 96 canards Pékin) et au sein d'une population de 96 hybrides Mulard (Tableau 2). Les probabilités d'identité sont de 7,5. 10⁻¹⁰ pour le Barbarie, 4,8 x 10⁻⁹ pour le Pékin et 1,1.10⁻¹³ pour le Mulard. Les probabilités d'exclusion en présence des deux parents sont proches de 0,99999, et supérieure à 0,9 en présence d'un seul parent pour toutes les populations. Certains marqueurs, comme par exemple CAUD026 et CAM044 donnent de faibles résultats chez le canard de Barbarie mais de bons résultats chez le canard Pékin, ce qui illustre la difficulté à trouver des marqueurs informatifs dans toutes les populations étudiées. Au final, 15 marqueurs ont été sélectionnés pour le panel canards. Ce chiffre est plus important que pour les panels utilisés chez les poissons qui contiennent en moyenne 11 microsatellites, mais les marqueurs chez les poissons sont plus polymorphes avec 10 allèles en moyenne contre 4,7 chez le canard.

TABLEAU 2 : Performances théoriques du panel « Canards »

| | Canard de Barbarie | Canard Pékin | Canard Mulard |
|----------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| Nombre d'allèles (moyenne) | 2 - 8 (4,2) | 2 - 6 (3,9) | 3 - 11 (6) |
| Identité | 7,5.10 ⁻¹⁰ | 4,8.10 ⁻⁹ | 1,1.10 ⁻¹³ |
| Exclusion 1 parent | 0,9577 | 0,9356 | 0,9952 |
| Exclusion 2 parents | 0,99995 | 0,9998 | 0,9999998 |

TESTS D'ASSIGNATIONS INTER-ESPECES

Lors du premier test d'assignation de parenté inter-espèces, 91 Mulards répartis dans 4 parcs de 10 mâles Barbarie ont été étudiés. 65 Mulards ont été assignés à 1 seul père avec tous les marqueurs et 19 ont été assignés à 1 marqueur près. Ce qui correspond à un pourcentage d'assignation total de 92,3% avec un seul parent. Les taux d'assignation obtenus sont homogènes entre les parcs et vont de

88 à 100%. Ces résultats sont très satisfaisants et comparables aux pourcentages d'assignation obtenus chez le poisson.

Afin de tester les assignations sur un plus grand nombre d'animaux, un second test a été réalisé entre 711 produits Mulards et 180 pères canard de Barbarie. Le pourcentage d'assignation obtenu est de 84,8% à 1 seul père, dont 7,4% d'assignation « hors plan » (c'est à dire à des pères inattendus, ce

qui révèle des erreurs dans la traçabilité du dispositif). Le résultat est plus faible que celui obtenu lors du premier test, mais s'explique par un nombre conséquent d'animaux qui n'ont pas pu être typés (9%). Plusieurs raisons techniques peuvent expliquer cette absence de résultat : le manque de sang dans le tube, une mauvaise qualité du prélèvement ou la présence de caillots. Il faut aussi noter que 4% des échantillons ont été assignés à plusieurs pères. Afin de résoudre ce problème de poly-assignation, les femelles vont aussi être typées. L'information génétique apportée par les mères devrait en effet nous permettre d'augmenter les pourcentages d'assignations.

Conclusion et perspectives

La difficulté de cette étude est d'obtenir un panel utilisable dans des espèces de canard différentes, car les microsatellites donnent des performances différentes dans chaque cas. Ainsi, le panel obtenu a donné des premiers résultats d'assignation de parenté satisfaisants en inter-espèces mais doit maintenant être testé en intra-espèce chez le canard de Barbarie et le canard Pékin. Nous aurons alors sans doute besoin de l'ajuster et deux solutions s'offrent à nous : soit nous trouvons de nouveaux marqueurs microsatellites performants dans les 3 populations, canards de Barbarie, Pékins, et Mulards, soit nous devons nous résoudre à établir un second panel.

Les intérêts d'un tel outil sont multiples et son utilisation peut profondément modifier les pratiques de la sélection avicole. Dans le cas du canard Mulard, nous pouvons imaginer la sélection des reproductrices Pékin au sol et une insémination en sperme mélangé, comme à l'étage de multiplication. Les mulards abattus seraient alors typés pour permettre l'indexation des parents. Il est même envisageable, sous réserve de résoudre des problèmes techniques posés par la concentration élevée en triglycérides, de typer uniquement les foies gras après abattage et non les canards. Nous allons, d'ailleurs, prochainement rechercher des solutions pour résoudre ces difficultés d'extraction d'ADN à partir de foie gras. Cette démarche suppose toutefois que les caractéristiques du foie représentent le seul caractère d'intérêt chez le Mulard. Dans le cas contraire, il demeurera nécessaire de génotyper le canard et d'assurer la traçabilité des différents morceaux de découpe tout au long de la chaîne d'abattage.

D'un point de vue du traitement statistique, la mutation du schéma de sélection induite par l'utilisation d'une méthode d'assignation de parentés *a posteriori* est potentiellement profonde, car il suppose de passer d'un schéma hiérarchique (une femelle accouplée avec un seul mâle sauf

période de virginisation pendant laquelle la filiation des canetons ne peut être garantie par les procédures habituelles) à un schéma de type factoriel (plusieurs mâles sont utilisés pour féconder plusieurs femelles). Un tel schéma factoriel permet de prendre en compte des effets d'interaction tels que la dominance pour expliquer les données. Il permet également d'introduire de façon plus rigoureuse des effets maternels. Même si la pertinence de ces nouveaux modèles est moindre en cas de profond déséquilibre dans la contribution des différents parents potentiels à la population génotypée, la prise de conscience d'un tel phénomène constituera, à elle seule, une information de grande valeur pour les sélectionneurs qui doivent préserver la variabilité génétique de leurs populations.

Par ailleurs, il faut noter que ces outils permettent également de vérifier les généalogies supposées connues. Le simple fait que l'on puisse trouver des parentés « hors plan » laisse présager une fréquence d'erreur non nulle dans leur enregistrement, qu'il importe de réduire au strict minimum pour préserver l'efficacité de la sélection.

Enfin, l'utilisation de ces outils suppose une réorganisation des schémas de sélection, pour prendre en compte le nécessaire délai de traitement des échantillons avant l'obtention des génotypes.

Références

- Genet C, Vignal A, Larzul C., 2003, Br. Poult. Sci., 44:794-795.
- Dupont-Nivet M., Vandeputte M., Haffray P., and Chevassus B., 2006. Aquaculture 252: 161-170
- Fève K, Bounet M, Leroux S, Bardes S, Vignal A, Marie-Etancelin C., 2008, in : 8èmes Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras; octobre 30-31; Arcachon, France. 2008: 25-28.
- Saillant, E., Dupont-Nivet, M., Haffray, P. and Chatain, B., 2006. Aquaculture 254: 139-147.
- Vandeputte M., Dupont-Nivet, M., Haffray, P., Chavanne H., Cenadelli, S., Parati, K., Vidal M.O., Vergnet A., Chatain, B., 2009. Aquaculture, 286, 20-27.

Remerciements.

FranceAgriMer a soutenu le programme APACHE au titre des Actions Innovantes et contribue par ailleurs au budget du SYSAAF via une subvention annuelle. Les auteurs l'en remercient.