

# ANALYSE DU TRANSCRIPTOME MUSCULAIRE DU POULET EN RELATION AVEC LA PERFORMANCE DE CROISSANCE

Jenkins Cédric<sup>1</sup>, LeBihan-Duval Elisabeth<sup>1</sup>, Simon Jean<sup>1</sup>, Cogburn Larry<sup>2</sup>, Duclos Michel J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, Station de Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly, France <sup>2</sup>Department of Animal and Food Sciences, University of Delaware, Newark, 19717 Delaware, USA

## Analyse du transcriptome musculaire du poulet en relation avec la performance de croissance

Des puces à ADN ont été utilisées afin d'étudier le profil d'expression global du muscle Pectoralis major de deux génotypes de poulet sélectionnés de façon divergente pour la performance de croissance (croissance rapide ou lente). A l'âge de 5 semaines, environ 750 gènes (sur 3718 gènes analysés avec les fluorochromes cyanines 3 et 5 et 2407 gènes avec les fluorochromes alexa 647 et 555) sont exprimés à des niveaux différents entre les deux génotypes. 255 gènes différentiellement exprimés ont été identifiés indépendamment des fluorochromes utilisés. Les gènes différentiellement exprimés (environ 750) ont été classés grâce aux annotations ontologiques de Gene Ontology. La sélection a eu pour effet une modulation des niveaux d'ARN messagers de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et protéique, la croissance cellulaire, la traduction de signal, la régulation de la transcription ou le développement musculaire. En particulier, des gènes impliqués dans la glycolyse sont plus exprimés dans le muscle des poulets à croissance rapide alors que des gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif sont moins exprimés. Ceci est en accord avec les résultats d'une étude précédente, portant sur les activités métaboliques. L'étude révèle aussi une expression différente de gènes de fonction encore inconnue. L'étude longitudinale à plusieurs stades de croissance qui est en cours permettra d'identifier des gènes impliqués dans le développement musculaire et d'expliquer en partie l'effet de la sélection génétique sur la performance de croissance.

## Analysis of the chicken muscular transcriptome in relation to growth performance

DNA microarrays were used for global gene expression profiling in the Pectoralis major muscle of divergently selected broiler chickens with high or low growth rate. The data showed that approximately 750 genes (out of 3718 genes analysed in a cyanine 3 and 5 experiment and 2407 genes analysed in an experiment using alexa 647 and 555 dyes) were differentially expressed between the two genotypes at the age of 5 weeks. 255 genes were differentially expressed regardless of the dyes used. The differentially expressed genes (approximately 750) were classified using Gene ontology annotations. Selection modulated the level of RNA messengers encoding genes involved in energy and protein metabolism, cellular growth, cell signalling, transcription regulation, or muscular development. Genes involved in the glycolytic pathway were expressed at higher levels in the high growth genotype, whereas genes involved in the oxidative pathway were expressed at lower levels. This is in accordance with metabolic activities recorded in a previous study. A number of genes with presently unknown functions were also differentially expressed. The longitudinal study underway, conducted at several stages of growth, will identify candidate genes that could be involved in muscle development and explain in part, the effect of genetic selection on growth rate.

## INTRODUCTION

La diversité des productions de volailles de chair repose essentiellement sur la diversité des vitesses de croissance, avec une influence directe ou indirecte sur la qualité des viandes. La compréhension des mécanismes impliqués dans la croissance pourrait donc contribuer à terme à la maîtrise conjointe de la qualité de la viande et de la performance de croissance. Afin d'appréhender de façon globale ces

mécanismes, l'analyse du transcriptome, une nouvelle approche permettant de suivre l'expression d'un grand nombre de gènes, est utilisée sur un modèle expérimental constitué de deux génotypes de poulets sélectionnés de manière divergente. Les poulets à croissance rapide (lignée lourde) ou à croissance lente (lignée légère) (Ricard et al, 1975) diffèrent au même âge par leur masse musculaire qui est plus importante, avec des fibres plus grosses et plus nombreuses, chez les lourds que chez les légers

(Remignon et al, 1995). Les poulets lourds présentent également des taux circulants d'IGF-1 (un facteur de croissance musculaire) ainsi que des niveaux d'ARN messagers (ARNm) d'IGF-1 hépatique plus importants (Beccavin et al, 2001). Dans ce modèle a priori polygénique, d'autres gènes doivent être impliqués.

La comparaison du transcriptome des deux génotypes se fait grâce à des puces portant l'empreinte de 18000 ADN complémentaires du génome *Gallus gallus*, développées par le Pr. Cogburn (Université de Delaware). Des comparaisons à six stades (1, 3, 5, 7, 9, 11 semaines) sont en cours afin de suivre l'évolution globale de l'expression des gènes pendant le développement post-natal du muscle Pectoralis major. La première comparaison, effectuée à l'âge de 5 semaines, avait pour objectif de mettre en place le dispositif expérimental et tester sa capacité à détecter des gènes pouvant être impliqués dans la performance de croissance et la qualité de viande. Les résultats obtenus sont brièvement présentés.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Principe

Cette analyse du transcriptome est basée sur l'hybridation ou l'accrochage ADN/ADN entre des sondes (produit de PCR ou ADN complémentaires double brin) déposées sur une lame de verre et des cibles d'ADN complémentaire (ADNc) synthétisées à partir d'extraits d'ARN de muscle des animaux à étudier. Un couple de fluorochromes émettant à des longueurs d'ondes différentes va permettre de distinguer deux populations de cibles hybridées simultanément sur une lame. Les signaux sont quantifiés grâce à un scanner couplé à des logiciels d'analyse d'images. Ceci permet de quantifier les ADNc, ce qui correspond (après certaines étapes d'analyse) aux niveaux d'expression des ARNm.

### 1.2. Génotypes expérimentaux

Des poulets mâles légers ou lourds ont été élevés au sol avec des aliments standards distribués ad libitum et une durée d'éclairage de 14hr (6-20hr). A l'âge de 5 semaines, 6 poulets de chaque lignée ont été choisis et abattus à l'état nourri. Des échantillons de muscle Pectoralis major ont été prélevés rapidement, mis dans de l'azote liquide et stockés à -80°C.

### 1.3. Lames

Les puces à ADN utilisées dans cette étude sont des lames de verre portant l'empreinte de 18000 ADNc organisés en micro-réseau, issus de plusieurs tissus de poulet : foie, muscle, tissu adipeux, appareils reproducteurs, hypophyse et hypothalamus (Cogburn et al, 2004 <http://udgenome.ags.udel.edu/cogburn>).

### 1.4. Extraction, marquage et hybridation

L'ARN total a été extrait des échantillons de muscles broyés grâce au kit Rneasy Fibrous tissue (Qiagen) (n=6 animaux par lignée). La quantité et la qualité de l'ARN ont été évaluées à l'aide d'un spectrophotomètre et d'une puce d'électrophorèse microcapillaire (Bioanalyser, Agilent technologies). Pendant une étape de rétrotranscription, l'ARN messenger a été converti en ADNc marqué de façon indirecte avec un fluorochrome (Cyanine 3/Cyanine 5 ou Alexa 555/Alexa 647). Les ADNc marqués, d'un échantillon de chaque lignée, ont été purifiés et déposés simultanément sur les lames (étape d'hybridation) et incubés 16 hr à 42°C. Après lavage, la lecture des lames s'est faite grâce au scanner Axon instruments 4000B et les images analysées avec le logiciel GenePix Pro 4.1.

### 1.5. Analyse des données

Les lames avec un bruit de fond acceptable ( $\leq 300$ ) et sans anomalie particulière ont été utilisées pour la suite de l'analyse. La première étape de l'analyse a consisté à éliminer les signaux correspondant aux dépôts d'ADNc de mauvaise qualité ou dont l'intensité était inférieure à 2,5 fois le bruit de fond. Les intensités des ADNc ont été normalisées grâce à la méthode des rangs invariants (Tseng et al, 2001) utilisée dans le logiciel Madscan (Le Meur et al, 2004). Cette méthode consiste à trouver des gènes dont l'expression ne varie pas et les utiliser pour effectuer plusieurs étapes de normalisation suivies d'une étape de détection de valeurs aberrantes. Les logarithmes (log) des rapports des intensités d'échantillon lourd sur léger normalisés ont été analysés grâce au logiciel Significance Analysis of Microarray (SAM, Tusher et al, 2001).

### 1.6. Classification des gènes

Afin d'avoir une vue globale des processus biologiques qui peuvent être modifiés par la croissance et d'identifier plus facilement les gènes pouvant être impliqués, de part leur fonction, dans le contrôle de la croissance musculaire un regroupement des gènes a été entrepris. Ceci a consisté à les regrouper en fonction du processus biologique dans lequel ils sont impliqués. Les gènes connus ont été classés grâce aux annotations de Gene Ontology (GO). Pour ce faire, les numéros TC de *Gallus gallus* (Tentative consensus de la mise à jour du 28/01/05) des gènes et leurs annotations ont été obtenus dans la base de données de TIGR ([www.tigr.org](http://www.tigr.org)) et une classification a été effectuée.

## 2. RESULTATS

A l'âge de 5 semaines, les poulets à croissance rapide sont en moyenne 2.8 fois plus lourds que les poulets à croissance lente (898±75 g vs 318±29, p<0.01).

### 2.1. Analyse globale

Dans l'expérience avec les fluorochromes cyanine 3/cyanine 5, 6 lames ont été utilisées. Après les étapes de normalisation par gènes invariants, seuls les rapports d'expression entre deux échantillons de génotypes différents, correspondant aux gènes pour lesquels il existait des dépôts exploitables sur au moins 4 lames/6 ont été retenus pour l'analyse statistique par SAM. L'analyse statistique sur 3718 log rapports a permis d'identifier 745 gènes exprimés à des niveaux différents (142 surexprimés et 603 sous-exprimés chez la lignée lourde), à un taux de faux positifs de 1%. Dans l'expérience avec les fluorochromes Alexa, seulement 4 lames ont été utilisées. L'analyse statistique de 2407 log rapports montre que 437 gènes sont surexprimés chez les poulets lourds et 295 sous-exprimés pour un taux de 1% de faux positifs.

**Tableau 1-** Détermination du nombre de gènes en commun entre l'expérience cyanine (n=6 lames) et alexa (n=4 lames) en terme de gènes analysés ou exploités, de gènes différentiellement exprimés, surexprimés ou sous-exprimés à un taux de faux positifs de 1%.

Expérience	Nombre de gènes		
	Cyanine	Communs	Alexa
Gènes exploités	3718	2260	2407
Gènes différentiellement exprimés	745	255	732
Surexprimés	142	56	437
Sousexprimés	603	199	295

Dans cette étude, 6 lames avec un marquage à la cyanine sont nécessaires pour avoir le même nombre de gènes différentiellement exprimés que 4 lames dans l'expérience alexa, pour un taux de faux positif identique. L'analyse sur 4 lames avec les mêmes échantillons donne seulement 44 gènes différentiellement exprimés et limite donc une analyse comparative. Cependant, le rapport moyen est plus élevé pour l'expérience utilisant des fluorochromes alexa. 2260 gènes analysés étaient communs aux deux expériences et environ 35% des

gènes différentiellement exprimés était commun aux deux analyses (tableau 1).

**Tableau 2 -** Détermination du nombre de gènes entre l'expérience cyanine et alexa en fonction de la fourchette de rapport d'intensité cy5/ cy3 ou échantillon lourd/léger ou alexa647/ alexa555 (lourd/ léger).

Rapport - Intensité X33/X44	Nombre de gènes		
	Cyanine	Alexa	Communs
>2	0	6	0
1,5-2	5	86	0
1-1,5	137	345	33
0,5-1	602	279	185
<0,5	1	16	0

Commun entre 1,5-2 Alexa et 1 à <1,5 Cyanine 13  
Commun entre <0,5 Alexa et 0,5 à 1 Cyanine 19

En ce qui concerne les rapports d'intensité, l'analyse montre que la majorité des gènes a un rapport entre 0,5 et 1,5 pour les deux expériences mais que l'expérience alexa présente une gamme de rapports des intensités plus large avec des rapports supérieurs à 2 et inférieurs à 0,5 malgré un nombre de gènes exploités plus faible (tableau 1 et 2). De plus, l'analyse montre que le rapport de certains gènes se retrouve plus important dans l'expérience alexa (tableau 2).

### 2.2. Classification par Gene Ontology

Un regroupement des gènes exploitables avec les fluorochromes alexa ou cyanine montre que certains des gènes se retrouvent dans des catégories intéressantes pour le développement musculaire comme des gènes du métabolisme (isocitrate deshydrogenase), de l'appareil contractile (tropomyosine alpha), ou impliqués dans la protéolyse (des protéines du protéasome). L'expression protéique de certains des gènes exploitables est connue pour être modulée pendant la croissance postnatale du muscle pectoral de poulet de chair (Doherty et al, 2004). Sur environ 745 gènes exprimés à des niveaux statistiquement différents entre les deux génotypes dans l'expérience Cyanine 3/Cyanine 5, 285 avaient une annotation de Gene Ontology et ont pu être classés par rôle biologique. La figure 1 montre leur répartition dans 8 catégories différentes. Ces gènes sont impliqués dans les métabolismes énergétique (17) ou protéique (18), la croissance cellulaire (22), la signalisation cellulaire (29), l'apoptose (3), le transport (13), la régulation de la transcription (20) ou le développement musculaire (9). L'annotation ontologique de l'expérience alexa montre que les mêmes catégories présentées de processus biologiques sont aussi différentiellement exprimées (données non montrées).

### 3. DISCUSSION

L'analyse du transcriptome est une technique assez récente qui offre plusieurs choix en ce qui concerne la stratégie de normalisation (globale ou rangs invariants, etc...) et l'analyse statistique (analyse de la variance, SAM, analyse bayésienne, etc). L'objectif premier de cette étude était de choisir et de mettre en place un dispositif expérimental permettant de détecter avec fiabilité des changements au niveau du transcriptome musculaire en relation avec la performance de croissance.

Les données ou signaux bruts des puces à ADN sont sujets à des biais d'origine technique qui peuvent masquer les variations biologiques à mettre en évidence. Il est donc nécessaire de procéder à l'étape cruciale de normalisation afin que les données (intensités ou rapports) représentent des différences d'expression en terme d'ARN messenger. La méthode des rangs invariants qui consiste à chercher des gènes d'expression invariante (log de rapport égale à zéro) entre échantillons appariés présente l'avantage de ne pas se baser sur des hypothèses a priori.

Les analyses statistiques appliquées aux études du transcriptome sont de plus en plus nombreuses mais cherchent toutes à corriger pour la comparaison multiple et donc diminuer le risque de faux positif. SAM présente l'avantage d'être un test non paramétrique (ne faisant pas d'hypothèse sur la distribution des données étudiées) grâce à un test de permutation. Elle permet également de calculer un taux de faux positifs basé sur le nombre de gènes statistiquement significatifs (taux de fausse découverte ou FDR) et d'utiliser le taux de faux positifs comme critère de sélection des gènes significatifs. D'autres études en cours (analyse de la variance, analyse discriminante, etc...) permettront d'affiner ces résultats.

Cette première étude a été réalisée aussi afin de comparer les performances des couples de fluorochromes Cy3/Cy5 et alexa 647/555. Pour un même nombre de lames analysées, les rapports obtenus et le nombre de gènes exprimés différemment sont plus élevés avec les fluorochromes alexas (données non montrées). En revanche, le faible nombre de gènes différemment exprimés ne permettait pas de comparer de façon approfondie les résultats de ces analyses. Il a donc été nécessaire de comparer les résultats de 6 lames avec un marquage à la cyanine avec 4 lames avec un marquage à l'alexas afin d'avoir un même nombre de gènes différemment exprimés avec un taux de faux positifs de 1%. Ceci pourrait s'expliquer par une plus grande variabilité due à l'utilisation de la cyanine 5 (Cox et al, 2004). Le fait que certains gènes présentent des rapports d'intensités plus importants avec les fluorochromes alexa pourrait s'expliquer par une zone où la relation entre niveau d'expression d'ARNm et niveau d'intensité (gamme de linéarité) est plus large en ce

qui concerne ces derniers fluorochromes. Ceci pourrait être dû au fait que les fluorochromes alexas soient moins affectés par le phénomène de « quenching » (Cox et al, 2004), une cause possible d'une gamme de linéarité réduite. Cette étude montre que la puissance statistique et le nombre de lames nécessaires pour avoir une bonne puissance statistique peuvent être tributaire des fluorochromes utilisés. Il en résulte que le nombre et l'identité des gènes identifiés comme statistiquement différentiels peuvent dépendre des fluorochromes utilisés. Cette étude nous conduira à utiliser les fluorochromes alexas pour la suite des comparaisons. Cette étude, composée de deux répétitions techniques avec des fluorochromes de caractéristiques différentes, nous a aussi permis d'identifier 255 gènes différemment exprimés indépendamment des fluorochromes utilisés.

Les différences observées entre les génotypes au niveau du transcriptome pourraient rendre compte des différences d'activités métaboliques globales déjà observées entre les deux lignées (Rémignon et al, 1995). L'activité de la voie métabolique glycolytique qui est prépondérante dans le muscle Pectoralis major augmente avec l'âge, mais à une vitesse différente selon le génotype. A l'âge de 5 semaines, elle est significativement plus élevée chez les poulets lourds que chez les légers (Rémignon et al, 1995). A l'inverse, l'activité de la voie oxydative est plus faible chez les poulets lourds que chez les légers. La présente étude montre que cela se traduit chez les poulets lourds par une augmentation des ARN codant pour des gènes impliqués dans la glycolyse, comme celui de la malate déshydrogénase mitochondriale et une diminution des ARN messagers de gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif tels que ceux de la PEPCK mitochondriale et de l'isocitrate déshydrogénase. Une validation par RT-PCR en temps réel est en cours. Les premiers résultats confirment l'expression différentielle de l'isocitrate déshydrogénase et la malate déshydrogénase cytosolique. Etant donné que le métabolisme des fibres musculaire est un facteur déterminant pour la qualité de la viande, ces gènes pourraient être impliqués dans les relations entre performance de croissance et qualité de viande.

D'autres gènes exprimés à des niveaux différents, qui appartiennent aux catégories des facteurs de transcription, des molécules de transduction du signal ou des facteurs importants pour le développement musculaire pourraient jouer un rôle dans la performance de croissance musculaire et par extension dans la qualité de la viande. Enfin, des gènes de fonction inconnue sont exprimés à des niveaux différents entre les deux lignées.

## CONCLUSION

Cette comparaison des transcriptomes musculaires entre poulets lourds et légers âgés de 5 semaines a permis de choisir un dispositif basé sur l'usage des fluorochromes alexas et une stratégie d'analyse. Elle met également en relation le profil transcriptomique et le profil métabolique ou biochimique du muscle pectoral des deux génotypes. Des gènes liés au développement musculaire, à la croissance cellulaire, au métabolisme ou à leurs régulations sont exprimés différemment entre les deux lignées. L'analyse du transcriptome appliquée à différents stades de la croissance ainsi que des techniques (RT-PCR en

temps réel) et études (analyse de QTLs) complémentaires devraient permettre l'identification de gènes importants pour la croissance musculaire et la qualité de viande chez le poulet.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs sont reconnaissants à E.Godet et T. Bordeau pour leur assistance technique. Le travail en cours est réalisé grâce au soutien financier du programme USDA-IFAFS (N°00-52100-9614) accordé à L.Cogburn et al.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beccavin, C., B. Chevalier, L.A. Cogburn, J. Simon And M.J. Duclos, 2001. *J.Endocrinol.* 168 (2):297-306.  
Cogburn, L.A., X. Wang, W. Carre, L. Rejto, S.E. Aggrey, M.J. Duclos, J. Simon, And T.E. Porter, 2004. *Comp Funct Genom.* 5: 253–261.  
Cox W.G., M.P.Baudet, J.Y. Agnew, And J.L. Ruth, 2004. *Analytical Biochem.* 331:243-254.  
Doherty, M.K., L. Mclean, J.R. Hayter, J.M. Pratt, D.H.L. Robertson, A. El-Shafei, S.J. Gaskell, And R.J. Beynon, 2004. *Proteomics.* 4:2082-2093.  
Le Meur, N., G. Lamirault, A. Bihouee, M. Steenman, H. Bedrine-Ferran, R. Teusan, G. Ramstein And J.J. Leger, 2004. *Nucleic Acids Res.* 32 (18):5349-58.  
Remignon, H., Mf. Gardahaut, G. Marche And F.H. Ricard, 1995. *J Muscle Res Cell Motil.* 16 (2):95-102.  
Ricard, F.H., 1975. *Ann Genet Select Anim.* 7:427-443.  
Tseng, G.C., M.K. Oh, L. Rohlin, J.C. Liao, And W.H Wong, 2001. *Nucleic Acids Res.* 29 (12):2549-57.  
Tusher, V.G., R. Tibshirani, G. Chu, 2001. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (9):5116-21.

**Figure 1-** Classification des gènes différemment exprimés dans le muscle Pectoralis major des poulets à croissance rapide ou lente, à l'âge de 5 semaines. Ce regroupement s'est effectué grâce aux annotations de Gene Ontology. Seuls 285 gènes différemment exprimés parmi 745 ont une annotation. Les colonnes représentent des nombres de gènes par catégories.

