



HAL
open science

La lignée ” Leghorn double jaune” : un modèle d’étude du déterminisme génétique du taux d’ovulation chez la poule

Agathe Vieaud, Stéphane Fabre, David Gourichon, Jean-Luc Coville, Thierry Heirman, Bertrand Bed’Hom, Michèle Tixier-Boichard

► To cite this version:

Agathe Vieaud, Stéphane Fabre, David Gourichon, Jean-Luc Coville, Thierry Heirman, et al.. La lignée ” Leghorn double jaune” : un modèle d’étude du déterminisme génétique du taux d’ovulation chez la poule. 8. Journées de la Recherche Avicole, Mar 2009, Saint-Malo, France. hal-01193489

HAL Id: hal-01193489

<https://hal.science/hal-01193489>

Submitted on 4 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

LA LIGNEE « LEGHORN DOUBLE JAUNE » : UN MODELE D'ETUDE DU DETERMINISME GENETIQUE DU TAUX D'OVULATION CHEZ LA POULE

**Vieaud Agathe¹, Fabre Stéphane², Gourichon David³, Coville Jean-Luc¹, Heirman
Thierry¹, Bed'Hom Bertrand¹, Tixier-Boichard Michèle¹**

¹INRA, UMR1236 Génétique et Diversité Animales, Dom. de Vilvert F-78352 Jouy-en-Josas

²INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et du Comportement F-37380 Nouzilly

³INRA, UE Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours F-37380 Nouzilly

RÉSUMÉ

Le taux d'ovulation a été intensément sélectionné chez la poule mais le déterminisme génétique des variations du taux d'ovulation est mal connu. Une lignée expérimentale de poules White Leghorn double-jaune (WLDJ) sélectionnée sur le taux d'ovulations multiples (deux jaunes ou plus par œuf pondu) présente une similitude phénotypique avec des lignées hyperprolifiques ovines, portant des mutations de certains gènes impliqués dans le contrôle de l'ovulation, tels que BMP15. L'expression du phénotype 'double jaune' de la WLDJ est diminuée par la mutation 'nanisme liée au sexe' qui inactive le récepteur de l'hormone de croissance. Les objectifs de cette étude sont de mieux caractériser le phénotype 'ovulation double' dans cette lignée. Sur la génération 2008, le taux moyen d'œufs doubles (%D) en 5 mois de ponte était de 26,2% sur 156 poules normales, et 13,6% sur 35 poules naines, avec une variation de 0% à 51,7%. Une lignée Leghorn non sélectionnée sur ce critère a un taux de 2%. La lignée WLDJ se caractérise par la persistance de la production d'œufs doubles tout au long de la ponte. Etant donné la croissance lente de cette lignée, le phénomène d'ovulations multiples n'est pas ici une réponse corrélée à la sélection sur la vitesse de croissance, comme chez les lignées de type chair. La distribution du %D apparaît normale mais présente un fort coefficient de variation (40%); la comparaison des familles les plus grandes (19 à 43 poules) ne montre pas d'hétérogénéité de variance. Le séquençage partiel du gène BMP15 a montré trois sites polymorphes dans deux exons et l'intron 1 sur 6 animaux de 5 familles différentes. Il est proposé de croiser des coqs de la lignée WLDJ avec des poules d'une lignée normale afin d'étudier la distribution du taux d'œufs doubles et de suivre le polymorphisme de gènes candidats possibles tels que BMP15.

Mots clés : poule pondeuse, sélection, ovulation multiple, nanisme, gène BMP15

ABSTRACT

Ovulation rate has been intensely selected in hens but the genetic determinism of variations in ovulation rate is not well understood yet. An experimental line of White Leghorn Double Yolk hens (WLDJ) selected for multiple ovulation rate (two yolks or more per laid egg) shows phenotypic similitude with hyperprolific ovine lines, carrying mutations for some genes involved in ovulation control, such as BMP15. The "double yolk" phenotype is decreased by the sex-linked dwarf mutation which invalidates the growth hormone receptor. The aim of the study was to improve the characterization of the phenotype of WLDJ line. In 2008, the average rate of double eggs (%D) over 5 months of lay was 26,2% for 156 hens and 13,6% for 35 dwarf hens, with a variation of 0% to 51,7%, while a Leghorn line, non selected on this criteria, had a rate of 2%. In the WLDJ line, a high rate of double-yolk eggs is continuous throughout laying. Considering the slow growth of this line, the multiple ovulations phenomenon is not here a correlated response to selection on growth rate, as it happens in broilers. Although normally distributed, the %D trait exhibited a quite high variation coefficient (40%). There was no heterogeneity of the within sire variances for the largest families (19 to 43 hens). The partial sequencing of the BMP15 gene revealed three polymorphic sites in two exons and intron 1 on 6 animals from 5 different families. The production of crossbred families, between WLDJ males and females from an unrelated normal line, is proposed in order to study the distribution of the %D trait and to follow the polymorphism of putative candidate genes, such as BMP15.

Key word : laying hens, selection, multiple ovulation, dwarfism, BMP15 gene

INTRODUCTION

Le nombre d'œufs pondus reflète assez fidèlement le taux d'ovulation chez les oiseaux et la sélection réalisée chez les poules pondeuses a permis de modifier fortement l'intensité de ponte, de créer une grande variété de lignées et d'obtenir des génotypes extrêmes sur le taux d'ovulation. Une lignée expérimentale de poules White Leghorn 'Double Jaune' (WLDJ) sélectionnée sur le taux d'ovulations multiples (deux jaunes ou plus par œuf pondu) constitue un modèle particulièrement original chez les oiseaux. La lignée WLDJ, créée en Californie en 1963, a été sélectionnée sur le nombre d'œufs doubles pendant environ 20 ans (Lowry et al., 1979) et a été importée en France en 1983 par l'INRA. L'héritabilité du caractère 'nombre d'œufs doubles' est de l'ordre de 0,30 (Lowry et Abplanalp, 1967). Le phénomène d'ovulations multiples a été étudié sur le plan de la cinétique de l'hormone LH et sur le plan de la cinétique de la vitellogenèse : les résultats montrent l'existence d'un seul pic de LH (Sharp et al., 1976) et d'un même schéma de vitellogenèse pour les deux jaunes dans 80% des cas (Lowry et al., 1979). L'ovulation double de la lignée WLDJ est due principalement à la simultanéité du développement et de l'ovulation de deux follicules qui ne sont pas forcément voisins sur l'ovaire (Lowry et al., 1979).

Le phénomène d'ovulations multiples a été particulièrement bien caractérisé chez la brebis, avec l'étude de plusieurs lignées hyperprolifiques portant des mutations à effet majeur de certains gènes impliqués dans le contrôle de l'ovulation, tels que *BMP15*, *BMPRI1B* ou *GDF9* (Fabre et al., 2006). La lignée WLDJ est un modèle qui peut être rapproché de ces lignées car les poules WLDJ présentent la même caractéristique d'ovulations simultanées.

Les objectifs de cette étude sont d'une part, de mieux caractériser le phénotype de la lignée WLDJ afin d'évaluer la possibilité de l'existence d'un gène majeur et, d'autre part, d'analyser le polymorphisme de gènes candidats choisis par homologie avec les résultats des lignées ovines hyperprolifiques, en commençant par *BMP15*.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

Depuis son importation à Jouy-en-Josas à l'automne 1983, la lignée WLDJ est maintenue en reproduction avec 9 familles de 1 coq et 5 poules par an. A son arrivée, la lignée était en ségrégation pour la mutation de nanisme liée au sexe, *DW*, qui avait été introduite par H. Abplanalp afin de faciliter la reproduction de la

lignée. En effet, les œufs doubles ne sont pas incubés car les embryons obtenus n'éclosent pas. La mutation *DW* est connue pour allonger l'intervalle entre ovipositions (Yoo et al., 1984) et réduire le taux d'ovulations doubles (Mérat, 1984). La reproduction est donc facilitée en choisissant les poules naines dont les sœurs normales ont produit le plus grand pourcentage d'œufs doubles. Les fils de taille normale issus des reproductrices naines sont hétérozygotes pour la mutation *DW* et produiront à la génération suivante moitié de filles naines et moitié de filles normales. Cette sélection par voie collatérale a été utilisée depuis les années 1980, en complément de la possibilité de faire reproduire quelques poules normales en incubant seulement leurs œufs normaux.

De plus, quelques animaux d'une autre lignée de White Leghorn non sélectionnée pour le taux d'ovulations multiples ont été introduits en 1985 et 1986 pour pallier à une fertilité insuffisante de la lignée WLDJ puis une troisième fois en 2001, et encore une fois en 2005. L'augmentation de consanguinité estimée entre 1984 et 2005 est inférieure à 18%.

En guise d'étude préliminaire, un échantillon de 6 animaux extrêmes pour le critère 'taux de double jaune' appartenant à 5 familles différentes a été choisi dans la génération née en 2007 pour étudier le polymorphisme du gène candidat *BMP15*. Parmi ces 6 animaux, deux poules ont fait moins de 2% d'œufs doubles et deux autres poules en ont fait plus de 55% sur les 5 mois de contrôle de ponte.

Afin d'étudier plus précisément la variabilité du pourcentage d'œufs doubles intra-père et entre pères, le nombre de familles et la taille de plusieurs familles ont été augmentés lors de la reproduction de la génération 2008. Les poules nées le 13/03/2008 ont été mises en cage individuelle le 02/07/2008 et le contrôle de ponte s'est terminé le 2/12/2008.

Les poules ont été pesées à l'âge de 8 semaines, à la mise en cage (à l'âge de 16 semaines) et à l'âge adulte (36 semaines). La mesure du tarse chez les poules adultes permet généralement de distinguer les poules naines des poules normales (Mérat, 1984). Cependant, un léger chevauchement des distributions de la longueur de tarse entre poules naines et normales peut nécessiter la confirmation du génotype de quelques animaux par un test moléculaire.

L'éclairage pendant la ponte comporte 14 heures de lumière par jour, entre 3h et 17h. Les poules reçoivent à volonté un aliment sous forme de miettes contenant 2680 kcal par kg d'aliment (énergie), 17,5% de protéines brutes, et environ 3,5% de calcium.

1.2. Mesures

La ponte a été enregistrée quotidiennement avec un appareil de saisie portable (TDS™). Les œufs sont ramassés une fois par jour, le matin. L'enregistrement distingue 9 catégories d'œufs : œufs normaux, doubles, mous, cassés ou fêlés, doubles et cassés, poreux, sales, déformés ou avec une forme anormale et enfin trop petits. Les données ont ensuite été transférées dans la base de données SIVOL. Les œufs doubles sont reconnus à leur forme oblongue, avec souvent un léger épaississement de la coquille en région équatoriale, en cas de doute ils sont mirés ou cassés. Les œufs mous sont notés sur le plateau de déjection, l'observation de 2 œufs mous simultanés peut correspondre à un œuf 'double mou' mais l'éventualité d'une ponte successive de deux œufs mous ne peut être écartée. Il est donc probable que le pourcentage d'ovulations doubles soit sous-estimé par la non prise en compte des ovulations doubles qui n'ont pas été suivies de la formation d'une coquille. Les œufs simples ou doubles ont été pesés la première semaine de novembre à l'âge de 34 semaines et le poids corporel a été mesuré à l'âge de 36 semaines.

1.3. Méthodes d'analyse statistique

L'âge au 1^{er} œuf a été calculé pour toutes les poules. L'intensité de ponte a été calculée en rapportant le nombre d'œufs total à la période de ponte effective pour chaque poule (depuis son 1^{er} œuf jusqu'à l'arrêt du contrôle le 2/12). Les pourcentages d'œufs doubles, d'œufs mous et d'œufs cassés ont été calculés pour toute la période de contrôle. La normalité de la distribution du pourcentage d'œufs doubles a été évaluée chez les poules normales avec la procédure Univariate du logiciel SAS™. Afin d'étudier la cinétique de la ponte, l'intensité de ponte, le pourcentage d'œufs doubles et celui d'œufs mous ont été calculés par période de quinze jours, soit pour 10 périodes successives. Le même calcul a été fait pour une lignée de White Leghorn contemporaine et non sélectionnée sur le taux d'ovulations multiples, la lignée WG, afin de disposer d'un témoin de type White Leghorn. La lignée WG ne présente pas la mutation *DW*.

Le poids moyen de l'œuf a été calculé avec au moins 3 œufs par poule, normal ou double.

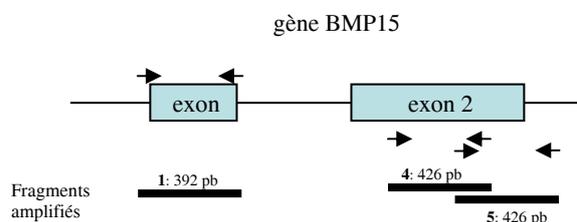
La variabilité intra-père a été évaluée par des statistiques élémentaires (moyenne, écart-type, minimum, maximum). La variabilité entre pères a été évaluée par analyse de variance avec un modèle à effets fixes comportant le père et la mère intra-père. Les calculs ont été réalisés avec le logiciel SAS™.

1.4 Méthodes d'analyse moléculaire

Le phénotype 'nanisme lié au sexe' est causé par l'inactivation du récepteur à l'hormone de croissance. La mutation causale chez la Leghorn est une substitution nucléotidique non-synonyme dans le gène GHR (Duriez et al., 1993). Un test moléculaire de génotypage de cette mutation a été mis au point afin de confirmer le génotype déduit des poids et de la longueur des tarse.

L'étude du polymorphisme du locus BMP15 a été entreprise en raison de l'importance des mutations de ce gène dans des lignées ovines hyperprolififiques déjà caractérisées (Bodin et al., 2007). Le transcript du gène BMP15 comprend 1842 pb. Les 2 exons correspondant à la région codante de BMP15 (exon 1 de 648pb et exon 2 de 1182pb), l'intron 1 et le début de la région 3'UTR ont été amplifiées par PCR afin de produire 5 fragments, qui ont été analysés par la méthode du 'single strand conformation polymorphism' (SSCP). Les fragments présentant une anomalie de conformation signalant une mutation ponctuelle ont ensuite été séquencés : il s'agit des fragments 1, 4 et 5 décrits sur la figure 1.

Figure 1. Méthode utilisée pour la détection des polymorphismes du gène BMP15



2. RESULTATS ET DISCUSSION

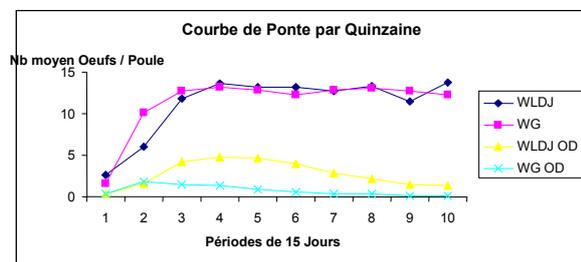
2.1 Performances moyennes

La génération 2008 comprend 191 poules pondeuses (156 normales, 35 naines) issues de 12 familles de père, dont 6 ont un effectif variant de 19 à 43 poules. Les performances confirment les différences importantes entre les poules normales et les poules naines pour le caractère sélectionné (Tableau 1). Ce résultat montre l'importance d'un fonctionnement normal du récepteur de l'hormone de croissance pour l'expression du phénotype 'œuf double'.

En comparaison avec la lignée normale WG, la lignée WLDJ présente une persistance similaire, mais une

entrée en ponte un peu plus lente (figure 2). La cinétique de la ponte montre que la production d'œufs doubles est observée en début de ponte chez la lignée WG, avec un taux de l'ordre de 10% qui décroît régulièrement ensuite, alors que le taux d'œufs doubles atteint plus de 30% au pic de ponte de la lignée WLDJ. De plus, le pourcentage d'œufs doubles se maintient à cette valeur pendant environ 2 mois (périodes 3 à 6 – figure 2) et commence à diminuer après la période 6, tout en restant supérieur au taux observé dans la lignée WG.

Figure 2. Courbe de ponte et évolution du pourcentage d'œufs doubles (OD) chez les poules non naines de la lignée WLDJ et chez la lignée White Leghorn WG.



La persistance de la production d'œufs doubles au cours de la ponte et le faible poids corporel montrent que l'ovulation double n'est pas une réponse corrélée à la sélection sur la croissance. On peut en déduire que le mécanisme de formation des œufs doubles diffère entre la lignée WLDJ et les lignées lourdes de poulets de chair, même si l'introduction du gène de nanisme a le même effet de diminuer le taux d'œufs doubles dans ces deux types de lignées.

2.2 Distribution du pourcentage d'œufs doubles

Les données sont distribuées de façon assez symétrique pour les poules normales (figure 3). La médiane (25,6) et la moyenne (26,1) sont très proches. On remarque un fort coefficient de variation (40%) et une tendance à l'aplatissement de la distribution.

L'analyse de variance ne montre pas d'effet significatif du père lorsque l'effet de la mère est pris en compte, que ce soit sur le nombre total d'œufs ou sur le pourcentage d'œufs doubles ($p < 0,10$) ou d'œufs mous. Lorsque seul le facteur père est considéré, il est significatif sur le nombre d'œufs total et sur le pourcentage d'œufs doubles.

L'analyse des données par père montre une assez grande homogénéité de l'écart-type intra-père, avec des valeurs maximales assez similaires et quelques différences sur les valeurs minimales (Tableau 2). Les coefficients de variation varient de 30 à 50% selon les pères. Les pères 68 et 79 montrent la plus grande plage de variation du caractère OD. Le fort coefficient de variation de ce caractère explique la grande dispersion des performances qui est souvent observée dans les familles de petite taille dans cette lignée.

2.3 Polymorphisme du gène BMP15

Deux mutations ponctuelles ont été identifiées dans la région codante, l'une en position 582 (T→C exon 1) et l'autre en position 1188 (G→A exon 2). Elles ne modifient pas la séquence de la protéine. Ces 2 mutations sont associées en 2 haplotypes : l'haplotype TG correspond à la séquence de la poule de jungle et l'haplotype CA est nouveau, il ne correspond à aucune mutation déjà décrite pour BMP15 chez la poule. Parmi les six poules étudiées, deux étaient homozygotes pour CA, une pour TG et 3 trois étaient hétérozygotes TG/CA. Aucune conséquence fonctionnelle ne peut être associée aux deux polymorphismes trouvés, mais leur existence permet de concevoir un dispositif d'analyse de liaison entre le polymorphisme 'marqueur' et l'expression du caractère 'œuf double'. L'existence d'une mutation localisée ailleurs dans le gène ne peut être exclue.

CONCLUSION

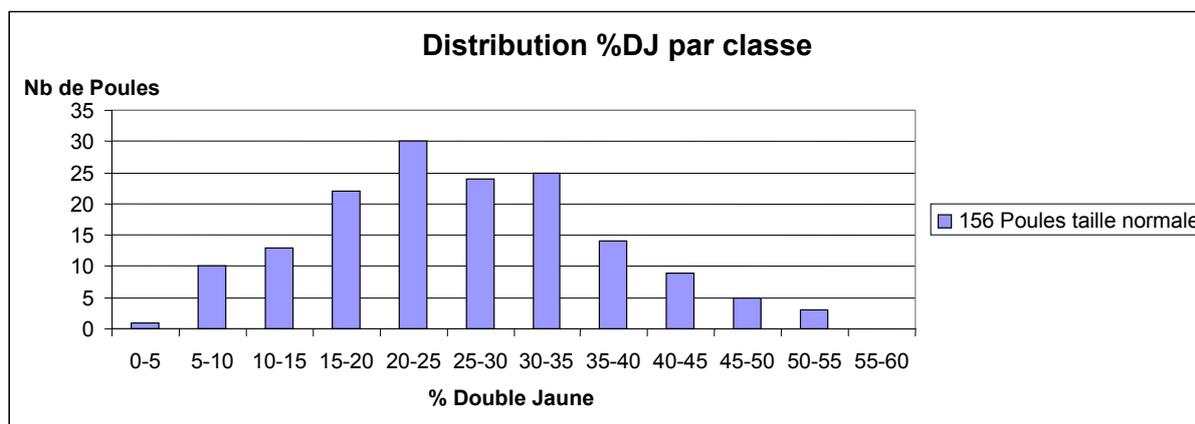
Le dispositif expérimental n'a pas permis de mettre en évidence dans cette lignée un gène à effet majeur sur l'ovulation, mais ne permet pas de l'exclure définitivement non plus. L'importance du coefficient de variation requiert une exploration plus approfondie du déterminisme génétique. Pour cela, il est prévu d'utiliser deux coqs ayant montré une grande variation des performances de ponte dans leur descendance (par exemple les coqs 79 et 68) pour les croiser avec des poules d'une lignée de pondeuses normales, indépendantes de la lignée WLDJ, afin de détecter la ségrégation d'un gène ayant un effet sur le critère « taux d'œufs doubles » chez les poules issues de ce croisement. Il sera nécessaire de vérifier que ces coqs sont porteurs d'un des polymorphismes détectés au niveau du gène BMP15, et sont informatifs pour des marqueurs proches des autres gènes candidats identifiés chez les mammifères (GDF9 et BMP1B) afin de pouvoir combiner l'analyse des performances avec l'analyse de liaison 'performance-marqueur'.

Tableau 1. Performances de ponte de la lignée WLDJ en 2008

| Génotype au locus DW | Age au 1 ^{er} œuf (jours) | Intensité de Ponte | Pourcentage d'œufs doubles | Pourcentage d'œufs mous | Poids de l'œuf à 36 semaines (g) | Poids Corporel adulte (g) |
|----------------------|------------------------------------|--------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| Normale (156 poules) | 134 | 85% | 26,2 | 26,7 | 55,9 | 1998 |
| Naine (35 poules) | 140 | 75,5% | 13,6 | 27,2 | 50,7 | 1443 |

Tableau 2- Variabilité du pourcentage de doubles jaunes chez les poules de taille normale dans les 4 familles de père les plus grandes

| père | Effectif de filles | moyenne | écart-type | Mini | Maxi |
|------|--------------------|---------|------------|------|------|
| 61 | 23 | 30,4 | 9,9 | 10,6 | 50,7 |
| 67 | 19 | 21,6 | 11 | 5,6 | 45,5 |
| 68 | 43 | 27,4 | 9,5 | 6,5 | 48,5 |
| 79 | 25 | 25,1 | 9,7 | 2,9 | 48,6 |

Figure 3. Distribution du pourcentage d'œufs doubles sur 5 mois de ponte chez les 156 poules non naines de la génération 2008.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bodin L., Di Pasquale E., Fabre S., Bontoux M., Monget P., Persani L., Mulsant P., 2007. *Endocrinol.*, (148), 393-400.
- Fabre S, Pierre A, Mulsant P, Bodin L, DiPasquale E, Persani L, Monget P, Monniaux D 2006. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, (4), 20
- Lowry D.C., Abplanalp H., 1967. *Genetics*, (56), 573-574.
- Lowry D.C., Dobbs J.C., Abplanalp H., 1979. *Poult. Sci.*, (58), 498-501.
- Mérat P., 1984. *World's Poult. Sci. J.*, (40), 10-18.
- Sharp P. J., Beuving G., Van Middelkoop J.H., 1976. In : *Proc. of the 5th European Poultry Conference*, Malta, 11: 1259-1264.
- Duriez B., Sobrier M.L., Duquesnoy P., Tixier-Boichard M., Decuypere E., Coquerelle G., Zeman M., Goossens M., Amselem S., 1993. *Mol. Endocrinol.*, (7), 806-814.
- Yoo, B.H., Sheldon, B.L., Podger, R.N. 1984. *Brit. Poult. Sci.*, (25), 119-126.