



HAL
open science

Les microARN circulants : de nouveaux biomarqueurs pour des caractères économiquement importants chez les poules ?

Tatiana Zerjal, Marie-Laure Endale Ahanda, Sophie Pollet, Andrea Rau, Elisabetta Giuffra

► **To cite this version:**

Tatiana Zerjal, Marie-Laure Endale Ahanda, Sophie Pollet, Andrea Rau, Elisabetta Giuffra. Les microARN circulants : de nouveaux biomarqueurs pour des caractères économiquement importants chez les poules ?. 11. Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Mar 2015, Tours, France. pp.1-5. hal-01194121

HAL Id: hal-01194121

<https://hal.science/hal-01194121>

Submitted on 5 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.

LES MICROARN CIRCULANTS: DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS POUR DES CARACTERES ECONOMIQUEMENT IMPORTANTS CHEZ LES POULES?

Tatiana Zerjal, Marie-Laure Endale Ahanda, Sophie Dhorne-Pollet, Andrea Rau, Elisabetta Giuffra

UMR INRA / AgroParisTech, GABI, Jouy-en-Josas, France

tatiana.zerjal@jouy.inra.fr

RÉSUMÉ

Les microARN (miARN) représentent une classe importante de petits ARN non codants chez les organismes eucaryotes et sont des régulateurs puissants d'un large éventail de processus biologiques. Grâce à leur présence dans le flux sanguin et leur grande stabilité, les miARN circulants font l'objet de nombreuses études chez l'homme en vue d'identifier leur potentiel en tant que biomarqueurs pour la détection précoce de nombreuses maladies. Des applications plus larges pourraient être envisagées dans d'autres domaines tels que la génétique végétale ou animale pour identifier des miARN qui seraient associés à des caractères économiquement importants.

Pour explorer cette possibilité nous avons réalisé une étude pilote afin d'identifier des miARN circulants répondant à un stress abiotique (la mise à jeun pour un temps limité). Deux lignées de poules sélectionnées pour être divergentes en terme de consommation alimentaire résiduelle (les lignées R + et R-) ont été choisies pour les différences extrêmes qu'elles présentent dans la prise alimentaire et le métabolisme énergétique. Le séquençage des miARN plasmatiques a permis d'identifier 148 miARN, dont 23 présentaient des différences significatives d'abondance entre les conditions « à jeun » et « nourri », et 19 entre les lignées R+ et R-. Notre étude montre que, chez la poule, le profil plasmatique des miARN réagit rapidement à la modification de l'état physiologique de l'animal, et ceci avec une forte influence du fond génétique de l'animal. Dans notre cas, nous pouvons y voir le reflet de la divergence génétique due à la sélection à long terme.

ABSTRACT

Circulating microRNAs: novel biomarkers for economically important traits in chickens?

MicroRNAs (miRNAs) are an important class of small non-coding RNAs in eukaryotic organisms and are potent regulators of a wide range of biological processes. With their presence in the blood stream and their high stability, circulating miRNAs are the subject of many studies in humans to identify their potential as biomarkers for early detection of many diseases. Broader applications could be considered in other areas such as plant or animal genetics to identify miRNAs that might be associated with economically important traits.

To explore this possibility we conducted a pilot study to identify plasmatic miRNAs responding to an abiotic stress (fasting condition for a limited time). Two chickens lines divergently selected for residual feed intake (R+ and R- chicken lines) were chosen because of their extreme differences in food intake and energy metabolism. Sequencing of plasma miRNAs allowed us to identify 148 miRNAs, of which 23 were significantly different between feeding conditions ("fasted" versus "fed") and 19 differed between lines (R+ versus R-). Our study shows that in the miRNA chicken plasma profile reacts quickly to changes in the physiological state of the animal, but it is strongly influenced by the genetic background of the animal which in our case reflects genetic divergence acquired by the long-term selection.

INTRODUCTION

Les microARN (miARN) sont des ARN de petite taille (entre 20-22 nucléotides), transcrits à partir du génome. Ils agissent en tant que régulateurs puissants d'une large gamme de processus biologiques, en régulant l'expression de gènes cibles soit par l'inhibition de leur traduction soit en entraînant leur dégradation (Bartel *et al.* 2004). Les microARN circulants, grâce à leur présence dans le flux sanguin et à leur grande stabilité, font l'objet de nombreuses études. Chez l'homme, ils sont actuellement considérés comme des biomarqueurs cliniques non invasifs parmi les plus prometteurs, pour le diagnostic, le pronostic et le traitement thérapeutique d'une variété de pathologies parmi lesquelles, le cancer, les maladies cardiovasculaires, le diabète, ainsi que des états physiologiques particuliers comme la grossesse (Reid *et al.* 2011, Morales Prieto *et al.* 2011).

Des applications plus larges en dehors de la médecine humaine ne sont, pour l'instant, pas proposées, mais pourraient être envisagées dans des domaines tels que la génétique animale. Des biomarqueurs non invasifs associés à des caractères importants comme la qualité des produits, l'efficacité alimentaire, la santé, la reproduction, le stress, le comportement, la robustesse, pourraient trouver des applications importantes en sélection animale.

Pour explorer cette possibilité nous avons réalisé une étude pilote afin d'identifier des miARN circulants répondant à un stress abiotique (la mise à jeun pour un temps limité). Comme modèle, nous avons choisi deux lignées de poules pondeuses (les lignées R + et R-, Bordas *et al.* 1984) sélectionnées de façon divergente pour la consommation alimentaire résiduelle, à poids corporel et production d'œufs constants, depuis 40 générations. Ces lignées sont caractérisées par une extrême divergence phénotypique (Bordas *et al.* 1992) associée à une différenciation génétique faible (Tixier-Boichard *et al.* 1996). Les poules R+ sont caractérisées par une augmentation très forte de la prise alimentaire (+ 89%), une adiposité très réduite par rapport à la lignée R- (El-Kazzi *et al.* 1995), une augmentation de la thermogénèse et une réduction de la lipogénèse hépatique (Gabarrou *et al.* 2000; Lagarrigue *et al.* 2000). D'autres caractères corrélés comme

la longueur des barbillons et des tarses ont aussi divergé entre les deux lignées.

Le séquençage des miARN plasmatiques des lignées R + et R- nous a permis de montrer deux résultats importants : 1) les miARN circulants réagissent rapidement à la mise à jeun et reflètent une altération physiologique de l'animal; 2) les miARN qui répondent à la mise à jeun sont différents entre les R + et R- ce qui signifie que même des niveaux de variation génétique faibles peuvent affecter considérablement le contenu en miARN circulants.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Animaux, échantillonnage et extraction des miARN

Les animaux de cette étude ont été produits et élevés dans des conditions standard à l'Unité Expérimentale PEAT (INRA, Pôle d'expérimentation avicole de Tours, 37380 Nouzilly ; F-autorisation C37-175-1, 2007). Trois coqs de la lignée R+ et trois de la lignée R-, tous âgés de 38 semaines, ont été mis à jeun pendant 16 heures et re-nourris ensuite *ad libitum*. Deux prélèvements de sang par animal ont été effectués : le premier à la fin de la mise à jeun et le deuxième quatre heures après la réalimentation. Le sang prélevé a été immédiatement traité pour isoler le plasma selon le protocole décrit par Turchinovich *et al.* (2011). Les ARN ont été extraits à partir de 2 ml de plasma, en utilisant du TRIzol LS selon les recommandations du fabricant (Life Technologies, Carls-bad, CA). Après validations quantitatives (Nanodrop) et qualitatives (Bioanalyzer 2100), les ARN extraits ont ensuite été utilisés pour la construction des banques de petits ARN et séquençage à grande échelle.

1.2. Préparation des banques de petits ARN et protocole de séquençage

Les banques de petits ARN ont été construites à partir de 25 à 50 ng d'ARN plasmatique total en utilisant les kits TruSeq SBS v5-GA et TruSeq SBS v3-HS (onze et deux banques respectivement). L'ensemble des banques ont été construites en suivant les recommandations du fabricant (Illumina). Elles ont été séquencées à partir d'une seule extrémité (single-read) sur un séquenceur GA-IIx ou sur un séquenceur HiSeq1000 Illumina.

1.3. Analyses post-séquençage

Un ensemble de précurseurs uniques de miARN de poulet a été construit à partir des bases de données miRBase v19 (Griffiths-Jones S, 2004) et Ensembl (version 72). Les structures secondaires de ces précurseurs ont ensuite été prédites en utilisant l'outil RNAfold du package ViennaRNA. Pour affecter correctement le nombre de lectures aux miARN, il a fallu associer les miARN matures à ce jeu de précurseurs. Les miARN matures ont donc été alignés sur le jeu de précurseurs en n'autorisant que des alignements parfaits. Au total, nous avons annoté 985 miARN matures. Plusieurs outils bioinformatiques (cutadapt v1.2.1, Bowtie v0.12.8 et des scripts internes) ont été utilisés ensuite pour le filtrage et l'alignement des séquences.

1.4. Analyses de données d'expression

L'analyse différentielle des données de séquençage des petits ARN (miARN-Seq) a été faite en utilisant le package edgeR du R/Bioconductor (version 3.2.3; Robinson *et al.* 2010). Les miARN ayant de faibles niveaux d'abondance dans tous les échantillons ont été filtrés à l'aide de HTSfilter R/Bioconductor package (version 1.0.0; Rau *et al.* 2013). 148 miARN ont été retenus pour une analyse plus approfondie. Les variations d'abondance estimées par le « *log fold-change* » (logarithme du rapport de deux moyennes de niveaux d'expression) pour les miARN identifiés comme différentiellement détectés dans au moins une comparaison, ont été visualisés en utilisant une « *heatmap* ». Pour une visualisation d'ensemble, les données normalisées de séquençage ont été soumises à une analyse en composantes principales (ACP) avec la fonction *dudi.pca* du package *ade4* (Chessel *et al.* 2004) de R (R Development Core Team, 2012).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse d'abondance différentielle des miARN plasmatiques a été effectuée à deux niveaux : 1) en comparant les deux lignées de poules (R + versus R-) afin de détecter des différences entre les lignées ("line"), et 2) en

comparant les deux états d'alimentation (à jeun contre réalimenté) pour évaluer l'effet de la privation de nourriture par rapport à l'état réalimenté.

Nous avons identifié 19 miARN qui différaient significativement en quantité entre lignées et 23 miARN qui différaient significativement entre les conditions alimentaires «à jeun» et «nourri». Seuls deux miARN sont communs aux deux groupes. Les différences étaient en moyenne plus marquées pour la comparaison entre conditions alimentaires que pour la comparaison entre lignées. D'autre part, des différences plus importantes ont été repérées à l'état «à jeun» et plus particulièrement chez la lignée R- (Figure 1 et 2). Ces résultats peuvent être interprétés à la lumière de la divergence physiologique que ces deux lignées ont acquise pendant la sélection divergente à long terme. La plus grande consommation alimentaire accompagnée par un contenu adipeux plus faible chez les R + a été justifiée par une possible modification du métabolisme énergétique (Gabarrou *et al.* 2000). Cette hypothèse est corroborée par cette étude où d'importantes différences d'abondance ont été trouvées entre R+ et R- pour trois miARN hautement conservés (gga-miR-204, gga-miR-let-7f-5p et gga-miR-122-5p), qui ont un rôle régulateur clé dans le métabolisme énergétique.

Les résultats de l'analyse différentielle indiquent que 1) la réponse des miARN à une privation de nourriture est fortement influencée par les différents génotypes et que 2) la divergence entre les lignées est plus forte dans des conditions de stress comme la mise à jeun.

CONCLUSION

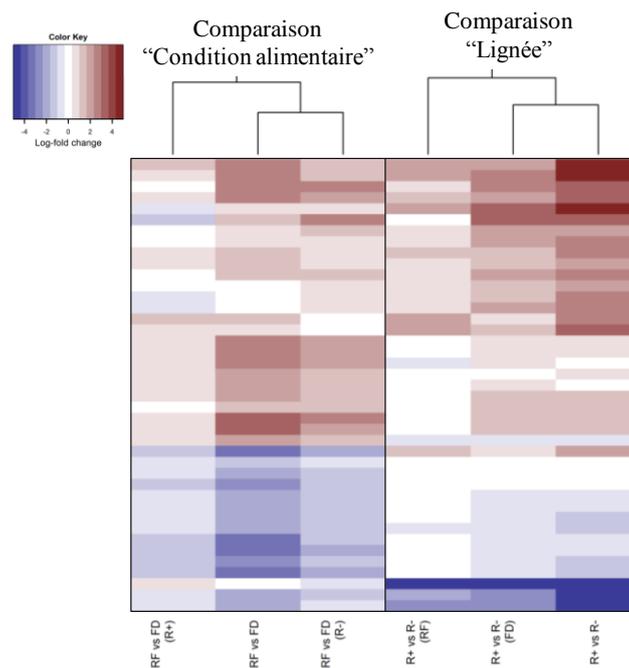
Chez la poule, le profil plasmatique des miARN réagit rapidement à la modification de l'état physiologique de l'animal. De plus, ces réactions sont également influencées par des différences, même faibles, de génotypes, reflétant dans notre cas la divergence acquise pendant l'expérience de sélection à long terme.

Dans l'ensemble, cette étude renforce l'idée que les miARN pourraient être de nouveaux biomarqueurs non-invasifs pour les animaux d'élevage (Wang *et al.* 2013).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

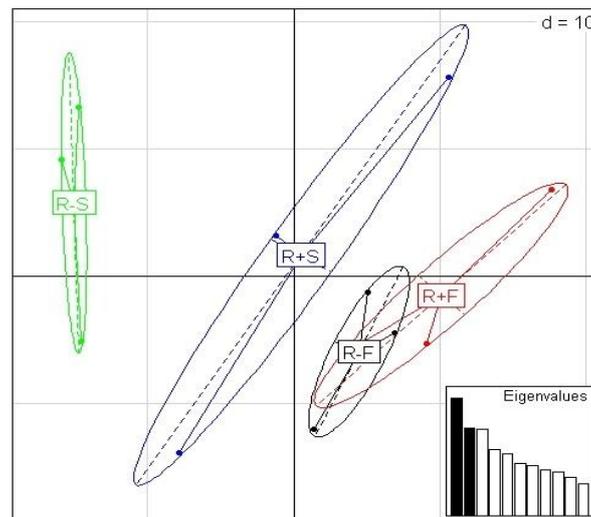
- Bartel D.P., 2004. Nat.Rev.Genet., (5), 396-400
Bordas A., 1984. Annales Agriculturae Fenniae. 233-237
Bordas A., 1992. Br.Poult.Sci., (33), 741-754
Chessel, D., 2004. R News (4), 5-10.
El-Kazzi M., 1995. Br.Poult.Sci. (36), 719-728.
Gabarrou J.F., 2000. Br.J.Nutr. (83), 645-651.
Griffiths-Jones S., 2004. Nuc.Ac.Res. (32), D109-111
Lagarrigue S., 2000. Genet.Sel.Evol. (32), 205-216
Morales Prieto D.M., 2011. J.Reprod.Immunol., (88), 106-11
Rau A., Bioinformatics (29), 2146-2152.
Reid G., 2011. Crit.Rev.Oncol.Hematol., (80), 193-208
Robinson M.D., 2010. Bioinformatics (26), 139-140
Tixier-Boichard M., 1996. An.Gen. (27), 163-169
Turchinovich A., 2011. Nuc.Ac.Res. (39), 7223-7233.
Wang X., 2013. Animal (7), 1567-1575.

Figure 1. « Heat map » des log ratios d'expression (*log-fold changes*) pour les miARN différentiellement abondants



RF = Réalimenté, FD= à jeun. Six comparaisons sont représentées: Lignée (R+ vs R-), Condition Alimentaire (RF vs FD), R+ & Condition (RF vs FD (R+)), R- & Condition (RF vs FD (R-)), Réalimenté & Lignée (R+ vs R- (RF)), à jeun & Lignée (R+ vs R- (FD)).
Le rouge représente une sur expression et le bleu une sous-expression.

Figure 2. Représentation des axes 1 et 2 de l'ACP obtenue à partir des miARN identifiés au niveau plasmatique



R-S = Lignée R- à jeun; R-F= Lignée R- nourris, R+S = Lignée R+ à jeun; R+F =Lignée R+ nourris