



**HAL**  
open science

## **OPTIVIANDE Prédiction de la qualité technologique de la viande de poulet : apport de nouvelles approches de phénotypage et des analyses biologiques et génomiques à haut-débit.**

- Bourin M., Alienor Vautier, Stéphane Beauclercq, Eva Pampouille, Christelle Hennequet-Antier, Simon Boitard, Elisabeth Duval, Cécile Berri

### ► To cite this version:

- Bourin M., Alienor Vautier, Stéphane Beauclercq, Eva Pampouille, Christelle Hennequet-Antier, et al.. OPTIVIANDE Prédiction de la qualité technologique de la viande de poulet : apport de nouvelles approches de phénotypage et des analyses biologiques et génomiques à haut-débit.. Innovations Agronomiques, 2019, 71, pp.323-337. 10.15454/3EFLKW . hal-02620930

**HAL Id: hal-02620930**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02620930v1>**

Submitted on 26 May 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

## **OPTIVIANDE - Prédiction de la qualité technologique de la viande de poulet : apport de nouvelles approches de phénotypage et des analyses biologiques et génomiques à haut-débit**

**Bourin M.<sup>1</sup>, Vautier A.<sup>2</sup>, Beauclercq S.<sup>3</sup>, Pampouille E.<sup>3</sup>, Hennequet-Antier C.<sup>3</sup>, Boitard S.<sup>3</sup>,  
Le Bihan-Duval E.<sup>3</sup>, Berri C.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> ITAVI – INRA Centre Val de Loire, F-37380 Nouzilly

<sup>2</sup> IFIP – La motte au Vicomte, F-35651 Le Rheu cedex

<sup>3</sup> BOA, INRA, Université de Tours, F-37380 Nouzilly

**Correspondance:** bourin@itavi.asso.fr

### **Résumé**

Même si la viande est de plus en plus consommée sous forme élaborée, les consommateurs sont sensibles à la naturalité des produits. Cette tendance est largement prise en compte par les industriels de l'agroalimentaire qui cherchent à limiter l'ajout d'additifs (exhausteurs de goût ou agents texturants) ou de conservateurs (en particulier le sel). Ceci montre l'importance de maîtriser dès l'amont la qualité de la matière première destinée aux produits élaborés. Cette problématique touche particulièrement la viande de poulet, majoritairement consommée sous forme découpée ou transformée mais dont la qualité technologique est très variable. L'objectif du projet CASDAR OPTIVIANDE était de développer de nouveaux outils de phénotypage ainsi que des marqueurs biologiques ou génétiques pouvant être utilisés à des fins de sélection ou d'évaluation de l'impact des facteurs d'élevage. Les approches mises en œuvre concernaient l'utilisation de la spectrométrie dans le proche infrarouge (SPIR) ainsi que des analyses biologiques et génomiques à haut-débit. L'étude s'est appuyée sur un modèle animal original constitué de deux lignées de poulet sélectionnées de manière divergente sur le pH ultime du filet et dont les caractéristiques technologiques et sensorielles de la viande sont très différentes. La spectrométrie dans le proche infrarouge est rapide à mettre en œuvre et permet de prédire plusieurs critères de qualité technologique tel que le pH ultime, les pertes d'eau lors du stockage et la dureté après cuisson. Les analyses transcriptomique et métabolomique ont permis le développement de premiers modèles de prédiction basés sur un nombre restreint de métabolites (sanguins et musculaires) ou de transcrits musculaires. Au niveau génétique, les analyses ont permis d'identifier les principales régions contrôlant le pH ultime du filet et révéler plusieurs gènes d'intérêt. En conclusion, le projet a conduit à des avancées significatives pour la compréhension des mécanismes génétiques et physiologiques impliqués dans la mise en place des défauts de qualité chez le poulet. Il ouvre des perspectives d'application grâce au développement d'outils de prédiction et d'aide à la sélection dont la généralité devra être validée sur d'autres populations et en conditions de production.

**Mots-clés :** SPIR, qualité technologique, poulet, transcriptome, métabolome, marqueurs génétiques

### **Abstract: Predicting the technological quality of chicken meat: new approaches of phenotyping and high-throughput biological and genomic analyzes**

Even though meat is increasingly consumed in elaborated form, consumers are sensitive to naturalness of the products. This trend is largely taken into account by agribusiness companies seeking to reduce additives (flavor enhancers or texturizing agents) or preservatives (in particular salt). This shows the importance of upstream control of quality of the raw material for elaborated products. This issue

particularly affects chicken meat, mostly consumed in cut or processed but whose technological quality is highly variable. The objective of the CASDAR OPTIVIANDE project was to develop new phenotyping tools and biological or genetic markers that could be used for selection or evaluation of the impact of breeding factors. The approaches implemented concerned the use of near-infrared spectrometry (NIRS) as well as high-throughput biological and genomic analyzes. The study was based on an original animal model composed of two chicken lines selected in a divergent manner on the ultimate pH of the filet and whose technological and sensory characteristics of meat were very different. Near-infrared spectrometry is fast to implement and makes it possible to predict several technological quality criteria such as ultimate pH, water loss during storage and hardness after cooking. Transcriptomic and metabolomics analyzes made it possible to develop first prediction models based on a limited number of metabolites (blood and muscle) or muscle transcripts. At the genetic level, analyzes made possible to identify the main regions controlling the ultimate pH of the filet and revealed several genes of interest. In conclusion, the project led to significant advances in understanding the genetic and physiological mechanisms involved in the establishment of quality defects in chicken. It opens perspectives of application thanks to the development of prediction tools for selection whose genericity will have to be validated on other populations and in conditions of production.

**Keywords:** near-Infrared spectroscopy, technological quality, chicken, transcriptome, metabolome, genetic marker

## Introduction

À l'instar de la viande de porc, la viande de poulet est aujourd'hui majoritairement utilisée en découpe et en transformation (74% de la consommation de poulet en 2017). Au-delà du rendement en viande, la qualité technologique constitue donc un facteur clé de compétitivité dans la mesure où elle impacte l'aptitude à la conservation et les rendements à la transformation. Actuellement celle-ci n'est pas maîtrisée, ce qui conduit à l'apparition de défauts technologiques liés en particulier au pH ultime (pHu) de la viande, c'est-à-dire le pH final de la viande (Gigaud et al., 2011). Ainsi chez le poulet standard, l'incidence des viandes acides (pH < 5,7) a été estimée à 20% et celle des viandes à pH élevé (> 6,2) à 5%. Si les premières peuvent engendrer de mauvais rendements technologiques et des pertes économiques après transformation, les secondes sont susceptibles de poser des problèmes de conservation en particulier pour les découpes ou les charcuteries crues (Gigaud et al., 2009). L'origine des variations de qualité chez le poulet résulte d'interactions complexes entre la génétique et les facteurs d'élevage et d'abattage (Berri, 2004). L'ensemble de ces facteurs modulent les réserves en glycogène du muscle, qui sont identifiées comme le déterminant majeur du pH ultime et de la qualité du filet chez le poulet (Le Bihan-Duval et al., 2008).

Plusieurs études chez le poulet ont démontré l'existence d'un contrôle génétique du pH ultime de la viande dont l'héritabilité varie entre 0,35 et 0,60 chez des souches à croissance lente (Chabault et al., 2012), intermédiaire (Le Bihan-Duval et al., 2001) ou rapide (Le Bihan-Duval et al., 2008). Ces mêmes études montrent que le pH ultime est génétiquement fortement relié à la couleur, au pouvoir de rétention d'eau et à la texture du filet. En pratique, il est possible de sélectionner le pH ultime, comme le montrent les résultats d'une expérience de sélection divergente menée à partir d'une souche commerciale de poulet standard (Alnahhas et al., 2014). Mais si la sélection sur le pH est efficace, elle reste coûteuse et difficile à généraliser car elle implique de sacrifier les animaux pour les mesures. Les outils de génotypage à haut-débit aujourd'hui disponibles chez le poulet permettent une recherche exhaustive et précise des régions chromosomiques hébergeant un (ou des) gène(s) muté(s) avec un effet significatif sur le caractère d'intérêt. L'identification de ces régions QTL (Quantitative Traits Loci) puis à terme des gènes et des mutations impliquées ouvre la voie à la mise en œuvre d'approches nouvelles telle que la Sélection Génomique. Jusqu'ici, peu de marqueurs ou gènes associés au pH et à la qualité technologique ont été identifiés chez le poulet faute sans doute de matériel génétique adapté.

Concernant l'élevage, il est possible d'optimiser le pH ultime de la viande et son potentiel technologique en adaptant l'alimentation des animaux en période de finition (Berri et al., 2008 ; Guardia et al., 2014). Ainsi, l'apport en protéines ou en acides aminés peut agir sur la proportion des nutriments utilisés à des fins de stockage énergétique, dont le glycogène musculaire, et moduler efficacement le pH et la qualité de la viande (Jlali et al., 2012). Les acteurs moléculaires qui contrôlent les réserves en glycogène restent à ce jour assez peu connus même si des premiers résultats ont montré le rôle central de l'AMP-activated protein kinase (AMPK), dont le niveau d'activation par phosphorylation est inversement lié aux teneurs en glycogène musculaire in vivo (Sibut et al., 2008, 2011) et peut être régulé par l'apport en protéines avec des effets associés sur la qualité de la viande (Jlali et al., 2012). Disposer de marqueurs physiologiques fins permettrait de modéliser les lois de réponse métabolique des animaux aux variations d'apports alimentaires et de s'affranchir en partie d'expérimentations lourdes à mettre en œuvre pour mesurer les paramètres de qualité.

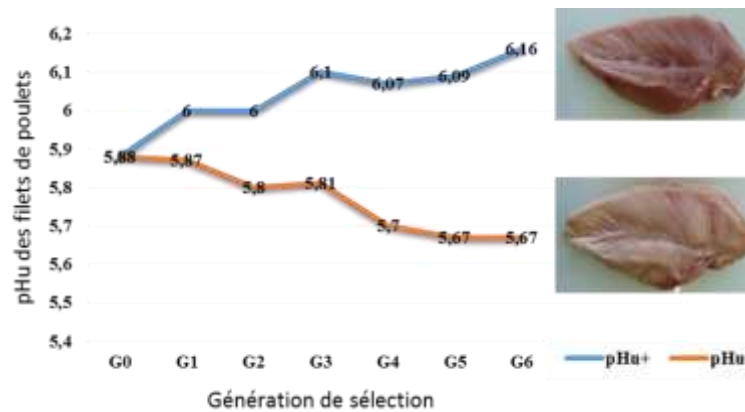
Pour atteindre ces objectifs, notre projet s'est appuyé sur un dispositif génétique original de lignées divergentes de poulet pour le pH ultime du filet, sélectionnées à partir d'une lignée commerciale française. Il a permis de tester la SPIR comme outil de phénotypage haut-débit pour évaluer rapidement le potentiel technologique de la viande de poulet, de rechercher des marqueurs génétiques indispensables pour le développement des futurs outils de sélection et de développer des premiers modèles de prédiction de la qualité basés sur la quantification de métabolites ou de transcrits musculaires.

Les résultats de ce projet sont le fruit d'une collaboration entre l'ITAVI, l'INRA UMR BOA et l'IFIP.

## 1. Développement d'outils de phénotypage haut débit de la qualité technologique de la viande

### 1.1 Présentation du modèle d'étude : les lignées divergentes pour le pH ultime

Chez le poulet comme dans d'autres espèces productrices de viande, le pH ultime apparaît comme un critère déterminant de la qualité technologique et sensorielle de la viande. Plusieurs études menées chez le poulet ont par ailleurs montré qu'il s'agissait d'un caractère héritable (voir revue de Le Bihan-Duval et Berri, 2017). C'est sur cette base de connaissance qu'a été initiée en 2009 par l'INRA une expérience de sélection divergente sur la valeur génétique du pH ultime mesurée 24 h post-mortem au niveau du muscle Pectoral (pHu-PM). Menée à partir d'une souche de type standard à croissance rapide, cette sélection s'est avérée très efficace du fait du coefficient d'héritabilité élevé ( $h^2=0,57$ ) confirmé au sein de la population (Alnahhas et al., 2014). Grâce à ce dispositif, nous disposons aujourd'hui d'une population variable et bien caractérisée en termes de qualité, propice au développement d'outils de phénotypage et à la recherche de marqueurs biologiques et génétiques des phénotypes étudiés. Le projet Casdar OPTIVIANDE a porté sur des animaux issus de la sixième génération de sélection pour laquelle il existait un différentiel de 0,5 unité pH entre les deux lignées au niveau du filet (Figure 1). Ainsi, 61% des poulets de la lignée pHu- présentaient une viande de type acide (pHu-PM < 5,7) et 63% des animaux de la lignée pHu+ une viande de type DFD (Dark Firm Dry) (pHu-PM > 6,1). Cette variabilité de pH ultime s'accompagne également d'une forte variation de couleur (mesures  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), pertes en eau de la viande fraîche ou après cuisson, texture et rendement de transformation (Tableau 1). La sélection divergente sur le pH ultime du muscle Pectoral a également entraîné des variations du métabolisme de la cuisse, dont le pH ultime (pHu-SART) est modifié, ainsi que de la composition corporelle des animaux. En effet, les animaux pHu+ présentent un développement musculaire plus important (en termes de rendement en filet et en cuisse), alors que le pourcentage de gras abdominal et le poids vif ne sont pas modifiés. Même si la teneur en gras intramusculaire (LIM) du filet est similaire entre les deux lignées, l'indice TBA-RS (Thiobarbituric acid reactive substances) d'oxydation des lipides apparaît supérieur dans la lignée pHu- par rapport à la lignée pHu+, suggérant un effet pro-oxydant des faibles valeurs de pH ultime (Alnahhas et al., 2015).



**Figure 1 :** Évolution phénotypique du pH ultime du filet (pHu-PM) en fonction des générations de sélection (Le Bihan-Duval E et al., 2018).

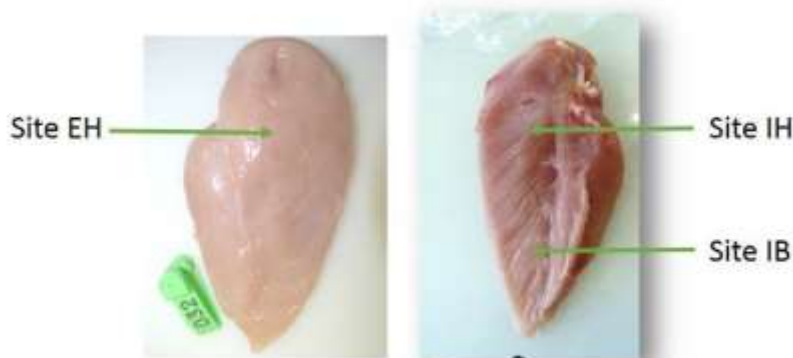
**Tableau 1 :** Statistiques descriptives des valeurs de pH, qualité de la viande, croissance et composition corporelle des animaux (Projet OPTIVIANDE).

| Caractère                                       | Moyenne [min-max]    | LSMEANS | LSMEANS | Effet lignée<br>P-value |
|---|----------------------|---------|---------|-------------------------|
|   |                      | pHu+    | pHu-    |                         |
| pHu-PM  | 5.91 [5.40 - 6.65]   | 6.16    | 5.67    | p<.0001                 |
| pHu-SART  | 6.36 [5.84 - 6.98]   | 6.53    | 6.20    | p<.0001                 |
| pH15  | 6.71 [6.42 - 7.02]   | 6.74    | 6.68    | p<.0001                 |
| L*  | 48.9 [36.1 – 59.7]   | 44.8    | 52.9    | p<.0001                 |
| a*  | -0.09 [-1.75 – 2.59] | -0.23   | 0.04    | p<.0001                 |
| b*  | 11.8 [7.9 – 15.7]    | 10.7    | 12.8    | p<.0001                 |
| Exsudat (%)                                     | 3.2 [0.05 – 10.6]    | 2.0     | 4.3     | p<.0001                 |
| Perte cuisson (%)                               | 9.9 [4.0 – 20.4]     | 9.1     | 10.8    | p<.0001                 |
| Résistance au cisaillement (N/cm <sup>2</sup> ) | 13.6 [5.7 – 24.1]    | 11.1    | 16.1    | p<.0001                 |
| Rend. Technologique (%)                         | 84.9 [70.1 – 93.4]   | 86.3    | 83.5    | p<.0001                 |
| LIM   | 1,44 [0.52 – 3.00]   | 1.45    | 1.45    | P=0.92                  |
| TBA-RS  | 0.41 [0.02 – 3.76]   | 0.32    | 0.51    | p<.0001                 |
| Poids vif                                       | 2784 [1782-3676]     | 2787    | 2816    | p=0.18                  |
| % gras  | 1.9 [0.9 - 3.0]      | 1.89    | 1.86    | p=0.26                  |
| % filet   | 20.7 [15.0 - 25.3]   | 21.0    | 20.4    | p<.0001                 |
| % cuisse  | 22.5 [18.6 - 26.8]   | 22.7    | 22.4    | p=0.0003                |

## 1.2 Méthodes et moyens mis en œuvre

Les filets (muscles Pectoralis major) de poulet ont fait l'objet d'acquisitions spectrales dans le domaine du visible et du proche infrarouge (350 – 1800 nm) sur trois sites (Figure 2). L'appareil utilisé était un spectroscope visible et proche infrarouge ASDI Laspec4. La sonde choisie pour la réalisation des mesures était une sonde de surface ASDI. Les mesures ont été réalisées 24h post-mortem sur un total de 640 poulets. Environ 200 poulets ont été retenus au hasard pour constituer une population de validation externe, le reste des échantillons étant affecté à la population de calibration/validation croisée

(n=400). La constitution de ces 2 populations a été réalisée en respectant l'équilibre 50% / 50% entre les lignées divergentes pHu- et pHu+. Plusieurs mesures de qualité technologique du filet de références ont également été réalisées: pH ultime, pertes d'exsudat, rendement cuisson, rendement technologique, tendreté après cuisson (test Warner Bratzler).

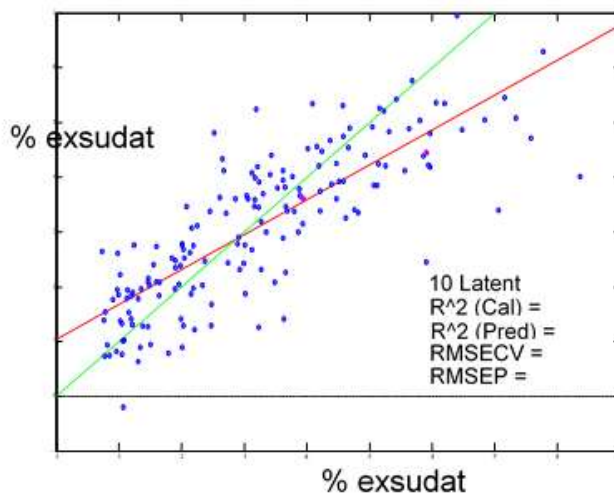


**Figure 2 :** Sites d'acquisition spectrale

### 1.3 Résultats obtenus

#### 1.3.1 Prédiction du pourcentage d'exsudat

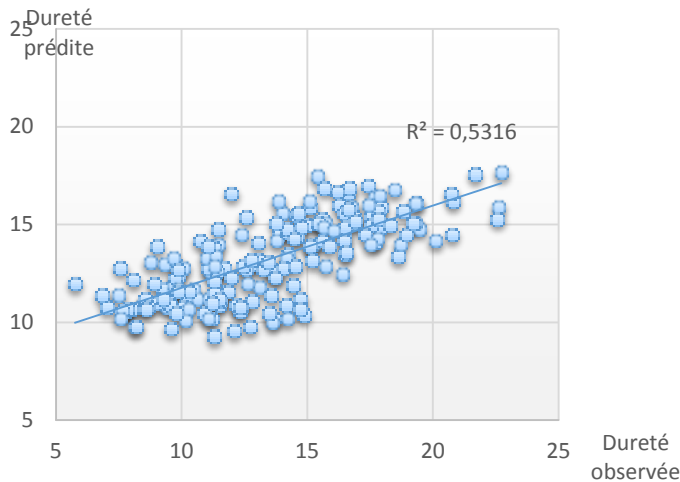
Quel que soit le site de mesure, la spectroscopie visible + proche infrarouge montre de bons résultats en validation externe pour la prédiction des pertes d'eau par exsudation ( $r=0,77$  à  $0,81$ ) (Figure 3). L'erreur de prédiction est acceptable ( $rmsep=1,04$ ), comparativement à l'écart type des pertes d'exsudat ( $et=1,74$ ).



**Figure 3 :** Corrélation entre pertes d'exsudat prédites (site EH, pas de prétraitement, 10 facteurs PLS (méthode de régression par les moindres carrés partiels)) et pertes d'exsudat observées. Projet OPTIVIANDE.

#### 1.3.2 Prédiction de la dureté

Les résultats de prédiction de la dureté après cuisson des filets de poulet en validation externe sont meilleurs pour le site IH que pour les autres sites : la corrélation prédite/observée est bonne ( $r=0,73$ ) et l'erreur de prédiction reste contenue ( $rmsep=2,49$ ) pour ce site au regard de la variabilité des mesures de dureté ( $écart\text{-}type=3,41$ ) (Figure 4).



**Figure 4 :** Corrélation entre la tendreté prédite (site IH, pas de prétraitement, 6 facteurs PLS) et la tendreté observée. Projet OPTIVIANDE.

### 1.3.3 Prédiction des pertes à la cuisson

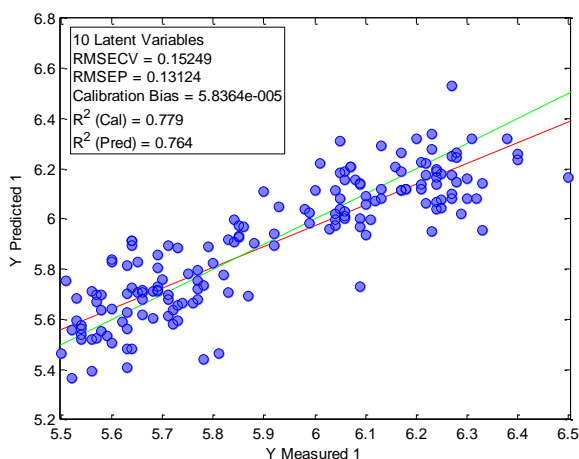
L'équation de prédiction des pertes à la cuisson basée sur les mesures du site IH sans prétraitement montre avec un modèle à 10 facteurs PLS une corrélation satisfaisante ( $r=0,63$ ). L'erreur de prédiction reste encore une fois contenue comparativement à la variabilité de la mesure de référence ( $rmsep=1,64$ ,  $et=2,11$ ).

### 1.3.4 Prédiction du rendement technologique

Les coefficients de détermination sont d'un faible niveau pour les calibrations obtenues afin de prédire le rendement technologique et ceci quel que soit le site de mesure ( $R^2c=0,35$  pour le site IH après dérivation d'ordre 1 des spectres). Conformément à ces derniers résultats, la précision obtenue en validation externe est insuffisante pour envisager une prédiction du rendement technologique par spectroscopie visible+proche infrarouge ( $r=0,36$ ,  $rmsep=3,87$  pour le site IB).

### 1.3.5 Prédiction du pH ultime du muscle *Pectoralis major*

Les données de calibration et de validation externe pour la prédiction du pH ultime du muscle *Pectoralis major* par spectroscopie visible+proche infrarouge sont d'un très bon niveau pour tous les sites de mesure testés, avec des  $R^2c$  proches de 0,80 et des corrélations proches de 0,90 en validation externe. Toutefois, la précision de la prédiction du pH ultime reste bien en dessous de la répétabilité obtenue lorsqu'on utilise un pH-mètre (0,03) (Figure 5).



**Figure 5 :** Corrélation entre le pH ultime du muscle *Pectoralis major* prédit (site EH, SNV, 10 facteurs PLS) et le pH ultime du muscle *Pectoralis major* observé. Projet OPTIVIANDE.

### 1.4 Conclusion

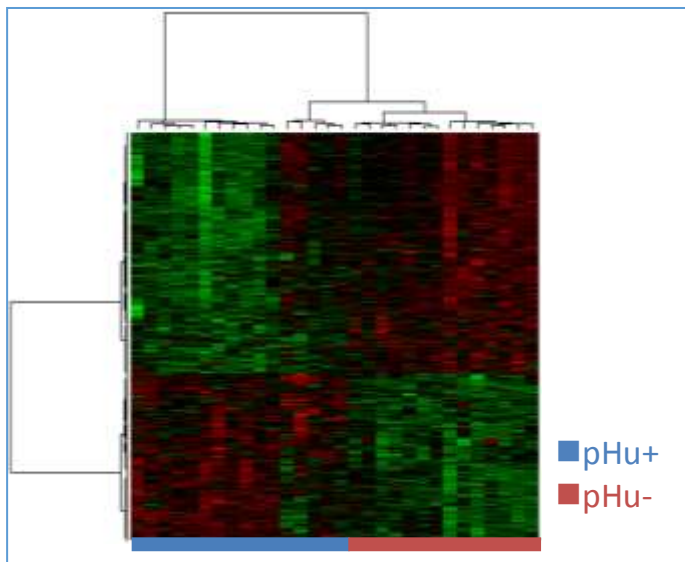
La caractérisation phénotypique de la qualité technologique par la SPIR, une méthode spectrale, rapide à mettre en œuvre, a été concluante et a permis de prédire plusieurs critères de qualité technologique du filet de poulet. Il est notamment possible de prédire le pH ultime du filet, ses pertes en eau lors du stockage et sa dureté après cuisson.

## 2. Recherche de marqueurs biologiques par la caractérisation du métabolome sanguin et du transcriptome musculaire d'animaux extrêmes pour la qualité.

La distribution du pH ultime au sein des deux lignées pHu+ et pHu- permet de disposer d'animaux extrêmes pour ce caractère et les paramètres de qualité associés (cf. § 1.1). Nous avons donc sélectionné au sein de ces deux populations, des sous-groupes d'animaux extrêmes en terme de pHu sur lesquels nous avons analysé le profil d'expression génique au niveau musculaire (*Pectoralis major*) et les signatures métaboliques au niveau sanguin et musculaire. L'objectif de ces études était d'identifier des marqueurs biologiques permettant un phénotypage fin et précoce de la qualité, en particulier dans le cas des métabolites sanguins accessibles *in vivo*. En effet, disposer d'outils de phénotypage à haut-débit est un enjeu majeur pour la sélection et plus largement la filière, puisque l'étude de leur régulation par les facteurs d'élevage permettra à terme de proposer des itinéraires de production optimaux pour la qualité de viande.

### 2.1 Analyse des profils d'expression génique et développement d'un modèle prédictif basé sur l'expression musculaire de 20 gènes

Le transcriptome de 31 filets (muscle *Pectoralis major*) de poulets extrêmes en termes de pHu, issus des lignées pHu+ et pHu-, a été étudié sur puce à ADN 8x60K. Cette étude a mis en évidence 1436 gènes différentiellement exprimés (DE) entre les deux groupes d'individus. Parmi ces gènes, 850 étaient sur-régulés et 586 sous-régulés dans les muscles des pHu- par rapport aux pHu+ (Figure 6)



**Figure 6** : Heatmap représentant le profil d'expression des gènes différentiels dans le muscle *Pectoralis major* des lignées pHu+ et pHu- (Projet OPTIVIANDE).

Une analyse d'enrichissement (Gene Ontology) a révélé que les gènes DE sont majoritairement impliqués dans la glycolyse, le glissement des filaments musculaires, la cicatrisation ou encore l'homéostasie des cellules musculaires. Par ailleurs, 90% des gènes liés au métabolisme des glucides étaient surexprimés chez les pHu-. Globalement, l'analyse du transcriptome musculaire des animaux



pHu+ et pHu- a révélé des statuts métaboliques et des modes de production d'énergie très différents entre lignées, les muscles des animaux pHu- utilisant principalement leur forte réserve en glucides et ceux des pHu+ des voies cataboliques alternatives entraînant un remodelage important du tissu musculaire (Beauclercq et al., 2015, Figure 7).

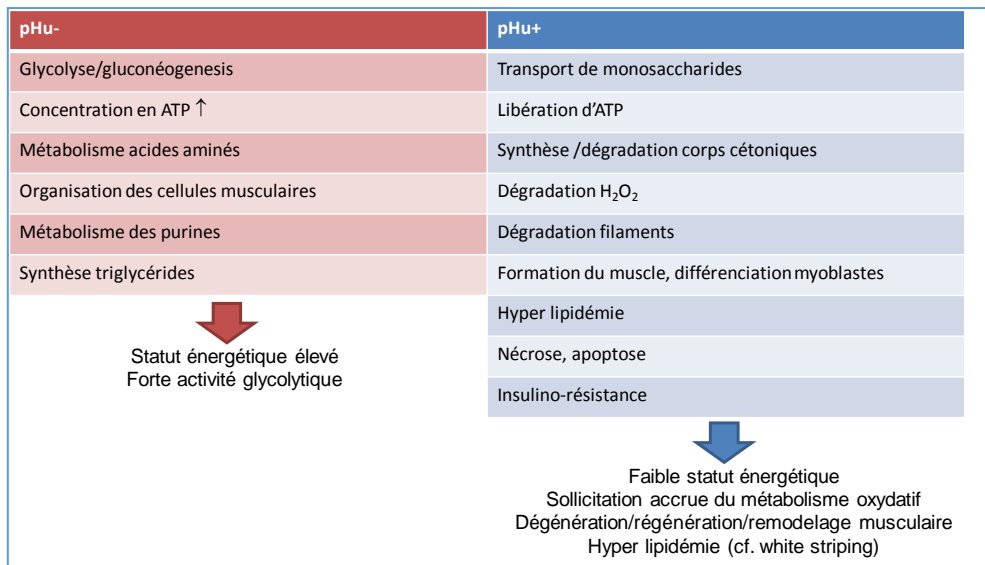


Figure 7 : Voies biologiques sur-régulées dans les lignées pHu+ et pHu- (Projet OPTIVIANDE).

À partir du transcriptome, incluant 1436 gènes identifiés comme différentiels entre individus pHu+ et pHu-, des modèles sPLS (sparse Partial Least Squares) ont été ajustés pour prédire le pHu. Les modèles développés présentaient un bon pouvoir explicatif et prédictif du pHu ( $R^2Y = 0,77 - 0,87$ ,  $Q^2 = 0,68 - 0,79$ ). Vingt et un gènes provenant de ces modèles complétés par 27 autres gènes candidats biomarqueurs du pHu ont été sélectionnés pour validation par qRT-PCR à haut débit (technologie Fluidigm) sur une population de 280 animaux issus des deux lignées (gamme de pHu allant de 5,41 à 6,50). À l'issue de cette analyse et d'une étape d'élimination des gènes avec un faible pouvoir explicatif, un modèle PLS final incluant 20 gènes a pu être ajusté, permettant de prédire le pHu du filet avec un pouvoir explicatif ( $R^2$ ) de 0,65, un pouvoir prédictif ( $Q^2$ ) de 0,62 et un taux d'erreur de 16% (Figure 8). Ce modèle permet de classer correctement 74% des viandes présentant un pHu dit normal (c'est-à-dire compris supérieur à 5,7 et inférieur à 6,1).

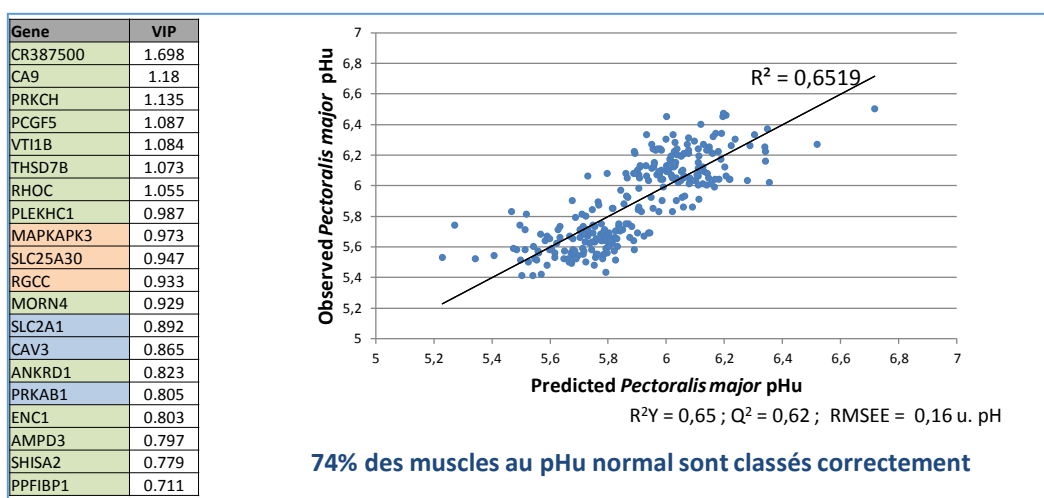
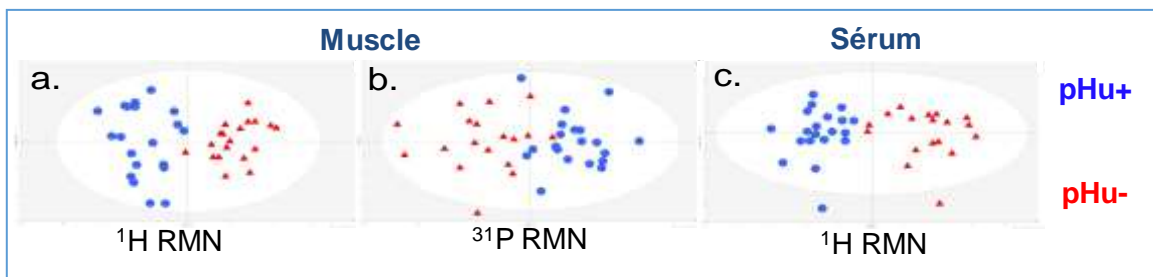


Figure 8 : Listes des gènes retenus pour le développement d'un modèle PLS prédictif du pHu du filet chez le poulet (Projet OPTIVIANDE).

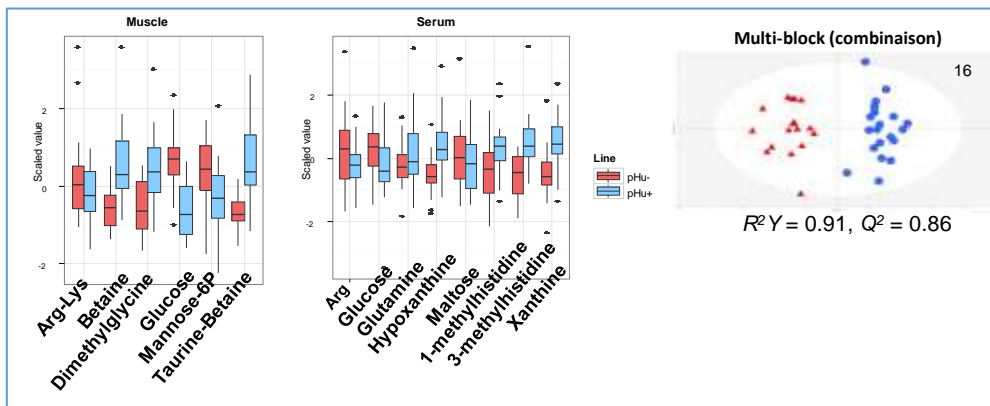
## 2.2 Analyse de la signature métabolique des poulets producteurs de viande acide (pHu-) ou à pH ultime élevé (pHu+)

En complément des analyses transcriptomiques, des extraits de muscle (filet) et de sérum issus des animaux extrêmes des deux lignées ont été analysés par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) haute résolution (du proton et du phosphore pour le muscle et du proton pour le sérum). Ces analyses ont révélé des signatures métaboliques très spécifiques des deux groupes, à la fois dans le sang et le muscle, permettant une discrimination quasi parfaite de ceux-ci (Beauclercq et al., 2016). Au total, 20 et 26 métabolites discriminant les deux lignées ont été identifiés par analyse multivariée OPLS-DA dans le sérum et le muscle, respectivement. Trois modèles indépendants ont été ajustés présentant un bon pouvoir explicatif ( $R^2Y$ ) et prédictif ( $Q^2$ ) du pHu ( $R^2Y = 0,63 - 0,82$ ,  $Q^2 = 0,45 - 0,76$ , Figure 9).



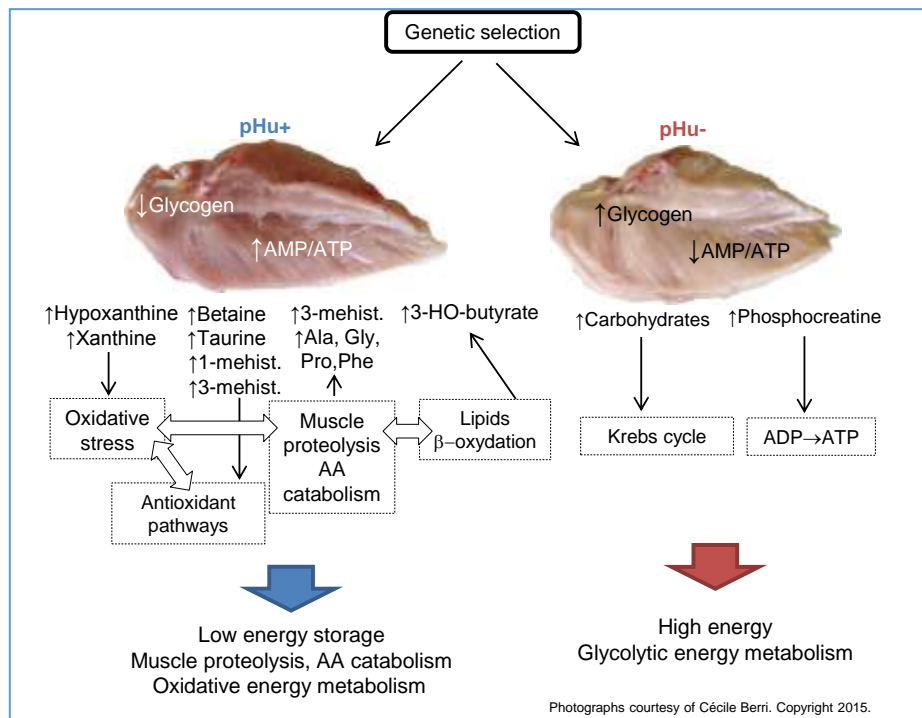
**Figure 9** : Analyse multivariée (OPLS-DA) basée sur les extraits polaires du muscle P. major (a : RMN 1H ; b : RMN 31P) prenant en compte 26 métabolites discriminants (16 et 10, respectivement) et les molécules polaires du sérum (RMN 1H, 20 métabolites discriminants). Projet OPTIVIANDE.

Un modèle « multi bloc » intégrant un nombre restreint de métabolites a par la suite été développé. Ce modèle composé de 8 métabolites musculaires et 8 métabolites sanguins possède une meilleure capacité prédictive ( $Q^2(\text{cum}) = 0,86$ ) et un meilleur pouvoir discriminant ( $R^2Y(\text{cum}) = 0,91$ ) que les modèles simples basés sur chaque type d'analyse (Figure 10).



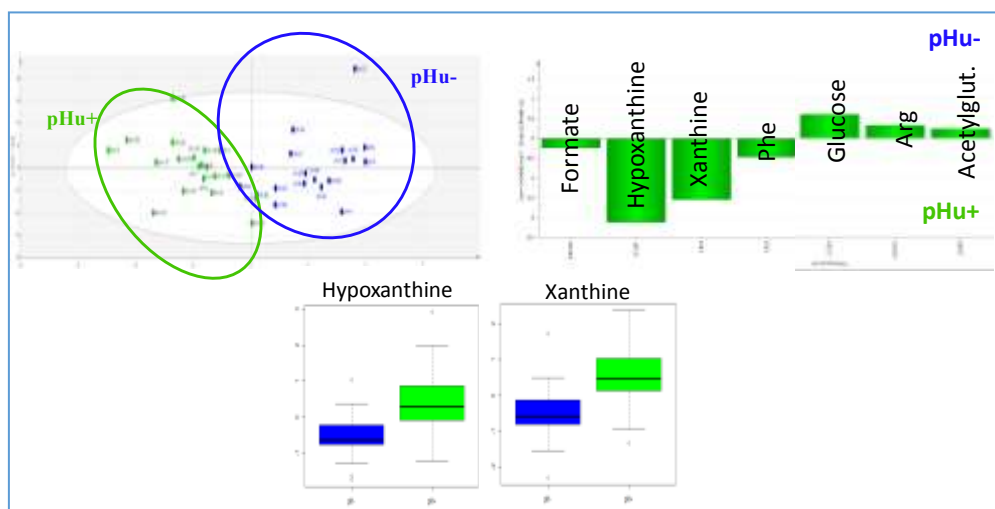
**Figure 10** : Métabolites intégrés dans le modèle multi bloc et représentation de sa capacité prédictive et son pouvoir discriminant. Projet OPTIVIANDE.

En analysant ces résultats globalement, nous avons montré que les animaux pHu- présentent des taux de glucides et de phosphocréatine plus élevés tandis que les pHu+ sont caractérisés par une surreprésentation de marqueurs liés au stress oxydatif, à la réponse anti-oxydante et à une protéolyse musculaire, un catabolisme des acides aminés et une  $\beta$ -oxydation lipidique accrue. Ces modifications du métabolisme tendent à démontrer une réponse adaptative des pHu+ pour compenser leur déficit (environ -20%) en glycogène stocké au niveau musculaire (Figure 11) en totale cohérence avec les régulations d'expression génique que nous avons observées entre lignées au niveau musculaire.



**Figure 11** : Représentation schématique des modifications métaboliques observées entre les lignées pHu+ et pHu- (Projet Optiviande).

Dans l'optique de développer un test utilisable en routine sur animaux vivants, l'étude s'est intéressée spécifiquement aux métabolites identifiés dans le sang. Ainsi, un modèle incluant 7 métabolites (acetylglutamine, arginine, formate, glucose, hypoxanthine, phénylalanine et xanthine) permet une bonne discrimination ( $R^2Y = 0,73$ ,  $Q^2 = 0,64$ , Figure 12) et dans le même temps de limiter le plus possible les tests biologiques pour le diagnostic. Cependant, le potentiel prédictif de ce set de biomarqueurs sériques reste à valider sur d'autres populations de poulets à la fois plus représentatives de la variabilité de pHu observée en abattoir et présentant des fonds génétiques différents de celui des lignées pHu+ et pHu-. Si cette étape de validation est concluante, ces biomarqueurs pourraient être utilisés en sélection pour éliminer les individus prédisposés à produire des viandes DFD ou acides, ou encore en recherche pour évaluer des innovations liées aux pratiques d'élevage des animaux.



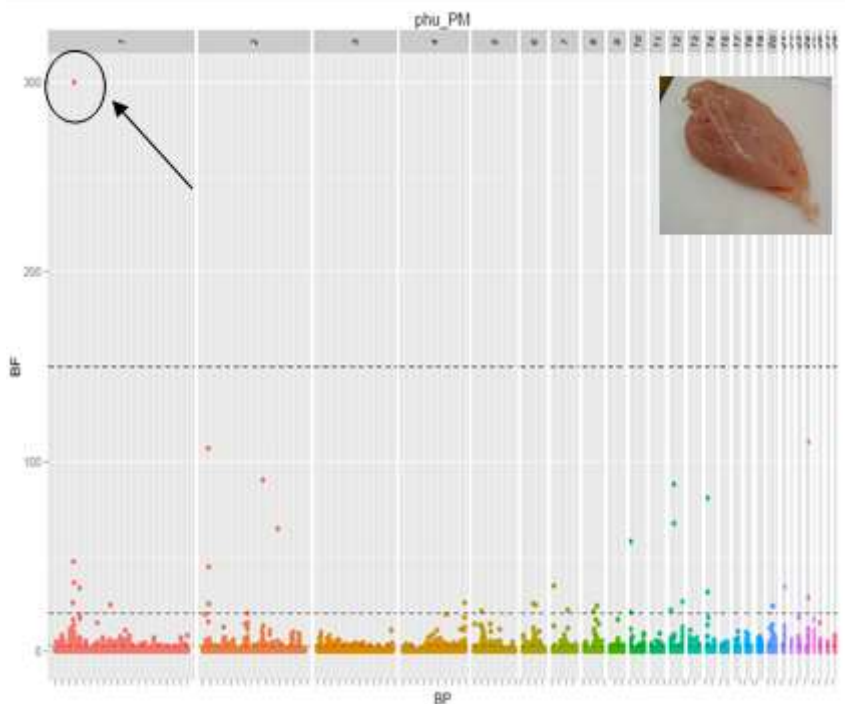
**Figure 12** : Modèle parcimonieux basé sur l'utilisation d'un nombre de métabolites sanguins réduit à 7. Les différents histogrammes montrent les différentiels de concentration entre animaux pHu+ et pHu-. Projet OPTIVIANDE.

### 3. Recherche de marqueurs génétiques et de gènes candidats de la qualité

#### 3.1 Identification de régions QTL (Quantitative Trait Loci) pour le pH ultime

Contrairement au Porc où de nombreuses régions chromosomiques (QTL) contrôlant des indicateurs de qualité de la viande ainsi que des gènes majeurs (tels que le gène RN et le gène de sensibilité à l'halothane) ont été identifiés, les acteurs moléculaires impliqués dans le contrôle de la qualité restent encore très peu connus chez le poulet. L'identification des gènes puis des mutations impliquées permettrait d'améliorer l'efficacité de la sélection, aujourd'hui basée sur des tests sur collatéraux, mais aussi de mieux comprendre le déterminisme de la qualité. Une analyse d'association entre marqueurs et phénotype à l'échelle du génome (ou analyse GWAS) a été réalisée sur 558 animaux de la sixième génération phénotypés et génotypés à l'aide de la puce poulet Illumina contenant 57 636 marqueurs SNP (Single-Nucleotide Polymorphism). L'analyse qualité des données génotypiques (réalisée à l'aide du logiciel Plink) a permis de retenir un total de 40 590 marqueurs SNP (présentant un taux de génotypage supérieur à 95% et une fréquence dans la population de l'allèle rare supérieure à 5%) localisés sur 28 autosomes.

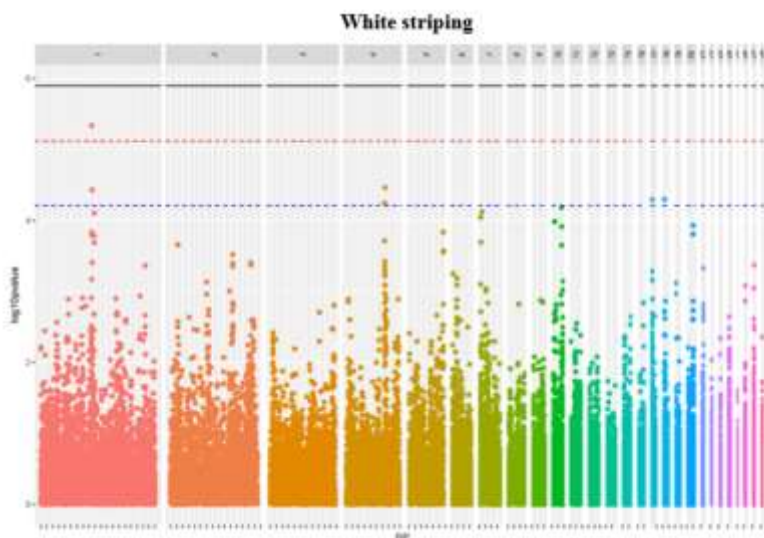
L'analyse GWAS réalisée à l'aide du logiciel GS3 et un modèle multi-marqueurs a permis d'identifier 33 marqueurs SNP associés au pH ultime du filet (Le Bihan-Duval et al., 2018). Ils définissent 24 régions QTL localisées sur 15 chromosomes. Comme illustré sur la Figure 13, un SNP très fort est détecté sur le chromosome 1. D'autres pics d'intérêt sont mis en évidence au niveau notamment des chromosomes 2 ou 24. Concernant le pH ultime de la cuisse, un total de 18 SNP regroupés au sein de 10 régions a été détecté. Un SNP très fort est mis en évidence sur le chromosome 4, alors que les autres QTL restent à des niveaux de signification plus modérés. Malgré une corrélation génétique positive entre pH ultime du filet et de la cuisse ( $r_g=0,54$ , Alnahhas et al., 2014), peu de co-localisations de QTL pour ces deux caractères sont donc observées. Ceci suggère que les gènes sous-jacents aux QTL détectés modifient spécifiquement le métabolisme de l'un ou l'autre muscle.



**Figure 13 :** Manhattan plot de la statistique (BF) du test d'association entre marqueur SNP et pH ultime du filet pH pour les 28 autosomes analysés. 24 régions ont été identifiées dont une principale sur le chromosome 1. Projet OPTIVIANDE.

### 3.2 Identification de QTL pour les autres caractères de qualité.

Le dispositif mis en place dans le cadre du projet OPTIVIANDE a également permis d'explorer les régions QTL contrôlant les autres indicateurs de qualité ainsi que le défaut musculaire de type White Striping (WS). Ce dernier se caractérise par la présence de stries blanches correspondant à des dépôts lipidiques le long des fibres musculaires. Son étude au sein des lignées pHu a montré qu'il était fortement héritable ( $h^2 = 0.65$ ; Alnahhas et al., 2016) et plus fréquent (pour les cas les plus sévères) dans la lignée pHu+. L'analyse GWAS réalisée avec le logiciel GEMMA sur la population constituée des deux lignées a conduit à la détection de 42 SNP significatifs, définissant 18 régions QTL localisées sur 13 chromosomes (Pampouille et al., 2018). Cette étude a permis d'identifier pour la première fois chez le poulet des régions QTL contrôlant le White Striping et localisées sur les chromosomes 1, 17 et 18 (Figure 14). En analysant séparément chacune des deux souches, nous confirmons la présence de QTL de WS sur les chromosomes 1 et 17 (ainsi que 20) dans la lignée pHu+, alors qu'aucun QTL n'est retrouvé dans la lignée pHu-. Ceci suggère une possible interaction entre le déterminisme génétique du défaut White Striping et le statut métabolique du muscle en lien avec les réserves en glycogène et le pH ultime. Parmi les QTL détectés, nous avons identifié une région particulièrement significative sur le chromosome 4. Elle contrôle plusieurs critères d'importance pour la qualité technologique comme le pouvoir de rétention d'eau de la viande (mesures de l'exsudat et des pertes à la cuisson) et la couleur (mesures de luminosité et indice du jaune). Les mécanismes impliqués semblent indépendants de l'effet du pH ultime ou du défaut musculaire White Striping, car aucune co-localisation avec des QTL pour ces deux caractères n'est mise en évidence au niveau de cette région.



**Figure 14** : Manhattan plot de la P-value du test d'association entre marqueur SNP et défaut White Striping pour les 28 autosomes analysés. 3 QTL sont identifiés sur les chromosomes 1, 17 et 18. Projet OPTIVIANDE.

### 3.3 Intégration des données génétiques et transcriptomiques pour l'identification de gènes candidats pour le pH ultime

En complément de l'analyse GWAS réalisée dans le cadre du projet OPTIVIANDE, nous avons mis en œuvre une recherche de signatures de sélection sur les deux lignées divergentes (Projet GENETECH financé par le département de Génétique Animale de l'INRA). Ce type d'analyse, basée sur la différence des fréquences alléliques (ou haplotypiques) entre les deux lignées, met en évidence des régions génomiques potentiellement impliquées dans le contrôle du phénotype sélectionné (i.e., le pH ultime). La mise en commun des deux approches (détection de QTL et recherche de signatures de

sélection) a permis d'identifier 13 régions principales d'intérêt (Le Bihan-Duval et al., 2018). Leur contenu en gènes est très variable, allant de moins de 20 gènes à plus de 100. La connaissance des gènes différentiels entre les deux lignées permise par l'analyse transcriptomique (Beauclercq et al., 2017) est alors très précieuse car elle permet d'identifier des doubles candidats, à la fois positionnels et fonctionnels, et de réduire en première approche la liste des gènes d'intérêt.

Cette analyse intégrée nous a permis d'identifier plusieurs gènes d'intérêt dont certains sont connus comme étant impliqués, chez l'homme, dans des pathologies de stockage du glycogène (ou GSD pour Glycogen Storage Diseases). Tel est le cas du gène *PPP1R3A* situé sur le chromosome 1 à proximité du marqueur SNP le plus significatif dans l'analyse GWAS du pH ultime du filet. Ce gène code pour une sous-unité régulatrice, spécifique du muscle, de la protéine phosphatase 1 (PP1). En dirigeant la sous-unité catalytique vers le glycogène, elle favorise la déphosphorylation de la glycogène synthase et de la glycogène phosphorylase et donc la synthèse du glycogène. Les souris knock-out dépourvues de *PPP1R3A* présentent une réduction de 90% du glycogène musculaire. Il y a quelques années, une mutation a été identifiée chez l'homme et s'est révélée être la première mutation connue pour altérer la synthèse du glycogène et pour diminuer les niveaux de glycogène dans le muscle squelettique humain. L'analyse transcriptomique des lignées divergentes a montré que *PPP1R3A* était significativement plus exprimée dans la lignée pHu-, qui présente en effet une teneur plus élevée en glycogène. *SLC37A4*, impliqué dans les pathologies humaines, est également présent dans la liste des gènes d'intérêt. Il est situé à proximité de l'un des SNP les plus significatifs détectés pour le pHu du filet sur le chromosome 24. Il correspond à la glucose-6-phosphate translocase (également appelé G6PT) qui transporte le glucose 6-phosphate du cytoplasme au réticulum endoplasmique, où il travaille avec la glucose 6-phosphatase pour décomposer la molécule de sucre et libérer du glucose libre qui peut quitter la cellule. On estime que les mutations de *SLC37A4* représentent environ 20% des cas de GSD de type I ou maladie de von Gierke, caractérisée par l'accumulation de glycogène dans certains organes et tissus. Il est également intéressant de noter que deux autres gènes responsables de GSD humaines étaient présents dans les régions génomiques d'intérêt même s'ils n'étaient pas exprimés de manière différentielle. C'est le cas pour *GAA* codant pour l'alpha-glucosidase lysosomale qui est essentielle pour la dégradation du glycogène en glucose dans les lysosomes et responsable de la GSD de type II ou maladie de Pompe. C'est également le cas pour *PHKA1* situé à environ 20kb du SNP le plus significatif détecté dans notre étude pour le pH ultime de la cuisse. Le gène *PHKA1* code pour la sous-unité régulatrice alpha de la phosphorylase kinase qui catalyse la phosphorylation de la glycogène phosphorylase et favorise ainsi la dégradation du glycogène dans le muscle. Chez l'homme, les mutations dans *PHKA1* provoquent une GSD de type VIII qui correspond habituellement à une myopathie légère, avec une légère élévation de la concentration de créatine kinase plasmatique et de la teneur en glycogène musculaire.

En conclusion, le projet aura permis d'identifier des marqueurs génétiques associés au pH ultime et à d'autres paramètres de qualité au sein des lignées divergentes étudiées. Leur génotypage dans d'autres populations devrait permettre de valider leurs effets et d'affiner la liste des mutations candidates à intégrer en sélection génomique.

## Conclusion

Le projet CASDAR OPTIVIANDE, a permis d'évaluer la possibilité de caractériser phénotypiquement la qualité technologique de la viande de volaille par SPIR, une méthode spectrale, rapide à mettre en œuvre. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour le pH ultime du filet, les pertes en eau lors du stockage et la dureté après cuisson. D'autres méthodologies développées chez le porc, telles que la visionique et l'imagerie hyperspectrale, doivent maintenant être explorées chez le poulet afin de proposer aux professionnels la ou les techniques les plus adaptées à la détection en ligne des défauts de qualité.



L'analyse globale des transcrits musculaires a permis d'établir un modèle efficace de prédiction, permettant de classer correctement 74% des viandes présentant un pHu dit normal (c'est-à-dire compris entre 5,7 et 6,1) au sein des lignées pHu+ et pHu- étudiées. Dans l'optique de développer un test utilisable en routine sur animaux vivants, l'étude s'est aussi intéressée aux métabolites identifiés dans le sang. Un modèle incluant 7 métabolites permet une bonne discrimination entre les deux populations.

Disposer de tels biomarqueurs sériques est utile en recherche pour évaluer des innovations liées aux pratiques d'élevage des animaux. Ils présentent aussi un intérêt en sélection en tant que critères non invasifs pour éliminer les individus prédisposés à produire des viandes DFD ou acides. Le projet a de plus permis d'identifier des marqueurs génétiques du pH ultime pouvant d'ores et déjà servir à des approches de sélection génomique au sein des lignées étudiées et après validation dans d'autres populations d'intérêt.

### Références bibliographiques

- Alnahhas N., Berri C., Boulay M., Baéza E., Jégo Y., Baumard Y., Chabault M., Le Bihan-Duval E., 2014. Selecting broiler chickens for ultimate pH of breast muscle: analysis of divergent selection experiment and phenotypic consequences on meat quality, growth, and body composition traits. *J Anim Sci.* 92(9), 3816-3824.
- Alnahhas N., Berri C., Chabault M., Chartrin P., Boulay M., Bourin M.C., Le Bihan-Duval E., 2016. Genetic parameters of white striping in relation to body weight, carcass composition, and meat quality traits in two broiler lines divergently selected for the ultimate pH of the pectoralis major muscle. *BMC Genet.* 17, 61.
- Alnahhas N., Le Bihan-Duval E., Baéza E., Chabault M., Chartrin P., Bordeau T., Cailleau-Audouin E., Meteau K., Berri C., 2015. Impact of divergent selection for ultimate pH of pectoralis major muscle on biochemical, histological, and sensorial attributes of broiler meat. *J Anim Sci.* 93(9), 4524-4531.
- Beauclercq S., Hennequet-Antier C., Praud C., Godet E., Collin A., Tesseraud S., Métayer-Coustard S., Bourin M., Moroldo M., Martins F., Lagarrigue S., Bihan-Duval E.L., Berri C., 2017. Muscle transcriptome analysis reveals molecular pathways and biomarkers involved in extreme ultimate pH and meat defect occurrence in chicken. *Sci Rep.* 7(1), 6447.
- Beauclercq S., Nadal-Desbarats L., Hennequet-Antier C., Collin A., Tesseraud S., Bourin M., Le Bihan Duval E., Berri C., 2016. Serum and Muscle Metabolomics for the Prediction of Ultimate pH, a Key Factor for Chicken-Meat Quality. *J Proteome Res.* 15(4), 1168-1178.
- Berri C., Besnard J., Relandeau C., 2008. Increasing dietary lysine increases final pH and decreases drip loss of broiler breast meat. *Poult Sci.* 87(3), 480-484.
- Berri C., 2004. Breeding and quality of poultry. *Poultry Meat Processing and Quality Mead*, G.C. (Ed.), Chap. 2: 21-37. CRC Press, Boca Raton (USA), Woodhead Publishing Ltd, Cambridge (GBR).
- Chabault M., Baéza E., Gigaud V., Chartrin P., Chapuis H., Boulay M., Arnould C., D'Abbadie F., Berri C., Le Bihan-Duval E., 2012. Analysis of a slow-growing line reveals wide genetic variability of carcass and meat quality-related traits. *BMC Genet.* 2313, 90.
- Gigaud V., Bordeau T., Chartrin P., Baéza E., Berri C., 2011. Variabilité de la qualité technologique des filets de poulet rencontrée dans les abattoirs français : analyse par système de production. In : 9. Journées de la Recherche Avicole. Synthèses et textes résumés. 9èmes Journées de la Recherche Avicole Tours (FRA) 2011/03/29-30, 232.
- Gigaud V., Le Bihan-Duval E., Berri C., 2009. Facteurs de variation de l'aptitude à la transformation de la viande de volaille. 8èmes Journées de la Recherche Avicole St Malo (FRA) 2009/03/25-26, 124-131.
- Guardia S., Lessire M., Corniaux A., Métayer-Coustard S., Mercierand F., Tesseraud S., Bouvarel I., Berri C., 2014. Short-term nutritional strategies before slaughter are effective in modulating the final pH and color of broiler breast meat. *Poult Sci.* 93(7), 1764-1773.

Jlali M., Gigaud V., Métayer-Coustard S., Sellier N., Tesseraud S., Le Bihan-Duval E., Berri C., 2012. Modulation of glycogen and breast meat processing ability by nutrition in chickens: effect of crude protein level in 2 chicken genotypes. *J Anim Sci.* 90(2), 447-455.

Le Bihan-Duval E., Berri C., 2017. Genetics and Genomics for Improving Poultry Meat Quality in Poultry quality evaluation: quality attributes and consumer values. Woodhead Publishing Series in Food Science Technology and Nutrition 199-220

Le Bihan-Duval E., Debut M., Berri C.M., Sellier N., Santé-Lhoutellier V., Jégo Y., Beaumont C., 2008. Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. *BMC Genet.* 189, 53.

Le Bihan-Duval E., Hennequet-Antier C., Berri C., Beauclercq S.A., Bourin M.C., Boulay M., Demeure O., Boitard S., 2018. Identification of genomic regions and candidate genes for chicken meat ultimate pH by combined detection of selection signatures and QTL. *BMC Genomics*- 19, 294

Le Bihan-Duval E., Berri C., Baeza E., Millet N., Beaumont C., 2001. Estimation of the genetic parameters of meat characteristics and of their genetic correlations with growth and body composition in an experimental broiler line. *Poultry Science.* 80(7), 839-843

Pampouille E., Berri C., Boitard S., Hennequet-Antier C., Beauclercq S.A., Godet E., Praud C., Jégo Y., Le Bihan-Duval E., 2018. Mapping QTL for white striping in relation to breast muscle yield and meat quality traits in broiler chickens. *BMC Genomics.* 19(1), 202.

Sibut V., Hennequet-Antier C., Le Bihan-Duval E., Marthey S., Duclos M.J., Berri C., 2011. Identification of differentially expressed genes in chickens differing in muscle glycogen content and meat quality. *BMC Genomics.* 1612, 112.

Sibut V., Le Bihan-Duval E., Tesseraud S., Godet E., Bordeau T., Cailleau-Audouin E., Chartrin P., Duclos M.J., Berri C., 2008. Adenosine monophosphate-activated protein kinase involved in variations of muscle glycogen and breast meat quality between lean and fat chickens. *J Anim Sci.* 86(11), 2888-2896.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL)