



**HAL**  
open science

## **Etablissement d'une stratégie de gestion génétique in situ pour la race locale "Noire de de Challans"**

Romuald Rouger, Hervé Deloison, Marc Teissier, Gwendal Restoux, Daniel  
Guemene, Sophie Brard-fudulea

### ► **To cite this version:**

Romuald Rouger, Hervé Deloison, Marc Teissier, Gwendal Restoux, Daniel Guemene, et al.. Etablissement d'une stratégie de gestion génétique in situ pour la race locale "Noire de de Challans". Quatorzièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à foie gras, Mar 2022, Tours, France. <hal-03811952>

**HAL Id: hal-03811952**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03811952v1>**

Submitted on 12 Oct 2022

**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.



HAL Authorization

# ETABLISSEMENT D'UNE STRATEGIE DE GESTION GENETIQUE *IN SITU* POUR LA RACE LOCALE « NOIRE DE CHALLANS »

Romuald Rouger<sup>1</sup>, Hervé Deloison<sup>2</sup>, Marc Teissier<sup>3</sup>, Gwendal Restoux<sup>4</sup>, Daniel Guémené<sup>1</sup>, Sophie Brard-Fudulea<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SYSAAF, UMR BOA, Centre INRAE Val de Loire, 37380 NOUZILLY

<sup>2</sup>Association pour la sauvegarde et la valorisation, 52, le broussais, 44460 SAINT NICOLAS DE REDON

<sup>3</sup>GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31326 CASTANET TOLOSAN

<sup>4</sup>INRAE, Université Paris Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350 JOUY-EN-JOSAS  
[romuald.rouger@inrae.fr](mailto:romuald.rouger@inrae.fr)

## RÉSUMÉ

La poule Noire de Challans est une race locale originaire de la région s'étendant entre Nantes et Challans en Vendée. La population est actuellement maintenue dans son aire de répartition grâce à l'activité de plusieurs éleveurs assurant le renouvellement des cheptels. A l'instar de nombreuses races locales, la gestion génétique de la population est difficile en raison de généalogies imparfaitement connues. Le but de cette étude a été de mettre en place une gestion *in situ* de la diversité génétique de la Noire de Challans par l'utilisation de marqueurs moléculaires. Quatre-vingt-seize marqueurs SNPs ont été sélectionnés à partir d'une liste obtenue lors de travaux antérieurs. Testés au sein de la population de Noire de Challans, ces marqueurs présentent un niveau élevé de diversité (Fréquence moyenne de l'allèle minoritaire égale à 0.358). Un léger déficit en hétérozygote causé par un effet Wahlund a été détecté dans la population. Une analyse *in silico* a ensuite permis de confirmer que les marqueurs choisis étaient parfaitement compatibles avec leur utilisation dans le cadre d'une assignation de parenté chez la Noire de Challans (probabilité d'identité de  $4.24 \times 10^{-27}$  et probabilité d'exclusion de 0.999). Finalement, une procédure itérative reposant sur un algorithme de type "recuit-simulé" a été mise en place afin de définir le plan de croisements permettant de maximiser la distance génétique moléculaire observée entre mâles et femelles à associer. La reconstruction *a posteriori* du pedigree à l'aide de ces marqueurs permettra de gérer *in situ* les populations de Noire de Challans en limitant l'accroissement de la consanguinité. Ces résultats représentent une preuve de concept qu'il sera possible d'étendre à d'autres races locales pour lesquelles les informations généalogiques sont partielles ou absentes.

## ABSTRACT

### Development of an *in situ* genetic management strategy of the local breed "Noire de Challans"

"Noire de Challans" is a local breed originating from the area located between Nantes and Challans in Vendée (France). The population is maintained within its geographic range thanks to several farmers breeding the animals to ensure the permanency of the flock. As in many local breeds, genetic management of this population is difficult because of incomplete or sparse pedigrees. The goal of this study was to develop a management strategy of the genetic diversity within the breed "Noire de Challans" using molecular markers. Ninety-six SNP markers have been selected from a list obtained through a previous project. Within "Noire de Challans", these markers displayed a high level of diversity (the average minor allele frequency is 0.358). A slight heterozygote deficit caused by a Wahlund effect has been detected within the population. An *in silico* analysis confirmed that this set of markers is perfectly suitable for parentage assignment within the breed (probability of identity:  $4.24 \times 10^{-27}$ , exclusion probability: 0.999). Finally, optimal mating plans were designed using an iterative procedure based on a simulated annealing algorithm to maximise the molecular distance between sires and dams. This posterior reconstruction of the pedigrees using these molecular markers allows the genetic management of the "Noire de Challans" by limiting the increase of inbreeding within the population. This proof of concept can be transferred to other local breeds for which genealogical information is often rare or inaccurate.

## INTRODUCTION

Lors du dernier recensement, datant de 2014, 47 races locales de poules étaient dénombrées en France. Parmi celles-ci, 45 étaient considérées comme menacées d'abandon pour l'agriculture souvent à cause d'un suivi insuffisant pour garantir la pérennité démographique et/ou génétique des cheptels (Audiot et al., 2015). A l'instar des protocoles mis en place pour les lignées à vocation commerciale, certaines associations de races font donc appel à des structures comme le Centre de Sélection de Béchanne (CSB) et le Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français (SYSAAF) qui disposent des capacités logistiques et statistiques permettant d'assurer un tel suivi. Pour ces races, l'enregistrement rigoureux du pedigree par le CSB permet au SYSAAF de calculer l'apparentement entre animaux puis de proposer des plans d'accouplements optimaux du point de vue de la gestion génétique du cheptel. Malheureusement, pour la majorité des races conservées les ressources logistiques manquent pour garantir leur sauvegarde sur le long terme.

La poule Noire de Challans fait partie de la liste des races menacées d'abandon pour l'agriculture. Originaire du marais breton-vendéen, cette race rustique est particulièrement adaptée aux conditions de vent et d'humidité qui y règnent. La population de Noire de Challans est gérée par la douzaine d'éleveurs membre de l'association pour la sauvegarde et la valorisation de la poule Noire de Challans. L'association assure jusqu'à présent le renouvellement du cheptel. La gestion génétique de ce cheptel est surtout menée de façon empirique. Le nombre d'animaux reproducteurs est faible (entre 70 et 80 au niveau de l'association, estimée entre 200 et 300 au niveau de la race, H. Deloison comm. pers.), la généalogie des individus n'est connue que de façon parcellaire et le noyau de renouvellement est souvent complété avec des individus provenant d'origines diverses. En l'état, il est donc impossible d'appliquer une stratégie de conservation génétique se basant sur le pedigree des animaux pour gérer l'évolution de la diversité génétique dans la population (i.e. Contrôle de la consanguinité). Le but du présent travail est donc de tirer profit de récents développements techniques pour mettre au point une méthode de gestion utilisant comme donnée d'entrée la distance génétique moléculaire entre animaux. Ce travail se partage en trois phases distinctes :

1) Tester l'utilisation d'une puce 96 marqueurs SNPs développée lors d'un projet antérieur sur une population non étudiée jusqu'à présent (Noire de Challans).

2) A l'aide de ces marqueurs, décrire le niveau de diversité génétique initial dans la population de Noire de Challans.

3) Développer une procédure spécifique afin de définir un plan d'accouplements permettant de gérer au mieux la diversité génétique dans la population.

## 1. MATERIELS ET METHODES

Au total, 54 animaux considérés comme candidats à la reproduction ont été prélevés (15 mâles et 39 femelles provenant de 5 origines distinctes, H. Deloison comm. pers.) par l'association pour la sauvegarde et la valorisation de la poule Noire de Challans. Un morceau de crête de chaque animal a été prélevé puis conservé au réfrigérateur. Les échantillons ont ensuite été disposés en plaque 96 puits puis envoyés à la plateforme Gentyane (UMR INRAE 1095, Génétique Diversité et Ecophysiologie des Céréales) pour extraction d'ADN. L'ADN a été extrait à l'aide du kit d'extraction AGENCOURT-GENFIND V2 (Beckman Coulter).

### 1.1. Choix du panel de marqueurs et génotypage

La définition du panel de marqueurs utilisé sur cette population s'appuie sur les travaux initiaux et successifs de Gwendal Restoux (INRAE) et de Marc Teissier (SYSAAF) dans le cadre du projet RefGenDivA. Ce projet, financé par le Centre de Ressources Biologiques des Animaux domestiques (CRB-Anim) avait notamment pour objectif de caractériser la diversité génétique des races locales françaises. Des individus provenant de 27 populations de poules différentes ont été génotypés à l'aide d'une puce Illumina 57K (Restoux *et al.*, en relecture). Sur la base de ce génotypage, une première liste de 1109 marqueurs a été définie en vue de leur utilisation en assignation de parenté. Ces marqueurs ont été choisis sur la base de leur niveau de diversité génétique intrinsèque à l'intérieur des 27 races étudiées (Fréquence de l'allèle minoritaire, i.e. MAF, la plus élevée possible, conformité à l'équilibre de Hardy-Weinberg).

Un génotypage complémentaire de 10 nouvelles populations tests comportant chacune des trios parents-descendants a été effectué afin de contrôler la ségrégation mendélienne des 1109 marqueurs. A partir de cette liste de 1109 marqueurs, des panels de différentes tailles (48, 96 et 192 marqueurs), de niveau de diversité variable (MAF>0,15 ; MAF>0,20 ; MAF>0,25) et dont la distribution des marqueurs le long du génome varie (fenêtre de 2, 4 et 6Mbp) ont été simulés (résultats disponibles sur demande). Sur la base de cette analyse, un panel répondant aux caractéristiques suivantes a été sélectionné pour analyser la population de Noire de Challans :

- Quatre-vingt-seize marqueurs,
- MAF supérieure à 0,25 dans au moins 27 des 37 populations génotypées,
- Un seul SNP possible par fenêtre non chevauchante de 6Mbp le long du génome.

Le génotypage de chaque individu aux 96 marqueurs définis préalablement a été effectué par chimie KASPar couplée à une lecture au LightCycler®480 (Roche LifeScience) sur la plateforme Gentyane. Les signaux de fluorescence ont ensuite été analysés sur le logiciel Fluidigm SNP Genotyping Analysis. Parmi les 96 marqueurs utilisés, 26 présentait plus de 10% de données manquantes, soit à cause d'un manque d'amplification ou à cause d'un manque de définition claire des clusters de génotypage. Ces marqueurs ont donc été retirés de l'analyse.

## 1.2. Analyse statistique et assignation de parenté

Sur la base des 70 marqueurs restants, les statistiques descriptives de diversité génétique et une Analyse en Composantes Principales (ACP) ont été obtenues à l'aide du package hierfstat (Goudet, 2005) du logiciel R. Pour juger de l'intérêt potentiel de ce panel de marqueurs en assignation de parenté, la probabilité d'identité (i.e. la probabilité que deux individus possèdent le même génotype par hasard) et la probabilité d'exclusion d'un parent (i.e. la probabilité d'exclure un parent sachant que ce n'est pas le vrai parent) ont été calculées (Jamieson & Taylor, 1997). Les génotypes de mille descendants issus de la population analysée ont été simulés à l'aide d'un script R développé spécifiquement. Chacun de ces descendants simulés a ensuite été réassigné à l'aide du package APIS (Griot *et al.*, 2020) afin de contrôler le taux d'individus correctement assignés à l'aide du panel de marqueurs.

## 1.3. Définition du plan d'accouplement (algorithme de gestion de la diversité génétique)

Le génotype de chaque individu a été exprimé sous forme de fréquence allélique (0 ; 0,5 ; 1) afin de calculer une matrice de distance euclidienne entre individus deux à deux. A partir des N=54 individus initiaux, un algorithme dit de « recuit-simulé » a été développé afin de sélectionner 40 individus ( $n_m = 10$  mâles et  $n_f = 30$  femelles) permettant de maximiser la distance génétique moyenne entre individus. Cet algorithme de « recuit-simulé » est une simplification de l'algorithme présenté dans Chapuis *et al.* (2015).

A l'état initial  $n_m$  mâles et  $n_f$  femelles sont sélectionnés aléatoirement. La distance moyenne  $d_0$  entre l'ensemble de ces animaux est calculée. A la première itération de l'algorithme, soit un mâle, soit une femelle est remplacé par un individu de même sexe ne figurant pas dans la combinaison initiale. Une nouvelle distance moyenne  $d_1$  est calculée. Si  $d_1 > d_0$ , alors la nouvelle combinaison d'individus est acceptée comme nouvelle combinaison de référence  $d_{ref}$ , si  $d_1 < d_0$ , alors la nouvelle combinaison est acceptée avec la probabilité :

$$p = e^{-(d_1 - d_0)/t_0}$$

Où  $t_0$  est appelé « température » initiale du système, définie comme l'écart type de la distribution construite à partir de la distance moyenne pour chacune de 10000 combinaisons aléatoires de 40 animaux.

A chaque itération, la même logique est appliquée. Ainsi, à l'itération  $i$ , la nouvelle combinaison est acceptée si  $d_i > d_{ref}$ . Si  $d_i < d_{ref}$ , la nouvelle combinaison est acceptée avec la probabilité :

$$p = e^{-(d_i - d_{ref})/t_j}$$

Où  $t_j$  est la  $j^{\text{ème}}$  « température » du système défini comme :

$$t_j = t_0 \times 0.99^j$$

A chaque « température », le nombre d'itérations de l'algorithme avant de passer à la « température » suivante est fixé arbitrairement à  $k=21N$  (soit au-dessus de la recommandation  $k=5N$  de Chapuis *et al.* 2015)). L'algorithme s'arrête lorsqu'aucune nouvelle combinaison est acceptée après 100 « températures » successives. La combinaison en cours est alors considérée comme étant la combinaison optimale.

Après avoir ainsi sélectionné la combinaison de 40 individus permettant de maximiser la distance génétique moyenne entre individus, la structure de parquets doit être définie. Cette structure de parquet est définie en deux étapes successives :

- Premièrement, il est nécessaire de maximiser la distance minimale entre deux femelles d'un même parquet (et ainsi de limiter l'appariement entre les individus de la prochaine génération). L'algorithme a donc été légèrement adapté en ce but. La valeur de  $t_0$  étant cette fois-ci l'écart type de la distribution construite à partir de la distance minimale entre deux femelles d'un même parquet pour chacune de 10000 combinaisons aléatoires de 10 parquets de 3 femelles.

- Deuxièmement, il est nécessaire de maximiser la distance moyenne entre mâles et femelles à accoupler. La structure de parquets définie lors de la première étape sert alors de point de départ pour une nouvelle adaptation de l'algorithme. A chaque itération, soit le mâle d'un parquet est permuté avec le mâle d'un autre parquet, soit une femelle d'un parquet est permutée avec une femelle d'un autre parquet. Lors d'une itération, la nouvelle combinaison est systématiquement rejetée si la distance minimale entre deux femelles d'un même parquet est inférieure à un seuil donné ( $s$ ). La procédure de recuit-simulé ne s'applique que sur la distance moyenne entre mâles et femelles à accoupler. La valeur du seuil permettant de garantir une distance minimale satisfaisante entre

femelles d'un même parquet tout en garantissant la plus large distance moyenne possible entre mâles et femelles d'un parquet a été estimée à  $s=3,86$  (analyse non montrée ici).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Diversité génétique

Bien que la Noire de Challans ne fasse pas partie du panel de races étudiées dans le cadre du projet RefGenDivA, le niveau de polymorphisme des marqueurs utilisés est compatible avec leur utilisation pour décrire la diversité génétique de la race (MAF moyenne de 0,358,  $sd=0,096$ ). Néanmoins, le passage sur la technologie KASPar des marqueurs identifiés en technologie Illumina a occasionné la perte d'un nombre important de marqueurs (26).

Le  $F_{IS}$  multilocus est légèrement positif (0,069, Figure 1A) et significativement différent de 0 ( $p<0,05$  après 1000 bootstraps) indiquant un léger déficit en hétérozygotes. L'ACP indique que cinq individus ségrégent hors de la population générale (Figure 1B). Ces animaux sont tous issus d'un même élevage ayant évolué en vase-clos depuis plus de 25 ans (H. Deloison, comm. pers.). La valeur du  $F_{IS}$  après avoir exclu ces cinq individus de l'analyse ne diffèrent pas significativement de 0 ( $p>0,05$  après 1000 bootstraps). L'excès en homozygotes observé dans la population est donc plus probablement le produit d'un effet Wahlund (i.e. fragmentation de la population en sous-groupes) plutôt que le produit d'accouplements entre apparentés (i.e. consanguinité). Nos résultats confirment les observations d'une étude précédente qui avait déjà montré un effet important de l'élevage d'origine sur la structure génétique de la race Noire de Challans (Berthouly *et al.*, 2008). Cette structure génétique suggère donc un volume d'échanges de reproducteurs assez faible entre populations isolées de Noire de Challans.

### 2.2. Utilisation en assignation de parenté

La probabilité d'identité calculée sur la base des 70 marqueurs analysés est de  $4,24 \times 10^{-27}$ . La probabilité d'exclusion quant à elle se situe à 0,999. Le potentiel de ce jeu de marqueurs dans un cadre d'assignation de parenté est confirmé par l'analyse *in silico* où la totalité des 1000 génotypes de descendants simulés ont été correctement assignés à leurs parents réels. Ces performances obtenues avec 70 marqueurs sont amenées à être améliorées lorsque d'autres marqueurs viendront compléter ce panel pour obtenir 96 marqueurs fonctionnels. Il est important de noter néanmoins que l'absence de reproduction avec pedigree connu dans la race empêche l'estimation du nombre d'incompatibilités mendéliennes (i.e. génotypes parent/descendants incompatibles).

### 2.3. Définition du plan de croisement optimal

Pour référence, la distance génétique moyenne entre les 54 individus génotypés est de 3,99. A titre indicatif, la distance génétique moyenne attendue entre deux pleins frères/sœurs dans cette population est de 2,68 (valeur obtenue après simulations, script R disponible sur demande). L'algorithme de recuit simulé a permis de sélectionner les 10 mâles et les 30 femelles permettant de maximiser la distance génétique moyenne existante entre eux. La combinaison optimale indique une distance génétique moyenne de 4,13, niveau significativement supérieur à celui attendu si la sélection de 40 animaux avait été effectuée au hasard ( $p<0,001$  après 10000 permutations, Figure 2A).

La définition des parquets a débuté par la répartition des 30 femelles en 10 parquets en maximisant la distance minimale entre deux femelles d'un même parquet. L'algorithme de recuit-simulé a permis de définir une structure aboutissant à une distance minimale entre deux femelles d'un même parquet de 4,06, valeur significativement supérieure à la distance minimale attendue si la répartition des femelles avait été effectuée au hasard ( $p<0,001$  après 10000 permutations, Figure 2B).

Cette structure a donc servi de point de départ afin d'assigner chaque mâle sélectionné à un parquet en maximisant la distance entre mâles et femelles accouplés. L'algorithme de recuit-simulé permettant d'assigner les mâles aux différents parquets a abouti à une distance moyenne entre mâles et femelles de 4,44, significativement supérieur à la distance attendue si le plan de croisement avait été dressé au hasard ( $p<0,001$  après 10000 permutations, Figure 2C). Cette structure de parquet est donc considérée comme optimale du point de vue de la gestion génétique du cheptel de Noire de Challans.

## CONCLUSION

Par contraintes biologique et opérationnelle, le suivi du pedigree des animaux d'une race de poule menacée d'abandon est souvent impossible (traçabilité mère-œuf impossible, impossibilité de suivre les accouplements, compétition spermatique entre les mâles...). Les liens de parenté existant entre animaux doivent donc être inférés par d'autres moyens que la seule observation. L'intégration par le SYSAAF d'outils récents de biologie moléculaire dans une procédure de gestion d'accouplements permet de répondre à cette difficulté. Le présent travail pose en effet les concepts d'une gestion *in situ* de la diversité génétique de la race Noire de Challans. Les efforts de gestion de cette race devraient se poursuivre grâce à son inclusion dans le projet européen GEroNIMO à l'intérieur duquel il est prévu de poursuivre le suivi sur cinq générations. Ce suivi permettra notamment de confirmer sur des données réelles l'utilisation du jeu de marqueurs dans un cadre d'assignation de parenté. La construction progressive d'un pedigree pour la race

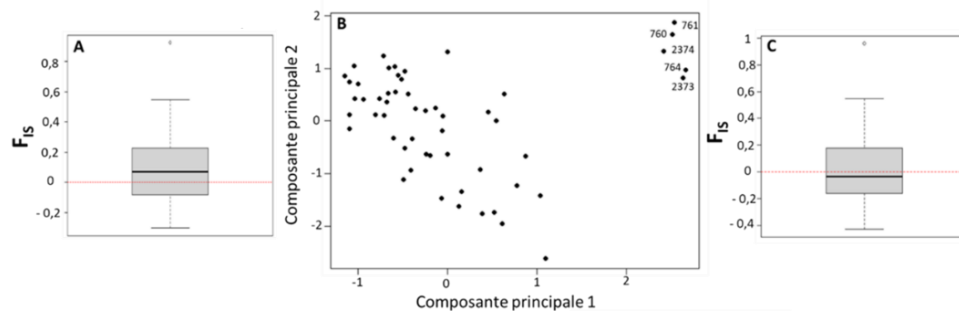
permettra également de passer à une stratégie de gestion basée sur le pedigree telle qu'elle est déployée de façon classique pour des lignées à vocation commerciale. La désignation concrète d'une population de base susceptible d'alimenter des éleveurs amateurs et professionnels (i.e. avec des individus rigoureusement identifiés) est aussi un nouveau pas en faveur de la pérennité de cette microfilière. Enfin, le SYSAAF entend tirer avantage de la portabilité du jeu de marqueurs utilisé ici afin d'étendre le concept de gestion *in situ* à d'autres petites races menacées d'abandon.

## REMERCIEMENTS

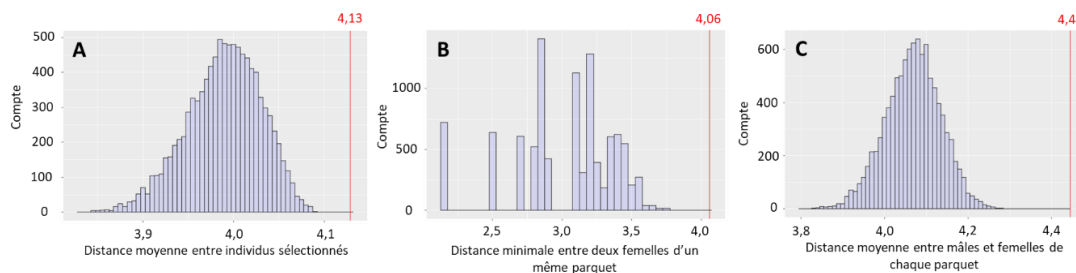
Les auteurs de l'étude remercient les éleveurs de l'association pour la sauvegarde et la valorisation de la poule Noire de Challans pour la mise à disposition de leurs animaux, la plateforme Gentyane pour la prestation de génotypage, le Conseil régional des Pays de la Loire et Conseil départemental de la Loire-Atlantique pour le financement de ces travaux.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Audiot A., Bertrand C., Chapuis H., Charvolin-Lemaire E., Danchin-Burge C., Danvy S., Gourdine J.-L., Gaultier P., Guemene D., Laloë D., Lenoir H., Leroy G., Naves M., Patin S., Sabbagh M., Verrier E., 2015. Rapport pour le Ministère chargé de l'Agriculture. 4 p.
- Berthouly C., Bed'hom B., Tixier-Boichard M., Chen C.F., Lee Y.P., Laloë D., Legros H., Verrier E., Rognon X., 2008. Anim. Genet., (39), 121-129
- Chapuis H., Pincet C., Colleau J.J., 2015. J. Anim. Breed. Genet., (133), 3-12
- Goudet, J., 2005. Mol. Ecol. Notes, (5), 184-186
- Griot R., Allal F., Brard-Fudulea S., Morvezen R., Haffray P., Phocas F., Vandeputte M., 2020. Mol. Ecol. Resour. (20) 579-590
- Jamieson A., Taylor S.C.S., 1997. Anim. Genet., (28), 397-400
- Restoux G., Rognon X., Vieaud A., Guémené D., Petitjean F., Rouger R., Brard-Fudulea S., Lubac-Paye S., Chiron G., Tixier-Boichard M., soumis à Genet. Sel. Evol.



**Figure 1. Diversité génétique de la population de Noire de Challans étudiée.** A : Distribution du  $F_{IS}$  en utilisant l'ensemble des individus de la population ( $n=54$ ). B : Distribution des génotypes le long des deux premiers axes de l'ACP (la part de la variance expliquée par les composantes principales 1 et 2 est de 15,7% et 9,3% respectivement). C : Distribution du  $F_{IS}$  en retirant les cinq individus « outliers » mis en évidence dans l'ACP.



**Figure 2. Performances des trois déclinaisons de l'algorithme de recuit-simulé utilisé dans l'étude.** La ligne verticale rouge sur chacun des histogrammes correspond à la combinaison identifiée optimale par l'algorithme. A : Distribution de la distance moyenne entre 40 individus lorsque les individus sont sélectionnés aléatoirement (10000 tirages). B : Distribution de la distance minimale entre deux femelles d'un même parquet lorsque les parquets sont construits aléatoirement (10000 tirages). C : Distribution de la distance moyenne entre mâles et femelles d'un même parquet quand les parquets de 1 mâle pour 3 femelles sont construits de façon aléatoire à partir de la population candidate (10000 tirages).