



HAL
open science

CONSTRUCTION A POSTERIORI DU PEDIGREE D'UNE POPULATION EXPERIMENTALE DE CANARDS A L'AIDE D'OUTILS MOLECULAIRES

Hervé Chapuis, Azélie Hazard, Sophie Brard-fudulea, Xavier Martin, Bruno Amadio, Josette Barrieu, Jean-Marc Mallet, Philippe Morganx, Gaele Garrigues-Cardinet, Hélène Gilbert

► To cite this version:

Hervé Chapuis, Azélie Hazard, Sophie Brard-fudulea, Xavier Martin, Bruno Amadio, et al.. CONSTRUCTION A POSTERIORI DU PEDIGREE D'UNE POPULATION EXPERIMENTALE DE CANARDS A L'AIDE D'OUTILS MOLECULAIRES. Quatorzièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, ITAVI; INRAE; ANSES; CTCPA, Mar 2022, Tours, France. hal-04163539

HAL Id: hal-04163539

<https://hal.inrae.fr/hal-04163539>

Submitted on 17 Jul 2023

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.

CONSTRUCTION A POSTERIORI DU PEDIGREE D'UNE POPULATION EXPERIMENTALE DE CANARDS A L'AIDE D'OUTILS MOLECULAIRES

Chapuis Hervé¹, Hazard Azélie², Brard-Fudulea Sophie³, Martin Xavier², Amadio Bruno², Barrieu Josette², Mallet Jean-Marc², Morganx Philippe², Garrigues-Cardinet Gaëlle² et Gilbert Hélène¹

¹GenPhySE - Université de Toulouse INRAE ENVT - 31326 Castanet Tolosan

²UEPFG INRAE - 1076 route de Haut-Mauco, 40280 Benquet

³SYSAAF- UMR BOA - Centre INRAE Val de Loire, 37380 Nouzilly

herve.chapuis@inrae.fr

RÉSUMÉ

L'entrée en vigueur de la directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques a conduit l'Unité Expérimentale des Palmipèdes à Foie Gras (INRAE) à reconsidérer la conduite de ses lignées nécessitant la connaissance du pedigree. Pour connaître la généalogie de 3 populations de canards (Pékin, Barbarie et leur hybride mulard) dans un programme expérimental en cours, il s'agissait de concevoir un plan d'accouplement au sol (sans recourir aux cages individuelles pour les femelles) compatible avec l'utilisation d'un panel de 96 marqueurs SNP développé parallèlement. Dans chaque cellule (3 par population parentale) environ 32 femelles étaient réparties en 4 groupes de 8 pour les canes de Barbarie ou 3 groupes de 11 pour les canes Pékin. Chacun de ces groupes était inséminé par la semence mélangée d'un pool de 4 mâles. On a donc remplacé un schéma hiérarchique classique en volailles (1 σ et k φ) par un schéma factoriel (p σ et q φ) habituellement rencontré en aquaculture. Les groupes de reproducteurs étaient constitués de façon à faciliter l'assignation, c'est-à-dire en évitant de rassembler des frères ou des sœurs au sein du même groupe. La consanguinité attendue a également été limitée en évitant les pères communs entre groupes de σ et de φ associés. Malgré la taille réduite du panel (96 marqueurs), son pouvoir d'assignation et la connaissance du plan d'accouplement et de la cellule où l'œuf a été ramassé ont permis la réassignation à un couple unique pour plus de 96% des individus en mulards et Pékin. Pour les Barbarie, l'absence d'une dizaine de génotypes parentaux a fait chuter ce succès à 88%. Sous réserve de pouvoir contrôler la ponte, ce type de panel concourt, pour un coût limité, à la mise en œuvre d'alternatives à la cage individuelle en sélection.

ABSTRACT

Parentage assignment in three duck experimental lines using a set of 96 molecular markers.

With the 2010/63/UE directive coming into force, the INRAE experimental facilities dealing with waterfowl had to imagine a new scheme in order to produce cohorts of offspring of known pedigree in three populations of ducks without resorting to cages for layers. A set of 96 SNP markers was therefore used to obtain pedigree knowledge through parentage assignment. In each parental population, roughly 96 dams were dispatched in 3 cells. Within each cell, they were split into 3 or 4 groups, and were inseminated using a mixed pool of semen from 3 to 4 drakes. The hierarchical mating design commonly used in poultry breeding was therefore replaced with a factorial design. In order to avoid tricky situations in the parentage assignment, such as a difficulty to find which of two brothers is the true sire (conversely which of two sisters is the true dam), groups of parents were built so that no sibs were pooled together. Despite the limited number of markers, assignment success was very high (above 96%) for common and mule offspring. Missing parents led to a reduced success rate (88%) for Muscovy offspring. Therefore, this set of markers offers a possible alternative to individual cages, including in breeding companies which are concerned by the forthcoming EU ban of cages, provided the availability of a tool allowing for the control of laying performances of females.

INTRODUCTION

Que ce soit dans les fermes de sélection ou dans les unités expérimentales œuvrant dans le domaine de la génétique animale, la connaissance du pedigree est une condition indispensable pour la conduite d'un programme de sélection efficace. Pour les espèces avicoles, il est habituel (et souvent suffisant) de relier l'œuf ramassé à la femelle qui l'a pondu. Si le schéma de reproduction est hiérarchique (un mâle est accouplé à plusieurs femelles, mais celles-ci sont inséminées par la semence d'un mâle unique), la connaissance, lors de l'éclosion, de la mère du poussin permet de construire la généalogie des populations. Pour assurer la liaison entre l'œuf et la femelle qui l'a pondu, les solutions les plus courantes sont la cage individuelle ou le nid-trappe. Dans cette dernière situation les femelles sont élevées au sol et ont accès à des nids d'où elles ne peuvent sortir qu'avec l'aide d'un humain qui, à cette occasion, relève l'identification de la femelle et la reporte sur la coquille de l'œuf ramassé. Cette technique nécessite une main d'œuvre fortement disponible pour effectuer une tâche pénible (il faut se pencher pour ramasser les œufs). Par ailleurs elle peut entraîner des comportements de ponte hors du nid, qui représentent alors une perte sèche pour le schéma de sélection, car les œufs non identifiés sont inutilisables.

La cage individuelle permet un ramassage et une identification plus aisés des œufs. Cependant ce système est décrié car il empêche l'expression de comportements sociaux et est donc contraire au bien-être animal. En juin 2021, suite à l'Initiative Citoyenne Européenne (ICE) intitulée « End the cage age » déposée en octobre 2020, la Commission Européenne s'est engagée à présenter une proposition législative pour une entrée en vigueur en 2027.

Depuis les années 1990, dans les populations aquacoles, il est possible d'identifier les parents d'un individu grâce à des marqueurs moléculaires hautement polymorphes (microsatellites), sous réserve que l'animal et ses parents aient été génotypés avec un nombre suffisant de marqueurs (Herbinger, 1995 ; Estoup et al, 1998). A partir de 2008 un panel de microsatellites (Chapuis et al, 2010) a été développé pour les populations canard avec l'objectif de permettre l'assignation à la fois chez les canards communs et les canards de Barbarie. Ses performances ont été décevantes car la vingtaine de marqueurs utilisées, même s'ils répondaient dans les deux populations (dont la divergence remonte à plusieurs millions d'années), n'étaient pas assez polymorphes.

La technologie de référence maintenant utilisée pour l'assignation fait appel aux marqueurs SNP, utilisés dans de nombreuses espèces dont les bovins (Barbotte et al, 2012), et les petits ruminants (Tortereau et al, 2017).

Nous décrivons ici la mise en place opérationnelle d'un jeu de 96 marqueurs SNP (pour les propriétés du panel, se référer à Brard Fudulea et al, 2022) dans 3 populations expérimentales INRAE, de la conception du plan d'accouplement aux résultats de l'assignation et tâchons d'en tirer des enseignements pour une généralisation aux entreprises de sélection avicoles.

1. MATERIELS ET METHODES

Les protocoles expérimentaux et les soins aux animaux ont été réalisés conformément à la directive européenne (2010/63/UE) et à leur déclinaison française. L'expérimentation a été menée à l'UEPFG-INRAE (numéro d'accréditation C40-037-1).

1.1. Schéma de reproduction

Les populations expérimentales PEK77, BAR11 et MUL17 étaient utilisées dans la conduite du protocole DUCKODAC (autorisation ministérielle APAFIS# 2018013116519672).

Suite aux évolutions de législation, la conduite de la dernière phase du protocole a été conditionnée à l'abandon des cages individuelles pour les femelles reproductrices. La surface des cages des mâles a, quant à elle, été agrandie afin de maintenir les mâles dans un hébergement qui permette la manipulation aisée des individus pour le prélèvement de la semence, évite les phénomènes de compétition et de bagarres qui engendrent blessures et souffrances, mais permette l'expression de comportements naturels.

Pour la dernière génération, le schéma a été dimensionné pour un effectif de 36 mâles reproducteurs et 99 femelles en Pékin, 48 mâles et 96 femelles reproductrices en Barbarie.

Afin de respecter la directive 2010/63/UE, le choix a été fait de laisser les canes au sol, afin qu'elles puissent exprimer les comportements sociaux propres à leur espèce dans des cellules (3 par population parentale) de 35 m² (5 m x 7m) avec un sol en caillebotis. Nous avons utilisé des nids individuels fermés (base 30x30 cm, hauteur 38 cm) pour les canes de Barbarie, et des nids collectifs (sans toit) pour les canes Pékin. Cette différence était due au comportement nidificateur particulier des canes de Barbarie, qui privilégient la présence d'un toit (Bilsing, 1991). Les nids étaient régulièrement garnis de copeaux de bois pour favoriser la ponte.

Afin de faciliter les chantiers d'insémination et d'éviter la lecture des bagues alaires pour identifier la cane à inséminer avec une semence donnée, nous sommes passés du schéma d'accouplements hiérarchiques habituel (1 mâle pour k femelles) à un schéma factoriel.

Au sein de chaque cellule, les femelles ont été réparties en 4 groupes de 8 (BAR11) ou 3 groupes de 11 (PEK77), repérés à l'aide d'une bague de couleur différente posée à la patte.

Parallèlement, les mâles ont été répartis en 12 groupes (production des Barbaries) ou en 9 groupes

(production des mulards et Pékins). La semence des mâles de chaque groupe était diluée avec le milieu de survie de semence avicole FertiMAX LC (MIO) et mélangée pour constituer un pool de semence. Tout au long de la période de reproduction, un groupe de femelles a toujours été inséminé avec le pool de semence du même groupe de mâle.

La contribution de chaque mâle au pool de semence était calculée en fonction de la densité optique de chaque éjaculat. Conformément aux pratiques usuelles en multiplication, l'objectif était d'apporter 100 millions de spermatozoïdes par insémination aux femelles Barbarie et 150 millions aux femelles Pékin, avec une contribution équilibrée entre les différents mâles.

1.2. Organisation de l'éclosion

Le principe était de baguer les canetons éclos jusqu'à atteinte de l'effectif visé (190 Barbaries mâles, 250 mulards mâles, et 280 Pékins dont 90 mâles et 190 femelles). L'objectif du programme expérimental DUCKODAC étant l'estimation de paramètres génétiques, nous avons cherché à maximiser la représentation des familles au sein des canetons conservés. Pour ce faire, à l'issue du second mirage, juste avant le passage en éclosoir, les œufs ont été classés dans des paniers en fonction de la cellule et du jour du ramassage. En priorisant les jours où il y a le plus d'œufs on optimise les chances d'avoir des canetons de mères différentes. Lors de l'éclosion nous avons noté la correspondance entre la bague posée sur le caneton et la cellule où fut ramassé l'œuf dont il était éclos.

1.3. Assignment des couples parentaux

L'assignment a été effectuée à l'aide du package R APIS (Griot et al, 2020).

Le principe consiste à calculer pour tous les trios « descendant-père-mère » possibles une probabilité de transmission mendélienne, en fonction des génotypes à tous les marqueurs. Un seuil, qui est fonction du taux de fausses assignments que l'on est prêt à accepter, doit ensuite être calculé afin de décider si le couple parental le plus probable est le vrai couple parental. Ce programme R permet également une construction alternative du pedigree en utilisant la méthode d'exclusion. Dans ce cas il utilise les incohérences mendéliennes pour exclure les couples parentaux (un descendant homozygote XX à un locus donné ne peut avoir un parent YY à ce même locus). Si le panel est suffisamment informatif, les parents potentiels sont progressivement exclus et à la fin il ne reste que le vrai couple parental. Il faut cependant également tenir compte des éventuelles erreurs de génotypage ou des génotypes absents à l'un ou l'autre des marqueurs (nous avons fixé un call rate minimal de 95%, fixant ainsi à 5 le nombre maximal de

marqueurs absents pour un animal, sous peine d'exclusion du processus d'assignment).

La connaissance du plan d'accouplements nous a également permis d'établir une liste exhaustive des couples possibles afin de confronter les résultats du logiciel d'assignment aux éléments factuels à disposition.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Taux d'assignment

Les taux d'assignment à un couple unique sont excellents pour les animaux : 204 sur 207 soit 98% pour les mulards et 261 sur 273 soit 96% pour les Pékins. Pour les canards de Barbarie, le succès était moindre, en chutant à 88% (138 sur 157). Ceci s'explique par l'absence de 16 échantillons parentaux (14 femelles et 2 mâles) dans les ADN traités par le laboratoire. L'utilisation d'une puce supplémentaire pour obtenir le génotype de ces parents et repasser les quelques descendants présentant un call rate insuffisant devrait, espère-t-on, permettre d'atteindre un taux au-delà de 98% de succès sur l'ensemble des 3 populations.

Ceci montre que le principal facteur limitant pour l'assignment est l'absence d'un ou deux parents. Le logiciel a alors « bien réagi » en n'assignant pas les animaux concernés. Une autre cause d'échec est purement technique : il s'agit de la condition imposée sur le call rate. Pour prévenir ces difficultés le plus grand soin doit être apporté à la conservation des échantillons et l'extraction de l'ADN.

2.2. Apports du plan d'accouplement

Dans un cas, en Barbarie, le logiciel ne pouvait statuer entre 2 couples potentiels. Il s'agissait du même mâle associé à deux femelles différentes. La connaissance du plan d'accouplement a permis d'exclure un couple a priori impossible. La prise en compte de cette information nous a également permis de corriger une fausse assignment, en mulards cette fois. Contrairement au verdict du logiciel, le couple parental présentant la plus forte probabilité mendélienne ne pouvait être le bon, compte tenu des accouplements pratiqués et de la cellule de ramassage de l'œuf dont était issu le caneton. Le second couple parental le plus probable (constitué du même mâle et d'une femelle peu apparentée à la première), en revanche satisfaisait toutes les contraintes, tout en présentant également une très forte probabilité mendélienne. La différence de probabilité n'était que de 0,0039 avec le premier couple tandis qu'elle était supérieure à 0,16 avec le couple de rang 3. Par conséquent le couple de rang 2 pour la probabilité mendélienne a été considéré comme le vrai couple. Ceci démontre que les excellentes propriétés du panel, associées à la connaissance du plan d'accouplement sécurisent pleinement la construction du pedigree.

2.3. Conséquences sur la structure de la population

Contrairement au système précédent (cages individuelles et schéma hiérarchique), on ne peut contrôler dès l'éclosion la taille des familles. Cette information n'est obtenue qu'à posteriori. Compte tenu du coût du génotypage, le gestionnaire peut être tenté de n'assigner que juste avant la mise en reproduction, après avoir effectué un tri sur des critères n'utilisant pas le pedigree. Les conséquences au long cours sur la consanguinité des populations doivent être étudiées pour conseiller les entreprises de sélection sur la taille des croisements à pratiquer.

Dans le tableau 1, nous avons rapporté, pour chaque population produite, la proportion des femelles ayant eu au moins un descendant avec un nombre de mâles donné. Auparavant, 100% des femelles étaient croisées avec un seul mâle. Dans ce nouveau système, plus de la moitié des femelles étaient croisées avec au moins deux mâles. Ceci peut ouvrir la voie à l'estimation de paramètres du croisement (dominance), mais uniquement avec une taille de population suffisante.

Dans le tableau 2, nous avons résumé la structure familiale (taille des familles de mères) dans les 3 générations successives de mulards du programme DUCKODAC. Les deux premières (M1, M2) étaient produites avec un système hiérarchique et des cages individuelles. Seul le dernier cheptel (M3) a été obtenu avec des femelles au sol. On constate d'abord que seules 69 femelles ont eu des descendants mâles dans la dernière génération. Nous n'avons pas relevé individuel de ponte permettant de conclure qu'un nombre plus élevé de canes n'a pas pondé, par comparaison avec un hébergement en cage, sachant que seuls les œufs ramassés dans les nids ont été incubés et qu'on ignore la proportion d'œufs pondus au sol. Quoiqu'il en soit, nous avons obtenu moins de canetons qu'attendu. Si la taille moyenne des familles de mères est comparable au cheptel M1 (alors que l'effectif de canards nés en M1 était 20% supérieur à l'effectif en M3), on constate que la variance est nettement plus élevée (3.4 en M3 vs. 0.49 en M1). Nous présumons qu'en l'absence de contrôle, la variance de la taille des familles était susceptible d'augmenter, et nous en avons eu la démonstration.

Par ailleurs 8,2% des individus M3 sont l'unique descendant de leur mère (contre 3.5% en M2 et 1.6% en M1) et 23% sont issus de familles maternelles d'au plus deux représentants, ce qui peut poser des problèmes pour l'estimation des paramètres génétiques.

CONCLUSION

Grâce à l'utilisation d'un panel de taille réduite (96 marqueurs pour une technologie KASPar) nous sommes parvenus à reconstituer le pedigree de nos populations expérimentales.

En cas d'interdiction des cages dans l'Union Européenne, ce panel pourra être utilisé dans les populations commerciales où la sélection génomique (qui repose sur des génotypes haut débit plus coûteux et dont l'assignation de parenté est un sous-produit) n'est pas pratiquée. Il peut également être utilisé pour la gestion de ressources zoogénétiques telles que les races locales, dans le cadre de programmes financés par les collectivités territoriales. Des calculs préliminaires de la probabilité d'exclusion (un des indicateurs de la qualité du panel) ont été conduits dans quelques races locales et ont donné des résultats encourageants qui restent toutefois à confirmer.

Nous avons montré que la connaissance du plan d'accouplement, bien que non strictement nécessaire, compte tenu des qualités intrinsèques du panel, est un outil particulièrement utile pour pleinement sécuriser la construction du pedigree, surtout dans des populations dans lesquelles les reproducteurs sont apparentés.

Un travail de modélisation est nécessaire pour dimensionner au mieux les plans d'accouplements en tenant compte des modifications dans la structure des populations, et identifier les risques en termes de gestion de la diversité qui pourraient émerger dans ce type de système.

Enfin il convient de rappeler que l'abandon de la cage pour les femelles à l'étape de sélection, non seulement nécessite un outil pour suivre la généalogie (ce qui semble être acquis ici) mais requiert également un dispositif permettant de contrôler la ponte des femelles, qui est une donnée essentielle dans de nombreuses populations. Comme l'ont montré des travaux récemment conduits chez la poule pondeuse (Becot et al, 2022), la mise au point de nids électroniques sera de nature à mieux caractériser les comportements de ponte et, *in fine*, améliorer la productivité des canes en reproduction au sol.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Département Génétique Animale INRAE pour son soutien au programme ASPARCAN dont est issu ce panel.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barbotte L., Genestout L, Fritz S., Chantry-Darmon C., Boichard D., 2012, 19èmes Renc. Rech. Ruminants, p 92
- Bécot L., Bédère N., Coton J., Burlot T. Le Roy P., 2022 ; 14èmes JRAPFG, Tours, 9 et 10 mars 2022
- Brard-Fudulea S., Chapuis H., Leroux S., Rouger R., Teissier M., 2022, 14èmes JRAPFG, Tours, 9 et 10 mars 2022
- Bilsing A, 1991, KTBL-Schrift, Kuratorium fuer Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft
- Chapuis H., Faugeras R., Rossignol M.N., Feve K., Genestout L., Chantry-Darmon C., Guemene D., 2010. 9èmes Journ. Rech. Palmipèdes à Foie Gras, Bordeaux, France, 1-4.
- Estoup, A., Gharbi, K., SanCristobal, M., Chevalet, C., Haffray, P., Guyomard, R., 1998, Can. J. Fish. Aquat. Sci., (55), 715–725.
- Griot R., Allal F., Brard-Fuduléa S., Morvezen R., Haffray P., Phocas F, Vandeputte M., 2020, Mol. Ecol. Resour.,(20), 579–590
- Herbinger, C.M., 1995, Aquaculture, (137), 245–256.
- Tortereau F., Moreno C., Tosser-Klopp G., Servin B., Raoul J., 2017, BMC Genetics, 18 :50

Tableau 1. Proportion de femelles ayant eu des descendants génotypés dans chaque population avec exactement n mâles depuis le passage du schéma hiérarchique au schéma factoriel.

$n =$ nombre de mâles	BAR11	MUL17	PEK77
4		33%	12%
3	16%	41%	30%
2	36%	20%	27%
1	48%	6%	30%

Tableau 2. Structure familiale des 3 cheptels mulards successifs du programme DUCKODAC. Nanim = effectif mis en place. Nmères = nombre de mères ayant effectivement contribué à la génération. La taille de famille de mère ne concerne que les descendants mâles, élevés dans le cadre du programme.

cheptel	N anim	N mères	taille famille de mère									MOY	VAR
			1	2	3	4	5	6	7	8	9		
M1	247	87	4	17	55	11						2,83	0,49
M2	282	84	10	15	22	18	14	2	2	1		3,35	2,33
M3	204	69	18	14	15	11	4	2	4		1	2,96	3,40