

Evaluation génomique du stress chez le cheval

Par :

- A. Foury¹, L. Lansade², M. Valençon², C. Neveux², F. Lévy² et M.P. Moisan¹
- ¹ NutriNeuro, UMR 1286, INRA, Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux, France
- ² UMR PRC 7247, INRA, CNRS, Université F. Rabelais, IFCE, 37380 Nouzilly, France

Résumé

Grâce au séquençage en 2009 du génome équin, il est désormais possible de réaliser des analyses génomiques chez le cheval. Nous proposons donc de mettre en place l'évaluation du stress chronique chez les équidés par l'approche transcriptomique. Deux lots de poulains de 1 an ont été maintenus en conditions sociales et sensorielles appauvries (n=9) ou enrichies (n=10). L'analyse transcriptomique a été réalisée à partir d'une prise de sang à la fin des 12 semaines d'expérimentation. Afin de déterminer les voies de signalisation moléculaires modifiées entre les 2 groupes, les résultats ont été analysés avec le logiciel TELiS. L'analyse montre une activation des facteurs CREB, ATF et GATA en conditions appauvries qui pourrait signer l'état de stress de ces animaux puisque la même voie de signalisation a été identifiée dans des conditions socio-environnementales d'adversité chez l'homme. Cette analyse transcriptomique a permis de fournir une signature biologique des conditions de vie des poulains complétant les analyses comportementales et aidant à évaluer le risque de maladie.

Mots clés : génomique, cheval, stress

Summary

Thanks to the sequencing of the equine genome in 2009, it is now possible to perform genomic analyses in the horse. Thus, we propose to assess chronic stress by a transcriptomic approach. Two groups of yearlings were maintained in impoverished (n=9) or enriched (n=10) social and sensory conditions. The transcriptomic analysis was performed in blood cells after 12 weeks of experimentation. Results were analyzed with the program TELiS in order to identify the biological pathways differentiating the 2 groups. The analysis showed an up-regulation of the factors CREB, ATF and GATA in impoverished conditions that could sign the distress of those animals since the same molecular pathway has been detected in socio-environmental adversity in humans. This transcriptomic analysis provides a biological signature of yearling welfare that completes the behavioral analyses and help to evaluate disease risk.

Key-words: genomic, horse, stress

Introduction

Les approches pour mesurer le stress chez l'animal d'élevage ont toujours été insatisfaisantes car basées sur la mesure dans le sang ou la salive, d'hormones (cortisol, catécholamines) ou de facteurs d'inflammation (protéine C activée, Interleukine 6) qui fluctuent au cours de la journée et rapidement après un stress aigu (Boissy *et al.*, 2007). Grâce aux outils de la génomique, il est maintenant possible de définir une signature biologique du stress chronique subi par les individus qui est stable car l'activation des gènes n'est pas fluctuante comme les hormones. De plus, elle est globale car tous les gènes exprimés dans ces cellules sont analysés en même temps (Cole, 2010). Grâce au séquençage en 2009 du génome du cheval, nous proposons de mettre en place l'évaluation du stress chronique chez les équidés par l'approche transcriptomique.

1. Matériel et méthodes

1.1. Animaux

Cette étude a été réalisée sur 19 poulains (âge : 10 ± 1 mois) de race Welsh à partir d'une expérimentation menée à l'INRA de Nouzilly qui visait à examiner l'influence des conditions de vie des chevaux sur le bien-être et leur réactivité émotionnelle et dont les résultats comportementaux ont été présentés en 2011 (Lansade *et al.*, 2011). L'expérience a duré 12 semaines tout au long desquelles les poulains sont répartis en 2 groupes : le groupe appauvri (N = 9, 3 femelles et 6 mâles) et le groupe enrichi (N = 10, 6 femelles et 4 mâles). Les poulains du groupe appauvri sont hébergés individuellement dans des boxes de 1,6 x 3,5m et sortent 3 fois par semaine dans des paddocks individuels en terre pendant 1 heure. Ils sont nourris 3 fois par jour (granulés matin et soir et foin le midi). En conditions enrichies, les poulains sont hébergés individuellement dans des boxes de 4 x 5m de 9h à 16h30, du lundi au vendredi. Le reste du temps, ils sont au pré. Ils reçoivent 3 repas par jour, variés et aromatisés. Dans leur box, ils sont également exposés à des stimulations tactiles, visuelles, olfactives et auditives.

1.2. Prélèvements sanguins

Après les 12 semaines d'expérimentation, 5ml de sang sont prélevés à la veine jugulaire dans des tubes sous vides qui contiennent un réactif stabilisant immédiatement l'ARN intracellulaire (système PAXgene blood RNA). Les échantillons sont conservés à température ambiante pendant 8 heures en accord avec la procédure afin de stabiliser l'ARN, puis à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ARN. L'ARN total est extrait avec le kit PAXgene blood RNA selon le protocole du fabricant.

1.3. Analyses transcriptomiques, statistiques et bioinformatiques

L'analyse de l'expression des gènes a été réalisée à partir d'une puce Agilent 44K incluant 43 803 sondes d'ADNc équin. Nous avons utilisé la puce développée chez le cheval par Agilent, enrichie avec 384 sondes supplémentaires par l'équipe d'Eric Barrey (Horse-Genopole Microarray, Agilent Technologies). Chaque échantillon (ADNc d'1 poulain) a été hybridé sur la puce conformément au protocole One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Agilent Technologies). L'annotation de la puce par Agilent étant incomplète, nous l'avons augmenté grâce à l'annotation automatique fournie par le site SigReannot-mart puis par analyses Blast jusqu'à obtenir 72% des sondes annotées, ce qui représente 14 944 gènes uniques. Nous avons ensuite identifié les gènes différentiellement exprimés entre les 2 groupes grâce à un test de Student entre les moyennes des niveaux d'expression calculées pour les 2 groupes expérimentaux (BRB ArrayTools).

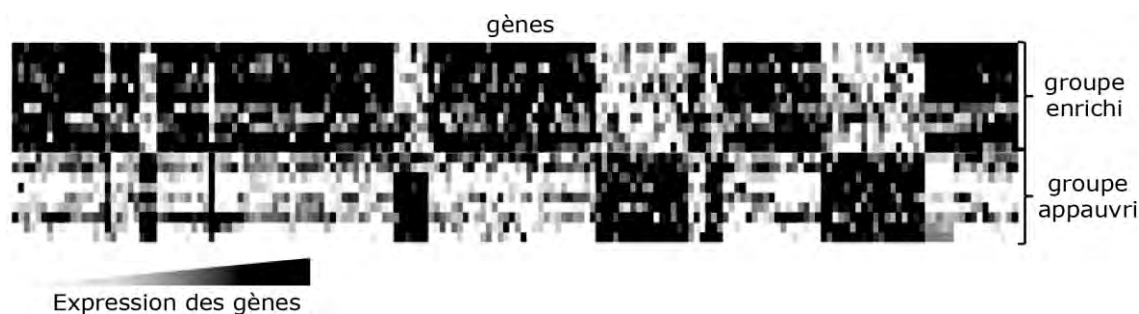
Afin d'identifier les voies de signalisation moléculaire qui contrôlent en amont la transcription et qui modifient ainsi l'expression des gènes, nous avons utilisé le logiciel TELiS (Cole *et al.*, 2005). Ce logiciel permet de déterminer la prévalence de motifs de liaison à des facteurs de transcription (transcription factor binding motifs, TFBMs) dans les promoteurs d'une liste de gènes. Il n'existe pas à l'heure actuelle de base de données contenant les motifs de liaison à des facteurs de transcription chez le cheval. Les génomes humain et équin présentant de très nombreuses homologues (Wade *et al.*, 2009), nous avons donc utilisé les TFBMs définis à partir des bases de données JASPAR et TRANSFAC disponibles chez l'homme et chez la souris, et analysant respectivement 109 et 192 facteurs de transcription. L'analyse utilisée est appelée « Transcriptional Shift Analysis » qui compare 2 analyses. La première a permis d'identifier la prévalence de TFBMs dans les promoteurs des gènes activés dans le groupe appauvri *versus* tous les gènes différentiellement exprimés dans les 2 groupes expérimentaux. La deuxième analyse a permis d'identifier la prévalence de TFBMs dans les promoteurs des gènes activés dans le groupe enrichi *versus* tous les gènes différentiellement exprimés dans les 2 groupes expérimentaux.

2. Résultats

2.1. Expression des gènes

La figure I est une représentation de l'expression différentielle des gènes dans les 2 groupes expérimentaux.

Figure I : Expression différentielle des gènes dans les groupes appauvri et enrichi
Figure I: Differential gene expression in impoverished and enriched groups



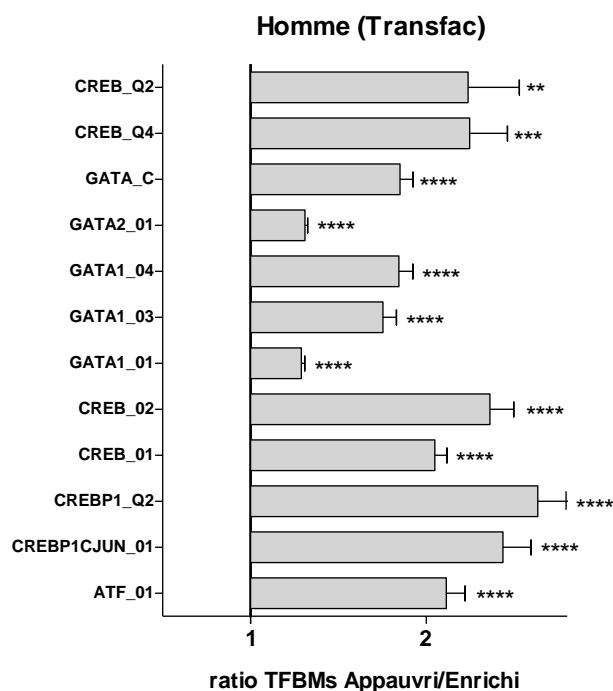
Avec une valeur de $p < 0,001$ pour le test de Student, nous obtenons 174 gènes différentiellement exprimés (gènes activés : appauvris, $n=63$; enrichis, $n=111$).

2.2. TELiS

L'analyse « Transcriptional Shift Analysis » a été réalisée avec les bases de données JASPAR et TRANSFAC, chez l'homme et la souris. Les résultats de ces 4 analyses étant similaires, seuls les résultats de l'analyse réalisée chez l'homme avec la base de données TRANSFAC sont représentés dans la figure II.

Figure II : Ratio de la prévalence des TFBMs (base de données TRANSFAC chez l'homme) dans les gènes du groupe appauvri sur la prévalence des TFBMs dans les gènes du groupe enrichi

Figure II: Ratio of the prevalence of TFBMs (TRANSFAC database in human) in the impoverished group genes on the prevalence of the TFBMs in the enriched group genes



**** $P < 0,0001$; *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; P correspond à la valeur de la probabilité obtenue par un z-test

Le principal résultat stable entre les 4 analyses de TFbMs, est l'activation des facteurs CREB, ATF et GATA dans le groupe appauvri. Un récent article de Cole *et al.* (2010) montre qu'une des voies de signalisation moléculaire associée à un stress social est une activation β -adrénergique de GATA 1. Or, les signaux adrénérergiques utilisent les facteurs CREB et ATF pour activer le transcriptome des cellules sanguines. L'activation des facteurs de transcription GATA, CREB et ATF pourrait ainsi constituer une signature biologique de la détresse de ces poulains liée à leur isolement social.

Conclusion

Cette étude a déjà montré que les conditions de vie des chevaux ont une forte influence sur leur comportement : en effet, l'émotivité des poulains est augmentée en conditions appauvries et complique les manipulations (Lansade *et al.*, 2011). L'approche génomique montre que les conditions de vie modifient également l'expression des gènes, et en particulier l'expression des gènes cibles des facteurs GATA, lui-même activé par le système β adrénérergique via CREB et ATF. Le risque de maladie associée à l'activation de GATA est une augmentation de certains facteurs de l'inflammation (Cole *et al.*, 2010). Ces résultats préliminaires sont donc à compléter par l'analyse de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation (IL6, CRP, TNF α , etc.) par qPCR, et grâce à d'autres analyses bioinformatiques comme l'identification de réseaux de gènes co-régulés.

Références

Boissy, A., Manteuffel, G., Jensen, M.B., Moe, R.O., Spruijt, B., Keeling, L.J., Winckler, C., Forkman, B., Dimitrov, I., Langbein, J., Bakken, M., Veissier, I., and Aubert, A., 2007. Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiology & Behavior* 92, 375-397.

Cole, S.W., Yan, W., Galic, Z., Arevalo, J. and Zack, J.A., 2005. Expression-based monitoring of transcription factor activity: the TELIS database. *Bioinformatics* 21, 803-810.

Cole, S.W., 2010. Elevating the perspective on human stress genomics. *Psychoneuroendocrinology* 35, 955-962.

Cole, S.W., Arevalo, J.M.G., Takahashi, R., Sloan, E.K., Lutgendorf, S.K., Sood, A.K., Sheridan, J.F. and Seeman, T.E., 2010. Computational identification of gene-social environment interaction at the human IL6 locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 5681-5686.

Lansade, L., Neveux, C., Valençon, M., Moussu, C., Yvon, J.M., Pasquier, F. and Levy, F., 2011. Enrichir l'environnement des chevaux permet d'améliorer leur bien-être, de diminuer leur émotivité et d'augmenter la sécurité des manipulateurs. *37^{ème} Journée de la Recherche Equine*, 33-41.

Wade, C.M., Giulotto, E., Sigurdsson, S., Zoli, M., Gnerre, S., Imsland, F., Lear, T.L., Adelson, D.L., Bailey, E., Bellone, R.R., Blocker, H., Distl, O., Edgar, R.C., Garber, M., Leeb, T., Mauceli, E., MacLeod, J.N., Penedo, M.C., Raison, J.M., Sharpe, T., Vogel, J., Andersson, L., Antczak, D.F., Biagi, T., Binns, M.M., Chowdhary, B.P., Coleman, S.J., Della Valle, G., Fryc, S., Guerin, G., Hasegawa, T., Hill, E.W., Jurka, J., Kiialainen, A., Lindgren, G., Liu, J., Magnani, E., Mickelson, J.R., Murray, J., Nergadze, S.G., Onofrio, R., Pedroni, S., Piras, M.F., Raudsepp, T., Rocchi, M., Roed, K.H., Ryder, O.A., Searle, S., Skow, L., Swinburne, J.E., Syvanen, A.C., Tozaki, T., Valberg, S.J., Vaudin, M., White, J.R., Zody, M.C., Lander, E.S. and Lindblad-Toh, K., 2009. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* 326, 865-867.