

## Etude de la réponse immunitaire des porcs français de race Large White et analyse conjointe du transcriptome des leucocytes du sang périphérique

**Présenté par : Claire ROGEL-GAILLARD**

Courriel : claire.rogel-gaillard@jouy.inra.fr

**IMMOPIG** – Etude de la réponse immunitaire des porcs français de race Large White et analyse conjointe du transcriptome des leucocytes du sang périphérique (2007-2009)  
Claire ROGEL-GAILLARD<sup>1</sup>, Laurence FLORI<sup>1</sup>, Yu GAO<sup>1</sup>, Jean-Pierre BIDANEL<sup>2</sup>, Isabelle OSWALD<sup>3</sup>, François LEFEVRE<sup>4</sup>, Marcel BOUFFAUD<sup>5</sup>, Yvon BILLON<sup>6</sup>, Marie-José MERCAT<sup>7</sup>

*Projet soutenu dans le cadre de l'édition 2006 de l'appel à projets GENANIMAL*

Projet co-financé par BIOPORC (apport en nature).

### *Unités et organismes concernés*

<sup>1</sup>INRA CEA, UMR 314 Laboratoire de Radiobiologie et Etude du Génome (LREG, coordination du projet)

<sup>2</sup>INRA, UR337 Station de Génétique Quantitative et Appliquées (SGQA)

<sup>3</sup>INRA, UR 66 Unité de Pharmacologie-Toxicologie (LPT)

<sup>4</sup>INRA, UR 892 Laboratoire de Virologie et Immunologie Moléculaires (VIM)

<sup>5</sup>INRA, UE450, Unité expérimentale de testage de porcs, Le Rheu

<sup>6</sup>INRA, UE967, Génétique Expérimentale en Productions Animales, Le Magneraud

<sup>7</sup>BIOPORC, La Motte au Vicomte

**Mots clefs** : génomique, réponse immunitaire, porc, phénotype, transcriptome, résistance aux maladies

### Résumé

L'espèce porcine a bénéficié depuis 20 ans d'un programme de sélection génétique qui a ciblé des caractères de production et cette sélection, accompagnée du respect de règles sanitaires strictes incluant vaccination et antibiothérapie préventive, a permis une nette amélioration des performances zootechniques. Or, dans une perspective de respect accru du bien-être animal et de la sécurité du consommateur, les normes européennes visent une réduction des mesures prophylactiques médicamenteuses. Dans ce contexte, il devient important d'introduire des critères liés à la santé dans les schémas de sélection.

Les êtres vivants sont soumis à des agressions extérieures dues à des agents pathogènes, des polluants ou toxines, des conditions climatiques extrêmes. La réponse immunitaire (RI) est sollicitée lors de certaines de ces agressions. La santé des individus dépend de cette réponse dont la part génétique est encore mal connue. Nous avons engagé une étude qui vise à caractériser la RI chez le porc par une approche génétique et fonctionnelle. L'approche génétique inclut la mesure de nombreux paramètres de la RI dans des populations dont la structure familiale permet de calculer l'héritabilité des phénotypes analysés. L'approche fonctionnelle est basée sur l'analyse du transcriptome des leucocytes du sang périphérique.

Deux groupes de porcs Large White sont inclus dans l'étude: une population en contrôle de performances dans la station de testage du Rheu (400 animaux, période 2007-2008) et des familles nées et élevées dans le domaine expérimental du Magneraud (200 animaux, période 2008-2009).

### Principaux résultats obtenus et applications envisageables

Dans le protocole expérimental mis en place, les animaux sont vaccinés contre *Mycoplasma Hyopneumoniae* à 36 jours et du sang est prélevé trois semaines plus tard. Un hémogramme complété par une analyse des sous-populations sanguines par cytométrie en flux (lymphocytes T $\alpha\beta$  CD4/CD8, lymphocytes B, lymphocytes T $\gamma\delta$ , monocytes, cellules natural killer) est réalisé le lendemain des prélèvements. La RI innée est caractérisée par des mesures de phagocytose, le dosage de cinq cytokines (IL1B, IL6, IL8, TNF, IL12) à partir du surnageant de culture de sang total

stimulé ou non, le dosage de deux protéines sériques de la phase inflammatoire (protéine C réactive, haptoglobine) et une mesure de l'activité interféron produite par du sang total ou des leucocytes stimulés ou non par un antigène viral. La RI adaptative est analysée par le dosage des immunoglobulines, le dosage de quatre cytokines de régulation (IFN $\gamma$ , IL2, IL4 et IL10) produites par du sang total stimulé, ainsi que la quantification de la prolifération cellulaire après activation mitogénique. L'ensemble des paramètres est enregistré pour chaque animal. L'ARN est extrait à partir de prélèvements de sang total.

Une première série de résultats concerne les mesures de la RI sur 397 animaux élevés au Rheu, les dernières mesures sur environ 36 animaux étant prévues en novembre 2008. Les analyses génétiques préliminaires démontrent une part héritable non négligeable d'une partie des caractères étudiés. De la semence de 29 verrats dont les descendants ont été contrôlés au Rheu en 2007-2008 a été congelée, afin de produire 58 familles (croisement de deux femelles par verroat) qui constitueront une génération G0 sur laquelle les mêmes mesures de la RI seront réalisées. Les prélèvements seront réalisés entre décembre 2008 et février 2009.

Dans le courant du projet, nous avons produit et validé une puce à ADN adaptée à l'étude de la RI chez le porc. Cette puce a été conçue afin de pallier l'absence actuelle de puces génériques couvrant l'ensemble des informations disponibles. Nous avons défini un groupe d'oligonucléotides noté SLA-RI (3773 sondes pour 3104 gènes) qui spécifie les gènes codant des protéines et les ARN non codants annotés dans la région du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), ainsi que les gènes hors CMH, répertoriés comme impliqués dans la RI. Ce set est venu enrichir un set générique de 13K oligonucléotides (Qiagen-NRSP8-13K). Nous disposons ainsi d'un outil générique spécifiquement enrichi pour étudier la RI chez le porc (puce SLA-RI/NRSP8-13K). Cette puce a été validée par l'étude du transcriptome de leucocytes stimulés soit par du LPS, soit par un mélange de phorbol myristate acetate (PMA) et ionomycine. Les résultats démontrent que les modifications du transcriptome sont spécifiques à chaque stimulation et l'exploitation des données nous permet d'identifier assez finement les voies qui sont modifiées. Ainsi, dans le cas de la stimulation par le mélange PMA/ionomycine, la voie de présentation des antigènes par les molécules de classe I est significativement modifiée et la densité en gènes de la puce pour la RI nous a permis de mettre en évidence que, dans cette cascade, les gènes impliqués dans le processing des peptides sont surexprimés alors que les gènes de classe I sont réprimés. Les résultats obtenus confirment que la puce SLA-RI/NRSP8-13K sera d'un intérêt majeur pour les études du transcriptome qui débiteront dans le courant du semestre 4. Cette puce est produite par le CRB GADIE.

## Perspectives

D'ici février 2009, nous aurons collecté les phénotypes de la RI pour plus de 400 animaux élevés au Rheu et 200 animaux nés et élevés au Magneraud. Les analyses génétiques de la RI obtenues avec les animaux du Rheu seront confrontées à celles obtenues avec les animaux du Magneraud. Nous aurons ainsi la possibilité de tester les interactions entre génotype et environnement car, comme indiqué précédemment, les pères seront les mêmes pour les deux groupes d'animaux étudiés. A notre connaissance, il s'agit de la première étude à grande échelle qui collecte des données aussi nombreuses sur la RI innée et acquise, en incluant un protocole rigoureux de vaccination. Dans le courant du projet, les mesures relatives aux niveaux de RI seront confrontées aux données zootechniques disponibles.

Le coût de la puce SLA-RI/NRSP8-13K nous permet d'envisager l'étude du transcriptome de 200 individus qui seront sélectionnés suite aux analyses génétiques des deux groupes d'animaux. Dans le cadre du consortium de séquençage du porc, une puce de génotypage de 50K SNP sera disponible en 2009 pour l'espèce porcine. Nous projetons de génotyper l'ensemble des animaux du Rheu et du Magneraud avec cette puce, en relation avec le programme DELISUS (projet Genanimal 2008-2011 coordonné par Denis Milan, Toulouse). Le financement pour réaliser le génotypage de tous les animaux est encore à compléter. Les données attendues nous permettront de rechercher des QTL en lien avec des informations transcriptome.

Les résultats obtenus seront exploités pour démarrer une expérience de sélection divergente sur la RI à partir de la génération G0 du Magneraud. Les familles divergentes produites seront précieuses pour affiner la caractérisation de la RI chez le porc, définir des critères et index de sélection et engager des travaux ciblant la résistance à certaines maladies à définir.

**Publications issues des travaux soutenus dans le cadre du projet ANR**

Gao Y, Flori L, Stam M, Hugot K, Lefèvre F, Oswald I, Rogel-Gaillard C. The SLA-immune long oligonucleotide set: a new tool for functional studies of immunity and disease resistance in pig. ISAG meeting, Amsterdam 20-24 Juillet 2008 (communication orale), article en préparation pour BMC Genomics.