



HAL
open science

Étude génétique du stress de contention chez le porc

Marion Canaple

► **To cite this version:**

Marion Canaple. Étude génétique du stress de contention chez le porc. Sciences agricoles. 2014.
dumas-01135559

HAL Id: dumas-01135559

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01135559>

Submitted on 25 Mar 2015

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.

**AGROCAMPUS OUEST****CFR de Rennes**

65 rue de Saint-Brieuc

CS 84215

35042 Rennes Cedex

UNIVERSITE DE RENNES 1

2, rue du Thabor

CS 46510

35 065 Rennes Cedex

INRA Unité GenPhySe

24 chemin de Borde-Rouge

Auzeville CS 52627

31326 Castanet-Tolosan Cedex

Mémoire de Fin d'Études**Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage**

Année universitaire : 2013-2014

Spécialité : Science de l'Animal pour l'Élevage de Demain (SAED)

Spécialisation ou option : Parcours Recherche

Etude génétique du stress de contention chez le porc

Par : Marion CANAPLE

Volet à renseigner par l'enseignant responsable de l'option/spécialisation ou son représentant

Date : / / Signature

Bon pour dépôt (version définitive) Autorisation de diffusion : Oui Non **Devant le jury :**

Soutenu à Rennes, le : 20/06/2014

Sous la présidence de : Lucile Montagne

Maître de stage : Pierre Mormède

Enseignant référent : Vanessa Lollivier

Autres membres du jury : Elodie Merlot (chercheur, INRA), François Ferrière (enseignant-chercheur, université de Rennes 1), Emmanuelle Moreau (enseignant-chercheur, ONIRIS).

"Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST".

Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

Cadre lié à la confidentialité :

Aucune confidentialité ne sera prise en compte si la durée n'en est pas précisée.

Préciser les limites de la confidentialité ⁽²⁾ :

➤ Confidentialité absolue : oui non

(ni consultation, ni prêt)

Si oui 1 an 5 ans 10 ans

Le maître de stage ⁽⁴⁾,

Cadre lié à la diffusion du mémoire :

A l'issue de la période de confidentialité et/ou si le mémoire est validé diffusable sur la page de couverture, il sera diffusé sur les bases de données documentaires nationales et internationales selon les règles définies ci-dessous :

Diffusion de la version numérique **du mémoire** : oui non

Référence bibliographique diffusable ⁽³⁾ : oui non

Résumé diffusable : oui non

Mémoire papier consultable sur place : oui non

Reproduction autorisée du mémoire : oui non

Prêt autorisé du mémoire papier : oui non

.....
Diffusion de la version numérique **du résumé** : oui non

☞ Si oui, l'auteur ⁽¹⁾ complète l'autorisation suivante :

Je soussignée Marion Canaple, propriétaire des droits de reproduction dudit résumé, autorise toutes les sources bibliographiques à le signaler et le publier.

Date :

Signature :

Rennes, le

L'auteur ⁽¹⁾,

L'enseignant référent
ou son représentant

(1) auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(2) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(3) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option)) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé.

(4) Signature et cachet de l'organisme

Remerciements

Je tiens à remercier **Pierre Mormède** pour m'avoir permis de réaliser ce stage qui s'est avéré très instructif et formateur. Merci de m'avoir laissée participer aux expérimentations en élevage du test de sélection. Cette expérience fut particulièrement intéressante.

Je remercie aussi **Elena Terenina**, **Yann Labrune** et **Catherine Larzul** pour leur soutien technique dans la réalisation et l'interprétation de l'analyse d'association. Sans leurs aides, cette étude n'aurait jamais été possible.

Je souhaite également remercier **Laure Gress** pour son accueil, son soutien et pour m'avoir formée au protocole d'extraction des catécholamines plasmatiques et à l'utilisation de l'HPLC.

Merci à l'HPLC d'être une machine aussi sensible, ses petits caprices m'ont permis de mieux la connaître.

Enfin, il ne faut pas oublier les êtres sans qui tout ceci n'aurait jamais pu être possible. Merci aux animaux d'avoir supporté tout ce qu'ils ont subi.

Table des matières

| | |
|---|-----|
| Remerciements | I |
| Table des matières | II |
| Liste des abréviations | III |
| Liste des annexes..... | IV |
| Liste des illustrations..... | V |
| Introduction | 1 |
| Le système nerveux autonome : activation, conséquences sur les tissus cibles et variabilité génétique | 3 |
| La libération des catécholamines par le système nerveux autonome..... | 3 |
| La modulation de l'activité du système nerveux autonome..... | 3 |
| Les conséquences de l'activation du système nerveux autonome sur les tissus cibles | 4 |
| Les variabilités génétiques des réponses au stress du système nerveux autonome..... | 4 |
| Matériel et méthode..... | 5 |
| Les animaux | 5 |
| Le stress de contention et l'échantillonnage..... | 6 |
| L'extraction des catécholamines plasmatiques | 6 |
| La chromatographie liquide à haute pression avec détection électrochimique | 7 |
| Les autres données du stress de contention | 10 |
| L'analyse statistique | 11 |
| Résultats et discussions | 14 |
| La quantification des catécholamines plasmatiques..... | 14 |
| Les relations entre les phénotypes étudiés | 15 |
| Le contrôle génétique des phénotypes..... | 16 |
| Conclusions | 19 |
| Perspectives | 20 |
| Bibliographie..... | 21 |
| Annexes | 26 |

Liste des abréviations

| | |
|-----------|---|
| A : | Adrénaline |
| ACTH : | AdrenoCorticoTropin Hormone |
| ADN : | Acide DésoxyriboNucléique |
| ADP : | Adénosine Diphosphate |
| AGLP : | Acides Gras Libres dans le Plasma |
| ARNm : | Acides RiboNucléiques Messagers |
| ATP : | Adénosine TriPhosphate |
| bpm : | battements par minute |
| CBG : | Corticosteroid Binding Globulin ou transcortine |
| CK: | Créatine Kinase |
| cM : | centiMorgan |
| CRH : | Corticotropin Releasing Hormone |
| DBH: | Dopamine β Hydroxylase |
| DHBA : | DiHydroxyBenzylAmine |
| DOPA: | Dihydroxy-Phénylalanine |
| DPBEA : | Diphényl Borate Ethanolamine |
| DRD3: | Récepteur à la Dopamine D3 |
| G0: | Population initiale (animaux non sélectionnés) |
| G1: | Animaux de la 1 ^{ère} génération |
| G2 : | Animaux de la 2 ^{ème} génération |
| G3 : | Animaux de la 3 ^{ème} génération |
| GRAMMAR : | Genome-wide Rapid Association using Mixed Model and Regression |
| GWAS: | Analyse d'association à l'échelle du génome (Genome Wide Association Study) |
| FASTA: | FAMily-based Score Test for Association |
| H : | Hauteur des pics |
| HPLC : | Chromatographie Liquide à Haute Pression |
| IBS : | Identity By State |
| INRA : | Institut National de Recherche Agronomique |
| IU : | Unité Internationale |
| LPS : | Lipopolysaccharide |
| NA : | Noradrénaline |
| NAD : | Nicotinamide Adénine Dinucléotide |
| NADP : | Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate |
| NCBI : | National Center for Biotechnology Information |
| OSA : | Octane Sulfonic Acid |
| p : | probabilité |
| PC : | Pool de catécholamines |
| PC3: | Troisième dilution du pool de catécholamines |
| PC3ex : | PC3 extrait |
| pg : | picogrammes |
| PNMT : | Phényléthanolamine N-MéthylTransférase |
| QTL : | Locus à effet quantitatif (Quantitative Trait Locus) |
| SNP : | Polymorphisme mononucléotidiques (Single Nucleotide Polymorphism) |
| ToABr : | Tetra N Octyl Ammonium Bromide |
| μ L: | Microlitre |

Liste des annexes

- Annexe 1 : Protocole de dosage des catécholamines plasmatiques par chromatographie
liquide haute pression p27
- Annexe 2 : Script en langage R mis en place pour réaliser l'analyse d'association p32
- Annexe 3 : Les graphiques des corrélations entre les phénotypes retenus p36

Liste des illustrations

Liste des tableaux :

| | | |
|-------------|---|-----|
| Tableau 1 : | Phénotypage et génotypage des animaux selon leur génération | p1 |
| Tableau 2 : | Phénotypes étudiés et leur normalisation | p11 |
| Tableau 3 : | Localisation des gènes et des marqueurs SNP étudiés | p13 |
| Tableau 4 : | Marqueurs SNP étudiés | p13 |
| Tableau 5 : | Corrélations de Pearson calculées entre les phénotypes avant et après le stress | p15 |
| Tableau 6 : | Localisation des marqueurs SNP détectés par l'analyse d'association à l'échelle du génome et fonctions des gènes associés | p16 |
| Tableau 7 : | Effets des allèles aux marqueurs sur la valeur du phénotype | p17 |

Liste des figures :

| | | |
|-------------|---|-----|
| Figure 1 : | Molécules de noradrénaline, d'adrénaline et de dihydroxybenzylamine et leur partie commune | p2 |
| Figure 2 : | Activation du système nerveux autonome et libération des catécholamines suite à un stress | p3 |
| Figure 3 : | Bilan des effets des catécholamines | p4 |
| Figure 4 : | Schéma de sélection divergente mis en place lors du projet SUSoSTRESS | p5 |
| Figure 5 : | Porcelet soumis au stress de contention | p6 |
| Figure 6 : | Réactions chimiques impliquées dans l'extraction des catécholamines | p6 |
| Figure 7 : | Appareil de chromatographie liquide haute pression | p7 |
| Figure 8 : | Chromatogrammes obtenus avec un pool de catécholamines et un plasma | p8 |
| Figure 9 : | Evolution du temps de rétention des molécules selon la concentration de méthanol ajoutée dans la phase mobile | p9 |
| Figure 10 : | Les étapes de l'analyse des données de cardiologie | p10 |
| Figure 11 : | Evolution des concentrations des phénotypes de biologie clinique au cours de la contrainte | p11 |
| Figure 12 : | Réponses du système nerveux autonome au stress de contrainte | p14 |
| Figure 13 : | Cercle des corrélations | p15 |
| Figure 14 : | Représentation graphique de l'apparement entre les individus | p16 |
| Figure 15 : | Détection d'un signal sur le Manhattan Plot associé à la concentration de glucose à 24 heures | p16 |
| Figure 16 : | Cycle de Lardy : lien entre le glucose et l'enzyme malique | p16 |
| Figure 17 : | Bilan des liaisons et corrélations entre les phénotypes et de leurs associations avec le système nerveux autonome | p19 |

Tableau 1 : Phénotypage et génotypage des animaux selon leur génération

Les parties grisées correspondent aux analyses faites sur les animaux d'une génération donnée. **G0** : animaux de la génération 0, **G1** : animaux de la génération 1, **G2** : animaux de la génération 2, **G3** : animaux de la génération 3, **ACTH** : adrenocorticotropin hormone, **AGLP** : acides gras libres dans le plasma, **CBG** : corticostéroïd binding globulin, **LPS** : lipopolysaccharides, **n** : nombre d'animaux utilisés.

| | G0 | G1 | G2 | G3 |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Génotypage et phénotypage | | | | |
| Mesures zootechniques | | | | |
| Etude des réponses de stress | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| Biologie clinique du stress | | | | |
| | | | | |
| Etude du comportement | | | | |
| | | | | |
| Etudes haut-débit | | | | |
| | | | | |

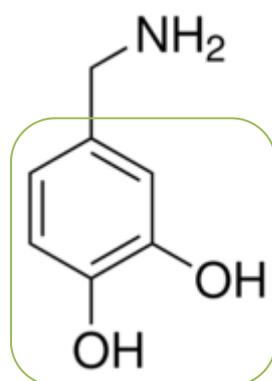
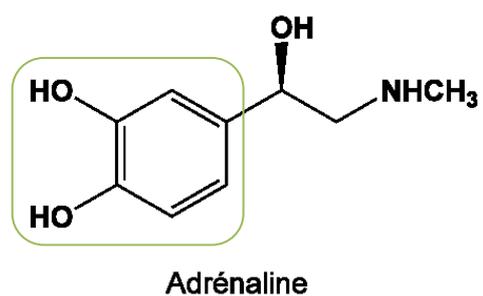
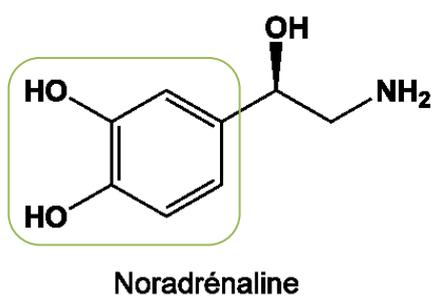
Introduction

Dans un contexte de croissance de la population mondiale, la sélection génétique des animaux d'élevage a surtout été orientée vers les caractères de production. Alors que la productivité et la prolificité ont augmenté en élevage porcin, d'autres caractères se sont dégradés comme la survie des porcelets. Les animaux sont aussi devenus plus sensibles aux maladies et moins résistants aux variations environnementales. Les attentes des citoyens ont par ailleurs évolué. En effet, les problèmes environnementaux liés à l'élevage et le bien-être animal sont des thèmes récurrents dans l'actualité. Pour satisfaire ces demandes, les entreprises de sélection tentent de mettre au point une nouvelle stratégie : sélectionner des animaux robustes dont l'efficacité alimentaire est élevée. Par définition, des animaux robustes sont capables d'associer un potentiel de production élevé et de faire face aux facteurs de stress quelles que soient les conditions environnementales (Knap, 2005 dans Mormède et al., 2011a). Ces animaux produiront moins de déjections, ce qui sera favorable à l'environnement dans des régions où l'élevage est prédominant. Ils seront moins sensibles aux pressions environnementales car ils seront capables de maintenir un même niveau de production sous différentes conditions climatiques, ce qui limitera les pertes de production dans les climats chauds et humides. Augmenter la robustesse des animaux permettra d'améliorer leur bien-être car les animaux robustes seront moins sensibles aux maladies. Ils seront capables de produire plus longtemps, ainsi la durée de leur carrière augmentera. De plus, l'axe corticotrope ou axe hypothalamo-hypophysaire-corticosurrénalien (Mormède, 2007) contribue à la robustesse des animaux. En effet, le cortisol, une hormone glucocorticoïde qui intervient dans de nombreuses fonctions biologiques, est corrélé positivement aux caractères de robustesse (Leenhouwers et al., 2002, Michel et al., 2007), mais corrélé négativement aux caractères de production (Hennessy et Jackson, 1987).

Pour augmenter la robustesse du porc, le projet SUSoSTRESS (2013-2016), financé par l'Agence Nationale de la Recherche propose la sélection divergente basée sur l'activité de l'axe corticotrope. Le choix de ce critère est justifié par la réponse de la corticosurrénale à l'hormone corticotrope (ACTH) qui est fortement héritable ($h^2 = 0,68$) (Larzul et al., 2014). Les objectifs de ce projet sont :

- D'approfondir les connaissances liées aux bases génétiques de l'adaptation des animaux d'élevage.
- De fournir des preuves expérimentales attestant que l'équilibre entre la production et la robustesse des animaux peut être modifié par la sélection d'individus dont l'activité de l'axe corticotrope est élevée.
- D'établir un modèle de variabilité génétique de l'axe corticotrope et de son activité physiologique en fonction des performances (productivité et robustesse) des animaux.
- De produire des données expérimentales pour la sélection génétique d'animaux plus robustes et de proposer des stratégies génétiques aux éleveurs pour équilibrer la production et la robustesse des animaux (Mormède, 2011b).

A chaque étape de la procédure de sélection des animaux, des expérimentations ont lieu. Les études réalisées et à venir sont synthétisées dans le **tableau 1**. Les animaux de la population initiale (G0) et les animaux G3 sont mis dans différentes situations de stress (test de stimulation à l'ACTH, stress de contention, injection de lipopolysaccharide (LPS), stress thermique (seulement pour les G3) et stress à l'abattage (seulement pour les G3)). Pour chacune de ces situations, un phénotypage intensif des animaux est réalisé. Ce phénotypage consiste à mesurer de nombreux paramètres chez ces individus. Des données zootechniques (poids, consommation alimentaire, performances de reproduction, composition de la carcasse et qualité de la viande), transcriptomiques, métabolomiques, comportementales, de biologie clinique et de génotypage sont recueillies suite au stress. A ce jour, 120



Dihydroxybenzylamine (DHBA)
Standard interne utilisé

Figure 1 (Sources : Société Chimique de France, Sigma-Aldrich) : Molécules de noradrénaline, d'adrénaline et de dihydroxybenzylamine et leur partie commune

animaux G0 sont phénotypés. Pour les générations G1 et G2, seules les mesures zootechniques sont faites (Mormède, 2011b). L'analyse des réponses de stress des animaux permet d'étudier les bases génétiques de l'adaptation des porcs. De plus, l'étude des réponses de stress consiste à quantifier les réponses de l'axe corticotrope et/ou du système nerveux autonome suite à leur activation par un stress. Le stress de contention a été choisi car il présente l'avantage d'impacter à la fois le système endocrinien, le système émotionnel et le comportement de l'animal (Mormède, 2013). Ce mémoire se limitera à l'étude de ce stress. L'activation du système nerveux autonome suite à un stress conduit à la production de catécholamines, comme la noradrénaline et l'adrénaline par les cellules chromaffines du système nerveux central et de la médullosurrénale. Le système nerveux autonome est particulièrement sensible aux stress. En effet, la libération des catécholamines dans le sang intervient quelques secondes après le stimulus (Sapolsky et al., 2000). Ces molécules sont donc très intéressantes pour étudier des variations de réponse sur le court terme, comme lors d'un stress de contention. Les catécholamines sont naturellement présentes dans l'urine et le plasma. Dans l'urine, les variations sur le court terme des concentrations des catécholamines ne peuvent pas être détectées car les molécules s'accumulent dans l'urine progressivement. Les catécholamines circulent dans le sang sous deux formes, liées à des molécules sulfatées ou libres. Ces dernières ne représentent que 30 % des catécholamines mais leur concentration varie rapidement suite à un stimulus (Damjanovic, 1991 ; Abid, 2011). L'étude portera donc sur les dosages des catécholamines plasmatiques. Les molécules d'intérêt sont présentées dans la **figure 1**.

De nombreuses données sont générées dans le projet SUSoSTRESS, il est donc particulièrement intéressant de chercher à les étudier ensemble plutôt qu'individuellement. L'intégration des données cherchera à mieux comprendre les réponses des différents phénotypes (biologie clinique, comportement, activité cardiaque) au stress de contrainte et à déterminer les gènes qui influencent ces réponses.

Ma mission fut d'abord de quantifier les catécholamines plasmatiques de porcs issus de la population G0 suite au stress de contention. Cependant, les catécholamines sont de petites molécules, elles sont aussi instables (sensibles à la chaleur et à la lumière), hydrophiles, polaires et présentes en faibles concentrations dans le plasma ce qui rend leur détection et leur quantification délicates (Damjanovic, 1991). La méthode de chromatographie liquide à haute pression a été retenue pour répondre à la question. En effet, sa spécificité et sa sensibilité sont deux arguments favorables à son utilisation. Par ailleurs, pour confronter les données de phénotypage obtenues sur les mêmes animaux, une analyse en composante principale et une étude des coefficients de corrélation de Pearson ont été réalisées. Enfin, pour étudier le rôle du système nerveux autonome sur ces phénotypes, une analyse d'association a été réalisée. Cette étude a été choisie car elle permet de prendre en compte le lien de parenté entre les individus contrairement à une analyse de variance.

La première partie de ce mémoire décrira l'activation du système nerveux autonome suite à un stress, ses effets sur les tissus cibles et sa variabilité génétique. La deuxième partie détaillera le protocole utilisé pour quantifier les catécholamines plasmatiques et les méthodes statistiques mises en œuvre. Enfin, la dernière partie présentera les résultats obtenus et les confrontera à la littérature existante.

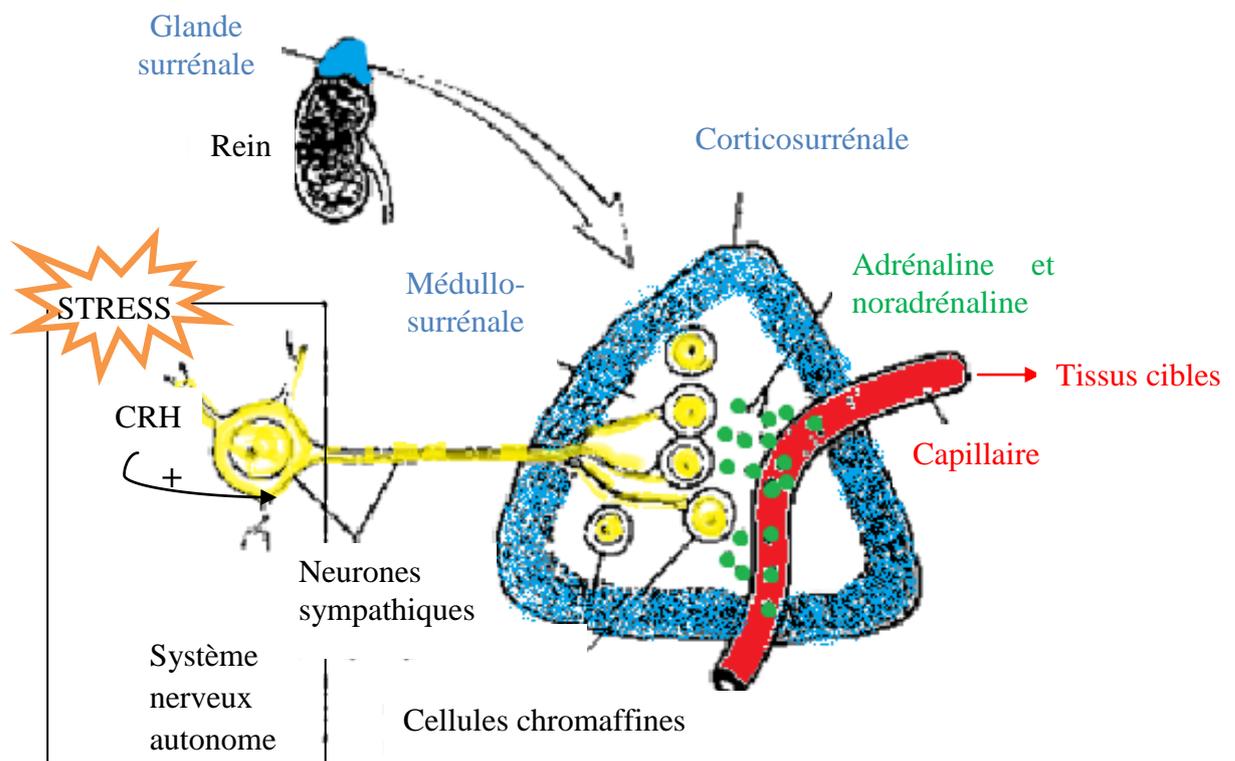


Figure 2 (D'après le cours du professeur du CEGEP de St-Hyacinthe (2004)): Activation du système nerveux autonome et libération des catécholamines suite à un stress
CRH : corticotropin-releasing hormone, + : stimulation des neurones sympathiques

Le système nerveux autonome : activation, conséquences sur les tissus cibles et variabilité génétique

La libération des catécholamines par le système nerveux autonome

La corticotropin releasing hormone (**CRH**) stimule les neurones qui produisent la noradrénaline et les neurones du locus ceruleus qui activent des neurones produisant des catécholamines (Valentino et Van Bockstaele, 2005 dans Salak Johnson et McGlone, 2007). L'activation des neurones se traduit par la transmission d'un potentiel d'action le long de ces cellules, ce qui conduit à la synthèse et à la libération de catécholamines par les terminaisons du système nerveux sympathique, présentes dans le cerveau et dans la médullosurrénale (Merlot, 2003, Nussey et Whitehead, 2001). Ces mécanismes sont schématisés dans la **figure 2**. La synthèse et la libération des catécholamines ont lieu dans les cellules chromaffines de la médullosurrénale et du système nerveux sympathique suite à la stimulation nerveuse issue du système nerveux autonome. Les catécholamines sont produites à partir de tyrosine et leur synthèse dépend de différentes enzymes :

- _ la tyrosine hydroxylase, qui convertit la tyrosine en dihydroxy-phénylalanine ou **DOPA**.
- _ une décarboxylase des acides aminés aromatiques qui convertit la DOPA en dopamine.
- _ la dopamine β -hydroxylase qui synthétise la noradrénaline à partir de la dopamine.
- _ la phényléthanolamine N-méthyltransférase (**PNMT**) qui convertit la noradrénaline en adrénaline.

Une fois synthétisées, les catécholamines sont stockées dans des granules de sécrétion liées à de l'adénosine triphosphate (**ATP**) et des protéines comme l'adrénomédulline. L'exocytose est provoquée par la libération d'acétylcholine au niveau des terminaisons neuronales du système nerveux autonome. La libération d'acétylcholine est contrôlée par l'hypothalamus postérieur et induit la dépolarisation des cellules chromaffines, ce qui conduit à l'exocytose des granules. Une fois libérées, les catécholamines agissent sur des tissus cibles via des récepteurs (α ou β adrénergiques) membranaires couplés aux protéines G. La fixation des catécholamines sur ces récepteurs induit une transduction de signal activatrice ou inhibitrice (Nussey et Whitehead, 2001). La réponse neuroendocrinienne suite à un stimulus est très rapide, elle intervient quelques secondes après celui-ci (Sapolsky et al., 2000).

La modulation de l'activité du système nerveux autonome

L'activation du système nerveux autonome dépend d'abord de l'interprétation individuelle d'un stimulus. Suite à un stimulus, les régions sensorielles du cortex sont activées et envoient un message vers l'amygdale et l'hippocampe, lieux de l'interprétation. Un second signal est alors transmis à l'hypothalamus, au cortex frontal et au tronc cérébral. C'est plus particulièrement le locus ceruleus qui est activé au niveau du tronc cérébral. Au niveau de l'hypothalamus, c'est le noyau paraventriculaire qui est activé, à la fois par l'action de l'amygdale et de l'hippocampe mais aussi par l'action du cortex préfrontal et du locus ceruleus. L'amygdale, le noyau paraventriculaire et le locus ceruleus innervent les neurones du système nerveux autonome. Ils peuvent alors l'activer. La CRH produite par le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus est libérée (Université de Genève, Merlot, 2003, Ulrich-Lai et Herman, 2009).

Par ailleurs, en contrôlant les quantités d'adrénaline et de noradrénaline libérées, il est possible de faire varier l'activité du système nerveux autonome. Les concentrations des deux hormones dépendent de différents mécanismes. Au niveau des terminaisons nerveuses, la majorité des catécholamines retourne dans le neurone pré-synaptique, limitant ainsi la durée du message nerveux. Si les catécholamines ont été libérées dans la circulation sanguine, certains tissus vont les piéger et les transformer pour supprimer leurs actions. Par exemple, la monoamine oxydase et la catéchol-O-méthyltransférase sont deux enzymes capables de

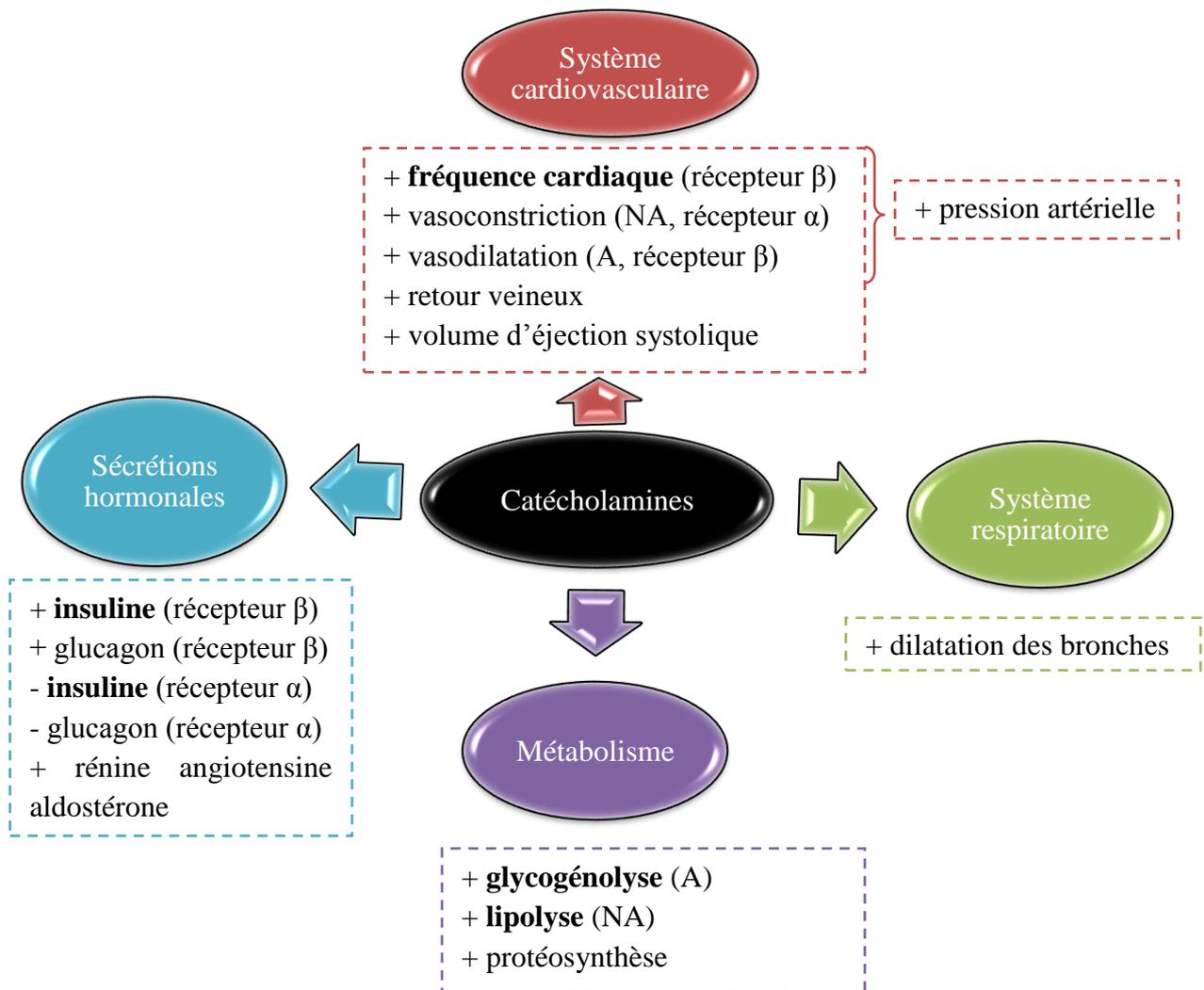


Figure 3 : Bilan des effets des catécholamines

+ : stimule, augmente, - : inhibe, diminue, A : adrénaline, NA : noradrénaline

dégrader les catécholamines. Par ailleurs, les concentrations des catécholamines sont aussi modulées par l'action des glucocorticoïdes (Nussey et Whitehead, 2001 ; Brandt, 1999).

Les conséquences de l'activation du système nerveux autonome sur les tissus cibles

Les catécholamines sont connues pour accompagner la réponse comportementale de type « fight or flight ». Elles induisent des changements pour aider l'animal à fuir la situation stressante ou à se battre contre elle (Nussey et Whitehead, 2001). Ces changements vont être décrits dans les parties suivantes et sont schématisés dans la **figure 3**.

Les actions des catécholamines sur le système cardiovasculaire et respiratoire

Les catécholamines induisent des changements au niveau du système cardiovasculaire. En effet, elles augmentent la fréquence cardiaque via les récepteurs β -adrénergiques situés sur le cœur (Merlot, 2003 ; Nussey et Whitehead, 2001) ainsi que la vasoconstriction périphérique et la vasodilatation musculaire en agissant sur les récepteurs α et β respectivement. La pression artérielle est alors modulée par la fréquence cardiaque et le diamètre des vaisseaux. De plus, les catécholamines augmentent le volume d'éjection systolique (volume de sang éjecté à chaque battement du cœur) et favorisent le retour veineux (Merlot, 2003 ; Nussey et Whitehead, 2001).

De plus, les catécholamines ont une action sur le système respiratoire en augmentant la dilation des bronches, ce qui favorise l'oxygénation du sang puis des muscles (Nussey et Whitehead, 2001).

Les actions des catécholamines sur le métabolisme

Les catécholamines favorisent l'utilisation des ressources d'énergie, qu'elles soient lipidiques ou glucidiques. La noradrénaline favorise la lipolyse (augmentation des concentrations d'acides gras libres dans le plasma) tandis que l'adrénaline stimule la glycogénolyse (augmentation de la glycémie), qui sont des processus de catabolisme (Nussey et Whitehead, 2001 ; Merlot, 2003). Par ailleurs, les catécholamines favorisent la synthèse protéique par l'activation de récepteurs β -adrénergiques qui favorisent l'utilisation des acides gras et réduisent la dégradation des protéines (Mersmann, 1998).

Les actions des catécholamines sur les sécrétions hormonales

Les catécholamines augmentent les sécrétions de différentes hormones, comme l'insuline ou le glucagon via l'action des récepteurs β -adrénergiques, mais elles diminuent aussi les concentrations de ces hormones via les récepteurs α -adrénergiques. Les catécholamines agissent sur d'autres systèmes endocriniens comme le système rénine-angiotensine-aldostérone. En effet, les catécholamines ont des effets sur la sécrétion de rénine, ce qui a pour conséquence d'augmenter la production d'aldostérone (Nussey et Whitehead, 2001).

Les variabilités génétiques des réponses au stress du système nerveux autonome

Observations de la variabilité génétique entre les individus

Des différences de concentrations basales de catécholamines, mesurées dans l'urine, sont observées entre les races. Par exemple, les porcs Landrace, Duroc et Meishan ont des concentrations urinaires d'adrénaline qui sont en moyenne 29% plus élevées que celles des Larges White et Piétrain (Foury et al., 2007). Dans le cas de la noradrénaline, les Meishan ont des concentrations urinaires 37% plus élevées que celles des autres races (Foury et al., 2007). Suite à un stress, les concentrations des catécholamines varient de manière différente selon la race. Par exemple, après un stress de transport les concentrations urinaires d'adrénaline augmentent de 308% pour les Piétrain, de 252% pour les Meishan, de 230% pour les Duroc, de 115% pour les Landrace et de 110% pour les Large White dans l'étude de Foury et al.

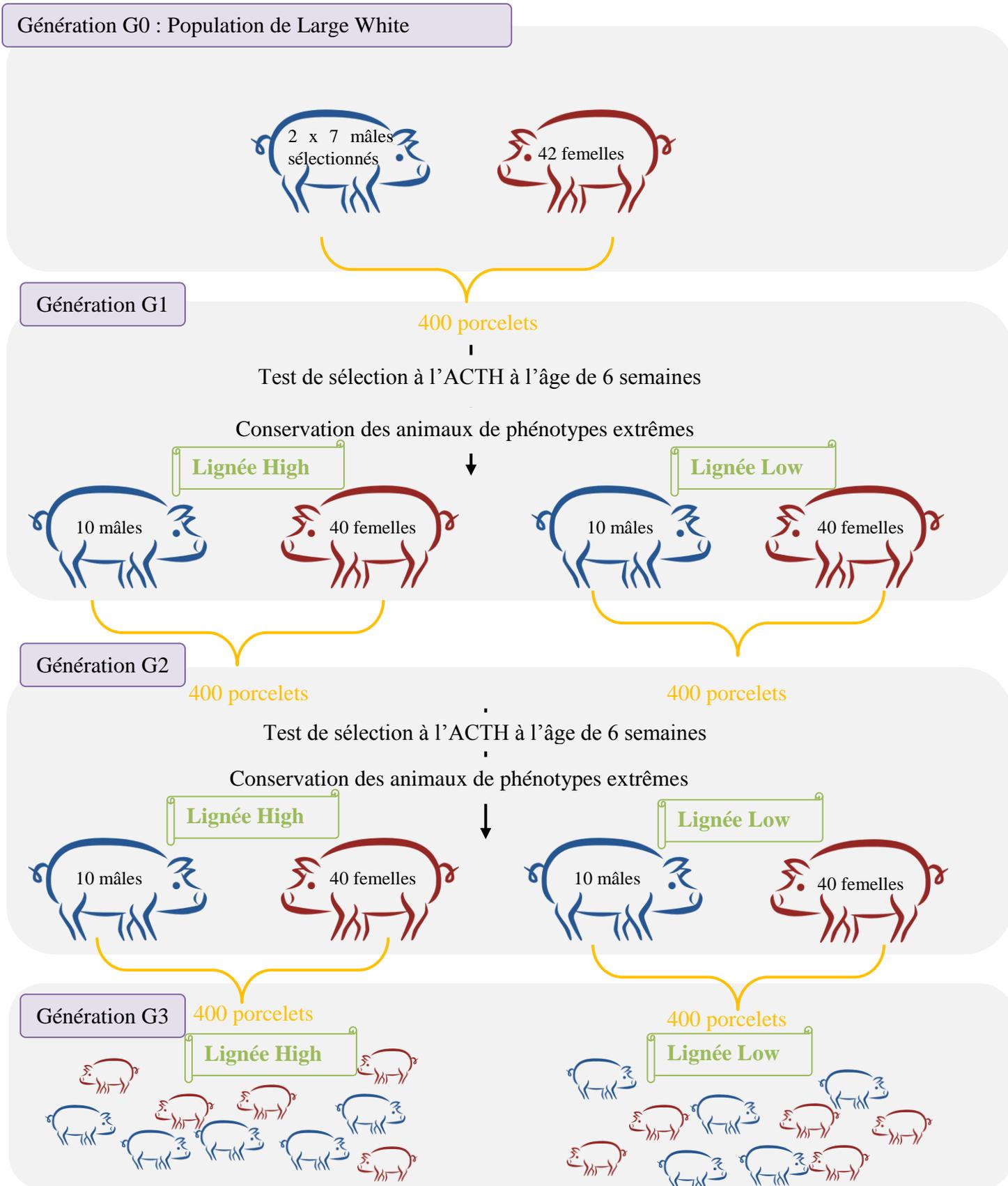


Figure 4 : Schéma de sélection divergente mis en place lors du projet SUSoSTRESS
ACTH : adrenocorticotropin hormone, **High/Low** : animaux dont la réponse de la corticosurrénale à l'ACTH est élevée/faible

(2007) et les concentrations de noradrénaline sont augmentées de 102% chez les Meishan suite à un stress et de 24% chez les Large White. Les mêmes types de résultats sont obtenus pour les concentrations plasmatiques des catécholamines dans l'étude de Rosochacki et al. (2000).

Il est difficile de dire s'il existe ou non un effet du sexe sur les concentrations des catécholamines puisque les études divergent dans les résultats (Collier et al., 2011, Mormède et al., 1984, Williams et al., 2009).

Existence de locus à effet quantitatif affectant les concentrations des catécholamines

Des locus à effets quantitatifs (QTL) affectant les concentrations d'adrénaline et de noradrénaline ont été trouvés dans une population d'individus croisés Duroc et Large White. Un QTL lié à l'adrénaline est situé sur le chromosome 13 à environ 14 centiMorgans (cM) près du marqueur SWR1941. Un QTL lié à la noradrénaline est situé sur le chromosome 10 à 62 cM près du marqueur S0070. Les allèles Duroc sont associés à des concentrations plus faibles de noradrénaline mais à des concentrations plus élevées d'adrénaline comparés aux allèles Large White (Sanchez et al., 2011).

Variabilité génétique des enzymes impliquées dans la synthèse des catécholamines

Aucune étude sur le porc n'a étudié la variabilité génétique des enzymes permettant la synthèse des catécholamines, c'est pourquoi les résultats ci-dessous proviennent d'analyses réalisées chez des rongeurs.

Les enzymes liées à la synthèse des catécholamines varient génétiquement. Ces variations peuvent toucher leur activité, leur structure ou leur nombre et sont observables entre lignées (Kessler et al., 1972). Par exemple, chez les souris, les concentrations de la tyrosine hydroxylase, de la dopamine β -hydroxylase et de la PNMT varient entre les sous-lignées de la lignée Balb/c. Les trois enzymes sont quasiment deux fois plus exprimées dans la sous-lignée Balb/cJ comparée à la sous-lignée Balb/cN (Ciaranello et al., 1974). De plus, les plus faibles concentrations de PNMT de la sous-lignée Balb/cN s'expliqueraient par une dégradation de l'enzyme plus rapide. La variation de la quantité de PNMT dépendrait de l'expression d'un gène codant soit pour un facteur contrôlant la dégradation de la PNMT, soit pour la protéine PNMT (Ciaranello et Axelrod, 1973). Le même type de contrôle pourrait exister pour la tyrosine hydroxylase et pour la dopamine β -hydroxylase. Cependant, l'activité des trois enzymes est très fortement corrélée. Différentes hypothèses permettraient d'expliquer ce résultat, la plus probable suggère qu'un seul gène régule l'expression des trois enzymes. Ce gène aurait subi une mutation dans le cas de la lignée Balb/cJ, ce qui influencerait l'expression des gènes codant les enzymes de la synthèse des catécholamines (Ciaranello et al., 1974).

Matériel et méthode

Les animaux

Tous les animaux ont été élevés sur un site expérimental de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) au Magneraud (17). Ils proviennent d'un schéma de sélection divergente détaillé dans la **figure 4**. La génération G0 est constituée de 42 femelles Large White non sélectionnées, de 7 mâles Large White présélectionnés pour lesquels la réponse de la corticosurrénale à l'ACTH est faible et de 7 mâles présélectionnés pour lesquels la réponse de la corticosurrénale à l'ACTH est élevée. Ces animaux sont utilisés pour produire la génération G1. Les 400 porcelets ainsi produits sont soumis à l'âge de 6 semaines à un test de sélection à l'ACTH, qui consiste en une injection intramusculaire d'ACTH et à la mesure de la réponse de la corticosurrénale au cours du temps par l'intermédiaire de prélèvements

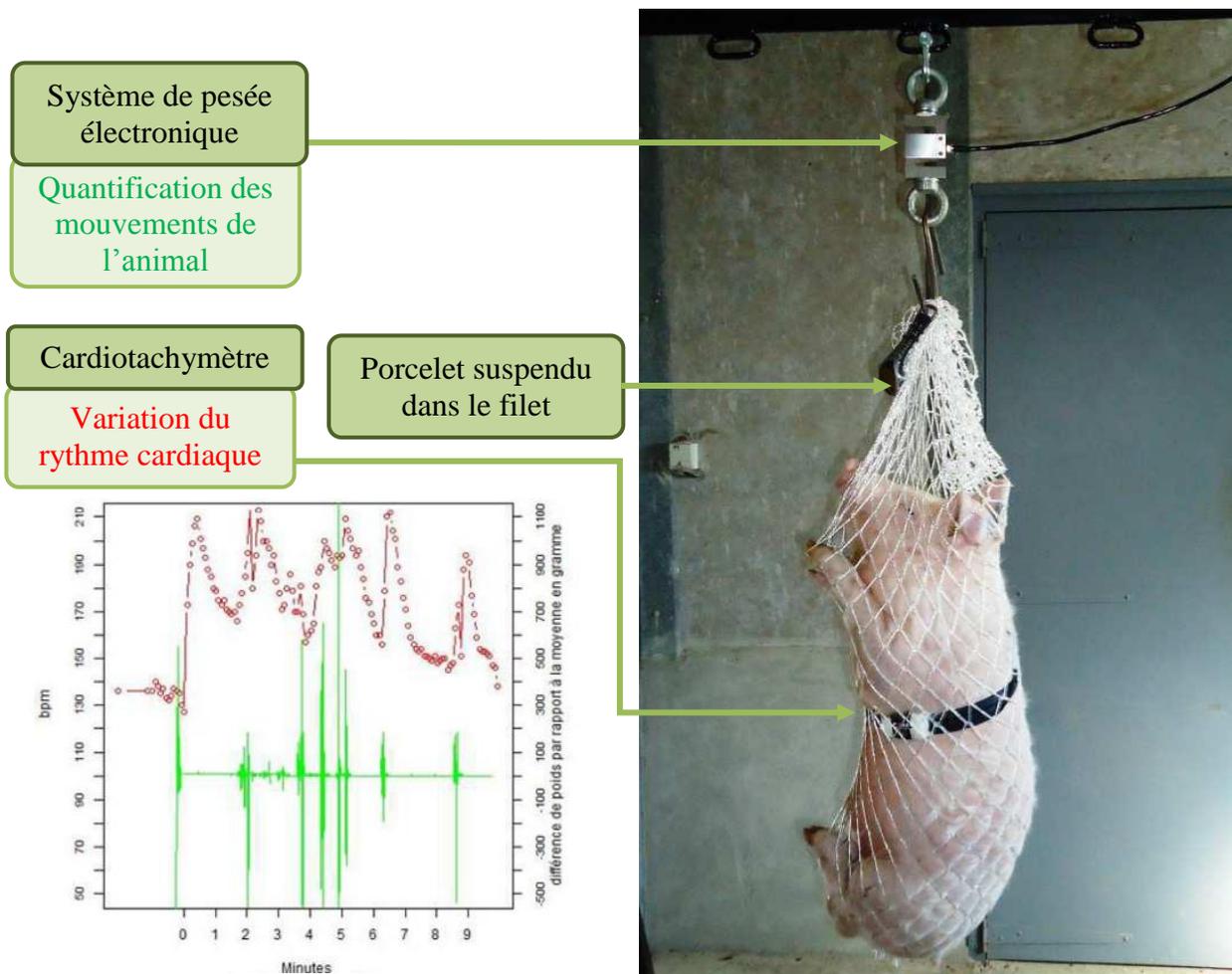


Figure 5 : Porcelet soumis au stress de contention

Crédit photo : Pierre Mormède.

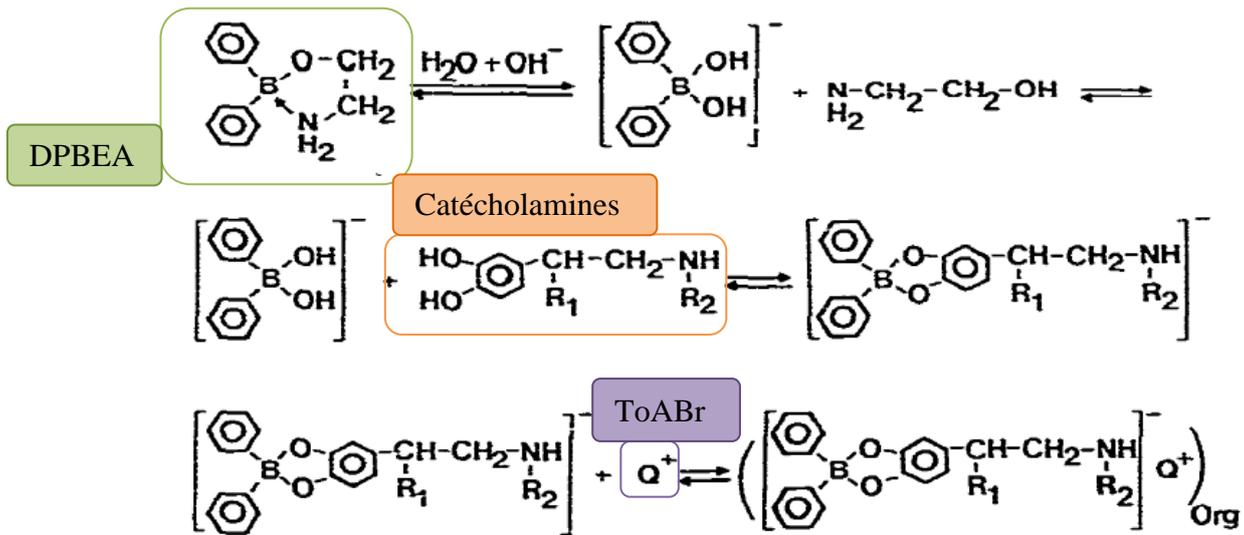


Figure 6 (Smedes al al., 1982) : Réactions chimiques impliquées dans l'extraction des catécholamines

DPBEA : Diphényl Borate Ethanolamine, ToABr : Tetra N Octyl Ammonium Bromide

sanguins réalisés avant l'injection et 1 h après. A l'issue de ce test, seulement les animaux de phénotypes extrêmes sont conservés (2 x 10 mâles et 2 x 40 femelles). Ces animaux sont utilisés pour produire la génération G2. Les animaux de cette génération seront aussi sélectionnés selon la même procédure. Les animaux conservés produiront la génération G3 (Mormède, 2011b).

Pour l'expérience de phénotypage approfondi de la génération G0, à laquelle j'ai été plus particulièrement associée, 40 porcelets ont été choisis dans trois bandes successives (soit 120 porcelets au total). Les animaux sont répartis équitablement entre les sexes. Au moment du stress de contention, ils étaient âgés de sept semaines (Mormède, 2011b, 2013) et pesaient environ 15 kilogrammes (écart-type de 2,36).

Le stress de contention et l'échantillonnage

Le stress de contention consiste à placer l'animal dans un filet, comme le montre le **figure 5**, et à le suspendre pendant dix minutes. Des prélèvements sanguins sont réalisés par ponction directe au niveau de la veine jugulaire sous contention légère avant de placer l'animal dans le filet (t = 0 h), dix minutes (t = 10 min), une heure (t = 1 h), quatre heures (t = 4 h) et vingt-quatre heures (t = 24 h) après le début de la contrainte. Il est à noter que chaque animal est son propre témoin. Le sang est ensuite placé dans des tubes contenant de l'héparine pour éviter qu'il ne coagule et il est centrifugé (3400 g, 4°C, 10 min). Des aliquotes de 750 microlitres (μL) de plasma sont alors transférées dans des tubes et conservées à -80°C . La fréquence cardiaque des animaux est enregistrée pendant la contrainte grâce à un cardiotachymètre (Polar RS800CX) situé sur une ceinture placée autour du thorax de l'animal et le comportement est mesuré grâce à un dispositif de pesée électronique qui enregistre le poids de l'animal environ toutes les trois secondes (Mormède, 2013).

L'extraction des catécholamines plasmatiques

Avant d'injecter les échantillons dans la colonne de chromatographie, il est nécessaire d'extraire et de concentrer les catécholamines des plasmas pour répondre aux exigences de la colonne : de petits volumes concentrés doivent y être injectés (Damjanovic, 1991). Cette méthode est très sensible, l'extraction permet de limiter la quantité de molécules qui sera injectée et de faciliter la lecture du chromatogramme. Pour cela, le mode opératoire N°144 du laboratoire de génétique cellulaire a été utilisé, basé sur la publication de Smedes et al. (1982). Le protocole est annexé à ce mémoire (**Annexe 1**). Les échantillons ont été extraits en duplicat.

L'extraction réalisée est une extraction par solvant. Elle se fait par l'intermédiaire de différentes solutions d'extraction, qui favorisent le passage des catécholamines d'une phase à une autre. L'ajout de 125 μL de solution A (NH_4OH , NH_4Cl , Diphényl Borate Ethanolamine (**DPBEA**)) au plasma conduit à la formation d'un complexe stable entre les catécholamines et le DPBEA. Le complexe se situe dans la phase aqueuse. Le NH_4OH et le NH_4Cl permettent d'ajuster le pH de la solution, un pH de 8-9 permet d'avoir une extraction optimale. L'ajout de Tetra N Octyl Ammonium Bromide (**ToABr**) présent dans les 625 μL de solution B (heptane, octanol, ToABr) permet de former une paire d'ions avec le complexe. Le schéma de la réaction est présenté en **figure 6**. L'heptane et l'octanol sont des solvants d'extraction qui vont faire migrer le complexe lié au ToABr hors de la phase aqueuse. Ces solvants organiques permettent aussi de stabiliser l'équilibre entre le ToABr libre et le ToABr associé au complexe et d'optimiser l'extraction. L'ajout de 250 μL d'octanol a pour objectif de dissocier les catécholamines du DPBEA et du ToABr. Enfin, l'ajout de 50 μL de solution C (acide acétique à 0,1 molaire) permet d'extraire les catécholamines du solvant et d'ajuster le pH à 4 avant l'injection. La phase organique est ensuite éliminée et la phase aqueuse (contenant l'acide acétique et les catécholamines) est diluée dans de la phase mobile avant l'injection (Smedes et al., 1982, Damjanovic, 1991).



Figure 7 : Appareil de chromatographie liquide haute pression

Avant l'extraction, un standard interne, le dihydroxybenzylamine (**DHBA**), est ajouté aux plasmas. Il servira de base pour calculer les concentrations d'adrénaline et de noradrénaline. De même, un tube « pool de catécholamines » (**PC**), qui contient une quantité de catécholamines connue ainsi que la même quantité de DHBA que les plasmas, est dilué (**PC3**) puis extrait (**PC3ex**). Il joue le rôle de témoin positif et intervient également dans le calcul des concentrations des deux hormones et dans le calcul de l'efficacité de l'extraction.

La chromatographie liquide à haute pression avec détection électrochimique

L'objectif de la chromatographie est de séparer les différentes molécules d'un échantillon selon leurs propriétés physicochimiques, c'est-à-dire selon leurs affinités pour la phase mobile et la phase stationnaire (Damjanovic, 1991).

Les phases mobiles et stationnaires

Le principe : La phase mobile permet de faire circuler l'échantillon à travers la colonne. La phase stationnaire, par sa composition, retient les différentes molécules de l'échantillon de manière variable selon l'affinité des molécules de l'échantillon pour les composants de cette phase. L'affinité d'une molécule pour une phase ou l'autre varie en fonction de sa taille, de sa conformation, de sa charge ionique et de sa solubilité dans la phase (Damjanovic, 1991).

La phase mobile utilisée est composée d'acétate de sodium, de méthanol, d'octane sulfonic acid (**OSA**), d'acide citrique et d'eau ultra pure. Sa composition dépend des types de colonne et de détecteur utilisés et des propriétés physicochimiques des molécules à séparer. La phase doit être réalisée à partir de composés de haute qualité, l'eau doit être ultra pure et la phase doit être filtrée avec un filtre de 0,45 micromètre avant de l'ajouter au circuit de l'appareil de chromatographie. Le méthanol présent dans la phase mobile permet de faire varier les temps de rétention des différentes molécules selon sa concentration. En effet, les temps de rétention des molécules diminuent avec des concentrations croissantes de méthanol (**figure 9**). Ainsi, il est possible de modifier la rapidité de la chromatographie (Damjanovic, 1991). Dans le cadre de notre étude, la phase circule en circuit fermé, elle est donc changée toutes les semaines pour limiter l'accumulation des molécules (Damjanovic, 1991).

La colonne constitue la phase stationnaire. Les colonnes sont constituées de silice, d'alumine, de charbon ou de polymères organiques. Cependant, la silice est la plus souvent utilisée. Les colonnes de silice sont composées de particules souvent sphériques, poreuses, d'un diamètre de l'ordre du picomètre (Damjanovic, 1991). La colonne utilisée dans notre étude est une colonne apolaire (HAISIL 100 C18 5µm, Higgins Analytical) qui supporte environ 1000 injections.

L'appareil de chromatographie haute pression

L'appareil est constitué de différentes parties, présentées sur la **figure 7**. Leurs fonctions sont développées ci-dessous. Le **réservoir** qui contient la phase mobile est situé au dessus de l'appareil. La phase mobile passe dans un **dégazeur** pour éliminer les gaz dissous. Cette étape est importante car l'oxygène dissous dégrade les échantillons, la phase stationnaire et les pièces en contact avec la phase mobile. L'oxygène favorise également la formation de bulles d'air dans le détecteur, ce qui participe à augmenter le bruit de fond et complique l'analyse. La **pompe** permet de mettre en mouvement la phase mobile à travers tout le système. Le pompage doit se faire à intervalles de temps réguliers et le volume pompé doit être constant. La pompe doit être constituée de matériaux inertes pour éviter la libération de métaux lourds qui pourraient chélater les catécholamines et favoriser leur dégradation. Elle est également sensible aux bulles d'air, d'où le dégazage préalable. La pression de notre pompe varie entre 45 et 48 bars. Une fois l'échantillon placé dans la machine, c'est l'**injecteur** qui est en charge de le transmettre à la colonne sans perte de matière ni addition

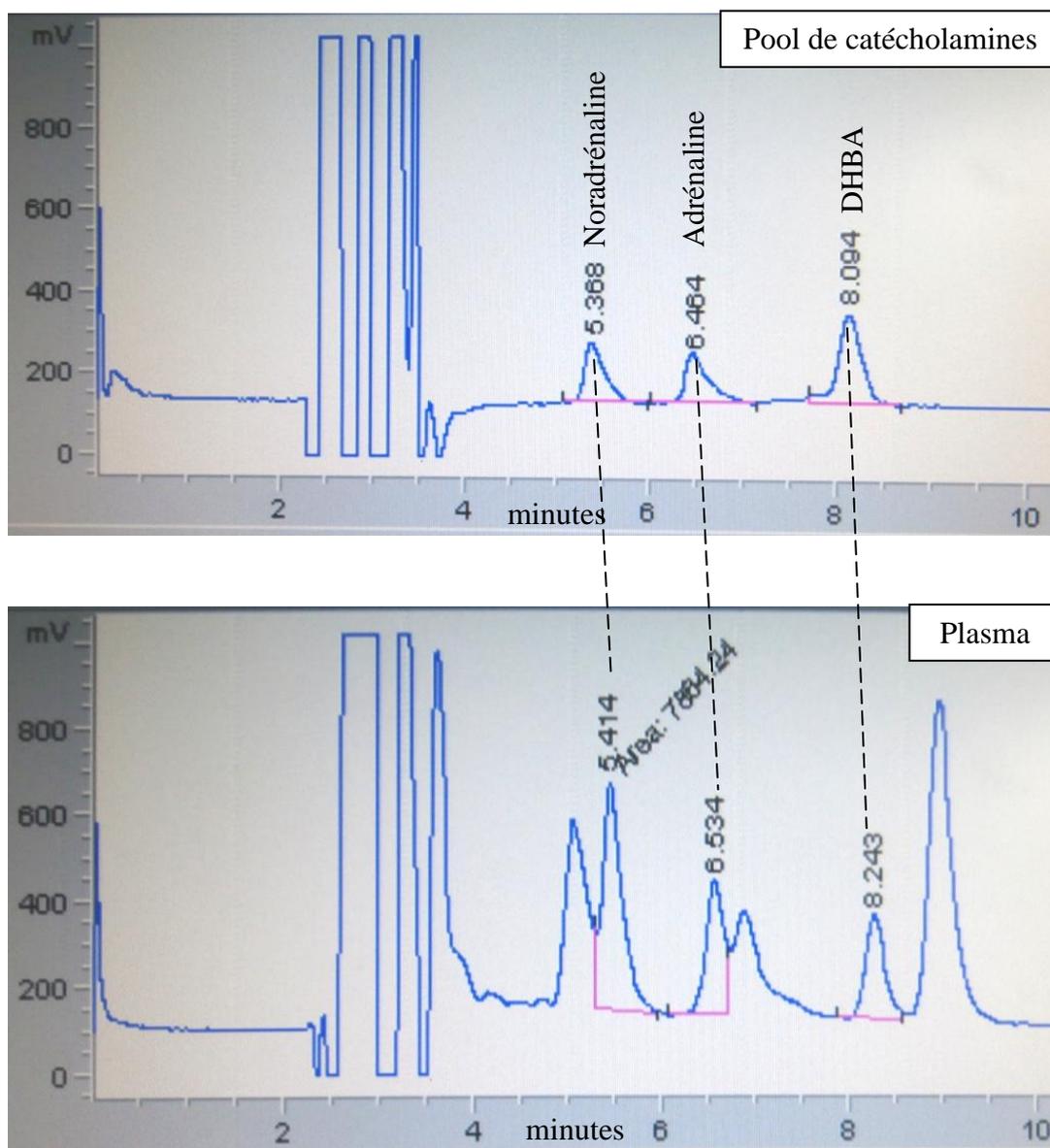


Figure 8 : Chromatogrammes obtenus avec un pool de catécholamines (haut) et un plasma (bas)

DHBA : Dihydroxybenzylamine

Les valeurs au dessus des pics correspondent aux temps de rétention des molécules.

La légère variation des temps de rétention entre le pool et le plasma est due au nombre important de plasmas injectés lors de cette série car cela conduit à charger la colonne. Dans une telle colonne, les molécules mettent plus de temps à migrer d'où la légère augmentation des temps de rétention des molécules au cours de la série.

d'air. Une **précolonne** précède la colonne de chromatographie. Son rôle est de protéger la colonne en captant les molécules indésirables, responsables d'une diminution de la résolution du chromatogramme. La phase mobile et l'échantillon traversent la précolonne puis la **colonne**. A ce niveau, les molécules sont séparées selon le principe décrit précédemment. Les molécules séparées migrent à travers le **détecteur électrochimique**. Elles sont alors soumises à un champ électrique qui provoque une réaction électrochimique (une oxydation des catécholamines) entre les molécules et l'électrode du détecteur. Les catécholamines sont des composés peu électroactifs, elles ne peuvent donner que deux protons en réponse au champ électrique. Ce transfert de protons de la molécule à l'électrode conduit à la formation d'un courant électrique, converti en une tension qui est proportionnelle à la quantité de molécules présentes. Il existe des détecteurs électrochimiques coulométrique ou ampérométrique. Les premiers oxydent 100 % des molécules, ils produisent donc un courant important, mais ils ont aussi un bruit de fond important. Les seconds n'oxydent que 10 % des molécules, ainsi une partie des molécules peut être récupérée et purifiée. Lors de nos expérimentations, un détecteur électrochimique ampérométrique a été utilisé. La phase mobile passe également au travers du détecteur électrochimique, elle doit donc être électroconductrice. Le signal émis par la phase mobile correspond à la ligne de base, au bruit de fond du chromatogramme. Par ailleurs, à cause de la migration de la phase mobile dans le détecteur le potentiel de l'électrode varie, ce qui modifie la capacité de l'électrode à quantifier d'autres molécules. Pour résoudre ce problème, une électrode auxiliaire est présente. Cette dernière est maintenue à un potentiel constant grâce à une électrode de référence (Ag/AgCl). Le détecteur est lui-même relié à un **intégrateur** qui convertit la tension mesurée en un pic sur le chromatogramme (Damjanovic, 1991, Jacob, 2010).

Le chromatogramme

Le chromatogramme final est constitué de plusieurs pics, chacun représente une molécule. Un pic est caractérisé par son temps de rétention qui correspond au temps nécessaire à la molécule pour arriver à l'électrode à partir du moment où l'échantillon a été injecté. Dans des conditions standardisées, les molécules sont identifiées par leur temps de rétention, qui est très spécifique. Cependant, il faut prêter attention aux pics supplémentaires pour ne pas les confondre avec les pics d'intérêt. Une erreur conduirait à l'obtention de faux-positifs. Les pics supplémentaires obtenus ont différentes origines. Ils peuvent correspondre à des substances du plasma qui ont aussi été extraites, à des produits des catécholamines, à des substances qui étaient présentes dans les solutions d'extraction ou dans la phase mobile, à des produits de la colonne ou du DPBEA ou encore à des impuretés dans l'octanol (Damjanovic, 1991). Des exemples de chromatogrammes sont donnés sur la **figure 8**.

Le calcul de l'efficacité d'extraction et des concentrations

Grâce aux chromatogrammes obtenus, la hauteur des pics (**H**) est quantifiée et peut être contrôlée manuellement. Dans le fichier de travail, il suffit de rentrer les hauteurs des pics de noradrénaline (**NA**), d'adrénaline (**A**), de DHBA, du PC3 et du PC3ex des différents plasmas pour obtenir les efficacités de chaque extraction et pour connaître les concentrations de noradrénaline et d'adrénaline dans les plasmas.

Calcul de l'efficacité d'extraction : un simple produit en croix est réalisé en considérant que l'efficacité d'extraction du DHBA est égale à celle des catécholamines à mesurer. Ainsi, pour un plasma ou un PC3ex, la formule est la suivante :

$$\text{Efficacité d'extraction} = \frac{\text{H DHBA(plasma ou du PC3ex)} \times 100}{\text{H DHBA(PC3)}}$$

Calcul des concentrations (exemple de la noradrénaline) : dans les PC3ex et les plasmas, la

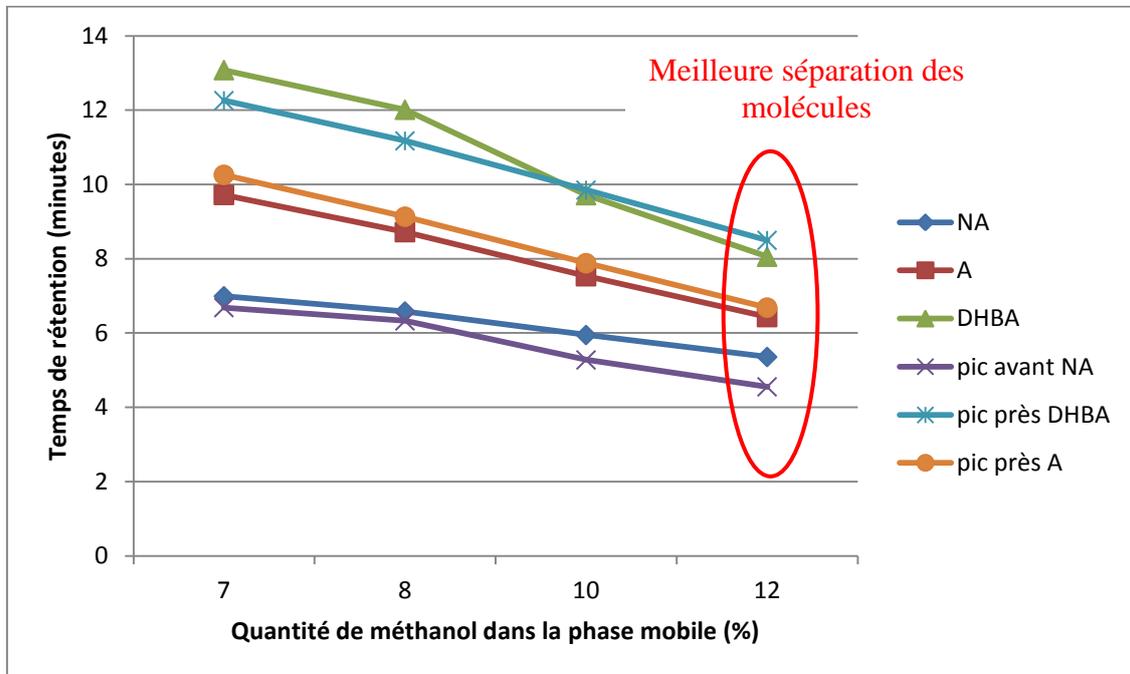


Figure 9 : Evolution du temps de rétention des molécules selon la concentration de méthanol ajoutée dans la phase mobile

DHBA : Dihydroxybenzylamine, **NA** : noradrénaline, **A** : adrénaline

même quantité de standard interne est présente (200 picogrammes (**pg**)). Dans les PC3ex, il y a aussi 200 pg de noradrénaline. Ainsi, seule la quantité de noradrénaline dans le plasma est inconnue. Un premier produit en croix permet d'obtenir cette quantité :

$$\text{Quantité NA(plasma)} = \frac{200 \times \text{H NA(plasma)}}{\text{H NA(PC3ex)}}$$

Cependant, la hauteur de NA mesurée varie en fonction de l'efficacité d'extraction. Pour corriger cet effet, il faut diviser la quantité de NA_(plasma) par celle du DHBA_(plasma), le standard interne. De la même manière que précédemment, un produit en croix permet d'obtenir la quantité de DHBA_(plasma) :

$$\text{Quantité DHBA(plasma)} = \frac{200 \times \text{H DHBA(plasma)}}{\text{H DHBA(PC3ex)}}$$

Le rapport est ensuite calculé :

$$\frac{\text{Quantité NA(plasma)}}{\text{Quantité DHBA(plasma)}} = \frac{\text{H NA(plasma)}}{\text{H DHBA(plasma)}} \times \frac{\text{H DHBA(PC3ex)}}{\text{H NA(PC3ex)}}$$

Pour revenir à la quantité de NA_(plasma), il suffit ensuite de multiplier par la quantité de DHBA ajoutée initialement au plasma. Enfin, pour obtenir la concentration, il est nécessaire de diviser par le volume de plasma utilisé au départ, soit 250 µL.

La formule finale est la suivante :

$$\text{Concentration NA} = \frac{\text{H NA(plasma)}}{\text{H DHBA(plasma)}} \times \frac{\text{H DHBA(PC3ex)}}{\text{H NA(PC3ex)}} \times \frac{\text{Quantité DHBA (plasma)}}{\text{Volume de plasma}}$$

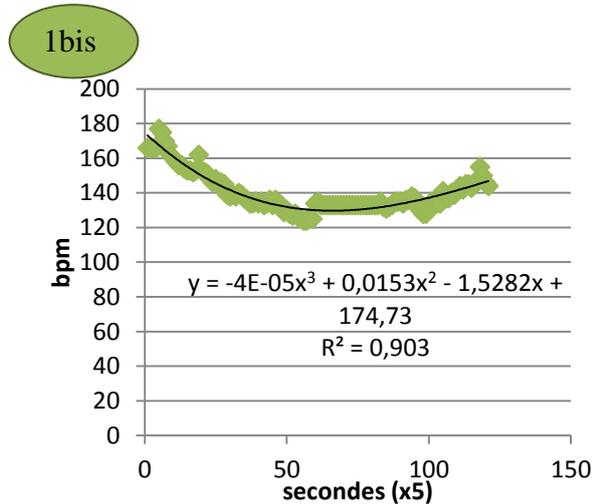
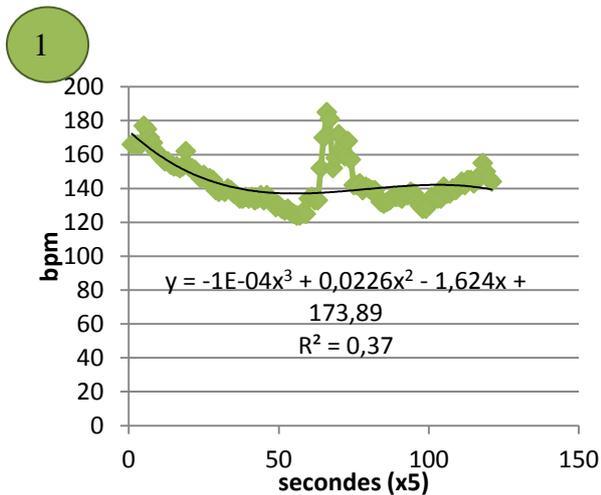
Les avantages et inconvénients de cette méthode

La chromatographie liquide à haute pression est une technique simple, reproductible, sensible, très spécifique et quantitative, ce qui fait d'elle la méthode la plus utilisée pour quantifier les catécholamines. Les extractions sont également très bonnes puisque leur efficacité peut atteindre 80 à 100 %. Cette méthode permet la détection de nombreuses molécules et la séparation de molécules chimiquement proches. En effet, elle est capable de détecter les mêmes molécules que la chromatographie en phase gazeuse, mais elle peut aussi détecter des molécules thermosensibles, très polaires et des composés de masses molaires élevées. Cette méthode est aussi relativement rapide puisque seulement deux heures sont nécessaires de l'extraction à la détection (Jacob, 2010, Smedes et al., 1982, Damjanovic, 1991).

Cette méthode est, comme nous l'avons déjà vu, très sensible à l'oxygène. Pour limiter les effets du gaz, un dégazeur, situé en aval du réservoir de phase mobile, est indispensable (Jacob, 2010). De plus, l'appareil a besoin d'être préalablement calibré avant l'analyse des échantillons pour détecter une molécule. Ainsi, il est capable d'identifier une molécule qui a été calibrée. En revanche, il ne peut pas identifier des pics supplémentaires (Damjanovic, 1991).

Les problèmes rencontrés et les solutions pour y faire face

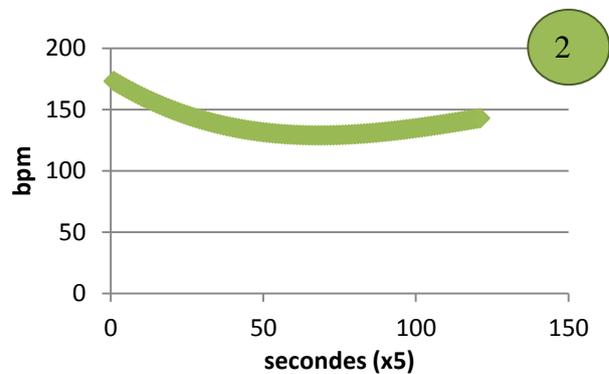
1. Parfois, pendant la nuit, la ligne de base du chromatogramme diminuait et passait en dessous de zéro. Il était alors impossible de calculer la hauteur des pics. Lorsque ce problème



Etape 1. Traçage de l'évolution de la fréquence cardiaque au cours du temps et calcul d'un premier polynôme du 3^{ème} degré. Vérification graphique de la superposition du polynôme à la ligne de base. Si l'ajustement ne convient pas: étape 1 bis

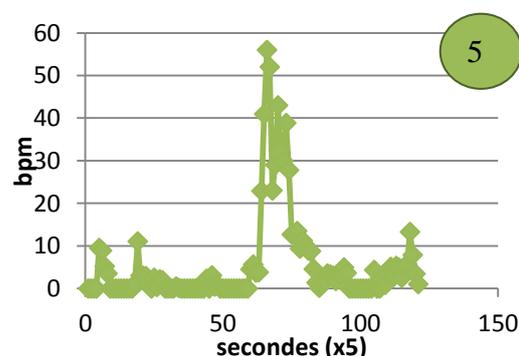
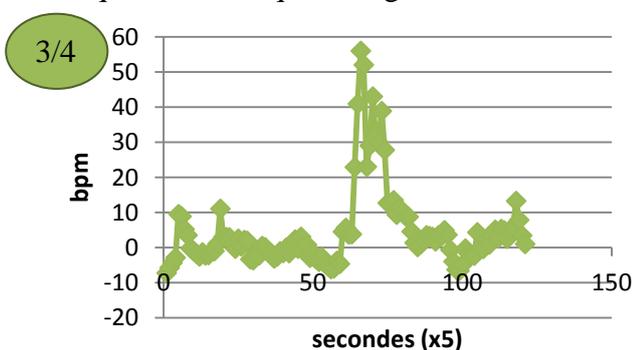
1bis. : Modification manuelle de la courbe de la fréquence cardiaque pour qu'elle ne soit composée que de la ligne de base. Calcul d'un second polynôme. Vérification graphique de la superposition du polynôme à la ligne de base.

Etape 2. Vérification graphique du polynôme. En effet, un polynôme du 3^{ème} degré possède 2 points d'inflexion. Parfois, le polynôme redescend très rapidement vers le bas, dans ce cas, il faut l'ajuster manuellement, en lui donnant une valeur constante vers la fin pour qu'il corresponde à la ligne de base.



Etape 3. Calcul du polynôme sur 100 à 120 points (soit environ 10 minutes, la durée du stress de contention). Soustraction des valeurs obtenues avec ce polynôme à la fréquence cardiaque réelle.

Etape 4. Vérification graphique de l'alignement de la ligne de base avec zéro. Dans le cas contraire, un alignement manuel est réalisé en ajoutant ou en soustrayant une valeur à la fréquence cardiaque corrigée.



Etape 5. Attribution de la valeur zéro aux valeurs négatives.

Etape 6. Somme de l'ensemble des points pour obtenir la réponse de l'activité cardiaque aux mouvements.

Figure 10 : Les étapes de l'analyse des données de cardiologie

bpm : battements par minute

arrivait il fallait relancer l'injection le lendemain matin.

2. Pendant l'extraction des plasmas, il est parfois arrivé qu'après la première centrifugation une interface blanche, épaisse soit présente entre les deux phases. La présence de cette interface n'est pas prévisible et diminue l'efficacité de l'extraction. En prélevant la phase supérieure, puis en mélangeant l'interface avec la phase inférieure, il était possible de récupérer de la phase supérieure après centrifugation. L'efficacité de l'extraction était ainsi améliorée.

3. Les chromatogrammes obtenus à partir de plasmas présentaient des pics supplémentaires. Différents produits des catécholamines (4-hydroxy-3-méthoxyphenylglycol, DL 3,4 dihydroxyphényl glycol) ont été testés pour tenter d'identifier ces pics, en vain. Les molécules indésirables n'ont toujours pas été identifiées. Ces pics supplémentaires sont particulièrement gênants car ils chevauchent partiellement certains de nos pics d'intérêt : l'adrénaline pour la phase à 12% de méthanol, le DHBA pour la phase à 10% de méthanol, la noradrénaline pour la phase à 7% et 8% de méthanol. Pour garder une bonne sensibilité, il est important de ne pas trop réduire la quantité de méthanol. En effet, plus la quantité de méthanol dans la phase diminue, plus les temps de rétention des différentes molécules augmentent (**figure 9**), plus les hauteurs des pics sont faibles et plus la largeur à la base du pic est importante. Ainsi, parmi les différentes phases testées, le choix s'est finalement porté sur la phase à 12% de méthanol car elle séparait le mieux les pics, comme l'indique la **figure 9**. Il est donc à noter que trois phases distinctes ont été utilisées au cours des extractions. Neufs animaux ont été étudiés sous une phase à 8%, 6 animaux sous une phase à 7% et 77 sous une phase à 12% de méthanol. Pour résoudre le problème de chevauchement des pics, il pourrait être intéressant de tester d'autres colonnes de chromatographie (la nouvelle colonne semblait prometteuse) ou d'analyser le temps de rétention d'autres composés comme la déoxyépinéphrine pour tester un autre standard interne ([Damjanovic, 1991](#)). De plus, des kits d'extraction des catécholamines existent. Au vu des mauvais résultats de variabilités inter-essais et de l'âge de la machine, si aucune amélioration dans la séparation des molécules n'est apportée avec une autre colonne ou un autre standard interne, il pourrait être judicieux de s'intéresser à ces kits bien que leurs prix soient élevés et de réaliser une étude comparative.

4. Suite au changement de la colonne de chromatographie (après plus de 1400 injections), la ligne de base du chromatographe présentait des variations qui s'accroissaient après une injection, ce qui rendait impossible le calcul des hauteurs sans les fausser. La cellule du détecteur a été polie, l'électrode de référence a été changée malgré cela, rien n'a changé. Il s'agissait d'un défaut du détecteur électrochimique, non réparable. Donc seulement 92 animaux parmi les 120 initialement prévus ont été extraits.

Les autres données du stress de contention

Les données de génotypage ont été obtenues grâce à une puce de génotypage (version 10.2 du génome porcin, environ 64 200 marqueurs SNP, commercialisée par Illumina). Les marqueurs de cette puce sont répartis sur tout le génome porcin, à intervalle régulier, environ toutes les 28 000 bases. Le génotype des individus est obtenu à partir d'un échantillon de 200 nanogrammes d'acide désoxyribonucléique (ADN). Celui-ci est d'abord dénaturé pour permettre son amplification. Les ADN amplifiés sont ensuite soumis à une fragmentation enzymatique contrôlée pour éviter une surfragmentation des échantillons. Les fragments d'ADN sont alors hybridés sur la puce de génotypage où se trouvent les sondes des marqueurs. Les fragments non hybridés sont éliminés par lavage. L'étape d'extension de l'ADN est réalisée avec des nucléotides couplés à des fluorophores. Ces derniers sont spécifiques au nucléotide ajouté. Un seul nucléotide va être ajouté aux différents brins d'ADN. Un laser est ensuite utilisé pour exciter les fluorophores, une capture d'image est alors réalisée. Son analyse permettra de connaître le génotype des individus ([Illumina, 2009](#)).

Tableau 2 : Phénotypes étudiés et leur normalisation.

bpm : battements par minute, **IU** : unité internationale

| Symbole | Description | Unités | Normalisation | Nombre d'individus |
|-----------------------|---|--------|------------------------|--------------------|
| Lact_temps | Concentration plasmatique de lactate | mmol/L | log10(x+1), médiane | 118-120 |
| AGL_temps | Concentration d'acides gras libres dans le plasma | mmol/L | racine carrée, médiane | 118-120 |
| CK_temps | Concentration plasmatique de la créatine kinase | IU/mL | log10(x+1), médiane | 118-120 |
| Gluc_temps | Concentration plasmatique du glucose | mmol/L | médiane | 118-120 |
| cortisol_temps | Concentration plasmatique du cortisol | ng/mL | log10(x+1) | 120 |
| Activité | Somme en valeur absolue des écarts du poids par rapport au mode | g | racine carrée | 106 |
| Cardio | Réponse cardiaque aux mouvements | bpm | log10 | 105 |
| Freq_base | Fréquence cardiaque de base | bpm | | 105 |
| NA_temps | Concentration plasmatique de noradrénaline | ng/mL | log10 + 0,7 | 91-92 |
| A_temps | Concentration plasmatique d'adrénaline | ng/mL | log10 + 0,7 | 91-92 |

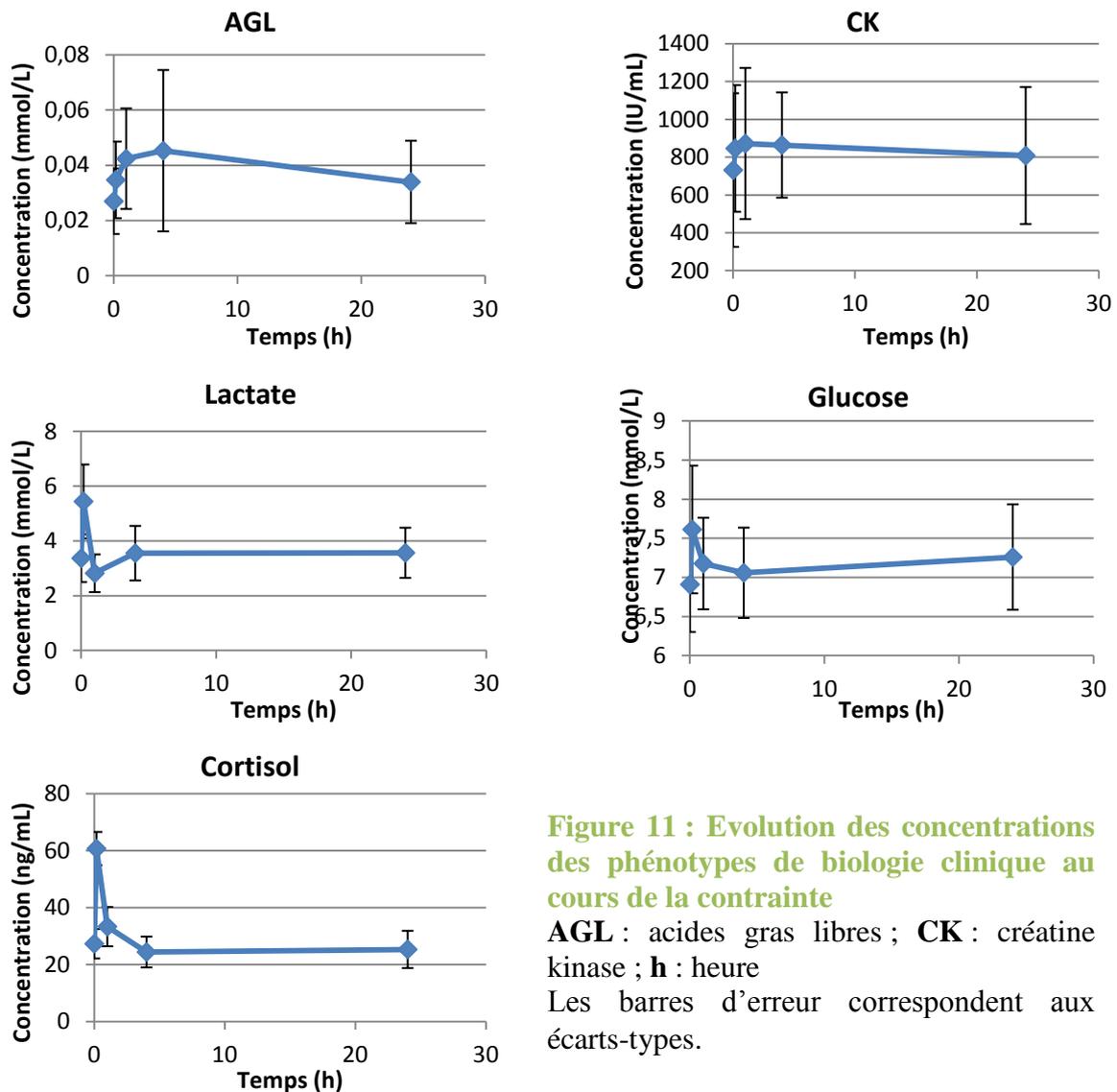


Figure 11 : Evolution des concentrations des phénotypes de biologie clinique au cours de la contrainte

AGL : acides gras libres ; **CK** : créatine kinase ; **h** : heure

Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

Les données du rythme cardiaque des animaux ont été analysées au cours de mon stage. Il s'est agi, pour chaque animal, de différencier la fréquence de base des réponses de stress. Pour cela, un polynôme du troisième degré a été calculé pour correspondre au mieux à la ligne de base grâce au logiciel Excel. Il a ensuite été soustrait à la fréquence cardiaque. La ligne de base a ensuite été centrée sur zéro et la valeur zéro a été attribuée aux points négatifs. L'ensemble des points a été sommé. La valeur retenue correspond donc à la somme des variations par rapport à la ligne de base. La **figure 10** synthétise les étapes de l'analyse. La fréquence de base a été définie comme la moyenne des fréquences cardiaques sur les deux dernières minutes de contention.

Les données d'activité physique avaient déjà été analysées. La valeur d'activité correspond à la somme en valeur absolue des écarts du poids de l'animal par rapport au mode.

Des données de biologie clinique étaient également disponibles. Les dosages de cortisol, de glucose, de lactate, de créatine kinase et d'acides gras libres dans le plasma avaient été réalisés pour les cinq temps étudiés. Ces données sont visibles sur la **figure 11**.

L'analyse statistique

La normalisation des données étudiées

Les concentrations de catécholamines plasmatiques obtenues sont comparées à des données de biologie clinique (concentrations de cortisol, glucose, acides gras libres, créatine kinase (**CK**), lactate), à des données comportementales, à des données de cardiologie (réponse cardiaque aux mouvements, rythme cardiaque au repos), à des données de génotypage. La majorité des données avait déjà été traitée puis normalisée. Les précisions de normalisation sont apportées dans le **tableau 2** qui décrit aussi les phénotypes étudiés. La fréquence de base suit une loi normale (Shapiro-Wilk, $p = 0,1141$). La réponse cardiaque aux mouvements a été normalisée par une transformation logarithmique de base 10. Cette transformation ne permettait pas d'avoir des données suivant une loi normale par le test de normalité, mais il s'agissait de la transformation qui se rapprochait le plus de cette distribution. Les données d'activité physique ont été normalisées grâce à la fonction racine carrée. Pour les données d'activité et de cardiologie, il n'a pas été nécessaire de normaliser les données par bande car les données ne présentaient pas de grandes variations entre elles. Les concentrations des catécholamines ont été normalisées par une transformation logarithmique de base 10. La normalité a été validée par le test de Kruskal-Wallis dans le cas de l'adrénaline ($p = 0,1119$). Une normalisation par bande n'a pas été nécessaire pour les données de catécholamines.

L'étude des corrélations entre les phénotypes

Pour étudier les relations entre les différents phénotypes étudiés, une analyse en composante principale a été réalisée avec les phénotypes de biologie clinique mesurés à $T = 0$ h et $T = 10$ min, avec les données d'activité physique et de cardiologie, soit 17 phénotypes au total. De plus, les corrélations de Pearson ont également été calculées avec les mêmes phénotypes. Ces analyses ont été réalisées avec le package Rcmdr et FactoMineR de R. Le seuil de significativité de l'étude de corrélation est fixé à 0,05.

L'analyse des données de génotypage

Il est à noter que l'analyse des données de génotypage à l'échelle du génome a été réalisée dans un objectif pédagogique. En effet, ce type d'analyse est difficilement réalisable avec seulement 120 animaux.

Le contrôle qualité des marqueurs et des individus

Un contrôle qualité des marqueurs SNP et des individus est réalisé pour éliminer les marqueurs SNP et les individus qui font parti d'une des catégories suivantes :

- Faible *call rate* (< 0,95) : élimination des marqueurs SNP et des individus qui ont beaucoup de données manquantes.
- Fréquence de l'allèle mineur inférieure à 5% : élimination des marqueurs SNP peu informatifs (monoallélique, fréquence de l'allèle mineur faible).
- *Identity by state (IBS)* trop élevée : élimination des individus qui ont une IBS > 0,95, c'est-à-dire des individus trop semblables.
- Hétérozygotie autosomale élevée : élimination des individus trop hétérozygotes, ce qui peut s'expliquer par des erreurs de génotypage ou des échantillons d'ADN contaminés (Aulchenko 2013).

La construction de la matrice de parenté

La matrice de parenté apporte des renseignements sur les coefficients de parenté entre les individus et sur les coefficients de consanguinité des individus. Elle est utilisée dans le modèle mixte de l'analyse d'association pour prendre en compte l'apparentement des individus. Elle a été calculée à partir des 120 animaux grâce au logiciel R (version 2.14.2), au package GenABEL et à la fonction *identity by state* de GenABEL. L'option *weight = freq* a été utilisée, elle permet de pondérer la valeur de l'IBS par la fréquence de l'allèle mineur. L'IBS est calculée entre deux individus, *i* et *j*, de la manière suivante :

$$f(i, j) = \frac{1}{N} \times \sum_k \frac{(x_{i,k} - pk) \times (x_{j,k} - pk)}{(pk \times (1 - pk))}$$

Où *N* est le nombre de marqueurs SNP, *k* varie de 1 à *N*, *x_{i,k}* est le génotype du *i*^{ème} individu au *k*^{ème} marqueur SNP codé par 0, ½ ou 1, *pk* est la fréquence de l'allèle mineur (Aulchenko 2013).

Cette fonction permet d'obtenir un tableau de 120 individus par 120 individus. Les valeurs au dessus de la diagonale correspondent au nombre de marqueurs SNP utilisés pour calculer l'IBS, les valeurs en dessous de la diagonale correspondent à l'IBS. La valeur de la diagonale pour un individu *i* est égale à :

$$\phi(ii) = 0,5 (1 + \phi(pm))$$

où $\phi(pm)$ correspond à la probabilité que deux allèles à un locus de deux individus (le père et la mère) aient la même origine. $\phi(ii)$ correspond donc à la probabilité que deux allèles à un locus chez un même individu *i* aient la même origine, il s'agit donc d'un coefficient de consanguinité. Plus cette valeur est élevée, plus l'individu est homozygote, plus son taux de consanguinité est fort (Laloë, Allais, 2013). Une représentation graphique de la matrice de parenté a été réalisée (figure 14). Il suffit de transformer la matrice en matrice de distance puis de réaliser une analyse en coordonnées principales (Aulchenko 2008).

L'analyse d'association à l'échelle du génome et l'approche par gènes candidats

L'analyse d'association à l'échelle du génome (GWAS) a été réalisée à partir de tous les marqueurs SNP disponibles sur la puce. Les données de génotypage proviennent des 120 animaux de la génération G0. L'objectif est d'étudier l'association entre les marqueurs SNP et nos phénotypes mesurés à différents temps (biologie clinique, comportement, cardiologie, hormones de stress). Comme le nombre de tests statistiques réalisés est multiple, la correction de Bonferroni est appliquée. Le seuil de significativité de l'association est égal à 0,05 divisé par le nombre de test, soit 5×10^{-8} (Debette et al, 2013 ; Blum et al., 2012).

Les données de la puce de génotypage ont ensuite été étudiées pour un nombre réduit de gènes candidats. Comme première approche, nous avons choisi trois gènes liés au fonctionnement du système nerveux autonome, la phényl-éthanolamine-N-méthyltransférase (PNMT), la dopamine β hydroxylase (DBH) et le récepteur D3 à la dopamine (DRD3). Le

Tableau 3 : Localisation des gènes et des marqueurs SNP étudiés

| Nom du gène | Fonction du gène | Symbole | Localisation (PubMed) | Nombre de marqueurs SNP étudiés | |
|---|--|---------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------|
| | | | | dans le gène | près du gène |
| Phényléthanolamine N-méthyltransférase | Enzyme de la synthèse des catécholamines | PNMT | Chromosome: 12; 23110418 à 23111803 | 0 | 3 |
| Dopamine bêta-hydroxylase | Enzyme de la synthèse des catécholamines | DBH | Chromosome: 1; 307178237 à 307198988 | 1 | 8 |
| Récepteur D3 de la dopamine | Récepteur à la dopamine | DRD3 | Chromosome: 1; 17934 à 46879 | 5 | 0 |

Tableau 4 : Marqueurs SNP étudiés

PNMT :phényl-éthanolamine-N-méthyltransférase, **DBH** : la dopamine β -hydroxylase, **DRD3** : récepteur D3 de la dopamine.

La localisation et la position des marqueurs SNP sur le génome proviennent de la carte du génome porcine (version 10.2). Le polymorphisme est celui observé sur nos animaux.

| Marqueur SNP | Gène | Distance au gène (bases) | Chromosome | Position sur le chromosome | Polymorphisme |
|--------------------|------|--------------------------|------------|----------------------------|---------------|
| ALGA0010985 | DBH | 98267 | 1 | 307297255 | A/G |
| ALGA0010988 | DBH | 75367 | 1 | 307274355 | A/G |
| ALGA0110895 | DBH | 117539 | 1 | 307060698 | C/T |
| ASGA0008215 | DBH | 0 | 1 | 307192626 | A/G |
| H3GA0005335 | DBH | 39607 | 1 | 307138630 | A/G |
| H3GA0055344 | DBH | 171752 | 1 | 307006485 | A/C |
| M1GA0001985 | DBH | 12281 | 1 | 307165956 | C/T |
| M1GA0002101 | DBH | 127220 | 1 | 307326208 | A/G |
| MARC0056609 | DBH | 127415 | 1 | 307050822 | A/G |
| ALGA0106802 | DRD3 | 0 | 1 | 20314 | C/T |
| ALGA0112556 | DRD3 | 0 | Inconnu | 22518 | C/T |
| ASGA0056161 | DRD3 | 0 | Inconnu | 24812 | A/C |
| ASGA0084499 | DRD3 | 0 | Inconnu | 22901 | C/T |
| MARC0022133 | DRD3 | 0 | Inconnu | 38367 | A/G |
| DRGA0008232 | PNMT | 3839 | Inconnu | 23115642 | G/A |
| M1GA0016423 | PNMT | 4609 | 12 | 23116412 | C/T |
| MARC0039999 | PNMT | 1444 | Inconnu | 23113247 | A/C |

tableau 3 précise la localisation des gènes et le nombre de marqueurs SNP étudiés pour chacun d'entre eux. Dix-sept polymorphismes mononucléotidiques (**SNP**), localisés dans ou près des gènes d'intérêt ont été sélectionnés. Les marqueurs SNP à proximité des gènes sont intéressants à étudier car la localisation des gènes peut varier d'une version du génome du porc à l'autre. En effet, l'assemblage du génome porcin n'est pas complètement terminé et les erreurs persistent. Ainsi, des marqueurs localisés à proximité d'un gène dans une version du génome peuvent être situés dans le gène dans une autre version. De plus, ces marqueurs SNP peuvent se trouver dans des zones régulatrices, dont la distance au gène est très variable et qui influencent l'expression des gènes. Les marqueurs SNP étudiés sont présentés dans le **tableau 4**. La localisation des gènes provient des bases de données du National Center for Biotechnology Information (**NCBI**) et d'Ensembl. La localisation des marqueurs SNP provient de la carte du génome porcin (version 10.2).

Des problèmes ont été rencontrés à cause d'une mauvaise annotation du génome porcin. Certains marqueurs SNP dont la position sur le génome coïncidait avec la position du gène étaient situés sur un chromosome différent de celui du gène. Ainsi, nous avons choisi d'exclure ces marqueurs SNP de l'analyse. De plus, certains marqueurs SNP dont la position est connue sur le génome n'ont pas réussi à être localisés sur un chromosome, ce qui peut paraître surprenant. Il s'agit encore de problèmes d'annotation du génome. Ces marqueurs ont été toutefois conservés dans l'attente d'une nouvelle version du génome. Pour cette analyse statistique, le seuil de significativité de l'association est fixé à 0,05.

Le principe de l'analyse d'association

Le principe de l'analyse est le même pour les deux approches citées précédemment, seul le nombre de marqueurs SNP étudiés change.

Le package GenABEL de R est utilisé pour faire une analyse d'association phénotype par phénotype. Une analyse d'association est utilisée du fait de la structuration de nos individus. Il s'agit en effet d'une population, constituée de plusieurs familles d'animaux. L'analyse d'association permet aussi de prendre en compte l'apparentement entre les individus contrairement à une analyse de variance classique. L'analyse réalisée est de type **GRAMMAR** (Genome-wide Rapid Association using Mixed Model and Regression), il s'agit d'une méthode d'étude d'associations à l'échelle du génome qui utilise le modèle mixte et la régression. L'objectif est de tester l'effet d'un marqueur SNP sur un phénotype, après que l'effet du marqueur SNP ait été corrigé par une estimation de l'effet polygénique. Cette méthode est plus rapide que l'approche **FASTA** (FAMILY-based Score Test for Association), mais peut conduire à des estimateurs biaisés et à des faux négatifs (Allais, 2013 ; Amin, van Duijn, Aulchenko, 2007 ; Aulchenko, 2012 ; Teyssèdre, Elsen, Ricard, 2012).

La régression est étudiée entre les différents génotypes (AA, AB ou BB) d'un marqueur SNP pour un phénotype donné, elle suit le modèle suivant :

$$y(i) = \mu + \beta x(i) + e(i)$$

Où $y(i)$ est la performance de l'individu i , μ est la moyenne des performances dans la population, $x(i)$ est la variable qui code le nombre d'allèles B (soit 0, 1 ou 2) dans le génotype de l'individu i , β est le coefficient de régression, e est l'erreur résiduelle (Allais, 2013). L'égalité du coefficient de régression avec zéro est testée.

L'analyse repose sur le modèle linéaire mixte suivant :

$$Y = \mu + X \beta + Zu + e$$

Où Y est le vecteur des n performances, n étant le nombre d'individus, X est le vecteur des

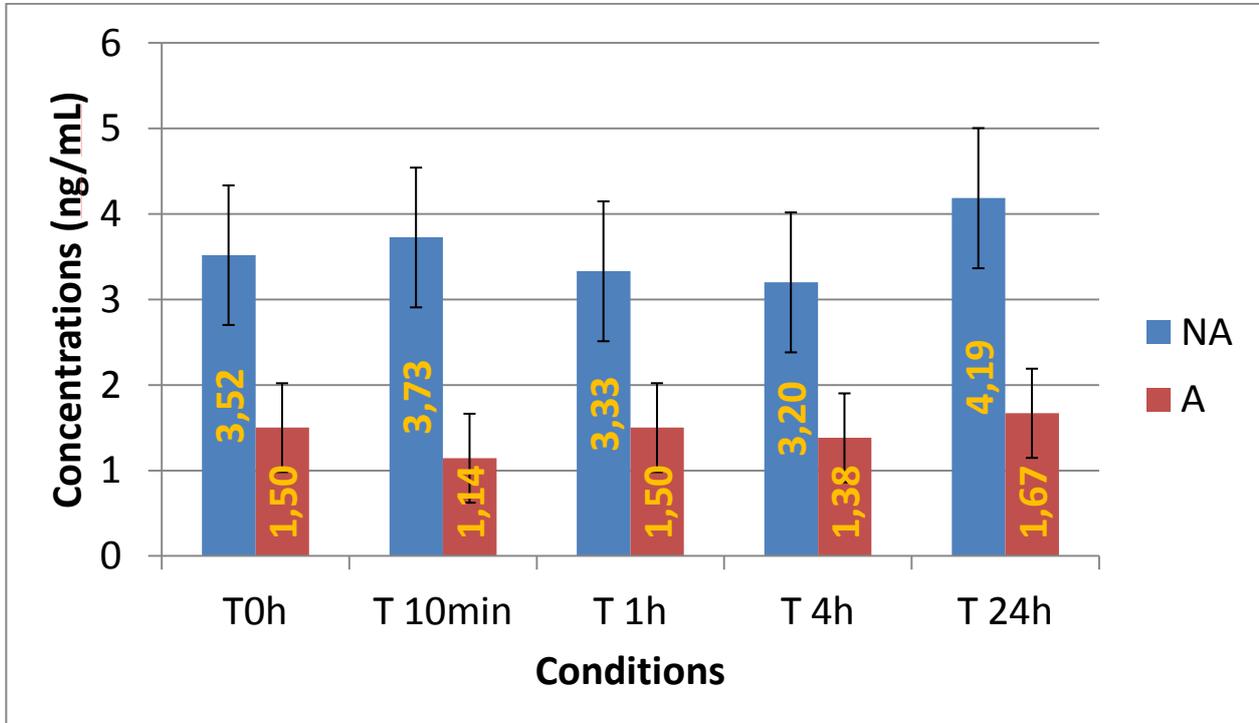


Figure 12 : Réponses du système nerveux autonome au stress de contrainte

h : heure, **NA** : noradrénaline, **A** : adrénaline

Les histogrammes correspondent aux moyennes des concentrations obtenues sur 92 animaux aux temps donnés. Les barres d'erreur représentent les écarts-types.

génotypes des n individus pour un marqueur SNP donné, Z est la matrice qui associe les phénotypes et les individus, μ est la moyenne des performances dans la population, β est le vecteur des coefficients de régression, u est le vecteur qui prend en compte la matrice de parenté, e est un vecteur des résidus (Allais, 2013).

Concrètement, la fonction *polygenic* de GenABEL est utilisée pour déterminer l'influence du génotype sur le caractère, une valeur résiduelle est obtenue sur laquelle la fonction *qtscore* est appliquée. Les marqueurs SNP significativement associés au phénotype sont obtenus. Enfin, le *Manhattan plot* est construit pour l'analyse d'association à l'échelle du génome. Ce graphique représente les probabilités d'association des marqueurs SNP avec le phénotype étudié selon leur localisation sur le génome. Une association avec le phénotype est repérée par la présence d'un signal, c'est-à-dire par la présence d'une région chromosomique associée au phénotype. Le script utilisé est disponible en **Annexe 2**.

Résultats et discussions

La quantification des catécholamines plasmatiques

L'étude de la variabilité intra et inter-essais

La variabilité intra-essai décrit la variabilité des résultats issus d'une même expérience. Elle est calculée à partir d'un pool de plasmas prélevés une heure après une injection d'ACTH chez des individus qui répondent faiblement à ce stimulus, il s'agit donc de pools « bas ». Le calcul du coefficient de variation (écart-type/moyenne) se base sur l'extraction en duplicat de ces plasmas lors de séries d'extractions à quatre dates différentes. Le coefficient de variation intra-essai pour la noradrénaline est de 2,6 % et celui pour l'adrénaline de 4,4 %. Ces coefficients sont faibles, ce qui signifie que les concentrations des deux duplicats sont très proches. L'extraction, l'injection, la séparation et l'intégration des échantillons sont équivalentes pour tous les tubes d'une même série.

La variabilité inter-essai est l'estimation de la variabilité des résultats sur une plus longue échelle de temps. Elle est calculée à partir d'un pool « bas » et d'un pool « haut » extraits en duplicats lors de séries d'extraction à six dates différentes. Les coefficients de variations inter-essais pour les pools « haut » sont de 22,4 % pour la noradrénaline et de 38,3 % pour l'adrénaline. Pour les pools « bas », les coefficients sont de 11,9 % pour la noradrénaline et de 34,1 % pour l'adrénaline. En moyenne, le coefficient de variation inter-essais de la noradrénaline est de 17,1 % et de 36,2 % pour l'adrénaline, ce qui reste élevé. Ces coefficients pourraient s'expliquer par la mauvaise séparation des molécules d'intérêt et des pics parasites. Le calcul des hauteurs a ainsi pu être moins précis ce qui aurait conduit à mesurer des concentrations différentes. Des solutions d'extraction ont été re préparées au cours de la période de laboratoire, cependant les solutions d'extraction, la présence d'une interface blanche et l'efficacité d'extraction plus globalement ne peuvent pas avoir influencé les concentrations des catécholamines puisque celles-ci sont calculées à partir d'un standard interne qui suit la même procédure d'extraction.

Les réponses des catécholamines au stress de contrainte

Les résultats des dosages sont présentés sur la **figure 12**. Les concentrations plasmatiques d'adrénaline mesurées sont inférieures à celles de la noradrénaline. En effet, en moyenne la concentration d'adrénaline est de 1,44 contre 3,59 ng/mL pour la noradrénaline. De plus, à $t = 0h$, les concentrations des catécholamines sont de 3,52 ng/mL et de 1,5 ng/mL pour la noradrénaline et l'adrénaline respectivement. Ces valeurs sont proches de celles mesurées 10 minutes après le début du stress (3,73 ng/mL pour la noradrénaline et 1,14 ng/mL pour l'adrénaline), et même supérieures dans le cas de l'adrénaline, ce qui suggère que

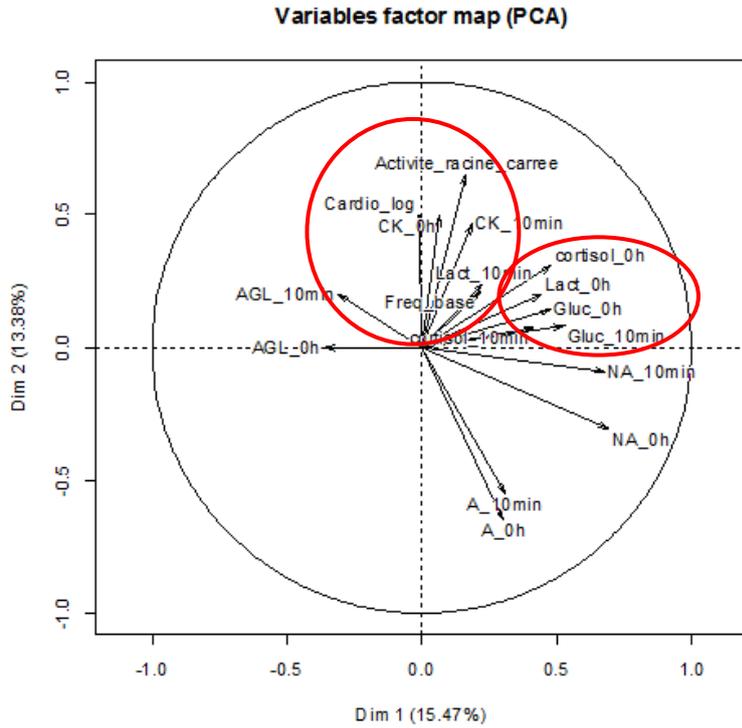


Figure 13 : Cercle des corrélations

Lact : lactate, **Gluc** : glucose, **AGL** : acides gras libres, **CK** : créatine kinase, **NA** : noradrénaline, **A** : adrénaline, **Freq_base** : rythme cardiaque de base, **Cardio** : réponse cardiaque aux mouvements

Tableau 5 : Corrélations de Pearson calculées entre les phénotypes avant et après le stress

Lact : lactate, **Gluc** : glucose, **AGL** : acides gras libres, **CK** : créatine kinase, **NA** : noradrénaline, **A** : adrénaline, **Freq_base** : rythme cardiaque de base, **Cardio** : réponse cardiaque aux mouvements, **CO** : cortisol.

Les corrélations suivies d'une étoile (*) sont significatives ($p < 0,05$), celles suivies de deux étoiles (***) suivent des tendances ($p < 0,10$).

| | A_0h | Activité | AGL_0h | Cardio | CK_0h | CO_0h | Freq | Gluc_0h | Lact_0h | NA_0h |
|-----------|---------|----------|---------|--------|--------|---------|--------|---------|---------|-------|
| A_0h | 1,000 | | | | | | | | | |
| Activité | -0,343* | 1,000 | | | | | | | | |
| AGL_0h | -0,034 | -0,068 | 1,000 | | | | | | | |
| Cardio | -0,125 | 0,566* | -0,037 | 1,000 | | | | | | |
| CK_0h | -0,284* | 0,166 | 0,182 | -0,120 | 1,000 | | | | | |
| CO_0h | 0,061 | 0,147 | -0,115 | 0,097 | 0,199 | 1,000 | | | | |
| Freq_base | -0,148 | 0,310* | 0,010 | 0,083 | 0,064 | 0,249* | 1,000 | | | |
| Gluc_0h | 0,021 | 0,096 | -0,241* | -0,018 | -0,099 | 0,227** | 0,358* | 1,000 | | |
| Lact_0h | -0,108 | 0,211 | -0,314* | 0,062 | 0,199 | 0,204** | 0,103 | 0,255* | 1,000 | |
| NA_0h | 0,424* | -0,220 | -0,237 | -0,196 | -0,045 | 0,051 | 0,127 | 0,214 | 0,186 | 1,000 |

| | A_10min | Activité | AGL_10min | Cardio | CK_10min | CO_10min | Freq | Gluc_10min | Lact_10min | NA_10min |
|------------|---------|----------|-----------|--------|----------|----------|--------|------------|------------|----------|
| A_10min | 1,000 | | | | | | | | | |
| Activité | -0,107 | 1,000 | | | | | | | | |
| AGL_10min | -0,112 | 0,138 | 1,000 | | | | | | | |
| Cardio | -0,092 | 0,566* | 0,099 | 1,000 | | | | | | |
| CK_10min | -0,210 | 0,106 | -0,117 | 0,153 | 1,000 | | | | | |
| CO_10min | 0,180 | 0,200 | 0,046 | 0,073 | -0,045 | 1,000 | | | | |
| Freq_base | -0,210 | 0,310* | 0,057 | 0,083 | 0,064 | 0,130 | 1,000 | | | |
| Gluc_10min | 0,044 | 0,016 | -0,324* | -0,020 | 0,156 | 0,149 | 0,238 | 1,000 | | |
| Lact_10min | 0,045 | 0,215 | -0,057 | 0,302* | 0,090 | -0,088 | -0,184 | 0,043 | 1,000 | |
| NA_10min | 0,433* | 0,171 | -0,170 | 0,027 | -0,014 | 0,131 | 0,168 | 0,221 | 0,120 | 1,000 |

nos animaux sont déjà en situation de stress à $T = 0h$. Enfin, au cours des prélèvements successifs, les concentrations plasmatiques des catécholamines varient peu ce qui souligne que nos animaux sont dans le même état de stress quels que soient les temps étudiés. Les différences de concentrations entre la noradrénaline et l'adrénaline, observées dans nos résultats sont aussi décrites dans la littérature (Rosochacki et al., 2000 ; Neubert et al., 1996 ; Williams et al., 2009). En situation basale, les concentrations plasmatiques d'adrénaline et de noradrénaline ne dépassent pas 0,2 ng/mL et 1,3 ng/mL pour l'adrénaline et la noradrénaline respectivement (Rosochacki et al., 2000 ; Neubert et al., 1996 ; Williams et al., 2009). Nos concentrations de base sont largement supérieures à ces valeurs ce qui confirme que les animaux de notre étude sont déjà dans un état de stress. En situation post-stress, dans l'étude de Rosochacki et al. (2000), 5 minutes après le début de la contrainte, la concentration plasmatique d'adrénaline est maximale, elle est 3,4 fois plus élevée que celle des individus témoins. La concentration plasmatique de noradrénaline augmente aussi de 2,4 fois après la contrainte. De même, dans l'étude de Neubert et al. (1996), les concentrations plasmatiques d'adrénaline augmentent fortement après la contrainte. Elles varient de 0,088 à 2,264 ng/mL pour l'adrénaline et de 0,2 à 7,73 ng/mL pour la noradrénaline. Nos résultats sont en contradiction avec ces données puisque de telles variations ne sont pas détectées. Les concentrations de base élevées et l'absence de grandes variations de concentrations s'expliquent par l'absence de cathéters posés sur nos animaux et par la légère contrainte imposée au moment de la ponction. Dans notre protocole de prélèvement sanguin, les animaux sont attrapés puis soumis à une contention légère le temps de la prise de sang. L'inconvénient majeur de ce protocole repose sur les réponses très rapides du système nerveux autonome. En effet, quelques secondes suffisent à la libération de catécholamines dans le sang (Sapolsky et al., 2000). Ces manipulations suffisent donc à libérer des hormones dans le sang, ce qui explique alors les concentrations de base élevées. Les données de la littérature sont obtenues chez des animaux munis de cathéters et non manipulés pour la prise de sang, c'est pourquoi les concentrations de base mesurées dans ces études sont plus faibles que les nôtres. L'installation de cathéters sur nos animaux auraient sûrement permis d'observer des variations, cependant ceci n'était pas réalisable sur 120 animaux.

Les relations entre les phénotypes étudiés

Le cercle des corrélations obtenu grâce à l'analyse en composante principale est présenté sur la **figure 13**. 29% de la variabilité des données est représentée dans le plan, ce qui est relativement peu important au regard du nombre de phénotypes étudiés (17 phénotypes). De plus, des liaisons entre les variables sont visibles sur cette représentation. En effet, l'activité physique, la réponse cardiaque aux mouvements et les concentrations de créatine kinase à 0 h et 10 minutes sont liées. En revanche, la mauvaise représentation de la fréquence cardiaque dans ce plan ne permet pas d'affirmer une liaison avec ces variables. Les concentrations de cortisol, de glucose et de lactate sont également liées. Il est également possible de noter la liaison entre les concentrations d'une même molécule mesurées avant et après le stress.

De plus, l'analyse des corrélations de Pearson, dont les résultats sont présentés dans le **tableau 5** et les graphiques disponibles en **Annexe 3**, conforte la liaison détectée par la précédente analyse entre l'activité physique et la réponse aux mouvements (probabilité (p) < 0,00001). Une corrélation entre l'activité et la fréquence cardiaque est également détectée ($p = 0,01$). Cependant, la corrélation entre ces variables et la concentration de la créatine kinase n'est pas significative quelle que soit la période étudiée. La corrélation entre les concentrations basales de lactate et de glucose est également significative ($p = 0,036$), mais ne l'est plus en post-stress. La corrélation entre les concentrations de cortisol et de ces deux métabolites n'est pas significative, mais suit une tendance ($p < 0,1$). En revanche, la

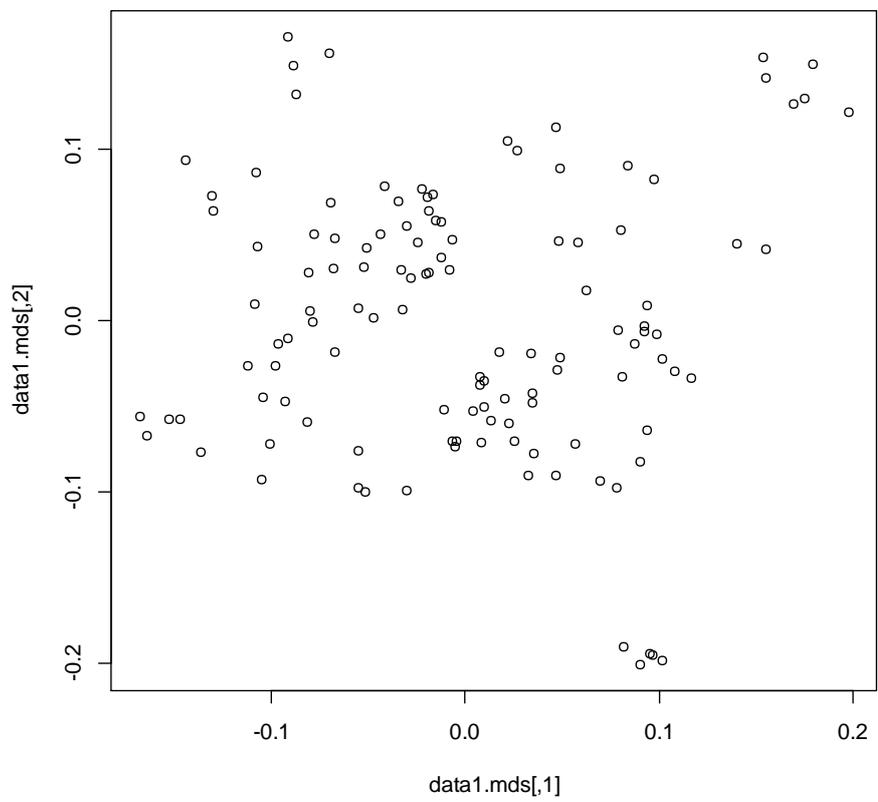


Figure 14 : Représentation graphique de l'apparement entre les individus

Tableau 6 : Localisation des marqueurs SNP détectés par l'analyse d'association

NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, **ATP** : adénosine triphosphate, **Lact** : lactate, **Gluc** : glucose, **AGL** : acides gras libres, **CK** : créatine kinase,

à l'échelle du génome et fonctions des gènes associés.
NA : noradrénaline, **A** : adrénaline, **Fréquence** : rythme cardiaque de base, **ARNnc** : ARN non codant, **ARNsn** : petits ARN nucléaires

| Phénotype | Marqueurs SNP du signal | Localisation | Fonction du gène (PubMed) |
|-------------|-------------------------|--------------|--|
| Cortisol_1h | DIAS0000242 | UNC45b | organisation des sarcomères |
| Lact_0h | H3GA0056153 | intergénique | |
| Lact_0h | M1GA0027173 | FBXO31 | complexe d'ubiquitination, régulation du cycle cellulaire, migration neuronale, croissance des dendrites |
| Lact_1h | ASGA0002403 | intergénique | |
| Lact_1h | ALGA0093561 | intergénique | |
| Lact_4h | ASGA0015717 | intergénique | |
| Gluc_0h | ALGA0089702 | intergénique | |
| Gluc_4h | H3GA0040460 | intergénique | |
| Gluc_24h | H3GA0055349 | ME3 | Enzyme malique, transformation du malate en pyruvate, réduction de la NADP |
| Gluc_24h | ALGA0110315 | ME3 | |
| AGL_0h | H3GA0053778 | EXPH5 | Transport de vésicules intracellulaires, lien avec les maladies de peau |
| AGL_1h | ASGA0104182 | LOC102158410 | ARNnc |
| AGL_4h | ALGA0010487 | intergénique | |
| AGL_4h | ASGA0096954 | intergénique | |
| AGL_24h | ASGA0101788 | IMMP2L | Protéine mitochondriale, activité catalytique, appartient au complexe de peptidases de la membrane interne |
| AGL_24h | ALGA0105002 | IMMP2L | |
| CK_10min | ALGA0005334 | LOC102163444 | ARNnc |
| CK_1h | H3GA0010704 | intergénique | |
| CK_1h | H3GA0010729 | TTC32 | association avec les maladies coronar-artérielles? |
| CK_24h | DRGA0004499 | ZHX1 | facteur de transcription |
| Activité | ALGA0090780 | LOC102157741 | ARNnc |
| Activité | ALGA0090769 | intergénique | |
| Activité | ALGA0090781 | intergénique | |
| Fréquence | ASGA0023762 | intergénique | |
| Fréquence | ASGA0100675 | intergénique | |
| Fréquence | M1GA0024473 | intergénique | |
| Fréquence | ASGA0105361 | intergénique | |
| Fréquence | ALGA0122740 | intergénique | |
| NA_0h | H3GA0031450 | intergénique | |
| NA_0h | ASGA0050023 | intergénique | |
| NA_0h | DIAS0000341 | INTS6 | hélicase, suppresseur de tumeurs, interagit avec l'ARN polymérase II, production d'ARNsn |
| NA_0h | M1GA0015002 | LOC102163801 | |
| NA_10min | ASGA0071854 | LOC102163854 | ARNnc |
| NA_10min | H3GA0045759 | LOC102163854 | ARNnc |
| NA_4h | ALGA0105659 | intergénique | |
| NA_4h | ALGA0033599 | LOC102161182 | ARNnc |
| NA_4h | ALGA0033600 | LOC102161182 | ARNnc |
| NA_24h | H3GA0046635 | intergénique | |
| NA_24h | ALGA0105383 | ERGIC1 | protéine membranaire du réticulum endoplasmique-Golgi, interaction avec d'autres protéines de la même famille pour augmenter leur turnover |
| NA_24h | ASGA0100680 | ERGIC1 | |
| A_0h | ALGA0062615 | LOC102164643 | ARNnc |
| A_10min | ALGA0039649 | intergénique | |
| A_10min | H3GA0053666 | intergénique | |
| A_10min | ALGA0118740 | intergénique | |
| A_10min | ALGA0040739 | intergénique | |
| A_4h | INRA0025193 | CUL9 | cytoplasme, liaison à l'ATP, ubiquitination des protéines |
| A_4h | ALGA0040937 | intergénique | |
| A_24h | H3GA0036713 | intergénique | |
| A_24h | ALGA0113729 | intergénique | |
| A_24h | ASGA0102940 | intergénique | |
| A_24h | ALGA0051672 | intergénique | |

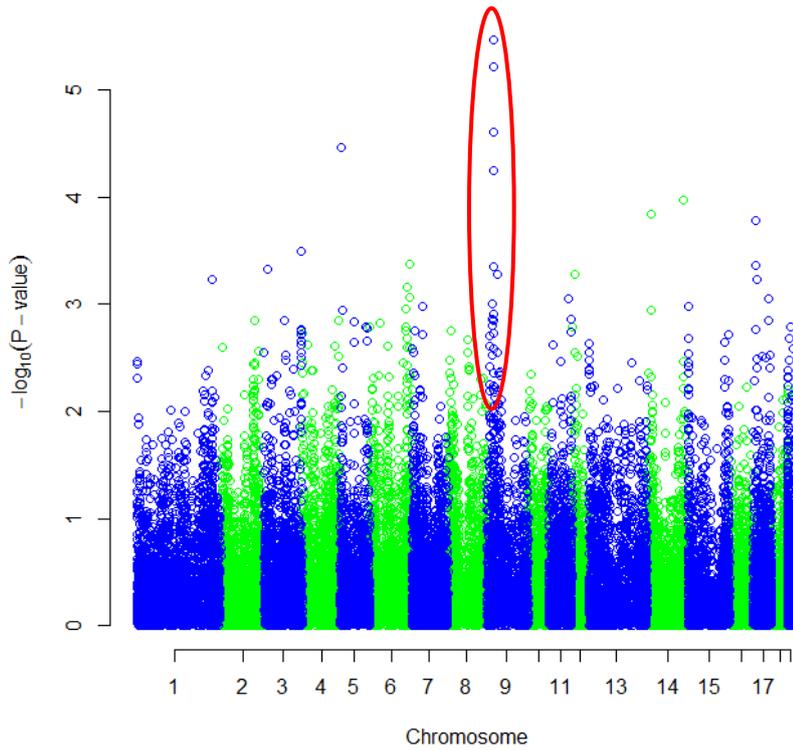


Figure 15 : Détection d'un signal sur le Manhattan Plot associé à la concentration de glucose à 24 heures

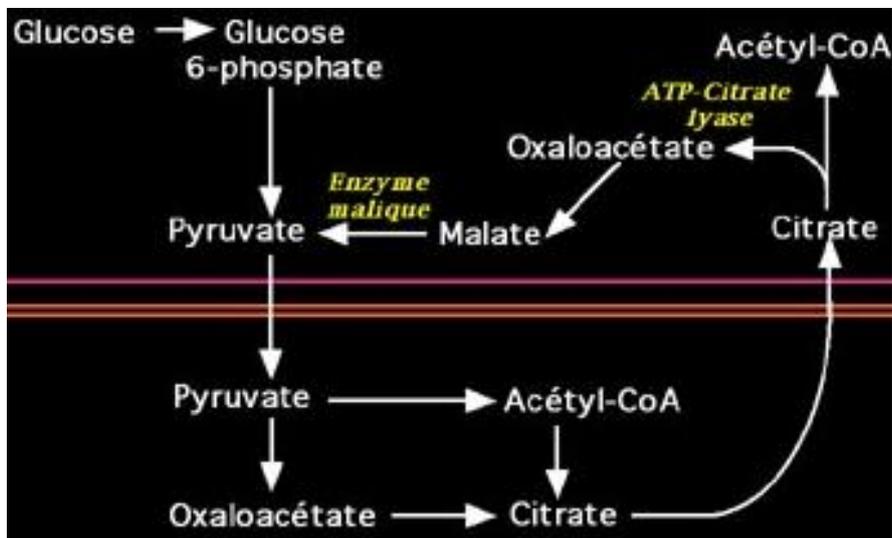


Figure 16 (source : Faculté de médecine Pierre et Marie Curie (2012b)): Cycle de Lardy : lien entre le glucose et l'enzyme malique

ATP : adénosine triphosphate, Acétyl-CoA : acétyl Coenzyme A

concentration basale de cortisol est significativement corrélée à la fréquence cardiaque, qui est elle-même corrélée avec la concentration basale de glucose. L'analyse des corrélations permet d'obtenir d'autres renseignements. Les concentrations d'adrénaline et de noradrénaline sont corrélées positivement de manière significative avant et après le stress. Les concentrations basales des métabolites glucidiques et des acides gras libres sont corrélées négativement.

La liaison et les corrélations entre l'activité physique, la réponse cardiaque aux mouvements, la concentration de la créatine kinase dans le plasma et la fréquence cardiaque de base sont intéressantes. En effet, suite à un effort physique la fréquence cardiaque augmente proportionnellement à l'effort réalisé (Tuttle, 1931). De plus, l'activité est liée à la concentration de la créatine kinase. Les résultats de corrélation entre ces deux variables ne sont pas significatifs dans notre étude. En revanche, l'étude de Schneider et al. (1995) confirme l'existence d'un lien entre l'activité physique et la concentration de la créatine kinase. Enfin, la liaison et les corrélations entre les concentrations de cortisol, de glucose et de lactate sont intéressantes. En effet, le cortisol stimule le métabolisme glucidique notamment la néoglucogenèse (Nussey et Whitehead, 2001) et le glucose peut conduire à la formation de lactate suite à la glycolyse et à la fermentation lactique. Les phénotypes impliqués dans ces corrélations et ces liaisons seront étudiés plus particulièrement dans l'analyse d'association.

Le contrôle génétique des phénotypes

La matrice de parenté et le contrôle qualité

Le graphe en **figure 14** représentant la matrice de parenté permet de vérifier l'absence de sous-structure génétique au sein de la population, il n'est donc pas nécessaire d'éliminer des individus. Le contrôle qualité conserve 43660 marqueurs SNP sur les 62 000 de départ (marqueurs SNP présents sur les autosomes) et les 120 individus. 6000 marqueurs sont éliminés à cause de leur faible *call rate*, 13 000 marqueurs SNP sont exclus à cause de la faible fréquence de leur allèle mineur. Dans le cas de l'analyse par gènes candidats, le contrôle qualité écarte 5 marqueurs SNP parmi les 17 marqueurs SNP de départ.

Les résultats de l'analyse à l'échelle du génome

Avec le seuil de significativité de 5×10^{-8} , aucun marqueur SNP n'a été trouvé comme significativement associé à l'un de nos phénotypes ($p > 10^{-7}$ pour tous les phénotypes). Cette absence de résultat s'explique par le faible nombre d'individus dans notre population. Généralement, plusieurs centaines d'individus sont nécessaires pour obtenir des résultats robustes. Toutefois, il est possible de détecter des tendances en observant la présence de signaux sur les *Manhattan plot* obtenus au cours de l'analyse d'association. Pour chaque phénotype étudié, des signaux ont donc été recherchés. Lorsqu'un signal est observé, la localisation des marqueurs SNP les plus associés au phénotype est recherchée plus précisément dans les bases de données spécifiques au génome (PubMed, Ensembl). Si un marqueur SNP se situe dans un gène, la fonction de ce dernier est recherchée pour déterminer son implication dans le phénotype. Les résultats de cette étude sont présentés dans le **tableau 6**. Certains marqueurs SNP qui semblent appartenir à des signaux sont localisés dans des régions intergéniques, à distance de gènes. Il est donc impossible d'émettre une hypothèse quant à l'intérêt de ces signaux. D'autres marqueurs SNP sont présents dans des gènes. Cependant, la fonction de la majorité de ces gènes ne semble pas présenter de lien avec le phénotype observé. Certains gènes ont une action trop imprécise (facteurs de transcription, transport de vésicules) ou sont liés à des pathologies qui ne présentent pas de lien avec le phénotype. Comme les résultats de l'analyse d'association ne sont pas significatifs, aucun signal n'est vraiment très marqué. Il faut donc en conclure que les signaux qui paraissaient intéressants ne le sont pas en réalité. Cependant, dans le cas du glucose à 24 h, un signal sur le chromosome 9 semble clairement se différencier des autres. Le *Manhattan plot* associé à ce

Tableau 7 : Effets des allèles aux marqueurs sur la valeur du phénotype

A : adrénaline, **NA** : noradrénaline, **AGL** : acides gras libres, **CK** : créatine kinase, **Lact** : lactate, **Fréquence** : fréquence cardiaque de base

| Phénotype | Marqueur SNP | Allèle | Effet de l'allèle sur la valeur du phénotype |
|-----------------------|--------------|--------|--|
| A_0h | ALGA0010988 | A | -0,1 |
| A_0h | M1GA0002101 | G | -0,11 |
| A_24h | MARC0039999 | C | -0,19 |
| NA_0h | MARC0022133 | G | 0,07 |
| NA_1h | ALGA0010985 | A | 0,05 |
| NA_1h | MARC0039999 | C | -0,05 |
| NA_4h | MARC0039999 | C | -0,06 |
| NA_4h | ASGA0084499 | T | -0,05 |
| NA_24h | MARC0039999 | C | -0,1 |
| Cortisol_10min | M1GA0016423 | C | 0,04 |
| Cortisol_10min | MARC0039999 | C | 0,04 |
| Cortisol_1h | M1GA0016423 | C | 0,09 |
| AGL_10min | H3GA0005335 | G | 0,03 |
| CK_0h | DRGA0008232 | A | 0,1 |
| CK_24h | MARC0039999 | C | -0,17 |
| Gluc_10min | M1GA0016423 | C | 0,67 |
| Gluc_1h | H3GA0005335 | G | -0,25 |
| Lact_0h | M1GA0016423 | C | 0,07 |
| Lact_10min | M1GA0016423 | C | 0,08 |
| Lact_1h | ALGA0010988 | A | -0,03 |
| Lact_1h | M1GA0002101 | G | -0,03 |
| Lact_4h | MARC0039999 | C | 0,06 |
| Fréquence | MARC0022133 | G | 8,8 |
| Activité | M1GA0016423 | C | 0,37 |

phénotype est présenté dans la **figure 15**. Deux marqueurs SNP (H3GA0055349 et ALGA0110315) de ce signal se localisent dans le gène de l'enzyme malique, enzyme qui permet la formation de pyruvate à partir de malate et la réduction de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (**NADP**) en NADPH lors du cycle de Lardy, schématisé dans la **figure 16** (*Faculté de médecine Pierre et Marie Curie, 2012a*). Cette enzyme intervient donc dans le métabolisme glucidique. Cette association est donc intéressante, cependant pour la valider il faudrait reconduire l'analyse avec plus d'individus. Cela permettrait peut-être au signal de passer le seuil de significativité. Cette approche ne permet donc pas d'apporter d'éclaircissements quant aux réponses des phénotypes au stress de contrainte.

Les résultats de l'approche par gènes candidats

Parmi les 12 marqueurs SNP qui ont passé le contrôle qualité, 9 sont significativement associés à au moins un des phénotypes étudiés. Les résultats des effets des allèles au marqueur pour chaque phénotype sont présentés dans le **tableau 7**. Dans cette partie, seuls les résultats des phénotypes qui ont montré une liaison ou une corrélation avec d'autres phénotypes seront étudiés. Chaque couple phénotype-temps a été étudié, les résultats des analyses ont été combinés par phénotype pour simplifier la lecture.

Le cas de la fréquence cardiaque, de l'activité et de la créatine kinase

Le marqueur SNP MARC0022133 ($p = 0,016$) du gène de la DRD3 est significativement associé à la fréquence cardiaque au repos. Le gène de la DRD3 a déjà montré des effets sur le système cardiovasculaire. En effet, des souris knockout pour le gène du récepteur à la dopamine D3 présentaient une fréquence cardiaque plus élevée que leurs congénères sauvages au même âge (*Johnson et al., 2013*). Ainsi, l'association entre le gène de la DRD3 et la fréquence cardiaque est vérifiée par la littérature. Cependant, aucun marqueur SNP n'a été détecté comme étant associé à la valeur de la réponse de l'activité cardiaque aux mouvements de l'animal.

Le marqueur SNP M1GA0016423 ($p = 0,049$) du gène de la PNMT est significativement associé à l'activité physique des animaux pendant la contrainte. Une expérience conduite sur des souris knock-out pour le gène de la PNMT, a comparé l'activité comportementale (distances parcourues par les souris dans une cage) de ces animaux avec des animaux témoins. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les deux groupes (*Toth et al., 2013*). Nos résultats semblent donc en désaccords avec ces données. Davantage d'investigations sont nécessaires pour mieux comprendre cette association.

Les marqueurs SNP DRGA0008232 ($p = 0,049$) et MARC0039999 ($p = 0,009$) sont associés aux concentrations de créatine kinase dans le plasma. Ces marqueurs SNP sont localisés près du gène de la PNMT. La créatine kinase est une enzyme qui permet de restaurer l'ATP à partir d'adénosine diphosphate (**ADP**) au cours d'une activité musculaire. Elle participe donc au maintien de l'activité du muscle (*Université de Cornell, 2011*). L'adrénaline et la noradrénaline ont montré leurs capacités à inactiver l'enzyme lors d'un stress oxydatif (*Miura et al., 1999*). Cependant, ces résultats n'indiquent rien quant à leurs effets sur les concentrations de l'enzyme, ce qui laisse suggérer l'existence d'une autre explication. En effet, l'activité physique modifie la concentration plasmatique et l'activité de la créatine kinase (*Schneider et al., 1995*).

A l'aide de ces résultats, il est possible de mieux comprendre nos précédents résultats. En effet, une liaison avait été trouvée entre l'activité, la réponse cardiaque aux mouvements et la concentration de créatine kinase. Cependant, l'activité n'était corrélée qu'avec les données cardiaques. Ici, l'activité physique et la créatine kinase sont associées à des marqueurs du gène de la PNMT, ce qui permet de vérifier l'existence d'une liaison entre les deux variables. Ces analyses traduisent que le système nerveux autonome participe activement à la valeur de

la fréquence cardiaque de base, à la réponse comportementale et à la réponse de la créatine kinase suite au stress de contrainte.

Le cas du cortisol, du glucose et du lactate

Les marqueurs SNP M1GA0016423 ($p = 0,037$; $p = 0,016$) et MARC0039999 ($p = 0,042$) des gènes de la PNMT sont associés aux concentrations plasmatiques de cortisol. Il est intéressant de noter que des concentrations élevées de cortisol sont connues pour stimuler l'expression du gène de la PNMT (Mormède, 2007 ; Brandt, 1999). Le cortisol stimule donc la production d'adrénaline. Cependant, nos résultats indiquent que selon les allèles de ces deux marqueurs SNP, la concentration de cortisol sera différente. L'étude de Böttner et al. (2002), menée sur des souris transgéniques pour lesquelles le gène de la PNMT était surexprimé, a montré que les animaux transgéniques avaient des concentrations plasmatiques de corticostérone de $240,8 \pm 40,98$ ng/mL contre $185,0 \pm 28,43$ ng/mL chez les animaux témoins. Cette différence n'était cependant pas significative. En revanche, les animaux transgéniques présentaient des concentrations plasmatiques d'adrénaline significativement supérieures dans le cerveau et la médullosurrénale. Les concentrations d'adrénaline dans le plasma étaient de $2,30 \pm 0,69$ nmol/L et de $1,36 \pm 0,12$ nmol/L pour les animaux transgéniques et témoins respectivement. Ces concentrations étaient significativement corrélées à celle du cortisol. Ainsi, la surexpression du gène de la PNMT conduit à augmenter les concentrations plasmatiques d'adrénaline et de cortisol. Par ailleurs, dans l'étude de Terenina et al. (2013), une association entre la concentration de cortisol urinaire et un marqueur SNP du gène de DRD3 avait été trouvée. La différence de résultat semble s'expliquer par la différence de variabilité génétique entre les individus des deux études.

Les marqueurs SNP M1GA16423 ($p = 0,024$) et H3GA0005335 ($p = 0,034$) des gènes de la PNMT et de la DBH sont associés à la concentration plasmatique de glucose. Les catécholamines sont connues pour avoir une action glycogénolytique (Nussey et Whitehead, 2001). Elles participent à la libération de glucose dans le sang et ont une action stimulatrice ou inhibitrice sur l'insuline. Or la synthèse des catécholamines par la DBH et la PNMT est indispensable à leurs actions. Ainsi les enzymes, par l'intermédiaire des molécules qu'elles produisent, modifient indirectement la concentration de glucose.

Les marqueurs SNP M1GA0016423 ($p = 0,049$; $p = 0,044$), ALGA0010988 ($p = 0,033$), M1GA0002101 ($p = 0,04$), MARC0039999 ($p = 0,017$) des gènes de la PNMT et de la DBH sont associés aux concentrations plasmatiques de lactate. Les catécholamines, par leur action glycogénolytique, libèrent du glucose dans le sang (Nussey et Whitehead, 2001). Le glucose ainsi libéré intervient dans le métabolisme de l'individu lors de la glycolyse. La glycolyse permet de produire de l'énergie pour l'individu mais réduit la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) nécessaire à son fonctionnement. La fermentation lactique peut être une solution métabolique pour régénérer la NAD. Elle conduit à la transformation du pyruvate en lactate (Camus, 2011). L'association entre les enzymes synthétisant les catécholamines et la concentration de lactate plasmatique peut donc s'expliquer d'un point de vue métabolique.

Dans l'analyse précédente, les corrélations entre ces trois phénotypes étaient significatives (glucose-lactate) ou suivaient une tendance (cortisol-lactate et cortisol-glucose). L'analyse d'association permet d'affirmer que ces trois phénotypes sont sous le contrôle du système nerveux autonome. Il est particulièrement intéressant de noter que le marqueur SNP M1GA0016423 du gène de la PNMT est associé avec chacun de nos phénotypes. De même, le marqueur SNP MARC0039999 du gène de la PNMT est associé avec deux de nos phénotypes. Ces associations permettent donc de mieux comprendre les corrélations détectées précédemment.

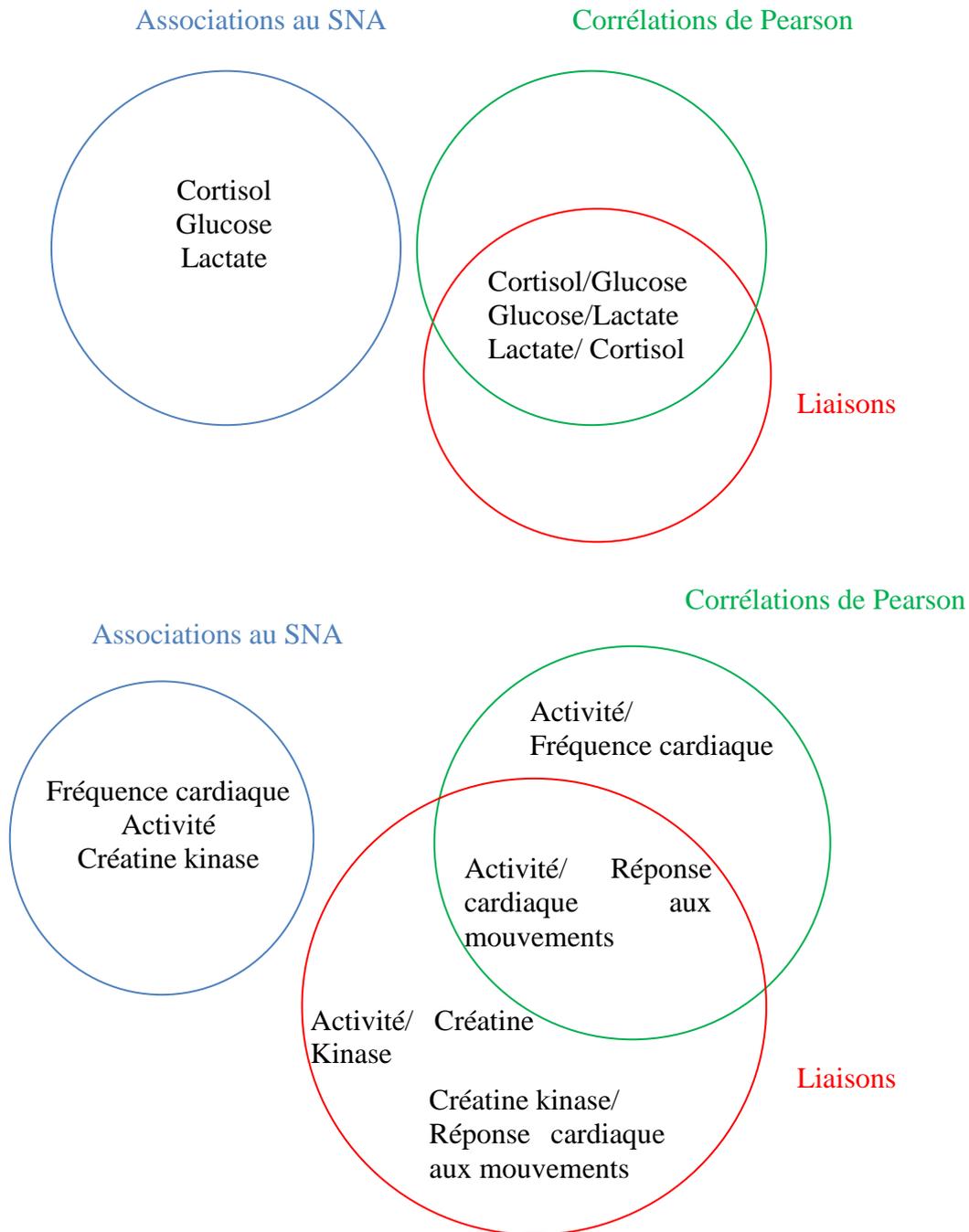


Figure 17 : Bilan des liaisons et corrélations entre les phénotypes et de leurs associations avec le système nerveux autonome

SNA : système nerveux autonome

Conclusions

L'objectif de ce mémoire était de chercher à mieux comprendre les réponses des différents phénotypes (biologie clinique, comportement, activité cardiaque) au stress de contrainte et à déterminer le rôle du système nerveux autonome sur ces réponses. Pour cela, le dosage des catécholamines plasmatiques a d'abord été réalisé. Nos résultats ont cependant été biaisés par l'absence de cathéters posés sur les animaux. En effet, les concentrations de base mesurées sont aussi élevées que les concentrations post-stress. L'étude s'est ensuite portée sur les réponses des autres phénotypes au stress et sur les relations entre ces phénotypes. Des liaisons ont été montrées entre les concentrations de glucose, de lactate et de cortisol plasmatiques ainsi qu'entre l'activité physique, la réponse cardiaque aux mouvements et la concentration plasmatique de la créatine kinase. Une étude des corrélations de Pearson a montré des corrélations significatives ou des tendances entre les concentrations de glucose, de lactate et de cortisol. Des corrélations ont aussi été trouvées entre l'activité et la fréquence cardiaque de base d'une part et entre l'activité et la réponse cardiaque aux mouvements d'autres part. L'analyse d'association s'est ensuite concentrée sur ces phénotypes pour chercher à comprendre leurs réponses et le rôle du système nerveux autonome sur les réponses de ces phénotypes. Une première approche à l'échelle du génome n'a pas permis de détecter d'associations. Toutefois, il est possible de noter la présence d'un signal bien défini dans le cas de la concentration de glucose à 24 heures. Certains marqueurs SNP de ce signal sont localisés dans le gène codant pour l'enzyme malique, impliquée dans le métabolisme glucidique. Il est donc possible qu'une association existe entre ce gène et ce phénotype, le nombre réduit d'animaux dans l'étude empêcherait alors toute significativité du résultat. Cette approche ne permet donc pas d'apporter d'éclaircissement quant au contrôle génétique des réponses des phénotypes. Une deuxième approche a consisté en l'étude ciblée de trois gènes candidats liés au fonctionnement du système nerveux autonome (les gènes de la PNMT, de la DBH et de DRD3) et en l'analyse de leurs associations avec les phénotypes étudiés. Parmi les 17 marqueurs SNP initialement étudiés, 9 sont associés à au moins un des phénotypes. L'étude ciblée de trois gènes candidats permet d'obtenir des résultats significatifs contrairement à l'étude à l'échelle du génome car le nombre de tests réalisés est alors moins important. Un nombre réduit d'animaux suffit alors pour obtenir des résultats significatifs. Les associations obtenues avec le cortisol, le glucose et le lactate sont particulièrement intéressantes car ces trois phénotypes sont associés au même marqueur SNP du gène de la PNMT, ce qui confirme la liaison entre eux et le rôle du système nerveux autonome sur ces phénotypes. Les associations détectées entre le système nerveux autonome et l'activité, la fréquence cardiaque et la créatine kinase sont intéressantes car elles permettent d'affirmer que le système nerveux autonome participe activement à la valeur de la fréquence cardiaque de base, à la réponse comportementale et à la réponse de la créatine kinase suite au stress de contrainte. Ainsi, le système nerveux autonome a un rôle majeur dans le contrôle des réponses au stress de contrainte. Le bilan des résultats est schématisé sur la **figure 17**.

Les résultats décrits dans ce mémoire proviennent des données de la génération G0. A l'issue de la sélection divergente, la génération G3 sera phénotypée de la même manière que les animaux G0. Les résultats obtenus avec les individus parentaux serviront alors de base pour comparer les réponses de stress des animaux G3 au stress de contention. Au final, l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre du projet SUSoSTRESS permettra de mieux comprendre les réponses de stress des porcs et de valider la stratégie de sélection génétique mise en place pour équilibrer la production et la robustesse des animaux.

Perspectives

Beaucoup d'analyses ont été faites pour arriver à ce mémoire, cependant pour que l'étude soit complète, de nombreuses études restent encore à faire :

- L'analyse des données de génotypage s'est concentrée sur les effets des marqueurs SNP sur le phénotype. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour tester les effets des haplotypes sur le phénotype.

- L'analyse par gènes candidats s'est limitée à l'étude de seulement trois gènes impliqués dans le fonctionnement du système nerveux autonome. D'autres gènes sont à étudier pour comprendre de manière plus globale les associations entre le système nerveux autonome et les phénotypes mesurés.

- Il faudrait aligner les marqueurs SNP significatifs pour vérifier leurs positions sur le génome et dans les gènes (partie codante ou non). Cette étude a été commencée mais des problèmes d'annotation des gènes ont empêché de mener à bien ces vérifications.

Toutes ces analyses sont déjà planifiées.

Par ailleurs, dans l'objectif de proposer une nouvelle stratégie de sélection. Il faudra étudier les conséquences de cette sélection sur la qualité de la carcasse et de la viande (ce qui est prévu dans le projet). Il sera aussi intéressant d'être en contact avec des sélectionneurs pour connaître leur avis sur la réalisabilité de ce test de sélection à grande échelle et pour rendre l'application des résultats possible.

Bibliographie

Abid K.A. (2011) Métabolisme des catécholamines dans le phéochromocytome: diagnostique et recherche. Cours du Centre hospitalier universitaire vaudois. http://www.ar-l.ch/Docs/pheo_2011.pdf, consulté le 01/06/2014 (mise à jour d'octobre 2011)

Allais S. (2013) Analyse de liaison et d'association en génétique animale et humaine. Cours de Master 2 à l'université de Rennes 1, 30 pages.

Amin N., van Duijn C.M., Aulchenko Y.S. (2007) A genomic background based method for association analysis in related individuals. PLoS ONE, 2:12:e1274, 7 pages.

Aulchenko Y. (2013) Package "GenABEL", 147p. <http://cran.r-project.org/web/packages/GenABEL/GenABEL.pdf> Consulté le 01/06/14 (mise à jour de décembre 2013)

Aulchenko Y. (2012) Using Mixed Models in GWA studies. http://mga.bionet.nsc.ru/~yurii/courses/2012.05_Bologna/mixed_models_web.pdf. Consulté le 06/05/2014 (mise à jour du 27/05/2012).

Aulchenko Y. (2008) GenABEL tutorial. 140p. <http://www.genabel.org/sites/default/files/pdfs/ABEL-tutorial.pdf>. Consulté le 01/06/14 (dernière mise à jour du 18/03/2011).

Blum D., Didier A., Gonzales De Aguilar J.L. (2012) Les maladies neurologiques à travers les études pan-génomiques (Genome Wide Association Studies - GWAS). La Lettre des Neurosciences. Printemps été 2012, N°42, 12 pages. http://www.neurosciences.asso.fr/V2/Actualites/LaLettre/Dossier_Let42.pdf. Consulté le 19/05/2014 (dernière mise à jour 14/05/2012).

Böttner A., Haidan A., Eisenhofer G., Kristensen K., Castle A.L., Scherbaum W.A., Schneider H., Chrousos G.P., Bornstein S.R. (2000) Increased body fat mass and suppression of circulating leptin levels in response to hypersecretion of epinephrine in phenylethanolamine-N-methyltransferase (PNMT)-overexpressing mice. Endocrinology, 141:11, pp 4239-46.

Brandt M. (1999) Chapter 4 The Adrenal Medulla. 6 pages. http://www.rose-hulman.edu/~brandt/Chem330/EndocrineNotes/Chapter_4_Adrenal_Medulla.pdf. Consulté le 06/05/2014 (dernière mise à jour 27/01/2003).

Camus G. (2011) La fermentation lactique et son utilisation dans la fabrication du yaourt. <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/fermentation-lactique/fermentation-lactique.html#chap2>. Consulté le 20/02/14 (dernière mise à jour du 31/05/2012).

Ciaranello R.D., Axelrod J. (1973) Genetically Controlled Alterations in the Rate of Degradation of Phenylethanolamine N-Methyltransferase. Journal of Biological Chemistry, 248, pp 5616-5623.

Ciaranello R.D., Hoffman H.J., Shire J.G.M., Axelrod J. (1974) Genetic Regulation of the Catecholamine Biosynthetic Enzymes. II Inheritance of tyrosine hydroxylase, dopamine-P-hydroxylase, and phenylethanolamine N-methyltransférase. *Journal of Biological Chemistry*, 249:14, pp 4528-4536.

Collier C.T., Williams P.N., Carroll J.A., Welsh Jr. T.H., Laurenz J.C. (2011) Effect of maternal restraint-stress during gestation on temporal lipopolysaccharide-induced neuroendocrine and immune responses of progeny. *Domestic Animal Endocrinology*, 40:1, pp 40-50.

Damjanovic D. (1991) Biogenic amine assay using HPLC-ECD, United States Patent, 55 p.

Debette S., Renaud A., Rahnema Z. (2013) Cours 10 : Génétique des Maladies Multifactorielles. Cours de l'UE Génétique Médicale de L3, UFR de médecine Paris Diderot - site Xavier Bichat, 13 pages. http://13bichat2013-2014.weebly.com/uploads/1/3/9/0/13905422/ue5_cours_10_genetique_des_maladies_multifactorielles.pdf. Consulté le 19/05/2014 (dernière mise à jour 17/12/2013).

Faculté de médecine Pierre et Marie Curie (2012a) Partie II - Régulation de la glycémie Chapitre 7 - Mécanismes hypoglycémiant : la lipogénèse 7.23 - Enzyme malique. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/REbioch/POLY.Chp.7.7.html>. Consulté le 21/05/2014 (dernière mise à jour de septembre 2012).

Faculté de médecine Pierre et Marie Curie (2012b) Partie II - Régulation de la glycémie Chapitre 7 - Mécanismes hypoglycémiant : la lipogénèse 7.7 - Sortie du citrate. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/REbioch/POLY.Chp.7.7.html>. Consulté le 21/05/2014 (dernière mise à jour de septembre 2012).

Foury A., Geverink N.A., Gil M., Gispert M., Hortós M., Font I Furnols M., Carrion D., Blott, S.C., Plastow G.S., Mormède P. (2007) Stress neuroendocrine profiles in five pig breeding lines and the relationship with carcass composition. *Animal*, 1:7, pp 973-982

Hennessy D.P., Jackson, P.N. (1987) Relationship between adrenal responsiveness and growth rate. Dans *Manipulating Pig Production*, Australian Pig Science Association, Werribee, Australie, pp. 23.

Jacob V. (2010) La Chromatographie Liquide haute Performance (HPLC). IUT de Chimie de Grenoble. 45 pages. <http://iut-tice.ujf-grenoble.fr/tice-espaces/CH/EP-fm/wupload/File/HPLC.pdf>. Consulté le 19/05/2014 (dernière mise à jour 02/12/2012).

Illumina. (2009) Infinium ® HD Assay. Ultra Protocol Guide. Catalogue #WG-901-4007, Partie #11328087, Revue B. http://supportres.illumina.com/documents/myillumina/67f59f89-51ee-44d6-b1bb-a53dcb5bd01e/infinium_hd_ultra_user_guide_11328087_revb.pdf Consulté le 03/06/2014 (dernière mise à jour du 16/05/2013)

Johnson T.L., Tulis D.A., Keeler B.E., Virag J.A., Lust R.M., Clemens S. (2013) The dopamine D3 receptor knockout mouse mimics aging-related changes in autonomic function and cardiac fibrosis. *PLoS One*, 30;8(8):e74116.

Kessler S., Ciaranello R.D., Shire J.G.M., Barchas J.D. (1972) Genetic Variation in Activity on Enzymes Involved in Synthesis of Catecholamines. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 69 :9, pp 2448-2450.

Larzul C., Terenina E., Foury A., Billon Y., Louveau I., Merlot E., Mormède P. (2014) Variabilité génétique de l'activité corticotrope chez le porc Large White et sélection divergente pour l'étude des caractères de robustesse. Journées de la Recherche Porcine, 46, 6 pages.

Laloë D., Allais S. (2013) Les bases de l'évaluation génétique. Cours de Master 2 à Agrocampus-Ouest, 19 pages.

Leenhouwers J.I., Knol E.F., de Groot P.N., Vos H., Van der Lende T. (2002) Fetal development in the pig in relation to genetic merit for piglet survival. Journal of Animal Science, 80, pp 1759–1770.

Merlot E. (2003) Modification de la production de cytokines par l'environnement social et susceptibilité aux infections. Thèse de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon, 228p.

Mersmann H. J. (1998) Overview of the effects of b-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. Journal of Animal Science, 76, pp 160-172.

Michel V., Peinnequin A., Alonso A., Buguet A., Cespuglio R., Canini F. (2007) Decreased heat tolerance is associated with hypothalamo-pituitary-adrenaocortical axis impairment. Neuroscience, 147:2, pp 522-31.

Miura T., Muraoka S., Fujimoto Y. (1999) Inactivation of creatine kinase induced by dopa and dopamine in the presence of ferrylmyoglobin. Chemico-Biological Interactions, 123:1, pp 51-61.

Mormède P., Dantzer R., Bluthe R.M., Caritez J.C. (1984) Differences in adaptive abilities of three breeds of Chinese pigs. Behavioural and neuroendocrine studies. Genetics Selection Evolution, 16:1, pp 85-102.

Mormède P. (2007) Variabilité génétique de l'axe corticotrope chez le Porc: mécanismes moléculaires et conséquences sur la production de viande. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, 160 : 2, pp 79-84.

Mormède P., Foury A., Barat P., Corcuff J.B., Terenina E., Marissal-Avry N., Moisan M.P. (2011a) Molecular genetics of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and function. Annals of the New York Academy of Sciences, 1220, pp 127-136

Mormède P. (2011b) Programme BIOADAPT, projet SUSoSTRESS. Agence Nationale de la Recherche. Edition 2011, 38 p.

Mormède P. (2013) Projet SUSoSTRESS. Compte-rendu de l'expérience de phénotypage approfondi de la population G0. 7 p. (Communication personnelle).

Neubert E., Gürtler H., Vallentin G. (1996) Effect of restraining growth pigs with snare restraints on plasma levels of catecholamines, cortisol, insulin and metabolic parameters. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 109:11-12, pp 409-413.

Nussey S., Whitehead S. (2001) *Endocrinology: An Integrated Approach*, Oxford: BIOS Scientific Publishers. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26/> Consulté le 12/05/2014 (dernière mise à jour 12/05/2014).

Professeur du CEGEP de St-Hyacinthe (2004) Stress. <http://pages.infinit.net/wave/stress.htm> . Consulté le 13/11/2013 (dernière mise à jour : 03/05/2004).

Rosochacki S.J., Piekarczywska A.B., Polozynowick J., Sakowski T. (2000) The Influence of Restraint Immobilization Stress on the Concentration of Bioamines and Cortisol in Plasma of Pietrain and Duroc Pigs. *Journal of Veterinary Medicine*, A47, pp 231-242.

Salak-Johnson J.L., McGlone J.J. (2007) Making sense of apparently conflicting data: Stress and immunity in swine and cattle. *Journal of Animal Science*, 85, pp E81-E88

Sanchez M.P., Iannuccelli N., Basso B., Foury A., Billon Y., Gandemer G., Gilbert H., Mormède P., Bidanel J.P., Larzul C., Riquet J., Milan D., Le Roy P. (2011) Microsatellite mapping of quantitative trait loci affecting meat quality, stress hormones and production traits in Duroc x Large White F2 pigs. *Animals*, 5:2, pp 167-174.

Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U., (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21, pp 55-89.

Schneider C.M., Dennehy C.A., Rodearmel S.J., Hayward J.R. (1995) Effects of physical activity on creatine phosphokinase and the isoenzyme creatine kinase-MB. *Annals of Emergency Medicine*; 25:4, pp520-524

Sigma-Aldrich. 3,4-Dihydroxybenzylamine hydrobromide. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/858781?lang=fr®ion=FR>. Consulté le 15/05/2014 (dernière mise à jour : 15/05/2014).

Smedes F., Kraak J.C., Poppe H. (1982) Simple and fast solvent extraction system for selective and quantitative isolation of adrenaline, noradrenaline and dopamine from plasma and urine. *Journal of Chromatography*, 231, pp 25-39.

Société chimique de France. Produit du Jour, Tyrosine. <http://www.societechimiquedefrance.fr/produit-du-jour/tyrosine.html>. Consulté le 24/02/2014 (dernière mise à jour : 24/02/2014).

Terenina E., Babigumira B.M., Le Mignon G., Bazovkina D., Rousseau S., Salin F., Bendixen C., Mormède P. (2013) Association study of molecular polymorphisms in candidate genes related to stress responses with production and meat quality traits in pigs. *Domestic Animal Endocrinology*, 44, pp 81–97.

Teyssède S., Elsen J.M. Ricard A. (2012) Statistical distributions of test statistics used for quantitative trait association mapping in structured populations. *Genetics Selection Evolution*,

44:32, 17 pages.

Toth M., Ziegler M., Sun P., Gresack J., Risbrough V. (2013) Impaired conditioned fear response and startle reactivity in epinephrine-deficient mice. *Behavioural Pharmacology*, 24:1, pp1-9

Tuttle W.W. (1931) The response of the normal heart to exercises of graded intensity. *Arbeitsphysiologie*, 4:6, pp 519-526.

Ulrich-Lai Y.M., Herman J.P. (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, pp 397-409.

Université de Cornell. Creatine Kinase – CK.

<https://ahdc.vet.cornell.edu/sects/clinpath/modules/chem/ck.htm>. Consulté le 15/05/2014 (dernière mise à jour : février 2011).

Université de Genève, faculté de médecine. Les circuits du stress. <http://www.medecine.unige.ch/enseignement/apprentissage/module3/pec/apprentissage/neuroana/stress/stress2.htm>. Consulté le 26/11/2013, (Dernière mise à jour : novembre 2001).

Ustione A., Piston D.W. (2012) Dopamine synthesis and D3 receptor activation in pancreatic β -cells regulates insulin secretion and intracellular $[Ca^{2+}]$ oscillations. *Molecular Endocrinology*, 26 :11, pp1928-1940

Williams P.N., Collier C.T., Carroll J.A., Welsh Jr T.H., Laurenz J.C. (2009) Temporal pattern and effect of sex on lipopolysaccharide-induced stress hormone and cytokine response in pigs. *Domestic Animal Endocrinology*. 37, pp 139-147.

Annexes

Annexe 1 : Protocole de dosage des catécholamines plasmatiques par chromatographie liquide haute pression

Rédigé par Laure Gress (Août 2013)

Objectifs

Les plasmas sont extraits (extraction organique) avant passage dans l'HPLC pour dosage des catécholamines.

Consommables et réactifs nécessaires

<http://mars/Lists/Risques%20des%20produits/AllItems.aspx>

Consommables :

Pipettes : P20, P200, P1000, Multipipette

Microtubes

Inserts de 400µl à fond plat pour l'injection HPLC (Agilent, 5181-3377)

Filtres γ mobile (*Filtre membrane MF pores 0,45 µm, diamètre 47 mm Millipore*) (Dutscher, 044126)

Réactifs :

Tampon PBS

Acétate de sodium (VWR, 1.06267.1000)

Octane Sulfonique Acide (OSA) (Sigma, O8380)

Acide citrique (VWR, 20276.292)

Ammoniaque 20% (VWR BDH Prolabo)

Méthanol (VWR, 20864.320)

Heptane (ADL Prochilab, 412592000)

Octanol (Sigma, 293245-1L)

Acide acétique

HCl fumant (36% min.)

NH₄Cl (PM 53.49)

Diphényl Borate Ethanolamine (DPBEA, PM 225.1) (Sigma, D9754-1G)

Tetra N Octyl Ammonium Bromide (ToABR, PM 546) (BDH Chemicals, 952169OE-25g)

Composés sous forme solide : **Noradrénaline** (Sigma, A0937-5G)

Adrénaline (Sigma, E4642-5G)

Dopamine (Sigma, H8502-5G) 4°C

DHBA (Sigma, 858781-250mg)

Documents rattachés

Smedes F, Kraak JC, and Poppe H 1982. Simple and Fast Solvent-Extraction System for Selective and Quantitative Isolation of Adrenaline, Noradrenaline and Dopamine from Plasma and Urine. *Journal of Chromatography* 231, 25-39.

Hygiène sécurité

Acide citrique: R36 S26

Ammoniaque 20%: R34 – R50 S26 – S36/37/39 – S45 – S61

Méthanol: R11 – R23/24/25 – R39/23/24/25 S7 – S16 – S36/37 – S45

Heptane: R11 – R38 – R50/53 – R65 – R67 S9 – S16 – S29 – S33 – S60 – S61 – S62

Octanol: R36/38 S26 – S36/37

Acide acétique : R10 – R35 S23 – S26 – S45

HCl fumant: R34 – R37 S26 – S45

NH₄Cl: R22 – R36 S22

Tetra N Octyl Ammonium Bromide: R36/37/38 S26 – S36

Noradrénaline: R26/27/28 S28 – S36/37 – S45

Adrénaline: R24/25 – R36/37/38 S26 – S36/37 – S45
Dopamine : R22 – R50/53 S61
DHBA: R36/37/38 S26 – S36

Préparation des Solutions

Conservation des plasmas à -80°C

Préparation préalable de produits

Solutions étalons des catécholamines :

⇒ **Préparation des solutions mères (1mg/ml), conservation à 4°C:**

❖ Noradrénaline :

PM sel: 319.3 g/mol

PM base = 169 g/mol

Peser **7.56mg** de sel → il contient donc 4mg de NA

Dissoudre dans **4ml d'HCl à 0.1N**

❖ Adrénaline :

PM sel: 333.3 g/mol

PM base = 183 g/mol

Peser **7.28mg** de sel → il contient donc 4mg de A

Dissoudre dans **4ml d'HCl à 0.1N**

❖ Dopamine :

PM sel: 189.6 g/mol

PM base = 154.1 g/mol

Peser **4.92mg** de sel → il contient donc 4mg de DA

Dissoudre dans **4ml d'HCl à 0.1N**

❖ DHBA :

PM sel: 220.1 g/mol

PM base = 140.1 g/mol

Peser **6.28mg** de sel → il contient donc 4mg de DHBA

Dissoudre dans **4ml d'HCl à 0.1N**

⇒ **Fabrication du pool PC (100µg/ml) :**

Diluer au 1/10 les solutions mères de NA, A, DA et DHBA avec de l'HCl à 0.1 N:

x ml de chaque solution mère + (6* x ml) d'HCl 0.1N

Congeler en aliquots de 0.5ml à -20°C.

Un aliquot par semaine peut être utilisé, si conservé à 4°C.

⇒ **Préparation Standard Interne DHBA (100µg/ml) :**

Diluer au 1/10 la solution mère de DHBA avec de l'HCl à 0.1 N:

x ml de la solution mère + (9* x ml) d'HCl 0.1N

Congeler en aliquots de 0.5ml à -20°C.

Un aliquot par semaine peut être utilisé, si conservé à 4°C.

Phase mobile:

⇒ **Solutions mères :**

❖ Acétate Sodium 1M (conservation à 4°C) :

CH₃COONa, 3H₂O PM: 136.08 g/mol → **136.08g qsp 1L H₂O mQ**
ou CH₃COONa PM: 82.3 g/mol → **41.15g qsp 500ml H₂O mQ**

❖ OSA 200mg/ml (conservation temp. ambiante) :

4g qsp 20ml H₂O mQ

Dissoudre à chaud (50°C). ATTENTION: cristallisation à froid.

❖ Acide Citrique 1M, PM : 210.14g/mol (conservation 4°C) :

210.14g qsp 1L H₂O mQ

⇒ **2L de phase mobile à 12% Méthanol (conservation 1 mois à 4°C):**

Préparer dans un bécher de 3L:

100ml Acétate de sodium

240ml Méthanol

1.5ml OSA

90 ml Acide citrique

qsp 2L H₂O mQ

Ajuster le **pH à 3.8** avec l'acide citrique ou l'acétate de sodium (grand bécher + agitateur).
Filtrer la préparation.

! Garder de côté un flacon de phase pour les dilutions.

En cas d'oubli, préparer de nouveau **200 ml de phase :**

- 10ml** Acétate de sodium
- 20ml** Méthanol
- 8.5ml** Acide citrique
- 150µl** OSA
- qsp 200ml** H₂O mQ

Ajuster le pH à 3.8 (*L'ajustement du pH est très important pour la conservation.*)

Solutions d'extractions (conservation à 4°C): ! Préparation sous la hotte !

❖ Solution A : NH₄OH/NH₄Cl + DPBEA

10.7g NH₄Cl (53.49g/mol)

3ml Ammoniaque 20%

200mg DPBEA

qsp 100ml H₂O distillée

Mettre au bain-marie à 50°C pendant 1 à 2h pour dissoudre le DPBEA.

❖ Solution B : Heptane-Octanol ToABr

100 ml Heptane

1ml Octanol

0.25g ToABr

Agiter pour dissoudre le ToABr.

❖ Solution C : Acide acétique 0.1M

570µl CH₃COOH pur

qsp 100ml H₂O distillée

Contenu du Mode Opérateur

Préparation des standards (pas de conservation, à refaire pour chaque manip):

⇒ Dilution Solution Mère PC 100µg/ml (soit 5µg/50µl) :

20µl PC + 980µl PBS → PC1 (100ng/50µl)

50µl PC1 + 950µl PBS → PC2 (5ng/50µl)

40µl PC2 + 960µl PBS → PC3 (200pg/50µl)

⇒ Dilution Solution Mère Standard Interne (SI-DHBA) 100µg/ml (soit 5µg/50µl) :

20µl SI + 980µl PBS → SI1 (100ng/50µl)

50µl SI1 + 950µl PBS → SI2 (5ng/50µl)

40µl SI2 + 960µl PBS → SI3 (200pg/50µl)

Préparation et extraction des standards et des plasmas :

⇒ Préparation des plasmas :

Décongeler les plasmas.

Numéroter les µtubes (2 fois pour les pools et les plasmas « basal » et 3 fois pour les « post-stress »)

❖ µtubes 1 et 2 : pool de catécholamines : 250µl PBS + 50µl PC3

❖ µtube 3 et suivants: plasma (en simple ou en double)

Les échantillons sont à traiter différemment selon les conditions de prélèvement :

- En situation de **base** : 250µl plasma + 50µl SI3 (200pg)
- En **post-stress** : 250µl plasma + 50µl SI2 (5ng)

⇒ Extraction sur tous les tubes ainsi préparés :

Ajouter 125µl SOLUTION A + 625µl SOLUTION B

Agiter 5mn. Centrifuger 2 mn, 10 000 rpm

Prélever 500µl de phase organique (surnageant) et transférer dans un nouveau µtube.

Ajouter 250µl OCTANOL + 50µl de SOLUTION C

Agiter 5mn. Centrifuger 2 mn, 10 000 rpm

Éliminer la phase organique (surnageant)

Récupérer la phase aqueuse :

µtubes 1 et 2 : Prélever 30 µl dans une fiole d'injection

Plasma « situation de base » : Prélever 30 µl dans une fiole d'injection

Plasma « situation post-stress » : Diluer au 1/50 : 5µl de phase aqueuse + 245 µl phase mobile

Prélever 30 µl dans une fiole d'injection

Injection dans la chaîne HPLC :

⇒ Caractéristiques de l'injection :

Echelle maximale pour le signal = 1500mV

R = 0.5nA

Volume d'injection = 20µl

⇒ Changer de phase mobile chaque lundi :

- Eteindre la pompe
- Changer la phase
- Allumer la pompe : 0.55ml/mn
- Rincer 2 heures en circuit ouvert
- Repasser en circuit fermé

- Injecter **20 µl** de PC calibration (**PC 3**)
 - Calibrer l'HPLC (DATA ANALYSIS : Calibration – Recalibration – Mode Replace – OK)
 - Imprimer calibration (icône imprimante)
 - Coller chromatogramme + hauteur des pics dans le cahier de manip
- ⇒ **Injection des échantillons :**
- Préparer les échantillons : mettre 30µl de chaque échantillon dans les fioles HPLC : **ATTENTION AUX BULLES !!!**
 - Placer les fioles sur le plateau d'injection
 - Dans **METHODS AND RUN CONTROL**, cliquer sur :
 - **Sequence/Parameters**: remplir les champs OPERATER NAME (Nom de l'opérateur), PREFIX (Nom de la série) et SUBDIRECTORY (nom du projet) puis OK
 - **Sequence/Table** : remplir les noms des échantillons (sample name).
 - Retirer les lignes inutiles en les sélectionnant et en cliquant sur CUT
 - Rajouter des lignes si besoin en sélectionnant la dernière ligne et en cliquant sur COPY puis sur PASTE autant de fois que nécessaire
 - Changer le n° de la fiole (VIAL) qui doit correspondre au n° de la ligne et indiquer le nom de l'échantillon
 - Valider en cliquant sur OK
 - Cliquer sur **START**
 - Noter sur le cahier de manip de l'HPLC les caractéristiques de l'injection (nom du projet, de la série, nombre de fioles, range (R), débit, pression et intensité de la cellule de détection)

Exploitation des résultats

Analyse des données avec le fichier CA plasmatiques.xlsx

Remarques éventuelles, particularités liées au dosage et à la technique

Annexe 2 : Script en langage R mis en place pour réaliser l'analyse d'association

```
##### Stockage des données et ouverture des packages#####
setwd(« dir »)
getwd()
library(GenABEL)

##### Lecture des données de génotypage#####
## Création d'une matrice à partir du fichier texte des données de génotypage de 64237
## colonnes remplies dans le sens des lignes
data <- matrix(scan("mart_export.txt",sep="\t",what="character"),ncol=64237,byrow=T)
## Enregistrement des noms des colonnes sous NOM_col
NOM_col <- data[1,]
## Enregistrement de la matrice précédente sans la ligne avec les noms des colonnes
data <- data[-1,]
## Transformation de la matrice en data frame
data <- as.data.frame(data)
## Les noms des colonnes sont dans NOM_col
names(data) <- NOM_col

##### Sélection des colonnes qui comportent des marqueurs SNP informatifs#####
##### Formatage des données pour l'importation dans GenABEL#####
## Sélection des données de génotypage présentes dans le data frame
geno <- data[,6:dim(data)[2]]
## Remplacement de l'espace entre les deux nucléotides par un slash
geno1 <- apply(geno,2,function(X) paste(substr(X,1,1),"/",substr(X,3,3),sep=""))

# Sélection des données qui concernent les animaux et leurs parents
# Formatage des données dans le sens suivant : ped id fa mo sex trait snp1.allele1 snp1.allele2
#snp2.allele1
ped_prelim <-
data.frame(fam=rep(1,dim(data)[1]),id=data[,3],mother=data[,5],father=data[,4],sex=data[,1],
trait=rep(1,dim(data)[1]))
## Transformation des informations de sexe en valeurs numériques, codées de la bonne
## façon pour GenABEL (mâle = 1 et femelle = 2)
ped_prelim$sex <- as.character(ped_prelim$sex)
ped_prelim$sex[ped_prelim$sex=="Male"] <- 1 #
ped_prelim$sex[ped_prelim$sex=="Female"] <- 2

## Fusion des informations des animaux avec celles des marqueurs SNP
data1 <- cbind(ped_prelim,geno1)

## Création d'un tableau
write.table(data1,"file_G0_formatGenABEL.txt",quote=F,row.names=F,col.names=F,sep="\t")

##### Formatage du fichier de localisation des SNP#####
map <- read.table("MapSNPV10-2f_draftV10-2f.txt",h=T,sep="\t")
# Les colonnes sont classées dans le bon ordre pour GenABEL
map <- map[,c(2,1,3)]
```

```

# Les marqueurs SNP sont mis dans le même ordre que dans le fichier de génotypage
NOM_col <- NOM_col[6:length(NOM_col)]
map <- map[match(NOM_col,map$SNP),]
## Création d'un tableau
write.table(map,"mapfile_genABEL.txt",row.names=F,quote=F,sep="\t")

##### Importation dans GenABEL#####
## Fusion dans un seul fichier des deux tables qui ont été créées
convert.snp.ped("file_G0_formatGenABEL.txt","mapfile_genABEL.txt","G0_geno_GenABEL.raw", format = "premakeped", traits = 1,strand = "u", bcast = 1000000, wslash=T, mapHasHeaderLine=TRUE)

##### Formatage et importation des données de phénotypage #####
pheno <- read.table("pheno_test.txt",h=T,sep="\t",dec=",")
## Formatage des données de sexe pour GenABEL (femelle= 0, mâle=1)
pheno$Sexe <- abs(pheno$Sexe-3)
## La deuxième colonne de pheno sexe est renommée en sex
names(pheno)[2] <- "sex"
## Remplacement des 2 dans la colonne sex par 0
pheno$sex[pheno$sex==2] <- 0
## Création d'un tableau
write.table(pheno,"pheno_test_genABEL1.txt",quote=F,row.names=F,sep="\t")
## Téléchargement des données dans GenABEL
data_GenABEL <- load.gwaa.data(phenofile = "pheno_test_genABEL1.txt", genofile = "G0_geno_GenABEL.raw",force = TRUE, makemap = FALSE, sort = TRUE, id = "N_nat")

##### Matrice de parenté#####
## La matrice de parenté n'est faite que sur les autosomes, les chromosomes MT, X, Y et XT
##sont enlevés
data_G1 <- data_GenABEL[, data_GenABEL@gtdata@chromosome%in%c(1:18,"U")]

## Contrôle qualité des marqueurs SNP et des individus
qc <- check.marker(data_G1,maf= 0.05,p.level =0)
## Sélection des marqueurs SNP et des individus qui ont passé le contrôle qualité
data_G1_qc <- data_G1[qc$idok, qc$snpok]
write.table(qc$snpok,"table_snpok.txt",quote=F,sep="\t")

## Construction de la matrice de parenté
table_IBS <- ibs(data_G1_qc, weight="freq")
write.table(table_IBS,"table_IBS.txt",quote=F,sep="\t")

# Construction du graphique de la matrice de parenté
# L'objet est renommé
data1.gkin <- table_IBS
# Transformation de notre matrice ibs en matrice de distance
data1.dist <- as.dist(0.5 - data1.gkin)
data1.mds <- cmdscale(data1.dist)
plot(data1.mds)

```

Maintenant seulement 12 marqueurs SNP sont utilisés, ceux parmi les 17 sélectionnés qui ont passé le contrôle qualité. Les étapes précédentes sont reprises pour télécharger notre nouveau jeu de données, les tables ne sont pas écrasées, la matrice de parenté est conservée.

```
##### Lecture des données de génotypage#####
data_snpok <-
matrix(scan("geno_22snpok.txt",sep="\t",what="character"),ncol=26,byrow=T)
NOM_col_snpok <-data_snpok[1,]
data_snpok <- data_snpok[-1,]
data_snpok <- as.data.frame(data_snpok)
names(data_snpok) <- NOM_col_snpok
```

```
##### Sélection des colonnes qui comportent des marqueurs SNP informatifs#####
##### Formatage des données pour l'importation dans GenABEL#####
geno_snpok <- data_snpok[,5:dim(data_snpok)[2]]
geno1_snpok <- apply(geno_snpok,2,function(X)
paste(substr(X,1,1),"/",substr(X,3,3),sep=""))
ped_prelim_snpok <-
data.frame(fam=rep(1,dim(data_snpok)[1]),id=data_snpok[,1],mother=data_snpok[,3],father=
data_snpok[,2],sex=data_snpok[,4],trait=rep(1,dim(data_snpok)[1]))
ped_prelim_snpok$sex <- as.character(ped_prelim_snpok$sex)
ped_prelim_snpok$sex[ped_prelim_snpok$sex=="Male"] <- 1
ped_prelim_snpok$sex[ped_prelim_snpok$sex=="Female"] <- 2
```

```
## Fusion des informations des animaux avec celles des marqueurs SNP
data1_snpok <- cbind(ped_prelim_snpok,geno1_snpok)
write.table(data1_snpok,"file_G0_snpok_formatGenABEL.txt",quote=F,row.names=F,col.names=F,sep="\t")
```

```
##### Formatage du fichier de localisation des marqueurs SNP#####
map_snpok <- read.table("Map_22SNPok.txt",h=T,sep="\t")
map_snpok <- map_snpok[,c(2,1,3)]
NOM_col_snpok <- NOM_col_snpok[5:length(NOM_col_snpok)]
map_snpok <- map_snpok[match(NOM_col_snpok,map_snpok$SNP),]
write.table(map_snpok,"mapfile_snpok_genABEL.txt",row.names=F,quote=F,sep="\t")
```

```
##### Importation dans GenABEL#####
convert.snp.ped("file_G0_snpok_formatGenABEL.txt","mapfile_snpok_genABEL.txt","G0_
geno_snpok_GenABEL.raw", format = "premakeped", traits = 1,strand = "u", bcast =
1000000, wslash=T, mapHasHeaderLine=TRUE)
```

```
##### Formatage et importation des données de phénotypage #####
pheno <- read.table("pheno_test.txt",h=T,sep="\t",dec=",")
pheno$Sexe <- abs(pheno$Sexe-3)
names(pheno)[2] <- "sex"
pheno$sex[pheno$sex==2] <- 0
write.table(pheno,"pheno_test_genABEL1.txt",quote=F,row.names=F,sep="\t")
```

```
## Téléchargement des données
data_GenABEL_snpok <- load.gwaa.data(phenofile = "pheno_test_genABEL1.txt", genofile
```

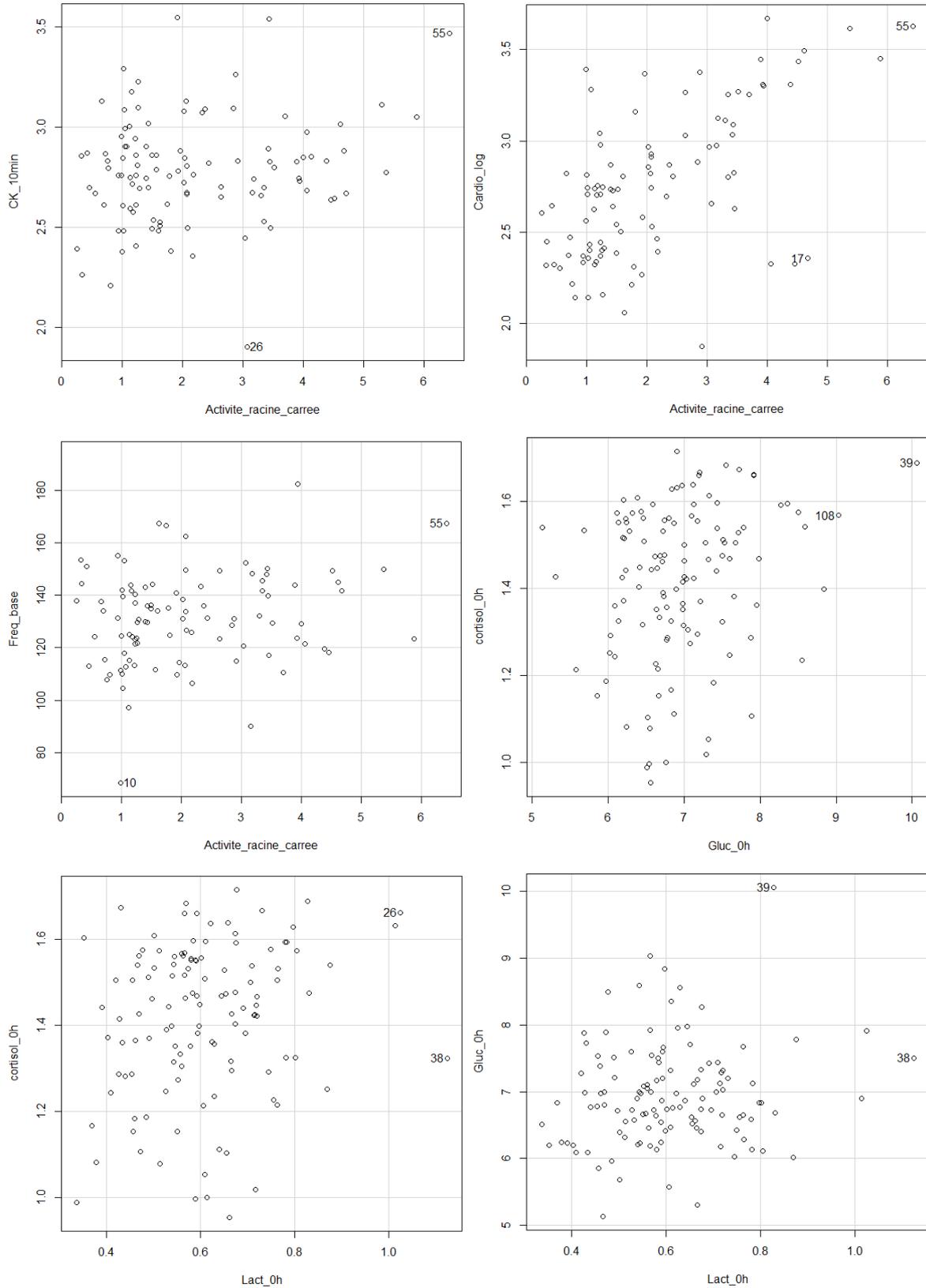
```
= "G0_genosnpok_GenABEL.raw",force = TRUE, makemap = FALSE, sort = TRUE, id = "N_nat")
```

```
##### Analyse d'association #####  
descriptives.traite(data_GenABEL_snpok)
```

```
##### Pour chaque phénotype appliquer le script suivant #####  
## Cas du cortisol 0h ##  
#Estime l'influence du polygénique sur le caractère, donne une valeur résiduelle sur laquelle  
#une étude d'association est réalisée  
h2<-polygenic(cortisol_0h,kin=table_IBS,data=data_GenABEL_snpok)  
h2$h2an  
##### étude d'association #####  
grs<-qtscore(h2$pgres,data=data_GenABEL_snpok,clam=FALSE)  
a<-descriptives.scan(grs,top=5,sort="Pc1df")  
write.table(a,"cortisol_0h_top5.txt",quote=FALSE,sep="\t")  
descriptives.scan(grs,top=5,sort="Pc1df")  
#Construction du graphique  
plot(grs, df = "Pc1df", col = "blue")
```

Annexe 3 : Les graphiques des corrélations entre les phénotypes retenus

CK : créatine kinase, **Cardio** : réponse cardiaque aux mouvements, **Freq_base** : fréquence cardiaque de base, **Gluc** : glucose, **Lact** : lactate





Diplôme : Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage
Spécialité : Science de l'Animal pour l'Elevage de Demain (SAED)
Spécialisation / option : Parcours Recherche
Enseignant référent : Vanessa Lollivier

Auteur(s) : Marion CANAPLE

Date de naissance : 17/08/1991

Nb pages : 37 pages Annexe(s) : 3

Année de soutenance : 2014

Organisme d'accueil : INRA GenPhySE

Adresse : 24 chemin de Borde-Rouge

Auzeville CS 52627

31326 Castanet-Tolosan Cedex

Maître de stage : Pierre Mormède

Titre français : Etude génétique du stress de contention chez le porc

Titre anglais : Genetic analysis of restraint stress in pigs

Résumé (1600 caractères maximum) :

Ce mémoire rentre dans le cadre du projet SUSoSTRESS dont un des objectifs est d'étudier les réponses de stress des animaux d'élevage. 120 porcs ont été soumis à un stress de contrainte de 10 minutes. Des prélèvements sanguins ont permis de quantifier le cortisol, le glucose, le lactate, les acides gras libres et la créatine kinase dans le plasma. Le dosage des catécholamines plasmatiques a été réalisé par chromatographie liquide haute pression avec détection électrochimique. Des données comportementales et génétiques ont été obtenues au cours du projet. L'intégration des données a cherché à mieux comprendre les réponses des différents phénotypes au stress de contrainte et à déterminer le rôle du système nerveux autonome sur ces réponses. Une analyse en composante principale et une étude des coefficients de corrélation de Pearson ont permis de détecter des liaisons entre le glucose, le lactate et le cortisol d'une part et entre l'activité physique, la créatine kinase, la fréquence cardiaque de base et la réponse cardiaque aux mouvements d'autre part. Une analyse d'association à l'échelle du génome a été réalisée pour mieux comprendre ces réponses. Cependant, le nombre réduit d'animaux dans l'étude n'a pas permis d'atteindre le seuil de significativité. Une analyse d'association par gènes candidats (gènes du récepteur D3 à la dopamine, de la dopamine β hydroxylase, de la phényléthanolamine N-méthyltransférase) a été réalisée. Les associations détectées permettent d'affirmer le rôle du système nerveux autonome dans le contrôle des réponses de stress des phénotypes étudiés.

Abstract (1600 caractères maximum) :

This essay is part of the SUSoSTRESS projet. One of its aims is to study stress responses of farm animals. 120 pigs were subject to a 10 minutes restraint stress. Blood samples were taken to determine cortisol, glucose, lactic acid, free fatty acids, creatine kinase concentrations in plasma. Quantification of plasma catecholamines has been done by high pressure liquid chromatography with electrochemical detection. Behavioral and genetic data were also generated by the project. Data integration aimed to better understand stress responses of our phenotypes and to determine the importance of the autonomic nervous system in those responses. A principal component analysis and Pearson's correlations allowed us to detect relationships between glucose, lactate and cortisol in a first hand, and between activity, cardiac responses to motions, creatine kinase and cardiac rhythm in a second hand. A genome-wide association analysis was performed to better understand those responses, but the small number of animal in our study did not allow us to reach significant results. An association analysis with candidate genes (dopamine receptor D3, dopamine β -hydroxylase and phenylethanolamine N-methyltransferase genes) was done. Significant associations showed the important role of the autonomic nervous system in controlling stress responses of our phenotypes.

Mots-clés :

Réponses de stress, contrainte, système nerveux autonome, adrénaline, noradrénaline, analyse d'association, chromatographie liquide haute pression, porc

* Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires

Document à déposer sur moodle en format txt