

APOPTOSE ET STEATOSE HEPATIQUE

Rémignon Hervé, Ben Haj Yahia Rim et Marty-Gasset Nathalie.

*GenPhySE, Université de Toulouse, 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville Tolosane, CS 52627, 31326
Castanet-Tolosan Cedex, France*

remignon@ensat.fr

RÉSUMÉ

Au cours d'une cinétique de gavage de canards mulards, des mesures de perte par fonte à la cuisson de foies gras ont été évaluées ainsi que des paramètres de leur composition chimique (matières sèches et minérales, lipides) et les activités des caspases initiateurs (-8 et -9) ou effectrices (-3 + -7). L'étude montre que l'activité des caspases est faiblement détectable en début et en milieu de gavage mais s'accroît fortement à partir de J10. Cela semble signer la mise en place de phénomènes apoptotiques en fin de gavage, probablement en réponse à la forte sollicitation métabolique du tissu hépatique induite par la suralimentation.

En sus du pouvoir prédictif du poids du foie et de sa teneur en lipides, le niveau d'activités des caspases étudiées permet de prédire de façon fiable environ 75% de la variabilité de la fonte au cours de la cuisson. Le lien entre l'activité des caspases et la fonte à la cuisson pourrait s'établir à travers le pouvoir protéolytique de ces enzymes qui participeraient à la fragilisation des structures cellulaires des hépatocytes. D'autres études vont être menées, avec un spectre de protéases plus large, pour confirmer cette hypothèse.

ABSTRACT

Apoptosis and Hepatic Steatosis.

Along a full period of force-feeding of mule ducks, measurements of cooking yields of fatty livers (foie gras) have been performed in association with the determination of the chemical composition (dry matter, ashes, lipids contents) and activities of initiator (-8 and -9) and executioner (-3 + -7) caspases. Results indicate that activities of caspases are low from the beginning to the middle of the force-feeding period but increase significantly after 10 days. This indicates that apoptosis is present at the end of the studied period, probably in response to the high metabolic solicitation of the hepatic tissue induced by the force-feeding.

In addition to the liver weight and its lipids content, the value of activities of caspases allow to reliably estimate 75% of the variability of cooking losses of the fatty liver. The relationship between the activity of caspases and cooking losses could be explained by proteolytic activities of those enzymes which could weaken cellular structures of hepatocytes. Other studies are actually on going, with a larger set of proteases, to confirm that hypothesis.

INTRODUCTION

La mort cellulaire est un phénomène permanent et indispensable de l'organisme. Elle est représentée par trois mécanismes (apoptose, nécrose, mort autophagique) qui sont indispensables au maintien de l'homéostasie cellulaire. L'apoptose représente la mort cellulaire programmée avec la plus forte occurrence (Lockshin et al., 2004) et participe ainsi à maintenir le bon fonctionnement des tissus et organes en éliminant les cellules endommagées ou non indispensables. Par exemple, l'absence de régulation de l'apoptose est présente dans de nombreux types de cancer (Evan et al., 2001).

La stéatose hépatique provoquée par la suralimentation forcée des palmipèdes induit une activation forte du métabolisme qui se trouve alors principalement tournée vers la synthèse et le stockage des lipides au niveau du tissu adipeux mais aussi dans les hépatocytes eux-mêmes. Au cours de la cuisson du foie gras, une part de ces lipides va être exsudée de ces hépatocytes à cause de la rupture des membranes cellulaires induites par la chaleur. Il s'en suit une fonte, essentiellement lipidique, qui si elle est trop importante peut nuire notablement aux qualités de présentation du produit, et à ses propriétés sensorielles, mais qui entraîne également des pertes économiques pour les transformateurs. Si certains facteurs ont été préalablement identifiés comme pouvant être associés à une fonte importante (origine génétique, poids du foie, teneur en lipides, moment de l'éviscération, barèmes de cuisson, etc...), il n'en reste pas moins vrai qu'une certaine part de la variabilité de cette fonte reste inexploquée (Theron et al., 2012).

L'apoptose étant un phénomène médié par l'activation de certaines protéases (les caspases), nous avons émis l'hypothèse qu'une protéolyse renforcée dans des hépatocytes en apoptose pourrait fragiliser leur cytosquelette et ainsi favoriser la fonte à la cuisson de certains foies gras. Dans cette expérience, nous avons donc tout d'abord cherché à savoir si l'activité des caspases variait au cours du gavage et si ces activités pouvaient être associées à des niveaux de fonte variables.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et échantillons

Un lot de 210 canards mulards a été élevé à la Ferme Expérimentale de l'Oie et du Canard (FEOC, Dordogne) selon un protocole standard. A l'âge de 12 semaines (poids vif moyen = 4,140 kg), les animaux ont été répartis aléatoirement en deux lots afin d'être gavés selon deux modalités différentes. Le premier lot dit « témoin ou T » a été gavé pendant 12 jours (23 repas) avec une intensité normale de gavage (quantité moyenne d'aliment consommé en gavage = 9435 g).

Le deuxième lot dit « intensif ou I » a été gavé pendant la même période mais avec une intensité de gavage légèrement plus forte (quantité moyenne d'aliment consommé en gavage = 9835 g). Dans les deux lots, l'aliment distribué en gavage était identique (38% de grains pour 62% de farine et 3% de premix).

A J0, J2, J4, J6, J8, J10 et J12, 15 animaux de chaque lot ont été abattus. Les foies ont été immédiatement éviscérés et pesés, et des échantillons ont été congelés dans de l'azote liquide pour les futures analyses. Quand les foies présentaient un poids supérieur à 300g, ils ont été refroidis pendant 6 h sur un lit de glace puis conditionnés en verrine de 180g et pasteurisés au LEGTA de Périgueux (VP = 70 min à 80°C). Après deux mois de conservation en chambre froide, le rendement technologique à la cuisson (fonte) a été déterminé.

1.2. Echantillonnage et dosages.

A J0, 10 échantillons de foie congelés ont été sélectionnés afin de conserver la variabilité du poids de foie. Pour les autres dates, 6 échantillons ont été choisis par type de gavage, 3 avec une fonte faible et 3 avec une fonte élevée, tout en respectant la variabilité de poids de foie. Sur l'ensemble de ces échantillons, les mesures suivantes ont été réalisées :

- Mesure de la teneur en lipides.

Elle a été estimée sur le foie entier frais à l'aide d'un spectrophotomètre proche infrarouge (NIRS) selon le protocole décrit par Marie-Etancelin et al., (2014).

- Mesure de la teneur en matières sèches (MS) et minérales (MM).

Après broyage dans l'azote liquide, les échantillons sont séchés en étuve à 103°C puis minéralisés par passage au four à 550°C afin de déterminer les teneurs respectives en MS et MM.

- Mesures des activités des caspases.

Après extraction des protéines dans une solution adaptée, les activités des caspases 3+7, 8 et 9 ont été mesurées par chémoluminescence à l'aide du kit Caspase-Glo® Assay (Promega France, 69260 Charbonnières-les-Bains).

- Statistiques.

L'ensemble des calculs statistiques ont été effectués avec le logiciel SAS (2012) en utilisant le modèle linéaire généralisé (Proc GLM) pour les analyses de variance et les comparaisons de moyennes (test de Student-Newman-Keuls). Les corrélations entre les différentes variables sont celles de Pearson (Proc Corr) et les régressions linéaires ont été faites pas à pas (Proc Stepwise forward).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Quelle que soit la variable considérée, les effets du mode de gavage et de l'interaction mode de gavage*jour ne sont jamais significatifs ce qui nous a finalement amené à ne considérer que la modalité « Jour de Gavage (ou Jour) » dans la suite des analyses statistiques. Les résultats pour les principales

variables caractéristiques des foies sont reportés dans le tableau 1. Le poids du foie, sa teneur en lipides et en matière sèche augmentent régulièrement tout au long du développement de la stéatose. Au contraire, le rendement à la cuisson est statistiquement stable de J6 à J10 puis décroît fortement à J12 pour atteindre une valeur de 56,80%. Quelle que soit la caspase considérée, l'effet de la durée du gavage sur leur activité est toujours hautement significatif ($p < 0,0001$, tableau 2). On note que l'activité des caspases initiatrices (-8, -9) est relativement stable entre J0 et J6, puis diminue à J8 pour ensuite augmenter fortement. L'activité des caspases effectrices (-3 + -7) est stable et basse de J0 à J8, puis augmente fortement à J10 et J12. Les variations similaires des activités des caspases -8 et -9 ne permettent pas de privilégier l'implication plus spécifique de la voie d'activation intrinsèque (liée à l'activité de la caspase-9) ou extrinsèque (liée à l'activité de la caspase 8). On peut donc simplement en déduire que le phénomène d'initiation de l'apoptose est contenu jusqu'à J6 et décroît à J8, ce qui pourrait traduire une certaine capacité d'adaptation du foie, puis s'installe de manière prononcée et irréversible à partir de J10. Il y a donc bien, en fin de gavage, des phénomènes apoptotiques dans le foie stéatosé des canards gavés. Les corrélations simples entre le rendement et l'activité des caspases, le taux de lipides ou de matière sèche sont négatives et voisines ($-0,7 < r < -0,6$, $p < 0,001$) alors que celle avec le poids du foie est légèrement plus élevée ($r = -0,82$, $p < 0,001$). On en déduit donc que plus le foie est lourd, avec une humidité réduite, un engraissement et des activités de caspases élevées, plus il aura tendance à fondre au moment de la cuisson. Pour essayer de préciser la valeur de prédiction du rendement du foie, nous avons utilisé la procédure de régression linéaire ascendante pas à pas de SAS (proc stepwise forward) qui permet de combiner linéairement l'ensemble des variables prédictrices en les introduisant progressivement dans le modèle en fonction de leurs poids prédictifs respectifs. Si une nouvelle variable à introduire ne permet pas une amélioration satisfaisante de la prédiction, la procédure s'arrête sur le dernier modèle le plus prédictif obtenu. En utilisant cette procédure sur l'ensemble de la période gavage, le modèle le plus

prédictif combine le poids du foie, sa teneur en lipides et les activités des trois caspases avec un r^2 de 0,77 et un C(p) de Mallows de 6 ce qui indique que le modèle est précis et non biaisé (figure 1). Avec le poids de foie comme seule variable prédictrice, le r^2 est de 0,67 et le C(p) de Mallows de 1,13. Pour travailler sur une gamme de poids, et des pratiques, plus proches de la réalité de terrain, nous avons reconduit le même type d'approche en ne considérant que les foies des canards gavés pendant 10 ou 12 jours (figure 1). Dans ces conditions, les variables prédictives restent les mêmes mais avec un r^2 de 0,75 et un C(p) de Mallows de 5,19 pour un optimum de 6. En sus de l'information apportée par le poids du foie lui-même et sa teneur en lipides, la connaissance de l'activité des caspases au moment de l'abattage permet donc de prédire avec une bonne certitude le rendement des foies à la cuisson que ce soit sur une gamme de poids large ou plus resserrée.

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons démontré que des signes probants de la présence du phénomène d'apoptose pouvaient être détectés lors de la mise en place de la stéatose hépatique et plus particulièrement en fin de période de gavage quand le métabolisme du foie est fortement sollicité. L'augmentation brutale de ce niveau d'activité des caspases en fin de gavage peut être interprétée comme le signe d'une certaine adaptation tissulaire à une forte surcharge métabolique. L'activité des caspases ayant pour but de dégrader certaines protéines, cela doit possiblement fragiliser la structure cellulaire hépatocytaire et pourrait donc expliquer pourquoi les foies avec les plus hauts niveaux d'activités des caspases sont ceux qui présentent également les plus faibles rendements à la cuisson. Les caspases n'étant pas les seules protéases susceptibles de fragiliser la structure des hépatocytes, notamment en fin de gavage, d'autres études sont en cours pour caractériser le niveau global de protéolyse dans les foies gras et ainsi mieux définir le lien pouvant exister entre protéolyse et fonte du foie gras à la cuisson.

SAS, 2012. The analysis for this paper was generated using SAS software. Copyright © 2012 SAS Institute Inc. SAS and all other SAS Institute Inc. product or service names are registered trademarks or trademarks of SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Theron L., Cullere M., Bouillier-Oudot M., Manse H., Dalle Zotte A., Molette C., Fernandez X., and Z. G. Vitezica, 2012, J. Anim. Sci., 90, 3312-3317

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Evan, G.I. and K.H. Vousden, 2001. Nature, 411(6835), 342-348.
 Lockshin, R.A. and Z. Zakeri, 2004, Int. J. Bio. Cell Bio, 36, 2405-2419.
 Marie-Etancelin C., Vitezica Z.G., Bonnal B., Fernandez X. and D. Bastianelli, 2014. Gen. Sel. Evol., 46(38), 1-7.

Tableau 1 : Evolution au cours du gavage du poids (Pdf), du rendement à la cuisson (%Rdt) et des teneurs en lipides (%L) et en matières sèches (%MS) et minérales (%MM) du foie.

	J0	J2	J4	J6	J8	J10	J12	p
Pdf (g)	85,04 ^f	220,77 ^e	254,65 ^e	355,98 ^d	478,07 ^c	617,19 ^b	784,06 ^a	<0,0001
%Rdt	-	-	-	97,54 ^a	93,79 ^a	86,64 ^a	56,80 ^b	<0,0001
%L	4,14 ^f	14,44 ^e	31,30 ^d	42,72 ^c	49,48 ^b	52,07 ^b	68,32 ^a	<0,0001
%MS	30,09 ^f	38,43 ^e	48,30 ^d	57,07 ^c	62,29 ^b	64,42 ^b	68,32 ^a	<0,0001
%MM	1,08 ^f	0,76 ^f	0,73 ^d	0,39 ^c	0,30 ^{bc}	0,22 ^b	0,25 ^a	<0,0001

Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas différentes (p<0,05)

Tableau 2 : Evolution au cours du gavage de l'activité des caspases initiatrices (8 et 9) et effectrices (3 + 7).

	J0	J2	J4	J6	J8	J10	J12	p
Caspase 8	1,33 ^b	1,00 ^{bc}	1,15 ^{bc}	1,08 ^{bc}	0,76 ^c	1,28 ^b	1,68 ^a	<0,0001
Caspase 9	1,19 ^{bc}	0,97 ^{bc}	0,92 ^{bc}	1,16 ^{bc}	0,77 ^c	1,35 ^b	1,86 ^a	<0,0001
Caspases 3+7	0,99 ^c	0,67 ^c	0,81 ^c	1,03 ^c	1,07 ^c	3,01 ^b	4,24 ^a	<0,0001

Les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas différentes (p<0,05)

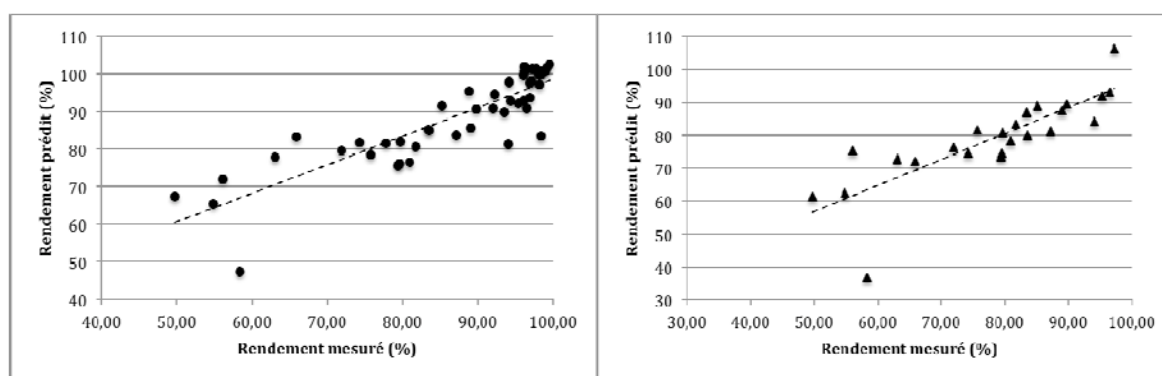


Figure 1 : Représentation de la valeur de la fonte du foie prédite en fonction de la valeur mesurée pour l'ensemble des animaux concernés (à gauche) et ceux des stades J10 + J12 (à droite).