

CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET METABOLIQUE PRECOCE DE POUSSINS ISSUS D'UNE SELECTION DIVERGENTE SELECTIONNEE SUR LE PH ULTIME DE LA VIANDE

Métayer-Coustard Sonia¹, Royer David¹, Bordeau Thierry¹, Cailleau-Audouin Estelle¹,
Godet Estelle¹, Praud Christophe¹, Delaveau Joël², Rat Christophe², Raynaud Emilie¹,
Le Bihan-Duval Elisabeth¹, Berri Cécile¹

¹ INRA, UR83 Recherches Avicoles - 37380 - Nouzilly

² INRA, UE1295 Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours – 37380 - Nouzilly

sonia.metayer-coustard@inra.fr

RÉSUMÉ

Chez le poulet, le pH ultime (pHu) de la viande est en grande partie déterminé par la teneur en glycogène du muscle à l'abattage. Une sélection divergente sur le pHu du filet a permis la création des lignées pHu+ et pHu-, qui représentent un modèle unique pour étudier le contrôle génétique et physiologique des réserves énergétiques et de la qualité de la viande. Plusieurs caractéristiques ont été mesurées dans les deux lignées à l'éclosion puis à 5 jours d'âge: le poids vif, les rendements en muscles, le glycogène musculaire et hépatique et plusieurs paramètres plasmatiques. A l'éclosion, les lignées pHu+ et pHu- présentent des poids vifs et des rendements musculaires équivalents. Toutefois, la lignée pHu- présente une glycémie supérieure à celle de la lignée pHu+, différence qui va persister jusqu'à l'âge d'abattage. Par ailleurs, les cultures primaires des myoblastes issues des deux lignées révèlent des différences de réponse à l'insuline. Après 5 jours, les lignées pHu+ et pHu- sont déjà divergentes en terme de glycogène (et de pHu) et de rendement en muscle, pour un poids vif similaire. Les différences entre lignées observées à l'éclosion et à 5 jours ont pu être associées à des régulations au niveau des voies de signalisation impliquées dans la synthèse protéique et le turn-over du glycogène musculaire. En conclusion, les poussins pHu+ et pHu- présentent dès l'éclosion des capacités de réponses différentes aux nutriments et aux hormones cohérentes avec le fait qu'après seulement 5 jours d'alimentation, des différences significatives de rendement et de teneur en glycogène musculaire existent entre les deux lignées.

ABSTRACT

Early growth and metabolic characterizations of two chicken lines divergently selected on their breast meat ultimate pH

In chicken, the ultimate pH (pHu) of meat is largely determined by the muscle glycogen content at slaughter age. A divergent selection on the *Pectoralis major* pHu allowed the creation of the pHu+ and pHu- lines, which represent a unique model for studying the genetic and physiological control of energy reserves and the meat quality. Several characteristics have been measured in the two lines at hatch then at 5 days of age: animal weight, muscle yields, muscular and hepatic glycogen content and several plasma parameters. At hatch, the pHu+ and pHu- lines present equivalent body weights and muscle yields. However, the pHu- line shows a higher glycemia than the pHu+ line, a difference that will persist until the slaughter age. In addition, primary myoblasts cultures from both lines show differences in insulin response. After 5 days, the pHu+ and pHu- lines are already divergent in terms of glycogen (and pHu) and muscle yield, for a similar body weight. Differences between both lines observed at hatch and at 5 days may have been associated with regulation of signaling pathways involved in protein synthesis and muscle glycogen turnover. In conclusion, pHu+ and pHu- chicks already have at hatch the ability to respond differently to nutrients and hormones consistent with the fact that after only 5 days of feeding, significant differences in yield and muscular glycogen contents exist between the two lines.

INTRODUCTION

Les lignées expérimentales pHu- et pHu+ représentent un modèle animal unique pour étudier les contrôles génétique et physiologique des caractéristiques de qualité des viandes associées aux variations de glycogène et de pH musculaire. L'objectif de l'étude est de déterminer si les différences phénotypiques des animaux caractérisés à l'âge d'abattage (Alnahhas et al., 2014, 2015) sont déjà effectives à l'éclosion (J0), avant tout apport nutritionnel, ou bien si elles se mettent en place au cours de l'élevage des animaux. Les lignées pHu+ et pHu- ont donc été caractérisées physiologiquement et métaboliquement à l'éclosion (J0) puis 5 jours post-éclosion (J5) pour évaluer l'impact de la nutrition sur le démarrage des animaux, qui constitue une phase critique de la croissance, en particulier musculaire, des poulets.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et matériel biologique

Soixante animaux (30 pHu+ et 30 pHu-) sont prélevés dès le jour de l'éclosion avant tout apport alimentaire (J0). Un second lot de 60 animaux est mis en élevage au sol dans des conditions de température et de lumière classiques. Ce deuxième groupe est nourri *ad libitum* jusqu'à 5 jours d'âge (J5).

Les poussins sont pesés puis mis à mort par décapitation à l'éclosion et après 8h de jeûne pour les animaux élevés jusqu'à J5. Du sang est prélevé sur tubes héparinés (135 USP U Lithium Heparin, VENOSAFE, Dominique Dutscher, Brumath, France), centrifugé (3000g, 10 min., 4°C), puis les surnageants correspondant sont aliquotés et congelés à -20°C jusqu'à la mesure des paramètres plasmatiques. Les muscles *Pectoralis major* sont prélevés immédiatement après la mort, pesés et congelés dans de l'azote liquide. Six muscles par lignée et par âge sont réservés pour les extractions de cellules myogéniques.

1.2. Dosages plasmatiques

Les mesures de glycémie, d'acide urique et de triglycérides sont réalisées sur plasma avec des kits commerciaux (Glucose RTU™, Acide Urique Enzymatique PAP 150, Triglycérides Enzymatiques PAP 150, Biomérieux, Craponne, France). Les acides aminés libres (AAL) sont mesurés après extraction avec 10% (v/v) d'acide sulfo-salicylique en utilisant 2% de réactif ninhydrine (SIGMA-ALDRICH, Lyon, France). La L-serine a été utilisée comme standard (Dupont et al., 2008). Ces dosages enzymatiques ont été réalisés avec un spectrophotomètre TECAN infinite M200 selon les recommandations du fournisseur (Fossati et Prencipe, 1982 ; Artiss & Entwistle, 1981).

1.3. Mesure du pHu des muscles *Pectoralis major*

Les muscles sont broyés avec un Ultra-Turrax T25 dans une solution de KCl-iodoacétate (sodium iodoacetate 5mM, KCl 150mM) à raison de 1 g de tissu pour 9 ml de solution. Le pH de cette solution a ensuite été mesuré.

1.4. Voies de signalisation impliquées dans la synthèse protéique et le turn-over du glycogène musculaire

Trois cent milligrammes de *Pectoralis major* de poulet sont broyés avec l'Ultra-Turrax T25 à 4°C dans du tampon de lyse (Cell lysis buffer (10X), Cell Signaling Technology, Leiden, Pays-Bas) dans lequel sont ajoutées 4 pastilles de cocktail d'inhibiteurs de protéases pour 50 ml de tampon (Roche, Boulogne-Billancourt, France). Les homogénats sont laissés 30 min dans la glace avant d'être centrifugés pendant 30 min à 1000 g et 4°C. Le surnageant est prélevé et soumis à une seconde centrifugation à 30000 g pendant 45 min à 4°C. Le surnageant est de nouveau prélevé, aliquoté et congelé à -80°C.

Les protéines sont réduites dans un tampon de Laemmli (Tris HCl, SDS 4%, glycérol 20%, bleu de bromophénol 0,05%) contenant du β -mercaptoéthanol (5%) pour réduire les ponts disulfure, puis dénaturées par chauffage à 95°C pendant 5 min. Les protéines sont séparées sur gel d'acrylamide (10%) SDS PAGE. Les protéines du gel sont transférées par électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes sont ensuite saturées avec du TBS-Tween (0,1%) lait écrémé ou BSA (5%) pendant 1 h à température puis incubées la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (anti-MF20 ou vinculine) dilué 1/1000 dans un tampon TBS-Tween (0,1%). Les membranes sont enfin incubées avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à un fluorophore pendant 1 h dans l'obscurité à température ambiante puis scannées avec un scanner Odyssey SYSTEM (LI-COR Inc. Biotechnology, Lincoln, NE, USA). L'intensité des bandes détectées est mesurée avec le logiciel Odyssey software release 1.2.

1.5. Culture de cellules musculaires *in vitro*

A J0 et à J5, 6 muscles *Pectoralis major* provenant d'animaux des lignées pHu+ et pHu- ont été prélevés pour extraire les cellules satellites musculaires et évaluer leurs caractéristiques en conditions de prolifération et différenciation mais aussi leurs réponses respectives à l'insuline.

Pour les expériences de stimulation des cellules, les cellules sontensemencées en plaques de 6 puits à raison de 30000 cellules/cm² dans du milieu de prolifération complet DMEM-HAMF12 SIGMA-ALDRICH, Lyon, France). Après 48 h de prolifération, le milieu de culture des cellules est remplacé par du milieu de différenciation DMEM-HAMF12 contenant les antibiotiques et l'antifongique

mais supplémenté avec 2% de sérum de cheval et 0,5% de sérum de veau fœtal. Après 48 h de différenciation, les cellules sont lavées une fois avec du PBS avant d'être sévrées dans un milieu DMEM-HAMF12 sans sérum pendant 4 h, puis sont utilisées pour les expériences de stimulation. Les cellules sont alors incubées dans du milieu DMEM-HAMF12 supplémenté ou pas avec de l'insuline (100 nM) pendant 0, 15 ou 45 min. La stimulation est stoppée par un lavage avec du PBS froid. Les cellules sont récupérées par grattage du puits avec 200 µl de tampon de lyse (identique à celui utilisé pour la solubilisation des protéines de la partie *in vivo*). Les extraits de cellules sont lysés pendant 30 min à 4°C puis les tubes sont centrifugés (12000 g, 30 min, 4°C) et les surnageants sont prélevés et conservés à -80°C jusqu'à leur analyse par électrophorèse SDS-PAGE et Western Blot comme décrit dans la partie *in vivo*.

1.5. Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM. Les analyses statistiques sont effectuées par analyse de variance (ANOVA) avec le logiciel Statview Software Program version 5 (SAS Institute, Carry NC). Les différences entre traitements sont considérées comme significatives pour une probabilité $P < 5\%$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

A J0, le rendement musculaire ne présente pas de différence entre la lignée pHu+ et la lignée pHu- (Tableau 1). De même, le pHu mesuré sur le *Pectoralis major* n'est pas différent entre les deux lignées. Chez le poulet, le pHu est génétiquement corrélé négativement avec la teneur en glycogène du muscle (le Bihan-Duval et al., 2008). Or ce glycogène musculaire est le principal substrat énergétique dont dispose un poussin en fin d'incubation pour bêcher la coquille et sortir de l'œuf. La qualité des poussins a également été évaluée selon une grille de scores établie par Tona et al. (Tona et al., 2003). Les pHu+ présentaient plus de jaune résiduel non réabsorbé à l'éclosion. Les pHu+ n'étant pas plus petits que les poussins de l'autre lignée à l'éclosion, ce résultat peut laisser penser à une utilisation différente des nutriments dans l'œuf. Cette hypothèse est étayée par le fait qu'à J0, les différents paramètres plasmatiques mesurés sont très différents entre les poussins pHu+ et pHu- (Tableau 2): la glycémie et les triglycérides sont plus élevés chez les pHu- alors que l'acide urique est plus élevé chez les pHu+. L'acide urique étant le déchet du catabolisme des acides aminés, les pHu+ pourraient avoir un catabolisme protéique plus actif que les pHu- et activer des voies de la protéolyse pour dégrader les protéines musculaires et pallier ainsi à son déficit en glycogène musculaire. Une fonte musculaire dû à de la protéolyse a en effet déjà été observée chez des poussins en fin d'incubation (Guernec et al., 2003 ; Everaert et al., 2013).

Après seulement 5 jours d'élevage, les poussins pHu+ sont différents des pHu- avec un poids de muscle, un rendement musculaire et un pHu (*Pectoralis major*) supérieurs aux poussins pHu-. Ainsi, le poids de muscle pectoral des poussins pHu+ est 10% supérieur à celui des pHu- ($P = 0,017$), ce qui se traduit par un rendement supérieur de +9 % ($P = 0,001$). Alors que le pHu ne variait pas entre lignées à J0, l'écart de la valeur de pHu à J5 entre les pHu+ et pHu- est de 0,45 unité pH et est comparable à celui observé à l'âge d'abattage (Alnahhas et al., 2014). En revanche au niveau plasmatique, plus aucun effet lignée n'est observé sur la teneur en acide urique. En effet la teneur élevée observée à J0 chez les pHu+ diminue et rejoint celle des pHu-. Les teneurs en triglycérides diminuent également de manière significative entre J0 et J5 et ce dans les deux lignées. Cette diminution peut s'expliquer par la réorientation du métabolisme des poussins à l'éclosion. En effet, dans l'œuf les poussins disposent comme principale source de nutriments et d'énergie des composants du jaune d'œuf, riches en lipides, tandis qu'après l'éclosion les poussins vont utiliser majoritairement les glucides de l'alimentation qui leur sera distribuée. Seule la glycémie est encore affectée par la lignée à J5, avec une glycémie plus élevée chez les pHu-. Cette différence est encore observée à 6 semaines d'âge (Beauclercq et al., 2016). Pour comprendre ce résultat, il serait intéressant de vérifier si cette différence de glycémie est liée à des différences d'insulinémie et/ou de ses récepteurs entre les deux lignées. Ainsi, il serait intéressant de vérifier si les deux lignées expriment différemment au niveau de leurs muscles les transporteurs de glucose (GLUTs) car le transport de glucose constitue l'étape limitante d'entrée du glucose dans la cellule.

Des approches complémentaires réalisées *in vivo* et *in vitro* ont été développées pour caractériser le métabolisme les poussins issus des deux lignées. Dès J0, les poussins présentent des capacités différentes pour activer des voies de signalisation impliquées dans la synthèse protéique et le stockage de glucose sous forme de glycogène.

Ainsi les pHu+ présentent une meilleure capacité à activer les phosphorylations en cascade de la voie P70S6K/S6, qui est directement impliquée dans la protéosynthèse. Ce résultat est cohérent avec le fait que ce sont ces poussins qui présentent les poids et les rendements en muscles pectoraux les plus élevés.

Une autre voie, impliquant l'AMPK, senseur énergétique majeur de la cellule musculaire, est aussi moins activée chez les poussins pHu-. Ceci pourrait en partie expliquer la glycémie plus élevée chez ces animaux. En effet, lorsque l'AMPK est phosphorylée et active, elle stimule la translocation des transporteurs de glucose insulino-sensibles à la membrane des cellules favorisant ainsi l'entrée du glucose dans celles-ci (Russell et al., 1999). Son activation moindre chez les pHu- est donc cohérente avec un moindre transport de glucose vers l'intérieur

de la cellule et une glycémie plus élevée. Les résultats obtenus concernant une des cibles de l'AMPK, la glycogène synthase (ou GS) sont plus difficiles à expliquer. En effet, l'activation par phosphorylation de l'AMPK inhibe la GS et donc la synthèse de glycogène (Wojtaszewski et al., 2002). Or la GS est plus phosphorylée et donc plus inhibée chez les pHu-, qui pourtant présentent une activation de l'AMPK et des niveaux de glycogène musculaire supérieurs à ceux de la lignée pHu+. Sachant que la GS est sous le contrôle direct d'autres kinases comme la GSK3 (glycogène synthase kinase, Oreña et al., 2000), des études complémentaires seront nécessaires pour comprendre ce résultat.

Les approches *in vitro* nous ont permis de montrer qu'une fois en culture les cellules prélevées à J0 issues des muscles pHu- ont une capacité inférieure à se différencier que celles des pHu+ (Figure 1). Ainsi, les myotubes des pHu- sont beaucoup plus petits et fins que ceux des pHu+. Concernant les cellules prélevées à J5, les différences sont beaucoup plus ténues entre les deux lignées même si les myotubes sont un peu plus nombreux dans les cultures de cellules issues des pHu+. Afin d'objectiver cette différence, la myosine sarcomérique (marqueur de différenciation cellulaire) a été quantifiée sur les lysats de cellules avec un anticorps MF20 pour évaluer leur état de différenciation (Figure 2). La quantification de la myosine sarcomérique dans les lysats cellulaires montre une capacité supérieure des cellules prélevées

à J5 à se différencier que celles prélevées à J0 ($P < 0.0001$). Un effet lignée ($P = 0,03$) en faveur de pHu+ a également pu être mis en évidence à J0 et à J5.

Les résultats *in vitro* concernant la réponse à l'insuline restent préliminaires et à confirmer mais semblent néanmoins indiquer que l'insuline active différemment des voies de signalisation telle que la P70S6K/S6 dans les cellules issues des deux lignées.

CONCLUSION

Cette étude qui combine des approches *in vivo* et *in vitro* montre que les différences phénotypiques (poids, rendement, pHu et glycogène musculaires) des lignées pHu+ et pHu- observées à l'âge d'abattage ne sont pas détectables à l'éclosion mais sont établies dès 5 jours d'âge. Par contre, dès l'éclosion, les lignées pHu+ et pHu- présentent des différences physiologiques qui pourraient en partie expliquer leurs différences de réponse aux nutriments et aux hormones. Ces travaux vont se poursuivre en étudiant la réponse des animaux issus de ces deux lignées à des variations nutritionnelles précoces ou des conditions de démarrage dégradées et évaluer de manière plus large l'impact des réserves énergétiques musculaires du poussin sur sa robustesse et ses capacités de croissance ultérieure.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alnahhas N., Berri C., Boulay M., Baéza E., Jégo Y., Baumard Y., Chabault M., Le Bihan-Duval E., 2014. JAS., [92(9)], 3816-24
- Alnahhas N., Le Bihan-Duval E., Baéza E., Chabault M., Chartrin P., Bordeau T., Cailleau-Audouin E., Meteau K., Berri C., 2015. JAS., [93(9)], 4524-31
- Artiss J.D. & Entwistle W.M., 1981. Clin Chim Acta., (116), 301-309
- Beauclercq S., Nadal-Desbarats L., Hennequet-Antier C., Collin A., Tesseraud S., Bourin M., Le Bihan-Duval E., Berri C., 2016. J Proteome Res., [15(4)], 1168-78
- Dupont J., Tesseraud S., Derouet M., Collin A., Rideau N., Crochet S., Godet E., Cailleau-Audouin E., Métayer-Coustard S., Duclos M.J., Gespach C., Porter T.E., Cogburn L.A., Simon J., 2008. Journal of Endocrinology., (197), 531-542
- Everaert N., Métayer-Coustard S., Willemsen H., Han H., Song Z., Ansari Z., Decuypere E., Buyse J., Tesseraud S., 2013. Br J Nutr., [110(2)], 265-74
- Fossati P. & Prencipe L., 1982. Clin Chem., (28), 2077-2080
- Guerneq A., Berri C., Chevalier B., Wacrenier-Cere N., Le Bihan-Duval E., Duclos M.J., 2003. Growth Horm IGF Res., [13(1)], 8-18
- Le Bihan-Duval E., Debut M., Berri C.M., Sellier N., Santé-Lhoutellier V., Jégo Y., Beaumont C., 2008. BMC Genet., (9), 53.
- Oreña S.J., Torchia A.J., Garofalo R.S., 2000. J Biol Chem., [275(21)], 15765-72
- Russell R.R. 3rd, Bergeron R., Shulman G.I., Young L.H., 1999. Am J Physiol., [277(2 Pt 2)], H643-9
- Tona K., Bamelis F., De Ketelaere B., Bruggeman V., Moraes V.M.B., Buyse J., Onagbesan O., Decuypere E., 2003. Poult. Sci., (82), 736-741
- Wojtaszewski J.F., Jørgensen S.B., Hellsten Y., Hardie D.G., Richter E.A. 2002. Diabetes., [51(2)], 284-92

Tableau 1. Poids vif, poids et rendement en muscle *Pectoralis major* des poussins à J0 et J5

Jour	J0		J5		Effet lignée	
	pHu+	pHu-	pHu+	pHu-	J0	J5
Poids vif (g)	42,45 ± 0,46	40,84 ± 0,40	98,96 ± 1,40	96,0 ± 1,97	*	NS
Poids <i>P. major</i> (g)	0,52 ± 0,01	0,48 ± 0,01	4,37 ± 0,09	3,92 ± 0,13	NS	*
Rdt ^s <i>P. major</i> (%)	1,21 ± 0,02	1,27 ± 0,02	4,43 ± 0,06	4,06 ± 0,07	NS	***

^sRdt : rendement = (poids du tissu × 100)/poids de l'animal ; NS : non significatif ; *P < 0,05 ; ***P < 0,001

Tableau 2. Concentrations plasmatiques en glucose, acide urique, triglycérides et acides aminés libres

Age	Lignée	Glycémie (g/L)	Acide Urique (μmoles/L)	Triglycérides (mmoles/L)	Acides Aminés Libres
J0	pHu+	2,96 ± 0,02	650,90 ^a ± 40,86	0,331 ± 0,014	0,513 ± 0,025
	pHu-	3,08 ± 0,02	414,77 ^b ± 24,66	0,441 ± 0,017	0,478 ± 0,019
J5	pHu+	3,01 ± 0,03	412,29 ^b ± 25,92	0,214 ± 0,009	0,492 ± 0,019
	pHu-	3,04 ± 0,04	447,14 ^b ± 20,06	0,236 ± 0,013	0,545 ± 0,030
Effet Lignée		*	***	**	NS
Effet Age		NS	***	****	NS
Lignée X Age		NS	****	NS	NS

NS : non significatif ; *P < 0,05 ; **P < 0,01 ; ***P < 0,001 ; ****P < 0,0001

Figure 1. Culture de cellules pHu+ et pHu- issues de poussins à l'éclosion après 2 jours de différenciation. Le grossissement utilisé est ×20.

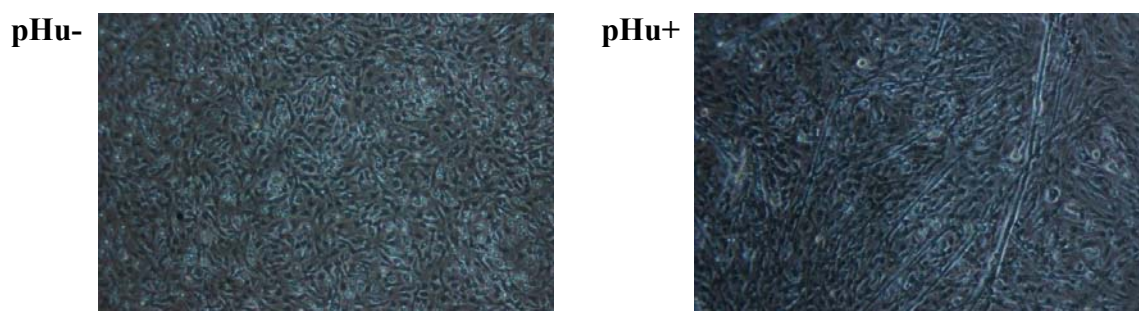


Figure 2. Quantification par Western Blot de la myosine sarcomérique (MF20), marqueur de différenciation cellulaire, dans les cultures de cellules J0 et J5. Les valeurs sont normalisées avec la vinculine.

