

ETUDE DES MECANISMES DE REGULATION DES CAPTAGES LIPIDIQUE ET GLUCIDIQUE PERIPHERIQUES ET HEPATIQUES CHEZ LES PALMIPÈDES A FOIE GRAS

Tavernier Annabelle¹, Gontier Karine¹, Jaglin Mathilde¹, Rey Mickael¹, Ricaud Karine¹, Bernadet Marie-Dominique², Davail Stéphane¹

¹IPREM EEM UMR CNRS 5254, 371 Rue du Ruisseau 40000 Mont de Marsan

²INRA UEPFG, 1076 Route de Haut Maucq 40280 Benquet

annabelle.tavernier@univ-pau.fr

RESUME

L'objectif de notre étude est d'identifier les mécanismes de régulation du captage lipidique et glucidique, périphérique et hépatique, chez divers types génétiques de palmipèdes, à savoir deux types parentaux Pékin et Barbarie et leur hybride le mulard, soumis à deux modalités d'alimentation. Afin de répondre à l'objectif, nous avons étudié les palmipèdes en situation de gavage en comparaison avec les groupes de canards restés en alimentation *ad libitum*. La composition corporelle met en avant un effet du gavage sur le poids du foie et du muscle rapportés au poids vif chez tous les types génétiques. Cependant, le mulard se rapproche du Barbarie pour ce qui est du foie mais se rapproche du Pékin concernant le muscle. Un effet gavage et génotype sont également à observer sur la glycémie et la triglycéridémie. Enfin, l'étude de l'expression des gènes GLUT2, FAS et FABP4 démontre un effet du gavage modéré à mettre en relation avec la nécessité de poursuivre une analyse en cinétique post prandiale, mais également d'étudier d'autres gènes des métabolismes glucidique et lipidique.

ABSTRACT

Regulatory mechanisms involved in lipid and glucose absorption at peripheral and hepatic level in overfed waterfowl

The aim of our study was to identify the regulatory mechanisms of lipid and glucose uptake at peripheral and hepatic levels among various genetic types of waterfowl, namely two parental types; Pekin and Muscovy ducks and the hybrid, the mule ducks. We compared overfed ducks with control ducks *ad libitum* fed. Body composition showed an effect of overfeeding on liver and muscle weights related to total body weight for all genotypes. However, the mule was closed to Muscovy ducks for the liver but was closed to Pekin ducks for muscle. Overfeeding and genotype effects were also observed on glycaemia and triglyceridaemia. Finally, the study of the expression of GLUT2, FAS and FABP4 demonstrated a low effect of overfeeding. Nevertheless, this effect requires further analysis like postprandial kinetic, and analysis of complementary genes of the glucose and lipid metabolisms.

INTRODUCTION

Chez les palmipèdes, la stéatose hépatique (ou foie gras) est induite par surcharge alimentaire ou gavage. L'apparition du foie gras résulte d'une forte activité de lipogenèse hépatique (Saadoun et Leclercq, 1986), les lipides néo-synthétisés sous forme de triglycérides (TG) s'accumulent et entraînent ainsi une forte stéatose hépatique (Hermier et al., 1991). Cependant, en fonction des espèces utilisées, on observe une sensibilité métabolique différente au gavage, supposant un déterminisme génétique. En effet, le canard Pékin, en plus d'une lipogenèse hépatique, présente une forte exportation périphérique des lipides par rapport aux canards de Barbarie et mulard (hybride stérile issu du croisement entre un mâle Barbarie et une femelle Pékin) qui présentent des poids de foie gras élevés (Baéza et al., 2005; Davail et al., 2003). Cette différence de performance en réponse au gavage pourrait être le résultat d'une différence de régulation de la balance synthèse/exportation des TG au niveau des tissus. Chez les canards de Barbarie et mulard, la majorité des TG hépatiques ne seraient pas exportés et favoriseraient la formation du foie gras (Hermier et al. 2003). Chez le canard Pékin, l'exportation des TG via la formation des VLDL (Very Low Density Lipoproteins) est plus active ainsi que l'expression de protéines de transport des acides gras (AG) telles que la A-FABP (Adipocyte Fatty Acid Binding Protein) ceci permettant un engraissement périphérique accru (Saez et al., 2009). De plus, l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme catabolisant la dégradation des TG au niveau périphérique, est augmentée chez le Pékin en fin de gavage, permettant un stockage périphérique des lipides accru (André et al., 2007). Les transporteurs de glucose peuvent également jouer un rôle non négligeable dans la mise en place de la stéatose hépatique. Le maïs, principal aliment de la pâtée de gavage, va être dégradé en glucose lors de la digestion, l'internalisation de ce dernier va alors se faire via des transporteurs spécifiques localisés sur la membrane des entérocytes. Transporté vers les organes cibles, le glucose pourra être métabolisé. Une internalisation différentielle du glucose peut également être une piste quant aux différences génotypiques de réponse au gavage. Notre étude se propose donc d'étudier les taux d'expression des transporteurs de glucose et d'acides gras dans les tissus d'intérêt ainsi que l'expression d'une enzyme de la lipogenèse, la Fatty Acid Synthase (FAS).

1. MATERIEL ET METHODES

Animaux

Six lots de 48 canards mâles Pékin (*Anas platyrhynchos*), Barbarie (*Cairina moschata*), et mulards issus du couvoir Grimaud (Roussay, France) ont été élevés dans des conditions naturelles de température et de lumière à l'unité expérimentale (UEPFG) de l'INRA Artiguères (Benquet, France). Chaque lot a été réparti en 6 loges. Tous les animaux ont été nourris avec les mêmes régimes de démarrage (EM : 2752 kcal/kg ; protéines brutes : 17,5%) et de croissance (EM : 2803 kcal/kg ; protéines brutes : 15%). La moitié des lots (lots témoins) a été nourrie *ad libitum* depuis l'éclosion jusqu'à la quatorzième semaine. L'autre moitié, destinée au gavage, a été nourrie *ad libitum* de l'éclosion à la huitième semaine, puis a suivi un rationnement horaire (préparation au gavage). Le gavage (26% maïs sec grain entier, 36% farine de maïs, 38% eau ; 2 repas par jour) s'est étalé sur 14 jours à partir de la douzième semaine pour les lots concernés. La croissance des canards a été suivie par des pesées à 4, 6, 8, 10, 12, 13 et 14 semaines. Des prises de sang ont été effectuées 3 h après le repas les semaines 9, 10, 11 et 12, ainsi que les jours correspondants aux 4, 12, 18 et 24^{ème} repas de gavage. Les canards des différentes modalités ont été abattus 3 h après le repas par électronarcose et exsanguination à la station expérimentale (UEPFG INRA Artiguères) aux semaines 12 et 14 correspondant au début et à la fin du gavage. Après dissection anatomique, le foie, le muscle *Pectoralis major* et le gras sous cutané ont été pesés puis un échantillon a été prélevé. Enfin, les muqueuses jéjunales ont été grattées et récupérées. L'ensemble des échantillons a été conservé à -80°C jusqu'à l'analyse.

Analyses

Les dosages de paramètres plasmatiques (glycémie, triglycéridémie) ont été réalisés à l'aide de kits enzymatiques (Kit triglycérides LDB, Biodirect ; Kit Glucose RTU, Biomérieux).

Les ARNs totaux ont été isolés à partir des tissus congelés suivant la méthode du TRIZOL (Invitrogen/Life technologies, Saint Aubin, France) et les indications du fournisseur. Après dosage au Nanovue® Plus (GE Healthcare, Vélizy, France) Les ADNc ont été synthétisés par reverse transcription en utilisant la Superscript III (Life technologies). Les ADNc ont ensuite été quantifiés au StepOne (Applied

Biosystems/Life technologies) en utilisant des primers spécifiques synthétisés par Life Technologies. Le gène de référence utilisé est le gène de l'ARN Polymérase II. Les gènes d'intérêt pour le métabolisme lipidique sont la FABP4 et la FAS. Pour le métabolisme glucidique, l'expression du transporteur de glucose GLUT2 dans les muqueuses jéjunales a été étudiée. L'expression des gènes a été rapportée au gène de référence par le calcul de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et Schmittgen, 2001). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. Une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test de Tukey a été réalisée grâce au logiciel Prism (GraphPad Prism software). Les valeurs de $P < 0,05$ étaient considérées comme statistiquement significatives.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Données zootechniques

Les poids de foie des individus non gavés sont semblables à l'entrée en gavage quel que soit le type génétique (de 68 à 92 g). Les différences sont significatives pour les poids de magret et de gras sous-cutané rapportés au poids vif plus élevés chez le canard Pékin comparé aux canards mulards et Barbarie. Après 2 semaines de gavage, le pourcentage de foie rapporté au poids vif a été multiplié par 4 chez les canards de Barbarie et mulards et par 3 chez le canard Pékin. Les canards mulards présentent le poids de foie le plus élevé (482 g), suivis des canards de Barbarie (430 g) puis des canards Pékin (264 g) (différences significatives à $p \leq 0,05$). Le poids du magret reste constant sur la durée du gavage, quel que soit le type génétique, mais présente une diminution significative rapporté au poids vif (Tableau 1). On observe un effet du gavage sur le développement du gras sous-cutané, avec une augmentation significative du poids chez les canards mulards et Pékin gavés (respectivement 177 et 198 g) comparés aux individus du même âge nourris *ad libitum* (99 et 137 g). Seuls les canards de Barbarie présentent un poids de gras sous-cutané constant, toujours plus faible que les deux autres palmipèdes.

Dosages biochimiques

Les trois génotypes présentent une évolution de la glycémie différente lors du gavage (figure 1). La glycémie, chez les canards Pékin et Barbarie, augmente de façon relativement constante sur toute la durée du gavage. Chez le canard mulard, la glycémie augmente fortement en fin de gavage. A ce stade, la

glycémie est significativement différente entre les trois types génétiques ; le canard Pékin présentant une glycémie toujours plus faible que les deux autres types génétiques (en moyenne 3 à 3,5 g/L pour les canards mulard et Barbarie contre 2,3 g/L chez le canard Pékin). On remarque un effet du gavage sur la glycémie dès le 4ème repas pour les canards de Barbarie et mulard, le canard Pékin ne présentant cette différence qu'à partir du 18ème repas. Ce retard dans l'augmentation de la glycémie peut être expliqué par une différence d'expression des transporteurs de glucides méritant de plus amples investigations.

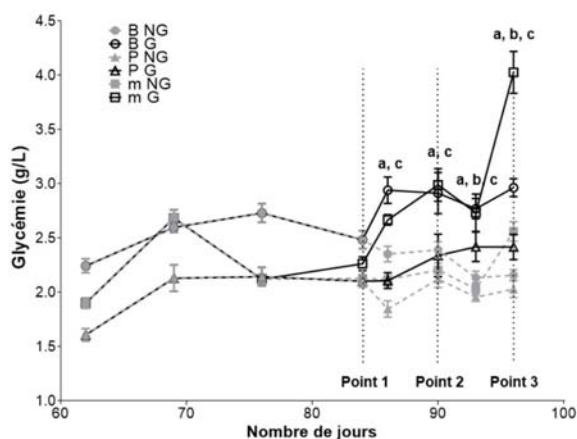
L'effet du gavage est significatif sur la triglycéridémie avec une augmentation du taux de TG circulants sur toute la durée du gavage comparé aux individus non gavés (Figure 2).

On peut noter un effet du génotype avec un taux de TG circulants significativement plus élevé à mi-gavage chez le canard Pékin ($p < 0,001$) ; ainsi que des valeurs distinctes pour chaque type génétique en fin de gavage avec les canards mulards présentant un taux plus élevé suivi des canards Pékin puis Barbarie (respectivement 7,41 ; 5,82 et 4,73 mmol/L).

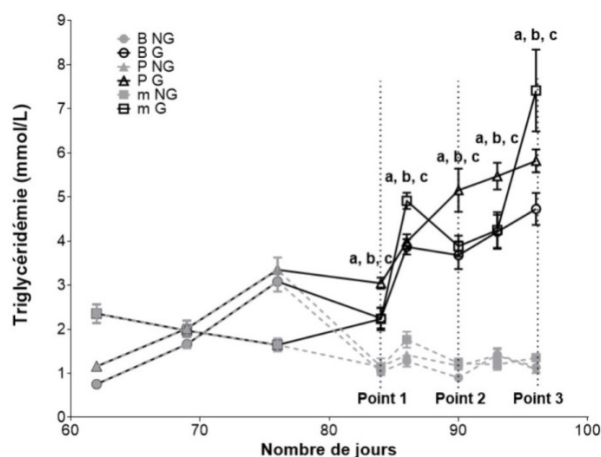
Tableau 1 - Composition corporelle des trois types génétiques de canards en fin de gavage (n = 16)

	Pourcentage / Poids Vif	
	Non Gavés (NG)	Gavés (G)
Foie		
Barbarie	1,66 $\pm$ 0,05	6,50 $\pm$ 0,27 ^{*,a}
mulard	1,61 $\pm$ 0,04	7,23 $\pm$ 0,30 ^{*,c}
Pékin	1,40 $\pm$ 0,04	4,14 $\pm$ 0,16 ^{*,a,c}
Muscle		
Barbarie	7,33 $\pm$ 0,09 ^a	6,17 $\pm$ 0,09 ^{*,a,b}
mulard	7,16 $\pm$ 0,12 ^c	4,74 $\pm$ 0,06 ^{*,b}
Pékin	5,95 $\pm$ 0,21 ^{a,c}	4,76 $\pm$ 0,16 ^{*,a}
GSC		
Barbarie	1,87 $\pm$ 0,06 ^a	1,83 $\pm$ 0,05 ^{a,b}
mulard	2,11 $\pm$ 0,08 ^c	2,65 $\pm$ 0,08 ^{*,b,c}
Pékin	2,94 $\pm$ 0,09 ^{a,c}	3,12 $\pm$ 0,08 ^{a,c}

* : effet significatif du gavage avec $P < 0,05$, a-c : effet significatif du type génétique : a : Barbarie vs Pékin, $p < 0,05$; b : Barbarie vs mulard, $p < 0,05$; c : Pékin vs mulard, $p < 0,05$.

Figure 1- Evolution de la glycémie (n=16)

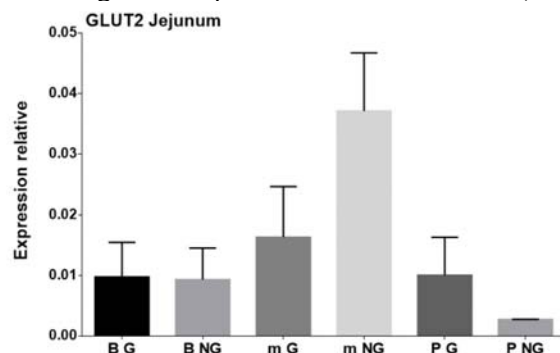
Effet gavage : a : Barbarie G vs NG, $p < 0,01$; b : Pékin G vs NG, $p < 0,05$; c : mulard G vs NG, $p < 0,001$.

Figure 2- Evolution de la triglycéridémie (n=16)

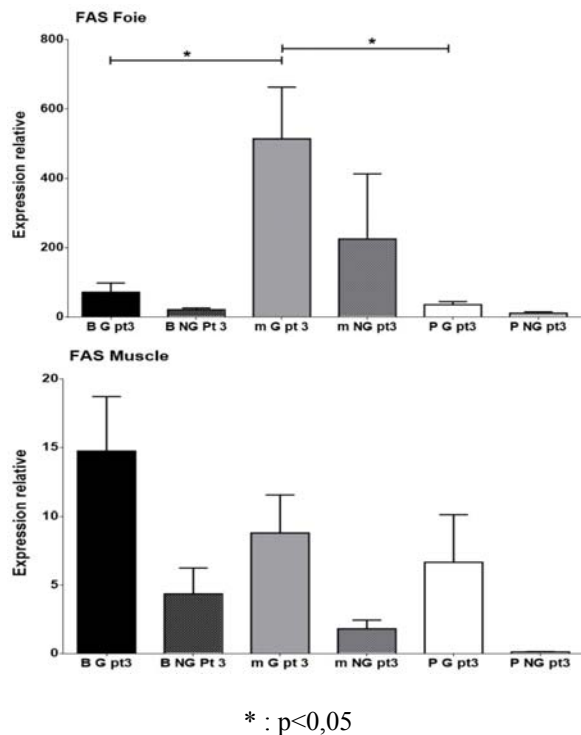
Effet gavage : a : Barbarie G vs NG, $p < 0,01$; b : Pékin G vs NG, $p < 0,001$; c : mulard G vs NG, $p < 0,05$.

Expression des gènes d'intérêt

Les différences d'efficacité de réponse au gavage entre les différentes espèces pourraient être expliquées par un défaut de captage du glucose au niveau intestinal après hydrolyse de l'amidon. L'expression relative quantifiée du transporteur GLUT2 (Figure 3) ne montre pas de différences significatives entre les individus gavés et non gavés, et ce, quel que soit le type génétique. Cependant, les prélèvements ayant été réalisés 3 h après le repas, l'expression transitoire de GLUT2 a pu être dépassée. Il serait donc intéressant de faire une étude de cinétique en étudiant l'expression de ce transporteur à différents temps après le repas. De plus, l'étude de l'expression d'autres transporteurs de glucose (GLUT1 ou SGLT1) pourrait être envisagée. Cependant, une expression de ce transporteur est pour la première fois mise en évidence dans les muqueuses jéjunales du canard.

Figure 3- Expression relative de GLUT2 (n=4)

Dans la figure 4, nous pouvons observer l'expression de la FAS dans le foie et le muscle. Bien qu'il n'y ait pas de différence significative dans le muscle, nous observons une tendance à l'augmentation de l'expression du gène induite par le gavage. Toutefois, la lipogenèse reste majoritairement au niveau hépatique avec des différences significatives inter-génotypes en gavage, le canard mulard présentant le plus fort taux d'expression. Ces observations sont à relier avec le fort taux de triglycérides circulants au même point pour l'hybride ainsi qu'un poids de foie/poids vif important. Cependant, il conviendrait là aussi de poursuivre les analyses en déterminant par une cinétique post prandiale le temps correspondant au pic d'expression de la FAS, le canard Barbarie présentant une activité accrue de cette enzyme dès le début du gavage (Baéza et al., 2005). Le transporteur d'acide gras FABP4, apparaît exprimé dans le foie, dans l'ordre décroissant, chez les canards mulard, Barbarie et enfin Pékin ; avec une expression augmentée chez les canards mulard et Barbarie gavés (Figure 5A), favorisant la stéatose hépatique. Dans le muscle, l'expression de FABP4 est quant à elle augmentée chez le canard Pékin gavé en comparaison avec les deux autres types génétiques. Ceci concorde avec les données de Saez et al. (2009). Ce transporteur apparaît surexprimé dans le GSC chez le canard de Barbarie et dans une moindre mesure dans le GSC des canards mulards et Pékin (Figure 5B). Aucun effet du gavage n'est observé sur l'expression de FABP4.

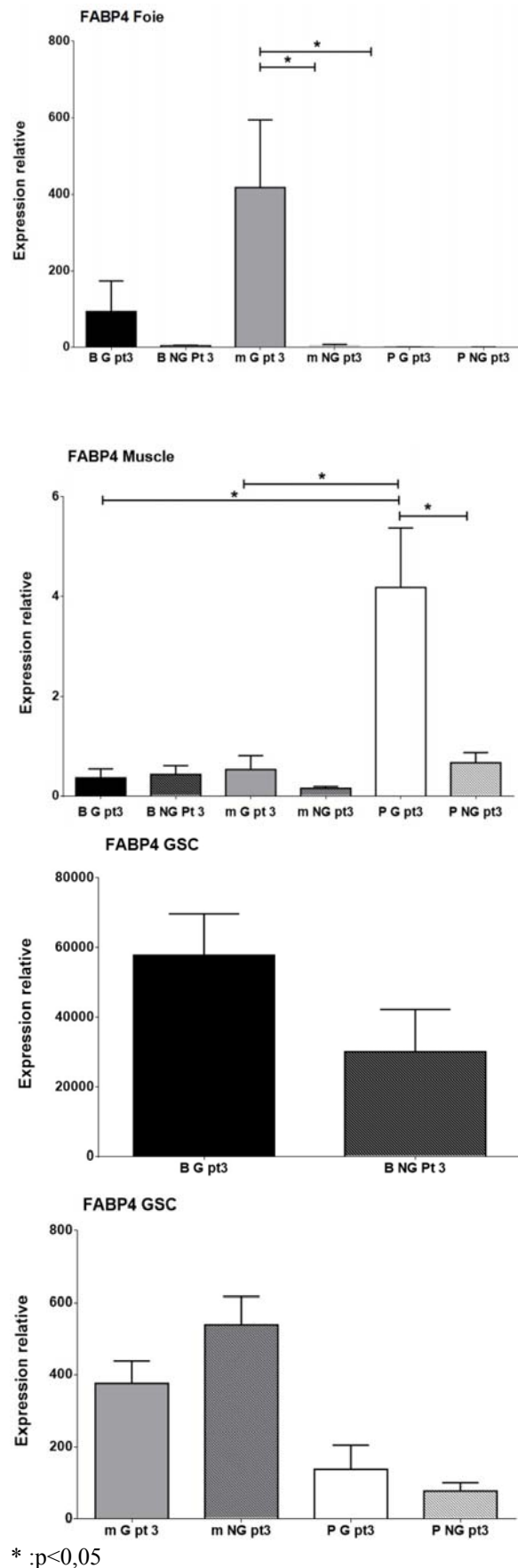


PERSPECTIVES

Des analyses complémentaires sont en cours afin de mesurer le recaptage des TG circulants par le biais des VLDL-R dans les différents tissus ainsi que le taux d'expression de GLUT 1 dans le muscle et le foie et de SGLT 1 dans l'intestin. De plus, il est également prévu de déterminer la teneur en lipides des tissus d'intérêt. Enfin, une étude en cinétique post prandiale apparaît indispensable dans la détermination d'un point optimal pour l'expression des différents gènes d'intérêt.

REMERCIEMENTS

Cette étude a reçu le soutien financier du Conseil Général des Landes et du Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. André J. M., Guy G., Gontier-Latonnelle K., Bernadet M. D., Davail B., Hoo-Paris R., Davail S., 2007. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 148 (4), 899–902.
2. Baéza E., Rideau N., Chartrin P., Davail S., Hoo-Paris R., Mourot J., Guy G., Bernadet M. D., Juin H., Meteau K., Hermier D., 2005. *INRA Prod. Anim.* 18 (2), 131-141.
3. Davail S., Rideau N., Guy G., André J. M., Hermier D., Hoo-Paris R., 2003. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 134 (4), 707–715.
4. Hermier D., Guy G., Guillaumin S., Davail S., André J. M., Hoo-Paris R., 2003. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 135 (4), 663–675.
5. Hermier D., Saadoun A., Salichon m. R., Sellier N., Rousselot-Paillet D., Chapman J., 1991. *Lipids.* 26 (5), 331–339.
6. Livak K. J., Schmittgen T.D., 2001. *Methods.* 25 (4), 402–408.
7. Saadoun A., Leclercq B., 1986. *J. Nutr.* 117 (3), 428–435.
8. Saez G., Davail S., Gentès G., Hocquette J. F., Jourdan T., Degrace P., Baéza E., 2009. *Poult. Sci.* 88 (11), 2382–2391.