

## EXPRESSION DE LA VISFATINE AU NIVEAU DES FOLLICULES OVARIENS DE POULE : UN ROLE INHIBITEUR SUR LA STEROÏDOGENESE ?

Diot Mélodie<sup>1</sup>, Reverchon Maxime<sup>1</sup>, Rame Christelle<sup>1</sup>, Yannick Baumard<sup>2</sup>,  
Dupont Joëlle<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR85, Unité Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France, CNRS, UMR6175, F-37380 Nouzilly, France; Université François Rabelais, F-37041 Tours, France ; IFCE, F-37380 Nouzilly, France.

<sup>2</sup> INRA, UE 1295, Unité Expérimentale Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, F-37380 Nouzilly, France

[jdupont@tours.inra.fr](mailto:jdupont@tours.inra.fr)

### RÉSUMÉ

Chez les mammifères, le tissu adipeux a été décrit initialement comme un tissu de stockage mais il est de plus en plus considéré comme un véritable organe endocrine qui sécrète plusieurs protéines appelées adipocytokines qui interviennent dans différentes fonctions physiologiques dont la reproduction. La visfatine est une de ces adipocytokines qui n'a pas encore de récepteur connu à ce jour. Dans cette étude, nous avons étudié l'expression de la visfatine dans les différentes cellules folliculaires de l'ovaire chez des poules *Gallus gallus*, de souche « Isa Brown » : les cellules de la thèque et les cellules de la granulosa. Nous avons également étudié l'effet *in vitro* de la visfatine recombinante humaine présentant 92-93 % d'identité avec la visfatine de poule, sur la sécrétion de progestérone par les cellules de la granulosa. L'ARNm et la protéine de la visfatine ont été retrouvés dans les cellules de la thèque et les cellules de la granulosa des follicules F1, F2, F2/4 par RT-PCR et Western-blot, respectivement. Par RT-qPCR, nous avons montré que l'expression de cette adipocytokine est plus importante dans les cellules de la granulosa au stade F1 et qu'elle varie au cours de la maturation folliculaire dans les cellules de la thèque et les cellules de granulosa. L'addition de la visfatine humaine recombinante (100ng/mL) dans le milieu de culture des cellules primaires de la granulosa inhibe la sécrétion de progestérone à l'état basal et en réponse à l'IGF-1 (10<sup>-8</sup>M) quelque soit le stade folliculaire mais pas en réponse à la FSH (10<sup>-8</sup>M) et à la LH (10<sup>-8</sup>M). Cet effet est confirmé par l'addition du FK866, un inhibiteur spécifique de la visfatine. En effet, en présence de FK866, l'effet inhibiteur de la visfatine est aboli. En conclusion, la visfatine est présente dans les cellules des follicules ovariens et inhibe la sécrétion de progestérone par les cellules primaires de la granulosa.

### ABSTRACT

#### Visfatin expression in chicken ovarian follicles: an inhibitory role in steroidogenesis ?

In mammals, the adipose tissue was originally described as a storage tissue but it is increasingly considered as a true endocrine organ which secretes several proteins called adipokines involved in various physiological functions including reproduction. Visfatin is one of them and its receptor is not yet known. In this study, we investigated the expression of visfatin in different ovarian follicular cells in hens *Gallus gallus* "Isa Brown" strain: the theca and granulosa cells. We also examined the *in vitro* effect of recombinant human visfatin sharing 92-93% identity with the chicken visfatin, on the secretion of progesterone by granulosa cells. Visfatin mRNA and protein were found in theca and granulosa cells of F1, F2 and F3/4 follicles by RT-PCR and Western blotting, respectively. By RT-qPCR, we showed that the expression of this adipokine was greater in the granulosa cell of F1 stage follicles and varied in theca and granulosa cells during the follicular maturation. The addition of recombinant human visfatin (100ng/mL) in the culture medium of primary granulosa cells inhibited basal and IGF-1 (10<sup>-8</sup>M)-induced progesterone secretion irrespective of the follicular phase but not on FSH (10<sup>-8</sup>M) and LH (10<sup>-8</sup>M)-induced progesterone secretion. This effect was confirmed by the addition of FK866, a specific visfatin inhibitor. Indeed, in the presence of FK866, the inhibitory effect of visfatin was abolished. In conclusion, visfatin is present in hen ovarian follicular cells and inhibits the progesterone secretion by primary granulosa cells cultured *in vitro*.

## INTRODUCTION

Le tissu adipeux considéré comme un tissu de stockage des lipides, est aussi décrit comme un véritable organe endocrine capable de sécréter des molécules appelées adipocytokines (Kershaw, 2004). Ces hormones, tels que la leptine, l'adiponectine ou bien encore la chemerine ou l'omentine sont essentiellement connues pour réguler les fonctions du métabolisme (Kershaw, 2004) ou encore la sensibilité à l'insuline (Stofkova, 2010). Cependant, de plus en plus d'études démontrent que ces molécules sont capables d'avoir des effets sur la reproduction (Reverchon et al, 2014).

Chez les mammifères, la visfatine aussi connue comme une nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT) ou pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF) est une nouvelle adipocytokine de 491 acides aminés avec un poids moléculaire de 52 kDa (Samal et al, 1994). Elle agit comme une protéine insulino-mimétique sans récepteur encore connu à ce jour. Chez les mammifères, la visfatine est présente au niveau des follicules ovariens de femme et la visfatine recombinante humaine augmente la sécrétion de stéroïdes induit par IGF-1 et la prolifération des cellules (Reverchon et al, 2013).

Chez les oiseaux, peu d'études ont été réalisées sur les adipocytokines. La majorité des études sur la visfatine ont été réalisées chez le poulet. Chez cette espèce, avec une glycémie basale de 2g/L (Simon, 1989) et une relative insulino-résistance, il a été démontré que le messenger et la protéine de la visfatine étaient présents dans différents tissus (Krzysik-Walker et al, 2008). Chez le poulet, la visfatine est composée de 493 acides aminés et possède un fort degré d'identité avec la visfatine de mammifères (Krzysik-Walker et al, 2008). Au niveau des tissus reproducteurs, la visfatine est exprimée au niveau des testicules de poulet et son expression augmente au cours de la maturation sexuelle (Ocón-Grove et al, 2010). En revanche, aucune étude n'a été réalisée au niveau de l'ovaire chez les oiseaux. Pourtant les femelles ont des spécificités au niveau de leur appareil reproducteur à savoir un seul ovaire fonctionnel et une hiérarchie au sein des follicules pré-ovulatoires.

Au cours de cette étude, dans un premier temps, la présence du messenger et celle de la protéine de la visfatine a été recherchée au sein de différents tissus chez des poules *Gallus gallus* et plus précisément au niveau des cellules de la thèque (CT) et de la granulosa (CG) (cellules ovariennes) à différents stades folliculaires (F1 à F4). Dans un second temps, nous avons étudié l'effet *in vitro* de la visfatine recombinante humaine sur la sécrétion de progestérone par les cellules de la granulosa issues des follicules pré-ovulatoires (F1 et F3/4) de poule. Pour confirmer

ses effets, le FK866, un inhibiteur spécifique de la visfatine a été utilisé.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Animaux

Pour la partie identification et caractérisation de l'expression de la visfatine, sept poules de réforme *Gallus gallus* de souche « Isa Brown » issues de l'UE-PEAT (UE 1295) de Nouzilly et âgées d'un an ont été requises. Pour la seconde partie de l'étude (*in vitro*), nous avons collecté les follicules F1 (le follicule le plus mature, prêt à être ovuler) et F2 et F3/4 (follicules moins matures) 15 heures après le dernier œuf pondu chez douze poules de réforme de la même souche et du même âge que décrit précédemment.

### 1.2. Extraction d'ARN et RT-PCR et RT-Qpcr

Les ARN totaux des CG, des CT à différents stades folliculaires ainsi que du cortex ovarien et du foie ont été extraits avec du réactif TRIzol® selon les recommandations du fabricant (Invitrogen™ by Life technologies™, Villebon sur Yvette, France). Un traitement à la DNaseI utilisant le kit DNA-free™ (Ambion® by Life technologies™) a été effectué sur les ARN totaux puis la quantité d'ARN a ensuite été évaluée avec un spectrophotomètre. Afin de synthétiser des ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN totaux, une reverse transcription (RT) des ARN totaux (1µg) a été effectuée comme décrit précédemment (Coyral-Castel et al. 2010). Les ADNc obtenus sont ensuite amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques (Invitrogen™ by Life technologies™): la visfatine (Sens : 5' GCTTCAGCCCCATTTGGTGA 3' et AntiSens : 5' ATCCCGGAAGTGGATCTTTTG 3') et de l'actine (gène de référence) (Sens : 5' ACGGAACCACAGTTTATCATC 3' et AntiSens : 5' GTCCAGTCTTCAACTATACC 3'). La PCR a été réalisée dans un mélange comme décrit précédemment (Coyral-Castel et al, 2010).

Pour quantifier l'expression de la visfatine au cours de la maturation folliculaire des qPCR ont été réalisées à partir des ADNc obtenus après avoir testé l'efficacité (E) des amorces utilisées de visfatine et de l'actine. E est obtenue à partir de plusieurs dilutions d'un pool d'ADNc et est comprise entre 1,9 et 2,0. Les ADNc ont été amplifiés par qPCR en utilisant du SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) et 250 nM d'amorces spécifiques comme décrit précédemment (Coyral-Castel et al. 2010). Les qPCR ont été réalisées sur le système MyiQ Cycler (Bio-Rad) : les échantillons ont été d'abord dénaturés (3 minutes à 95°C) puis amplifiés en 40 cycles (dénaturation de 30 secondes à 95°C, hybridation pendant 30 secondes à 60°C et élongation de 30 secondes à 72°C). Les ADNc des échantillons ont été testés en duplicat sur la même plaque et une amplification avec de l'eau a été réalisée en tant que contrôle négatif.

Afin de connaître l'expression relative de notre adipocytokine, un ratio (R) a été calculé à partir des CT (cycle threshold) et de l'efficacité de chaque gène (visfatine et gène de référence l'actine).  $R = (\text{puissance de E du gène étudié} - \text{CT gène étudié}) / (\text{puissance de E du gène de référence} - \text{CT du gène de référence})$ .

### 1.3. Extraction de protéines et western-blot

Les protéines ont été extraites par lyse cellulaire à froid avec du tampon de lyse comme décrit précédemment (Coyral-Castel et al, 2010) et dosées à l'aide d'un kit BCA (bicinchonic acid assay). Quatre-vingt microgrammes de protéines ont ensuite été dénaturés et soumis à une électrophorèse dans un gel SDS-polyacrylamide 12% puis transférés sur une membrane de nitrocellulose et incubés avec des anticorps spécifiques, couplés à la HRP, à 4°C durant une nuit comme décrit précédemment (Coyral-Castel et al. 2010). L'anticorps dirigé contre la visfatine est un anticorps polyclonal provenant du lapin et celui contre la vinculine (protéine de référence) est issu de la souris. La révélation des protéines a été réalisée par chemiluminescence grâce au réactif ECL qui est un substrat de la HRP (enhanced Chemiluminescence, Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) à l'aide de la caméra Gbox (Ozyme). Le logiciel Gene Snap permet de détecter le signal émis et le logiciel GeneTools de le quantifier.

### 1.4. Isolation et culture primaire des cellules de la granulosa de poule et stimulation cellulaire. Mesure de la sécrétion de progestérone.

Des grappes ovariennes de poule *Gallus gallus* âgée de 50 semaines ont été prélevées afin de récupérer les follicules F1, F2 et F3/4. Les CG de ces follicules ont ensuite été collectées après avoir enlevé le maximum de jaune d'œuf. Les CG ont été dissociées à 37°C avec de la collagénase A (0.3%) et du milieu Hams' F12 pendant 5 minutes. Après centrifugation et lavage avec du milieu de culture (DMEM avec 5% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotiques), les cellules ont étéensemencées et cultivées dans une étuve à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Pour déterminer si la visfatine exerce un effet sur les CG, les cellules ont été sevrées 24 heures dans un premier temps avant d'être stimulées pendant 48 heures avec de la visfatine recombinante humaine (100 ng/mL) en présence ou non d'IGF-1 (10<sup>-8</sup>M, Sigma (L'Isle d'Abeau Chesnes, France)), de FSH (10<sup>-8</sup>M) et de LH (10<sup>-8</sup>M) toutes deux obtenues par le Dr. A.F. Parlow et the National Hormone and Pituitary Program (USA). Les milieux de culture ont été collectés après les 48 heures et la concentration de progestérone est déterminée par dosage ELISA décrit précédemment (Canepa et al, 2008).

### 1.5. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été analysés avec le logiciel Statview pour déterminer si les différences observées entre les moyennes de chaque condition sont significatives ou non. Pour cela, une analyse de variance (test ANOVA) avec un niveau de significativité inférieur à 5 % (p<0.05) a été effectuée suivi d'un test post-hoc (Test de Fisher).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Résultats

#### 2.1.1. Expression de la visfatine au niveau des tissus et au sein des cellules ovariennes chez la poule

Nous avons déterminé l'expression du messager et de la protéine de la visfatine dans les CT et CG chez des poules âgées d'un an. Des fragments de taille attendue à la visfatine ont été amplifiés par RT-PCR à 97 pb dans tous les tissus étudiés. Après révélation à l'ECL, nous pouvons visualiser un signal qui est émis à 52 kDa, taille attendue pour la visfatine dans les différents tissus étudiés (cortex ovarien, thèque, granulosa et tissu adipeux) (figure 1). Le tissu adipeux sert de témoin positif pour les adipocytokines (Kershaw et al, 2004). La vinculine est une protéine de référence qui est présente dans tous les tissus.

#### 2.1.2. Expression de la visfatine au cours de la maturation folliculaire

Par RT-qPCR, nous avons étudié l'expression du messager de la visfatine au cours de la maturation folliculaire dans les CT et les CG. Nous avons constaté que la visfatine était plus exprimée dans les CG que dans les CT au stade folliculaire F1 (stade où le follicule est prêt à être ovulé) (figure 2). De plus, au cours de la maturation folliculaire, dans les CT, l'expression de la visfatine diminue. En effet, la visfatine est plus exprimée dans les follicules les moins matures au niveau des CT. Au niveau des CG, une diminution de l'expression est observée dans les stades F3/4 à F2 qui est ensuite suivie par une augmentation au stade F1 *in vitro* dans les conditions de culture utilisées.

#### 2.1.3. Effet *in vitro* de la visfatine sur la sécrétion de progestérone par les CG

Afin de déterminer l'effet de la visfatine recombinante humaine (100ng/mL) sur la sécrétion de progestérone par les CG issues de follicules pré-ovulatoires F1, une stimulation des cellules et un dosage de progestérone par ELISA. Tout d'abord la visfatine seule a un effet inhibiteur sur la sécrétion de progestérone (de 2.58ng/mL en conditions témoins à 0.66ng/mL en conditions visfatine seule). Comme attendu d'après une étude précédente, l'IGF-1, la FSH et la LH à des concentrations de 10<sup>-8</sup>M augmentent la production de progestérone (Tosca et al, 2006). Lorsqu'on ajoute de la visfatine au milieu de stimulation, cette dernière exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion de progesté-

rone en réponse à l'IGF-1. Cependant la visfatine ne semble avoir aucun effet, stimulateur ou inhibiteur, lorsqu'elle est additionnée à la FSH ou à la LH (les mêmes observations ont été observées pour les follicules F2 et F3/4).

Pour confirmer l'effet inhibiteur observé sur la sécrétion de progestérone, une expérience similaire en présence ou non d'un inhibiteur spécifique de la visfatine, le FK866 (10 $\mu$ M), a été réalisée dans les mêmes conditions. L'analyse montre que le FK866 abolit cette inhibition de la progestérone en présence de visfatine.

## 2.2. Discussion

Dans cette étude, nous avons reporté, pour la première fois par RT-PCR, que la visfatine est présente au niveau des cellules ovariennes chez la poule *Gallus gallus*. Ces résultats ont été confirmés au niveau protéique par Western-Blot. Par RT-qPCR nous avons observé que son expression était plus forte dans les CG que dans les CT et qu'elle diminuait lors de la maturation folliculaire dans les CT.

Nous avons retrouvé la visfatine dans le tissu adipeux, le foie et l'ovaire chez des poules. Ocón-Grove et al. ont aussi identifié la visfatine dans les testicules chez le poulet en 2010, suggérant que cette adipocytokine pourrait être impliquée dans les fonctions de reproduction chez ces animaux. Dans notre étude, l'expression de son ARNm diminue lors de la maturation folliculaire (du F3/4 au F2) avant d'augmenter de nouveau au follicule F1. Sachant que le follicule F1, le plus mature, est prêt à être ovulé (Chabrolle, 2008), la visfatine pourrait jouer un rôle lors de l'ovulation même si elle ne semble pas avoir d'effet sur la sécrétion de progestérone en réponse aux gonadotropines. Ocón-Grove et al., en 2010, ont démontré une possible influence de la visfatine dans la maturation sexuelle chez le mâle on peut donc supposer que cette dernière joue aussi un rôle identique chez la femelle.

Comme les CG expriment plus de visfatine que les CT, les travaux *in vitro* ont été réalisés sur ces types cellulaires. Nous avons observé que la visfatine recombinante humaine inhibe à l'état basal et en réponse à l'IGF-1 la sécrétion de progestérone par les CG au stade F1. A l'inverse, chez les mammifères, la visfatine stimule la sécrétion de progestérone (Reverchon et al, 2013). Chez les oiseaux, la progestérone déclenche le processus d'ovulation en provoquant l'apparition du pic de LH (Sauveur et al, 1988) tandis que chez les mammifères, la progestérone est sécrétée par les cellules de la granulosa du corps jaune après le pic de LH qui induit l'ovulation. En présence d'un inhibiteur spécifique de la visfatine, le FK866, cet effet inhibiteur observé de la visfatine est aboli suggérant un effet spécifique de cette hormone.

Chez les mammifères, plusieurs adipocytokines sont capables de moduler la phosphorylation des MAPK (Reverchon et al, 2013), il faudrait étudier cette possibilité chez la volaille afin de démontrer le mode d'action moléculaire de la visfatine. Il serait tout aussi intéressant de comprendre comment la visfatine inhibe l'effet d'IGF-1 sur la sécrétion de progestérone. Chez les mammifères, la visfatine agit sur la voie de transduction de l'insuline en phosphorylant IRS-1 et IRS-2 (Xie et al, 2007), nous pouvons nous interroger sur cette action chez la volaille. De plus, son récepteur est encore inconnu mais Fukuhara et al. ont reporté que la visfatine pourrait se lier de manière non spécifique au récepteur de l'insuline (Fukuhara et al, 2005). Même si ce fait a été démenti par la suite on peut supposer qu'en se fixant sur le récepteur d'IGF-1, la visfatine inhibe sa phosphorylation et par conséquent inhibe la sécrétion de progestérone induite par IGF-1. A noter que dans les cellules de la granulosa humaine la visfatine augmente la phosphorylation du récepteur d'IGF-1 (Reverchon et al, 2013).

Chez la volaille, chacun des follicules exerce, en fonction de sa position hiérarchique, une fonction particulière dans la production de stéroïdes ovariens : ainsi le follicule le plus avancé (F1), qui est le plus proche d'ovuler, sécrète le plus de progestérone par rapport aux follicules F2 à F4 (Sauveur et al, 1988). Un follicule est donc « mature » et prêt à être ovulé lorsqu'il sécrète une quantité suffisante de progestérone pour provoquer l'apparition du pic pré-ovulatoire. Ainsi, peut-être que le follicule le plus mature (F1) exprime de la visfatine au niveau des cellules de la granulosa pour inhiber la sécrétion de progestérone par les autres follicules en croissance. Il reste toutefois à démontrer que l'expression des niveaux protéiques de visfatine augmente lors du stade le plus mature dans les CG et que la visfatine est bien sécrétée par le follicule. Par ailleurs, il serait tout aussi intéressant d'étudier un effet dose de la visfatine sur des cultures primaires de CG.

## CONCLUSION

En conclusion, ces résultats préliminaires montrent pour la première fois que la visfatine est présente dans différents tissus et types cellulaires chez la poule et qu'un de ses effets *in vitro* est de diminuer contrairement aux mammifères la production de progestérone par les cellules de la granulosa.

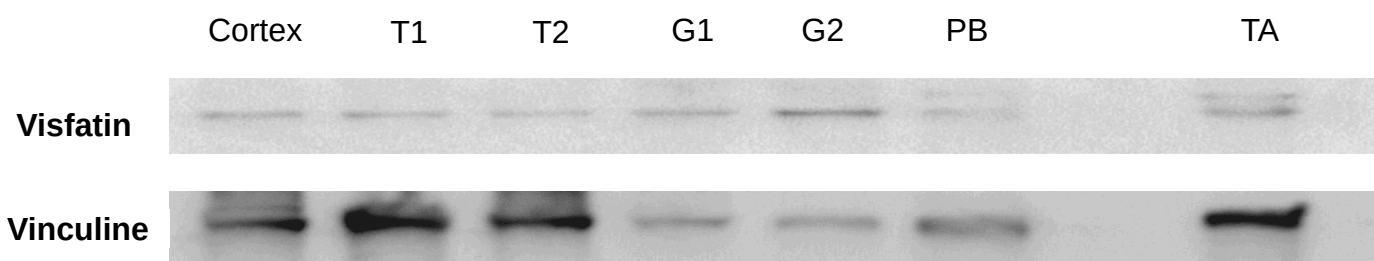
## REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par le projet région Centre Adipofertikines (32000407). Nous remercions Mr. David Gourichon et l'ensemble des personnes de l'UEPEAT pour les animaux.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

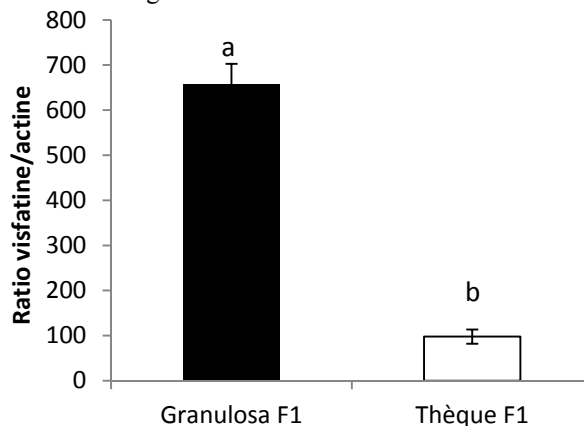
1. Chabrolle C., 2008. Thèse, Université François Rabelais, Tours, 401 pages.
2. Coyral-Castel S., Ramé C., Fatet A., Dupont J., 2010. *Domest Anim Endocrinol* 38 272-283.
3. Fukuhara A., Matsuda M., Nishizawa M., Segawa K., Tanaka M., Kishimoto K., Matsuki Y., Murakami M.,
4. Ichisaka T., Murakami H., Watanabe E., Takagi T., Akiyoshi M., Ohtsubo T., Kihara S., Yamashita S.,
5. Makishima M., Funahashi T., Yamanaka S., Hiramatsu R., Matsuzawa Y. & Shimomura I., 2005. *Science* Vol307 : 426-430.
6. Kershaw E & Flier JS., 2004. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(6):2548–2556.
7. Krzysik-Walker SM., Oco'n-Grove OM., Maddineni SR., Hendricks III GL. & Ramachandran R., 2008.
8. *Endocrinology* 149(4):1543–1550.
9. Oco'n-Grove OM., Krzysik-Walker SM., Maddineni SR., Hendricks G. & Ramachandran R., 2010. *Reproduction* 139 : 217–226.
10. Reverchon M., Cornuau M., Cloix L., Ramé C., Guerif F., Royère D. and Dupont J., 2013. *Molecular Human*
11. *Reproduction*, Vol.19, No.5 pp. 313–326.
12. Reverchon M., Ramé C., Bertoldo M. & Dupont J., 2014. *International Journal of Endocrinology*. Volume 2014, Article ID 232454.
13. Samal B., Sun Y., Stearns G., Xie C., Suggs S. & McNiece I., 1994. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 14, No.2, p. 1431-1437.
14. Sauveur B. & De Reviers M., 1988 In : *Reproduction des volailles et production d'œufs*. Editions Quaue.
15. Simon J., 1989. *CRC Crit. Rev. Poult. Biol*, 2 pp. 121–148.
16. Stofkova A., 2010. *Endocrine Regulations*, Vol. 44, 25–36.
17. Tosca L., Crochet S., Ferre P., Foufelle F., Tesseraud S. & Dupont J. 2006. *J Endocrinol* 190 85-97.
18. Xie H., Tang SY., Luo XH., Huang J., Cui RR., Yuan LQ., Zhou HD., Wu XP. & Liao EY., 2007. *Cal-cif Tissue Int* 210 : 80-201

**Figure 1.** Expression de la protéine de la visfatine dans différents tissus ovariens par Western-blot.



T1 = Cellules de la thèque du follicule F1, T2 = cellules de la thèque du follicule F2, G1 = cellules de la granulosa du follicule F1, G2 = cellules de la granulosa du follicule F2, PB = petit blanc

**Figure 2.** Expression du message de la visfatine dans les cellules ovariennes du follicule F1.



Comparaison thèque/granulosa par RT-qPCR au niveau du follicule pré-ovulatoire (F1) (n=7 poules). Les différentes lettres représentent des différences significatives ( $p < 0.05$ ).