

INTEGRATION DE DONNEES « OMIC » ET COMPREHENSION DES MECANISMES SOUS-JACENTS A LA PRODUCTION DE FOIE GRAS

François Yoannah¹, Liaubet Laurence¹, Molette Caroline², Vignal Alain¹, Marty-Gasset Nathalie¹, Marie-Etancelin Christel¹

¹INRA GenPhySE, Chemin de Borde Rouge, BP 52 627, 31 326 CASTANET-TOLOSAN Cedex – FRANCE,

²EURALIS, Bois de Marmajou, 65 700 MAUBOURGUET - FRANCE

Christel.marie-etancelin@inra.fr

RÉSUMÉ

Un programme de détection de QTL d'intérêts du canard mulard a conduit à l'identification de 80 QTL phénotypiques et de 176 pQTL d'abondances protéiques quantifiées dans le foie gras. Afin de donner sens à cette masse de résultats, nous avons en premier lieu testé l'existence de QTL pléiotropiques entre une abondance protéique et un phénotype lorsque ces 2 QTL étaient co-localisés sur le génome, à l'aide du logiciel CLIPtest : parmi les 66 co-localisations observées, nous avons conclu à la possible existence d'un QTL pléiotropique pour 16 cas et pour 21 cas à 2 QTLs distincts mais liés. La réalisation de graphiques d'inférence à l'aide du logiciel Gephi a permis de visualiser les résultats. Ainsi le taux de fonte du foie gras est régulé par un QTL pléiotropique qui impacte simultanément 2 spots distincts de l'alpha-énolase, ce qui met en évidence sur le chromosome 15 un locus impliqué dans la régulation de la voie glycolytique. Sur le chromosome 7, un QTL affectant conjointement le poids de la cuisse et l'apolipoprotéine A1 a été mis en évidence, confirmant le rôle central de cette protéine dans le transport et le stockage des lipides. Le QTL pléiotropique du chromosome Z associe la protéine GLUD1 et le taux de glucose sanguin après un repas de gavage, le gène *GLUD1* modulant l'absorption hépatique du glucose par le foie via la production d'insuline. Aucun de ces 16 QTLs pléiotropiques ne met en œuvre un cis-QTL, confirmant la complexité des régulations métaboliques jouant sur un phénotype.

ABSTRACT

“Omics” data integration and understanding of underlying mechanisms of fatty liver production traits.

A QTL program in mule ducks for fatty liver led to the identification of 80 phenotypic QTLs and 176 pQTL of protein abundances in fatty liver. In order to give meaning to these numerous results, we first tested the hypothesis of pleiotropic QTLs between a protein and a phenotype when the 2 traits presented QTLs co-localized on the genome, using the CLIPtest software: among the 66 co-locations observed, we concluded of 16 possible pleiotropic QTLs and, for 21 cases, of 2 distinct but linked QTLs. Building graphs of inference using the Gephi software made possible to visualize the results. Thus the melting rate of liver is regulated by a pleiotropic QTL which simultaneously impacts two distinct alpha-enolase's spots, which demonstrate that a locus on chromosome 15 participates in the regulation of the glycolytic pathway. On chromosome 7, a QTL affecting both the thigh weight and the apolipoprotein A1 was identified, confirming the central role of this protein in the transport and storage of lipids. The pleiotropic QTL of the Z chromosome associates the GLUD1 protein and the blood glucose level after force-feeding, the *GLUD1* gene modulating the hepatic absorption of the glucose by the liver via insulin production. None of these 16 pleiotropic QTLs were cis-QTL, confirming the complexity of metabolic regulation of the phenotype.

INTRODUCTION

Les approches dites « omics » - qu'elles concernent les protéines, les métabolites ou les transcrits – sont des approches « haut débit » produisant un grand nombre de mesures pour un seul et même tissu. Couplées avec des détections de QTL impliquant des centaines de marqueurs, ces méthodes d'analyses conduisent à l'identification d'un grand nombre de zones du génome d'intérêt, et nous confrontent à la difficulté d'interprétation de cette masse de résultats.

A partir de données de protéome du foie gras, nous allons montrer comment, parmi tous les QTL protéomiques co-localisés sur le génome avec des QTL de caractères d'intérêts des animaux, nous allons pouvoir distinguer ceux où 2 QTL proches mais distincts influencent les 2 caractères, de ceux où les 2 caractères sont influencés par le même QTL, que l'on qualifie de pléiotropique.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Données disponibles : QTL phénotypiques et protéomiques identifiés

Le dispositif animal se compose de 294 canards mulards gavés issus de 3 familles F1 de canards communs. Ces animaux ont été caractérisés par 49 caractères zootechniques allant de la croissance, à la réaction au stress, du métabolisme hépatique durant le gavage à l'aptitude au gavage et la qualité des produits (foies gras et magrets). Pour chacun de ces canards mulards, 326 spots de protéines solubles présentes dans les foies gras ont été quantifiés à l'aide d'électrophorèses bidimensionnelles et identifiés par spectrométrie de masse (Francois et al., 2015).

Une première détection de QTL uni-caractère portant sur les 49 caractères zootechniques d'une part et les 326 abondances protéiques d'autre part, a permis d'identifier 80 QTL phénotypiques et 176 QTL protéomiques au seuil de 5 % au niveau du chromosome. Lorsque les QTL uni-caractères co-localisent dans un même intervalle de confiance, les caractères correspondants ont été associés 2 à 2 (un caractère zootechnique avec un spot protéique) et des détections de QTL bi-caractères ont été effectuées : 290 analyses bi caractères protéome-phénomène de détections de QTL ont été entreprises et 66 détections bi-caractères dont le niveau de significativité était supérieur à celui du QTL le plus significatif en uni-caractère ont été retenus.

1.2. Carte génétique

La population commune, i.e. les 98 canes BC -mères des 294 canards mulards- et leurs 29 ascendants, a été

génomée à l'aide d'un jeu de 334 marqueurs (278 SNP et 56 microsatellites) répartis en 28 groupes de liaisons positionnés sur 28 chromosomes différents du canard commun (*Anas Platyrhynchos* -APL).

1.3. Analyse statistique : tests de la pléiotropie

Afin de distinguer entre 1 QTL pléiotropique (un seul et même locus impactant 2 phénotypes) et 2 QTL liés (2 locus très proches, qui sont très corrélés, impactant 2 phénotypes) parmi les 66 détections bi-caractères significatives, nous avons mis en œuvre le CLIP-test (pour Close Linkage versus Pleiotropism) proposé par David et al. (2013). Ce test considère que sous l'hypothèse (H0) de pléiotropie la forme des effets des marqueurs dans la zone génomique d'intérêt doit être similaire pour les 2 caractères tandis qu'elle doit être différente sous l'hypothèse (H1) de QTL proches et liés.

1.4. Analyses graphiques

Pour aider à l'interprétation des résultats du CLIP-test, des graphes d'inférence ont été réalisés à l'aide du logiciel Gephi (Bastian et al., 2009). Les liens protéome-phénomène pour lesquels un effet pléiotropique est supposé sont épaissis dans le graphe pour les différencier des liens dus à 2 QTL liés.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Pléiotropie

Parmi les 66 détections de QTL bi-caractères pour lesquelles le CLIP-test a été mis en œuvre, 29 n'ont pas convergé, l'hypothèse de QTL pléiotropique a été rejetée pour 21 bi-caractères pour lesquels nous avons conclu l'existence de 2 QTL liés et très proches. Au final, 16 couples « phénomène – protéome » sont supposés être sous dépendance partielle d'un seul QTL pléiotropique. En particulier pour le foie gras, c'est le cas pour le taux de fonte et 2 spots distincts d'alpha-énolase sur APL15, la luminance du foie et le glutamate déshydrogénase (GLUD1) sur le chromosome APL6, l'indice de jaune du foie et la peroxyrédoxine 4 sur APL22. Le poids de la cuisse semble être modulé de façon pléiotropique avec l'apolipoprotéine A1 sur le chromosome APL7, et le pH ultime du muscle avec 2 protéines -l'ATP synthase sous unité bêta et la triose phosphate isomérase- sur APLZ. Des QTL pléiotropiques sont aussi détectés avec les paramètres sanguins durant le gavage : le taux de glucose sanguin en début de gavage avec d'une part l'hydrolase 3-hydroxyisobutyryl-CoA sur APL10 et d'autre part la glutamate déshydrogénase sur APLZ ; enfin le taux de cholestérol en début de gavage et la sulfuryltransférase 3-mercaptopyruvate sur APL15.

2.2. Intégration des données

Afin d'illustrer les résultats de détections bi-caractères obtenus et de nous aider à leur interprétation, une représentation graphique des interactions a été construite (Figure 1).

Sur le chromosome APL15 (Figure 1B), nous avons cartographié plusieurs QTL et pQTL autour du marqueur SNP266, dont un QTL relatif au taux de fonte (MR) et 2 pQTL relatifs à l'alpha-énolase (ENO1) et à la protéine chaperone CCT7. L'étude conjointe du taux de fonte et de la protéine CCT7 montre qu'ils sont régulés par 2 QTL très proches mais néanmoins disjoints. A l'inverse, le taux de fonte et les 2 spots d'ENO1 (spots 112 et 124) sont contrôlés par 2 QTL pléiotropiques que l'on suppose être un seul et même QTL puisque le CLIPtest effectué sur ces 2 spots conjointement ne rejette pas la pléiotropie (résultats non présentés). Ce faisceau de résultats suggère l'existence d'un locus sur le chromosome APL15 impliqué dans la régulation de la voie glycolytique. Pour affiner ce résultat, il serait intéressant d'étudier le gène *LMF1* (Lipoprotein maturation factor 1, Peterfy, 2012) chez le canard : en effet, chez le poulet le marqueur SNP266 se situe dans la partie intronique du gène *LMF1* et la protéine qu'il code est impliquée dans la maturation des lipoprotéines avant qu'elles ne quittent les cellules hépatiques.

Un QTL pléiotropique apparait comme co-régulant le poids de la cuisse (TSW) et l'apolipoprotéine A1 (APOA1) sur le chromosome 7 (Figure 1F). Cette protéine est connue pour jouer un rôle dans la conformation des HDL (High Density Lipoprotein), qui transportent le cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Chez le poulet, les publications rapportent principalement des liens entre APOA1 et la quantité de gras abdominal (Resnyk et al. 2013, Bourneuf et al. 2006). Ainsi, de nombreux QTLs liés au gras abdominal ont été identifiés sur le chromosome GGA7, chromosome du poulet homologue d'APL7 du canard (Wang et al. 2012). Par ailleurs, Lagarrigue et al. (2000) ont montré que les poulets d'une lignée grasse présentaient significativement plus de d'ARNm d'APOA1 que les oiseaux de la lignée maigre. Sur ce modèle animal mâle, ces auteurs considèrent que cette protéine a un rôle de transport mais aussi de stockage des lipides chez les oiseaux. Dans notre cas, les muscles de la cuisse n'étant pas dissociés de la peau et du gras sous-cutané, nous suggérerons que le lien APOA1 et poids de la cuisse provient de différences de gras stockés en sous-cutané lors du gavage. Ainsi, bien que nous n'ayons identifié aucun QTL pour le gras abdominal sur APL7, nos résultats sont cohérents avec le fait qu'APOA1 joue un rôle important dans l'exportation des lipides.

Sur le chromosome APLZ, un QTL supposé pléiotropique a été identifié comme régulant à la fois

le niveau de glucose sanguin en début de gavage et la glutamate déshydrogénase (Figure 1F). La protéine GLUD1 n'est pas directement impliquée dans la voie métabolique des lipides mais intervient dans le cycle de Krebs en participant à la synthèse du citrate, nécessaire à la synthèse des lipides. Chez l'homme, une mutation du gène *GLUD1* conduit au syndrome d'hyperinsulinémie/d'hyperammoniémie (Rahman et al., 2015). La modification du gène induit l'augmentation de la production d'insuline par les cellules du pancréas, ce qui accroît l'absorption du glucose par le foie. Ce mécanisme de régulation se produisant naturellement après chaque repas, un QTL affectant simultanément l'abondance de la protéine *GLUD1* et le taux de glucose sanguin après le repas est très plausible.

Parmi les 16 QTLs bi-caractères pour lesquels un effet pléiotropique peut être supposé, aucun ne se situe à une position chromosomique proche de celle du gène codant la protéine. Contrairement à ce que Consoli et al. (2002) suggèrent, cette approche ne permet pas d'identifier directement le gène candidat.

L'interprétation de ces QTL pléiotropiques est clairement plus complexe : la variation génétique affecte probablement un gène qui modifie une voie de signalisation ou métabolique impactant la protéine pour laquelle le pQTL a été trouvé. De plus, la faible densité de notre carte génétique (334 marqueurs seulement) et la relative pauvreté de l'annotation du génome du canard ne permet pas de formuler des hypothèses robustes pour les différents QTLs pléiotropiques identifiés.

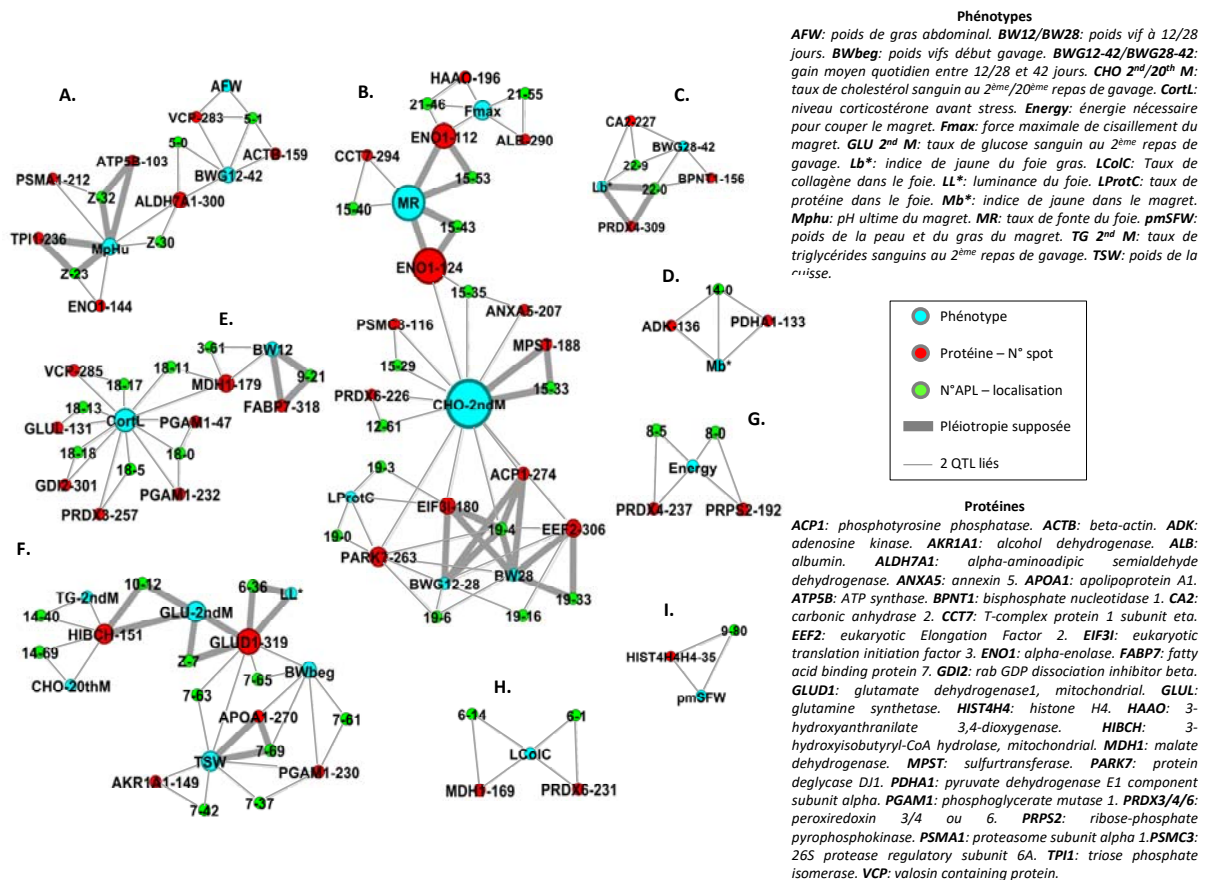
Néanmoins, l'association caractères et protéines pour lesquels le QTL pléiotropique était très significatif (taux de fonte et ENO1 sur APL15 ; Poids de la cuisse et APOA1 sur APL7 ; taux de glucose sanguin et glutamate déshydrogénase sur APLZ) a permis de donner des premières explications très cohérentes sur les voies métaboliques impactées.

CONCLUSION

Grâce à l'analyse conjointe des QTL phénotypiques et protéomiques et à l'identification des locus à effet pléiotropiques, cette étude a mis en exergue certains mécanismes métaboliques impliqués dans les variations génétiques de caractères d'intérêts du canard mulard gavé, tels que le taux de fonte et la glycolyse ou le poids de cuisse et le transport des lipides. A l'inverse, l'identification de mécanismes métaboliques pertinents impliqués dans les variations génétiques de caractères d'intérêts du canard mulard gavé valide en partie notre approche de recherche de QTL et pQTL pléiotropiques.

Les foies gras de ces mêmes canards ayant été caractérisés par des analyses du transcriptome et du métabolome, une nouvelle intégration de toutes ces données « omics » permettra de confirmer ou infirmer les voies métaboliques décrites ci-dessus.

Figure 1. L'inférence graphique réalisée à partir des 21 couples de QTL liés et 16 QTL pléiotropiques permet d'obtenir 9 graphes soulignant des mécanismes métaboliques impliqués dans les variations génétiques de caractères d'intérêts



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bastian M., et al., 2009. Int. AAAI Conf. Weblogs Social Media. <https://gephi.org/publications/gephi-bastian-feb09.pdf>.
- Bourneuf, E., et al., 2006. Gene., 372, 162-170
- Consoli L., et al., 2002. Plant Mol. Biol., (48), 575.
- David I., et al., 2013. Heredity, (110), 232.
- François Y., et al., 2015. JRAFG
- Lagarrigue S., et al. 2000. Genet. Sel. Evol., (32), 205.
- Peterfy, M. 2012. Biochim Biophys Acta 1821, 790–794
- Rahman S.A., et al., 2015. J. Mol. Endocr., 54(2), 119.
- Resnyk C.W., et al. 2013. BMC Genomics, 14:557.
- Wang S.Z., et al., 2012. Genet. Mol. Res., 11(2), 956.