

**RECHERCHE DE BIOMARQUEURS DE L'ETABLISSEMENT DE LA STEATOSE
HEPATIQUE CHEZ LE CANARD MULARD : ÉTUDE CINETIQUE DE
L'EXPRESSION DE GENES EN LIEN AVEC LE METABOLISME DU
CHOLESTEROL ET L'AUTOPHAGIE**

**Tracy Pioche¹, Fabien Skiba², Marie-Dominique Bernadet³, William Massimino¹,
Marianne Houssier¹, Karine Ricaud¹, Stéphane Davail¹, Sandrine Cassy-Skiba¹, Karine
Gontier¹**

¹INRA, Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme,
Aquaculture, Saint Pée sur Nivelle, F-64310, France

²NUTRICIA - route de Saint-Sever - 40280 HAUT-MAUCO

³UEPFG INRA Bordeaux-Aquitaine - domaine d'Artiguères Benquet - 40280 HAUT-MAUCO

tracy.pioche@univ-pau.fr

RÉSUMÉ

Afin d'optimiser le gavage chez le canard, il est indispensable de comprendre les mécanismes sous-jacents du développement de la stéatose hépatique pour proposer de nouvelles stratégies d'élevage. Dans cette étude cinétique, les effets du gavage sur l'expression de gènes en lien avec le métabolisme du cholestérol et l'autophagie ont été analysés chez des canards mulards. Les principaux résultats montrent une augmentation significative du taux de cholestérol plasmatique au cours du gavage ainsi qu'une corrélation positive entre le taux de cholestérol plasmatique et les poids de foie marquée en fin de gavage. De plus, l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol (SOAT1, HMGCR...) augmente significativement au cours du gavage et une forte corrélation existe entre les poids de foie et l'expression de gènes tel que SOAT1, impliqué dans l'estérification et le stockage du cholestérol. Il existe dans le même temps une augmentation significative de gènes impliqués dans des mécanismes de réponse au stress et autophagie (SQSTM1, ASN...). L'établissement de la stéatose hépatique chez le canard mulard se caractériserait ainsi par une modification du métabolisme du cholestérol et l'induction de processus autophagiques.

ABSTRACT

Kinetic study of the expression of genes related to cholesterol metabolism and autophagy during overfeeding in mule ducks

In order to optimize the overfeeding in ducks, it is essential to understand the mechanisms underlying the development of hepatic steatosis in order to propose new breeding strategies. In this kinetic study, the effects of overfeeding on the expression of genes related to cholesterol metabolism and autophagy were analysed on mule ducks. The main results show a significant increase in plasma cholesterol levels during overfeeding as well as a positive correlation between plasma cholesterol levels and liver weights at the end of the overfeeding. Furthermore, the expression of genes involved in cholesterol metabolism (SOAT1, HMGCR...) increased significantly during overfeeding and there was a strong correlation between liver weights and the expression of genes such as SOAT1, involved in cholesterol storage and esterification. Simultaneously, there was a significant increase of genes involved the mechanisms of stress response and autophagy (SQSTM1, ASN...). The establishment of hepatic steatosis in mule duck may be characterized by a modification of cholesterol metabolism and the induction of autophagic processes.

INTRODUCTION

Induite par le gavage, la stéatose hépatique (aussi appelée foie gras) est le résultat d'une forte accumulation de triglycérides dans les hépatocytes des oiseaux aquatiques domestiques (Davail *et al.*, 2003). Ce mécanisme, qui est à l'origine une adaptation physiologique des animaux aux besoins énergétiques dans des situations telles que la migration ou l'hibernation, est exploitée aujourd'hui pour la production de foie gras (Hermier *et al.*, 2003). Afin de faire face aux différentes contraintes économiques et réglementaires qui supporte cette production, il est nécessaire d'optimiser les conditions d'élevage et de gavage des animaux. Pour cela, différentes options s'offrent à nous : tenter d'identifier des marqueurs du développement du foie gras, mais aussi comprendre les mécanismes sous-jacents liés à ce développement afin de l'optimiser.

Notre modèle animal, le canard mulard est un hybride stérile issu du croisement entre un mâle Barbarie (*Cairina moschata*) et une femelle Pékin (*Anas platyrhynchos*) qui présente des aptitudes à l'engraissement optimales pour la production de foie gras (Tavernier *et al.*, 2016 ; Chartrin *et al.*, 2006).

Le foie gras est très riche en cholestérol (parfois plus de 1g pour 100g) (Hermier *et al.*, 1999) mais à ce jour, pas ou peu d'études ont été menées sur le métabolisme du cholestérol au cours du gavage chez le canard mulard. Seules des mesures plasmatiques en fin de gavage ou chez des canards non gavés ont été réalisées (Chartrin *et al.*, 2006), ou encore au cours du gavage chez l'oie Landaise (Zhu *et al.*, 2011). C'est pour cela que notre intérêt s'est porté sur l'étude cinétique du métabolisme du cholestérol au cours du développement de la stéatose hépatique chez le canard mulard.

D'autre part, la pâtée de gavage distribuée aux canards est une alimentation riche en amidon composée quasi exclusivement de glucides. Cela représente un régime contenant de très faibles quantités de lipides, d'acides aminés et de protéines et caractérisé par un fort déséquilibre protéines/énergie (Baéza *et al.*, 2013). On peut ainsi s'interroger sur les effets que peuvent engendrer ce régime notamment au niveau des hépatocytes tels que l'activation de processus comme l'autophagie, généralement induite en situation de carence ou de stress cellulaire (Mizushima *et al.*, 2011).

Ainsi, afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents du développement de la stéatose hépatique, on se propose ici de faire une étude cinétique des effets du gavage sur l'expression de gènes en lien avec le métabolisme du cholestérol et l'autophagie chez le canard mulard au cours du gavage.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et design expérimental

Toutes les procédures expérimentales ont été effectuées conformément aux directives nationales françaises sur le soin et l'utilisation des animaux à des fins de recherche et en accord avec le comité d'éthique (n° agrément : C40-037-1). Cette étude a été réalisée sur 96 canards mulards mâles élevés dans un bâtiment de type Louisiane de 80 m² à raison de 2,6 canards / m². Face au risque élevé par rapport à la grippe aviaire au moment de l'élevage, les canards ont été maintenus en claustration totale. Ils ont bénéficié de l'éclairage naturel et ont été élevés sur litière de copeaux et abreuvés par pipettes à la station expérimentale palmipèdes à foies gras (INRA Artiguères, France). Ils ont été nourris (aliment de type commercial) *ad libitum* de l'éclosion à l'âge de 8 semaines pour la phase de démarrage (17,5 MAT, 2850 Kcal) puis par rationnement horaire (1h/jour) de 8 à 9 semaines suivi d'un rationnement quantitatif de 9 à 12 semaines pour la phase de croissance et de définition (15,5 MAT, 2800 Kcal). Le gavage a débuté à l'âge de 12 semaines et a duré 11 jours soit 22 repas composés uniquement de pâtée (53% MS Palma 146, Maïsador) et d'eau. Les quantités d'aliments distribuées au cours du gavage sont ajustées au poids vif des animaux.

Deux heures après les 4^{ème} (R4), 12^{ème} (R12) et 22^{ème} (R22) repas de gavage, les canards ont été abattus conventionnellement par électronarcose puis saignés et éviscérés à chaud. Les plasmas ont été séparés par centrifugation (3000rpm, 10 min, à 4 °C) puis stockés à -20°C. Après dissection, le foie, le *pectoralis major* (muscle), le gras abdominal et le gras sous-cutané ont été pesés, échantillonnés puis stockés à -80 °C.

1.2. Analyses plasmatiques

Les taux de glucose (GLU), triglycérides (TG) et cholestérol (CHO) plasmatiques (cholestérol total) ont été quantifiés par méthodes enzymatiques colorimétriques (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) selon les recommandations du fabricant.

1.3. Analyses Western blot

Les foies congelés (100 mg, n=12 à chaque temps de prélèvement) ont été broyés au Precellys Cryolys (Bertin technologies) (5000rpm, 2 cycles/10 sec, pause/15sec) dans 1 ml de tampon de lyse contenant un inhibiteur de protéase (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Sigma). Les homogénats ont ensuite été centrifugés (4°C/15min, 12000g) et les surnageants ont été récupérés puis centrifugés (4°C/15min, 12000g). Les concentrations de protéines ont été déterminées par dosage selon la méthode de Bradford avec l'utilisation de BSA comme standard. Des lysats (20µg) ont été soumis à une SDS-PAGE et à un Western blot en utilisant l'anticorps anti-phospho-eIF2α (Ser51) (n°9721) et anti eIF2α total (n°9722) de Cell Signaling Technologies (Ozyme,

Saint Quentin Yvelines, France). Les membranes ont été lavées puis incubées dans un anticorps secondaire IRDye Infrarouge (Li-COR Biosciences, Lincoln, USA). Les bandes ont été visualisées par fluorescence infrarouge et quantifiées par densitométrie à l'aide du système d'imagerie Odyssey (Li-COR Biosciences).

1.4. Analyses d'expression de gènes

Extraction d'ARNs

L'ARNm total a été isolé en utilisant le TRIzol Reagent (Invitrogen/Life technologies) selon les recommandations du fabricant puis quantifié par spectrophotométrie (absorbance à 260 nm) en utilisant l'appareil NanoVuePlus (GE Healthcare). Les échantillons ont été normalisés à 500 ng/μl. La qualité et l'intégrité des ARN totaux ont été vérifiées par électrophorèse (gel d'agarose 1%).

Rétrotranscription des ARNs

Après un traitement à la DNase (Quanta Biosciences), les ADNc ont été obtenus par rétrotranscription en utilisant le kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) et un mélange d'oligo dT et de random primers (Promega) selon les instructions du fabricant. 1 μl de luciférase (100 μg/μl), ARN exogène non présent chez le canard, a été ajouté lors de l'étape de dénaturation afin de servir comme gène de référence. La réaction a été réalisée sur un thermocycler (Biorad) selon le programme 25°C/5min, 55°C/1h, 70°C/15min, 4°C/∞ puis stockage à -20°C.

qPCR et Fluidigm

Les niveaux d'expression des gènes liés au métabolisme du cholestérol ont été déterminés par qPCR à partir de 2 μl d'ADNc (dilué 80 fois), d'amorces des gènes cibles (10 μmol.L⁻¹), de SYBr Green FastMix (Quanta) et d'eau RNase free pour un volume total de 15 μl. Les qPCR ont été réalisées selon le programme suivant : initiation à 95°C/10s suivi de 45 cycles d'amplification (60°C/15s) 15s suivi de 45 cycles d'amplification sur l'appareil CFX Mastro (Biorad).

Pour les gènes liés à l'autophagie, la méthode Fluidigm a été employée car réalisée antérieurement. Pour cela, une amplification cible spécifique (STA) a été réalisée au préalable avec 5 ng/μl d'ADNc afin de normaliser tous les échantillons et s'assurer qu'il y a suffisamment de copies d'ADNc dans chaque puits. La réaction a été effectuée à l'aide du colorant 20X EvaGreen suivant le programme 95°C/10min (étape de maintien) suivi de 35 cycles d'amplification (95°C/15s, 60°C/1min). Toutes les données ont été analysées avec le logiciel d'analyse PCR en temps réel Fluidigm (Fluidigm Corporation v4.1.3). Cette partie du travail a été réalisée à la plateforme de transcription quantitative GeT-TQ (GenoToul, Toulouse, France).

Pour l'analyse de l'ensemble des données, le gène de référence choisi est la luciférase. La quantité relative d'expression des gènes cibles a été déterminée par la méthode $\Delta\Delta CT$. L'efficacité de la PCR, mesurée par

la pente d'une courbe standard à l'aide de dilutions en série d'ADNc, était comprise entre 1,85 et 2.

1.5. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM et analysés par analyse de variance à une voie (one-way ANOVA) ($P < 0,05$) complétée par un test de Tukey avec le logiciel GraphPad Prism. Les tests de corrélations de Pearson et les ACP sont réalisés avec le logiciel R (Rcmdr, FactominR).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Données zootechniques - dosages biochimiques

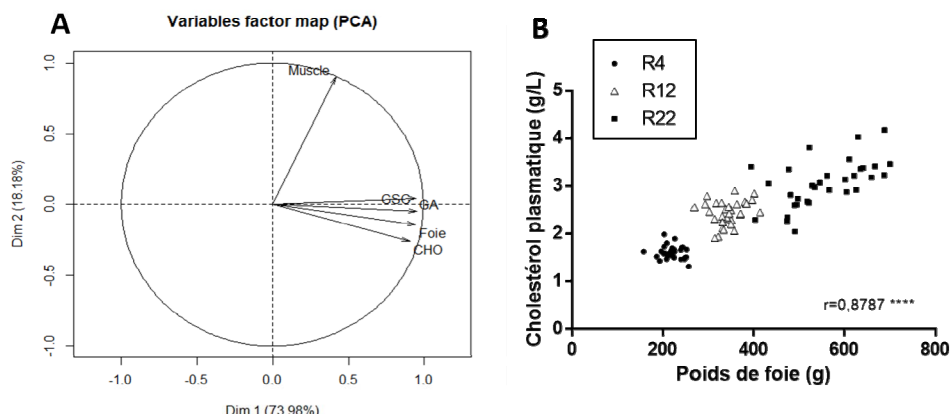
Afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes mis en place au cours du développement du foie gras chez le canard mulard gavé, les données zootechniques (poids de tissus) ainsi que les données plasmatiques ont été analysées au cours du gavage (n=32 à chaque point de prélèvement R4, R12 et R22) (Tableau 1). Une augmentation significative des poids de foie ($p < 0,0001$), gras abdominal ($p < 0,0001$) et gras sous-cutané ($p < 0,0001$) est observée au cours du gavage tandis que le poids de muscle augmente significativement en début de gavage (entre R4 et R12) puis se stabilise en fin de gavage ($p = 0,0007$). De plus, l'analyse des paramètres plasmatiques montre une augmentation significative du taux de glucose ($p = 0,0052$), triglycérides ($p < 0,0001$) et cholestérol total ($p < 0,0001$) au cours du gavage. On a ainsi une croissance régulière du poids de foie au cours du gavage qui s'accompagne d'une concentration accrue des paramètres plasmatiques comme cela a déjà été montré dans différentes études (Baéza *et al.*, 2005, Chartrin *et al.*, 2006).

Tableau 1. Effets du gavage sur les paramètres plasmatiques et sur les poids de tissus (n=32, moyenne $\pm$ SEM) ; GA : gras abdominal, GSC : gras sous-cutané ; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$

	R4	R12	R22	P value
Tissus (g)				
Foie	220,9 $\pm$ 3,87 a	344,1 $\pm$ 5,85 b	556,0 $\pm$ 15,12 c	****
Muscle	287,4 $\pm$ 4,43 a	306,9 $\pm$ 4,36 b	314,1 $\pm$ 5,94 b	***
GA	38,09 $\pm$ 2,86 a	77,08 $\pm$ 4,02 b	156,9 $\pm$ 4,25 c	****
GSC	69,59 $\pm$ 2,34 a	116,7 $\pm$ 2,49 b	154,3 $\pm$ 3,05 c	****
Plasma (g/l)				
GLU	3,21 $\pm$ 0,08 a	3,48 $\pm$ 0,11 ab	3,62 $\pm$ 0,07 b	**
TG	3,202 $\pm$ 0,14 a	4,05 $\pm$ 0,20 b	5,27 $\pm$ 0,29 c	****
CHO	1,61 $\pm$ 0,02 a	2,45 $\pm$ 0,04 b	3,06 $\pm$ 0,09 c	****

Par ailleurs, des tests d'analyses en composantes principales montrent qu'il existe une corrélation significative entre les poids de tissus et le taux de cholestérol total ($r = 0,88$, $p < 0,0001$; $r = 0,81$, $p < 0,0001$ et $r = 0,81$, $p < 0,0001$ pour le foie, le gras abdominal et le gras sous cutané respectivement (Figure 1a). Cette

Figure 1. Corrélations entre paramètres zootechniques et plasmatiques. (A) : Analyse en composantes principales (GA : gras abdominal, GSC : gras sous-cutané, CHO : cholestérol total. (B) : Test de corrélation de Pearson entre poids de foie et cholestérol total plasmatique.



corrélation est marquée en fin de gavage entre poids de foie et taux de cholestérol total d'après le test de corrélations de Pearson ($r=0,17$ ns, $r=0,24$ ns et $r=0,59$ $p<0,001$ à R4, R12 et R22 respectivement (Figure 1b). Ces résultats préliminaires devront être confirmés avant d'envisager l'utilisation d'un éventuel marqueur du développement du foie gras en lien avec le métabolisme du cholestérol.

2.2. Métabolisme du cholestérol et gavage

Différents gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol ont été étudiés afin d'avoir une meilleure connaissance de l'action du gavage sur ce métabolisme. Ainsi, l'expression des gènes HMGCR (hydroxyméthylglutaryl-CoA reductase), DHCR7 (7-dehydrocholesterol reductase) et CYP51a (cytochrome P450 family 5) impliqués dans la synthèse du cholestérol; SOAT1 (sterol O-acyltransférase 1) impliqué dans l'estérification du cholestérol; Apo B (apolipoprotéines B) impliqué dans le transport du cholestérol; VLDLR (very low density lipoproteins receptor) et LDLR (low density lipoproteins receptor) récepteurs impliqués dans la retour du cholestérol au niveau du foie ; ont été analysés au cours du gavage ($n=32$ à chaque point de prélèvement) (Tableau 2). Les résultats montrent une augmentation significative de l'expression de HMGCR ($p=0,0004$) entre R12 et R22 ainsi qu'une augmentation significative de l'expression de CYP51a ($p=0,03$) marquée en milieu de gavage. HMGCR est une enzyme clé qui intervient dans la voie du mévalonate qui produit les précurseurs du cholestérol. Il semble alors que le gavage induise une hausse notable de la synthèse de cholestérol. On observe également une augmentation significative des gènes ACAT, ApoB, VLDLR et LDLR au cours du gavage ($p<0,0001$).

Des études menées chez l'homme associent une augmentation du métabolisme du cholestérol à la maladie du « foie gras » non-alcoolique (NAFLD) ou encore à la stéato-hépatite (NASH) (Min *et al.*, 2012). Cela dit chez les canards et l'ensemble des palmipèdes

à foies gras, le processus de formation du foie gras est un phénomène non pathologique et totalement réversible (Babilé *et al.*, 1996 ; Benard *et al.*, 1998).

2.3. Stress cellulaire et autophagie au cours du gavage

Notre étude s'est portée sur la voie eIF2 α -ATF4 (eukaryotic initiation factor 2 alpha - activating transcription factor 4) qui joue un rôle clé dans la réponse à des stress cellulaires tels que la carence en acides aminés ou le stress oxydant (Bruhat *et al.*, 2015, Warland *et al.*, 2008). Les analyses Western blot de la forme phosphorylée de la protéine eIF2 α dans les hépatocytes ($n=12$ à chaque temps de prélèvement) montrent qu'il y a une diminution significative de sa quantité en milieu de gavage (entre R4 et R12) suivie d'une augmentation significative en fin de gavage (entre R12 et R22) mais moindre qu'à R4 ($p<0,0001$) (Figure 2). Les analyses des gènes ATF4 et ASN impliqués dans la voie eIF2 α -ATF4 montrent une augmentation significative de leurs expressions au cours du gavage ($p<0,0001$ pour chaque gène respectivement). Le développement de la stéatose hépatique semble ainsi s'accompagner d'une activation de la voie eIF2 α -ATF4.

Figure 2. Analyse Western blot de la protéine eIF2 α dans le foie au cours du gavage. Les blots représentent le rapport entre la protéine phosphorylée et la quantité totale de protéine. ($n=12$; a, b, c signifient que les valeurs des moyennes sont significativement différentes à $p<0,05$).

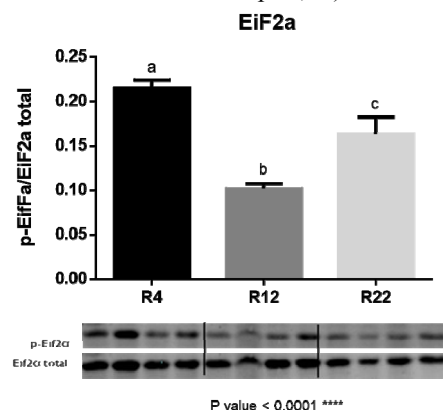


Tableau 2. Effets du gavage sur l'expression relative des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, le stress cellulaire et l'autophagie dans le foie (n=32, moyenne $\pm$ SEM) ; ns : non significatif, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$

	Expression relative			
	R4	R12	R22	P value
Métabolisme des lipides				
HMGCR	4,00 ± 0,35 a	5,44 ± 0,54 a	7,76 ± 0,92 b	***
CYP51A	1,89 ± 0,27 a	2,68 ± 0,39 b	1,59 ± 0,16 a	*
DHCR7	3,01 ± 0,35	4,57 ± 0,58	3,46 ± 0,54	ns
SOAT1/ACAT	1,53 ± 0,15 a	3,63 ± 0,31 b	8,50 ± 0,78 c	****
VLDLR	1,65 ± 0,19 a	5,00 ± 1,01 b	9,15 ± 0,74 c	****
LDLR	1,43 ± 0,22 a	3,07 ± 0,27 b	4,67 ± 0,41 c	****
APOB	2,02 ± 0,22 a	4,39 ± 0,38 b	10,32 ± 0,96 c	****
Stress cellulaire et autophagie				
ASN	1,83 ± 0,25 a	8,13 ± 0,97 b	13,07 ± 1,52 c	****
ATF4/CREB2	1,39 ± 0,14 a	4,14 ± 0,34 b	7,87 ± 0,69 c	****
SQSTM1/P62	1,58 ± 0,21 a	3,43 ± 0,33 b	6,30 ± 0,57 c	****
ATG8/LC3	3,40 ± 0,59 a	9,97 ± 0,97 b	23,08 ± 2,10 c	****
ATG9	1,28 ± 0,17 a	4,04 ± 0,46 b	6,62 ± 0,86 c	****

Des gènes impliqués dans le processus de macroautophagie cellulaire SQSTM1 (sequestosome 1), ATG8/LC3 (autophagy related gene 8) et ATG9 (autophagy related gene 9) ont été analysés afin de savoir si le gavage induisait ou non son activation. On observe une augmentation significative de l'expression des gènes SQSTM1, ATG8 et ATG9 au cours du gavage. ATG8 et ATG9 sont connus chez la levure pour être associés au nombre d'autophagosomes formés (Zhuang *et al.*, 2017). Le développement de la stéatose hépatique semble impacter le processus d'autophagie chez le canard mulard.

CONCLUSION

D'un point de vue moléculaire, l'établissement de la stéatose hépatique chez le canard mulard semble se

caractériser par une modification du métabolisme du cholestérol d'une part, et l'induction de processus autophagiques d'autre part. Les analyses de corrélations réalisées permettent d'envisager l'identification de nouveaux marqueurs du développement de la stéatose hépatique chez le canard mulard en lien avec le métabolisme du cholestérol, sous réserve de validation ultérieure.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le personnel technique de l'INRA Artiguères pour l'élevage, le gavage et l'abattage des animaux à la station expérimentale de Benquet. Nous remercions également Emilie Bonin pour l'analyse du Fluidigm (Genotoul, GeT-PlaGe : plateforme de génomique et transcriptomique Toulouse, France).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Babilé, R. *et al.*, (1996) 2^{ème} JRA, Bordeaux, 12-13 Mars. P107-110
 Baeza, E., *et al.*, (2013) INRA Productions Animales, 26(5), 403-414
 Bénard G. *et al.*, (1998) 3^{ème} JRA, Bordeaux, 27-28 oct. p49-52
 Bruhat, A. *et al.*, (2015) médecine/sciences, 31(12), 1057-1060
 Chartrin, P. *et al.*, (2006) Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 145(3), 390-396
 Cuervo, A.M. (2004) Mol. Cell. Biochem. 263, 55-72
 Davail, S. *et al.*, (2003) Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 134(4), 707-715
 Hermier, D. *et al.*, (1999) Poultry Science, 78, 1398-1406
 Hermier, D. *et al.*, (2003) Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 135(4), 663-675
 Min, H.-K. *et al.*, (2012) Cell Metabolism, 15(5), 665-674.
 Mizushima, N. et Komatsu, M. (2011) Cell, 147(4), 728-741.
 Tavernier, A. *et al.*, (2017) Molecular and Cellular Biochemistry, 424(1-2), 147-161
 Walrand, S. *et al.*, (2008) Nutrition Clinique et Métabolisme, 22(4), 161-167.
 Zhu, L. H. *et al.*, (2011) Poultry Science, 90(1), 107-117
 Zhuang, X., *et al.*, (2017) Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(3), E426-E435