

# PROGRAMMATION NUTRITIONNELLE DU METABOLISME HEPATIQUE CHEZ LE CANETON MULARD : ETUDE DE TRANSCRITS

Sécula Aurélie<sup>1</sup>, Chapuis Hervé<sup>1</sup>, Collin Anne<sup>2</sup>, Bluy Lisa E<sup>1</sup>, Bonnet Agnès<sup>1</sup>, Bodin Loys<sup>1</sup>, Manse Hélène<sup>1</sup>, Gress Laure<sup>1</sup>, Cornuez Alexis<sup>3</sup>, Bernadet Marie-Dominique<sup>3</sup>, Martin Xavier<sup>3</sup>, Bonnefont Cécile MD<sup>1</sup> et Morisson Mireille<sup>1</sup>

<sup>1</sup>GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, F-31326, CASTANET TOLOSAN

<sup>2</sup>INRAE, Université de Tours, BOA, 37380, NOUZILLY

<sup>3</sup>UEPFG INRAE Bordeaux-Aquitaine (Unité Expérimentale Palmipèdes à Foie Gras),  
Domaine d'Artiguères 1076, route de Haut Mauco, F-40280 BENQUET

[mireille.morisson@inrae.fr](mailto:mireille.morisson@inrae.fr)

## RÉSUMÉ

Chez les oiseaux, la qualité de l'alimentation maternelle peut impacter les performances de la progéniture. Nous avons ainsi montré que chez le canard mulard, un régime alimentaire maternel restreint en méthionine (0,25% *versus* 0,40%) affecte certains paramètres du métabolisme hépatique des canetons des deux sexes. Une évaluation du niveau d'expression hépatique de 170 gènes cibles nous a permis d'identifier 55 gènes différenciellement exprimés entre les deux groupes de canetons. Parmi eux, certains concernent le métabolisme énergétique et d'autres concernent le métabolisme du monocarbonate et quelques mécanismes épigénétiques. Ces changements des niveaux des transcrits, ainsi que les données phénotypiques observées, suggèrent une modulation dans l'établissement de voies métaboliques précoces pouvant ainsi constituer la base des effets à long terme observés sur le métabolisme énergétique. En effet, à 12 semaines d'âge, les mulards issus de canes restreintes en méthionine ont un taux de lipides hépatiques et un poids de gras abdominal plus faibles et, après gavage, le poids du foie gras est diminué de plus de 10 % (495 g *versus* 546 g ; P = 0,003). Ceci nous a conduits à proposer un schéma d'interactions métaboliques reliant le métabolisme du monocarbonate et le métabolisme énergétique. Ces travaux soulignent le lien entre alimentation maternelle et performances de gavage chez le canard mulard.

## ABSTRACT

### **Nutritional programming of hepatic metabolism in mule ducks: a transcript study**

In farmed birds, the quantity and quality of the maternal diet can affect the production performances of the offspring. We have already shown that maternal dietary methionine restriction (0.25% *versus* 0.40%) affects parameters of liver metabolism in mule ducklings. The hepatic expression level of 170 targeted genes allowed us to identify 55 differentially expressed genes between the two groups of ducklings. Among them, some were related to energy metabolism and others concerned the one-carbon metabolism and some epigenetic mechanisms. These early changes in transcript levels, together with the observed phenotypic data, suggest modulation in the establishment of early metabolic pathways that may pave the way for long-term effects on energy metabolism. Indeed, at 12 weeks of age, mule ducks from the methionine-restricted group showed lower liver lipid percentage together with a lower abdominal fat weight. After force-feeding, fatty liver weight was reduced by more than 10% (495 g *versus* 546 g; P = 0.003). This led us to propose a metabolic interaction scheme linking one-carbon metabolism and energy metabolism. This work thus highlights the link between maternal nutrition and production performance in mule ducks.

## INTRODUCTION

Les effets de la nutrition maternelle sur les phénotypes des descendants sont très documentés chez les animaux d'élevage (Chavatte-Palmer et al., 2016 ; Sinclair et al., 2016), y compris chez la volaille (Dixon et al., 2016 ; Jha et al., 2019 ; Métayer Coustard et al., 2019). Ainsi, la disponibilité en donneurs de méthyle dans l'alimentation maternelle et ses effets sur le métabolisme hépatique lors du développement embryonnaire sont très étudiés chez les mammifères et des revues récentes soulignent les interactions entre le métabolisme du monocarbonate, les mécanismes épigénétiques et le métabolisme énergétique (Cai et al., 2017 ; Chango and Pogribny, 2015 ; Clare et al., 2019).

Nous avons déjà montré qu'une carence alimentaire en méthionine chez les canes Pékin (0,25% versus 0,40%) conduit à des œufs de plus petit poids et contenant moins de blanc, induisant ainsi une moindre disponibilité en nutriments pour le développement embryonnaire des canetons. En conséquence, nous avons observé chez ces canetons un poids à l'éclosion réduit (33,0 g versus 35,2 g ;  $P < 0,001$ ) mais aussi des niveaux plasmatiques de glucose et de triglycérides plus élevés (16,4 mMol/L versus 10,6 mMol/L ;  $P = 0,03$  et, en Log, 0,55 versus -0,09 ;  $P = 0,01$  respectivement) et un taux plasmatique d'acides gras libres plus faible (0,27 mMol/L versus 0,55 mMol/L ;  $P = 0,01$ ). Ces résultats montraient un impact de la carence maternelle en méthionine sur le métabolisme hépatique des canetons à l'éclosion (Bodin et al., 2019). Nous avons donc continué à examiner les effets de la carence maternelle en étudiant le niveau d'expression de 170 gènes dans le foie de canetons issus de canes restreintes en méthionine (Groupe R) comparativement à celui mesuré dans les foies de canetons du groupe contrôle (Groupe C). Les gènes ciblés étaient principalement liés au métabolisme énergétique, au métabolisme du monocarbonate et à quelques mécanismes épigénétiques.

## 1. MATERIELS ET METHODES

Le protocole expérimental a reçu l'autorisation ministérielle (APAFIS#1847-2015092213418825v2) et a été réalisé conformément aux directives en vigueur (2010/63/UE). L'expérimentation a été menée à l'UEPFG (INRAE, Artigues ; accréditation B40-037-1).

### 1.1. Préparation des ADNc

Des échantillons de foie congelés de 8 femelles et 10 mâles du groupe C et de 10 femelles et 10 mâles du groupe R ont été broyés et 80 à 100 mg de poudre de ces tissus ont été traités comme décrit précédemment (Voillet et al., 2018) pour en extraire l'ARN total qui a

été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 8000 (Thermo Fisher, Illkirch, France). Son intégrité a été contrôlée par électrophorèse et avec un bioanalyseur Agilent 2100, (Agilent Technologies, Massy, France). La transcription inverse a été réalisée en présence de l'enzyme SuperScript™ II (Invitrogen, Californie, Etats-Unis), de l'inhibiteur de ribonucléase RNasin® (Promega Corporation, Etats-Unis) et de l'oligo (dT)15 (Sigma Aldrich, France). Les ADNc ont ensuite été dilués dans de l'eau et stockés à -80°C.

### 1.2. Design des amorces et validation par qPCR

Les séquences des gènes cibles ont été obtenues à partir de données chez *Anas platyrhynchos* ou chez *Gallus gallus*, disponibles sur les bases de données NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) et/ou Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.htm>). Les amorces ont été conçues sur 2 exons, de part et d'autre d'un intron, en utilisant les logiciels Primer3Plus ou LightCycler® Probe Design 2.0 (Roche Applied Science). Les produits PCR ont d'abord été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % pour confirmer la taille de l'amplicon puis testés par qPCR sur QuantStudio6 (Thermo Fisher Scientific). Les valeurs Cq et l'efficacité de la PCR ont été obtenues directement à partir du logiciel QuantStudio Real-Time PCR v1.3.

### 1.3. PCR quantitative et analyse de l'expression des gènes

Pour conduire ces analyses, nous nous sommes référés au guide MIQE (Bustin et al., 2009). La quantification de l'expression des 170 gènes et de 5 gènes de référence potentiels a été réalisée sur puces (IFC) 96.96 Dynamic Array avec le système BioMark HD de Fluidigm et les données ont été analysées avec le logiciel d'analyse PCR Fluidigm (version 4). L'expression relative de chaque gène pour chaque échantillon a été calculée comme proposé par Pfaffl (Pfaffl, 2001). La stabilité des cinq gènes de référence potentiels a été testée à l'aide de l'algorithme GeNorm (version 3.4) (Vandesompele et al., 2002) et les trois gènes les plus stables ont été retenus comme gènes de référence. Enfin, l'expression relative de chaque gène pour chaque échantillon a été normalisée avec la moyenne géométrique des expressions relatives des trois gènes de référence retenus. Ensuite, afin d'obtenir des distributions gaussiennes, certaines expressions relatives normalisées ont été transformées soit par une fonction racine carrée, soit par une fonction logarithmique. Des ANOVA ont été menées sur les expressions relatives normalisées puis transformées, en utilisant un modèle linéaire mixte avec le logiciel ASReml (Gilmour et al., 2015). Les effets fixes du modèle sont le régime maternel, le sexe du caneton, et l'interaction régime-sexe tandis que la valeur génétique additive du caneton constitue, avec la résiduelle, les effets aléatoires. Nous avons ensuite recherché les gènes différentiellement exprimés soit

entre les deux groupes maternels (groupe C et R) soit entre les canetons mâles et femelles (effet sexe du caneton). Les gènes présentant une différence significative (p-value de l'effet < 0,05 évaluée après une correction de Benjamini-Hochberg afin de tenir compte des tests multiples) ont été considérés comme des gènes exprimés de manière différentielle (DEG).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

Parmi les 170 gènes étudiés, 14 ont été retirés de l'analyse du fait d'un nombre de données manquantes supérieur à 25%. Parmi les 156 gènes restants, 55 gènes présentaient des expressions différentielles entre les deux groupes de canes (effet carence en méthionine de la cane) et 19 présentaient des expressions différentielles entre les canetons mâles et femelles (effet sexe du caneton). Enfin, 9 gènes étaient différentiels pour les deux effets et 2 d'entre eux, *FASN* et *PGKI*, montraient une interaction entre les deux effets.

### 1.1. Les gènes du métabolisme du monocarbonate sont majoritairement sous-exprimés dans les foies des canetons du groupe carencé

Nous avons identifié 12 gènes différentiels impliqués dans le métabolisme du monocarbonate (dont *MTHFD1*, *ATIC*, *GART*, *MTHFR*, *AHCY*, *AHCYL1*, ...) et 4 impliqués dans des mécanismes épigénétiques (*DNMT3A*, *EZH2*, *HDAC9*, *SIRT1*). Parmi eux, 15 sont sous-exprimés dans le groupe de canetons issus de canes carencées, ce qui suggère une moindre activité du métabolisme du monocarbonate ainsi qu'une moindre production d'enzymes impliquées dans des mécanismes épigénétiques. Ces hypothèses restent cependant à valider par des études d'expression protéique et/ou d'activités enzymatiques.

Quelques-autres sont impliqués dans des réponses de stress (*EEF1A1*, *ERRF11*, *HSBP1*) ou sont des facteurs de transcription (*ESR1*, *NR3C1*) et sont, à nouveau, tous sous-exprimés dans le groupe de canetons issus de canes carencées.

### 1.2. La carence maternelle en méthionine affecte l'expression de gènes du métabolisme énergétique dans les foies des canetons du groupe carencé

Les autres gènes différentiels concernent différentes voies du métabolisme énergétique (glycolyse, transport d'électrons, lipogenèse *de novo*, export d'acide gras, ...) ou codent pour des récepteurs nucléaires (*PPARA*, *PPARG*, *RXRA*, *PPARGC1B*). D'autres encore sont impliqués dans la régulation du stress oxydatif, l'apoptose ou les lésions hépatiques. Ces résultats peuvent suggérer quelques hypothèses quant au niveau d'activité de certaines voies métaboliques. Il est à noter par exemple, que tous les gènes différentiels de la lipogenèse *de novo* sont sur-exprimés chez les canetons du groupe R ce qui tend à montrer que cette voie métabolique serait plus active dans ce groupe de canetons. Au contraire, *CD36*,

*ACLS1*, *CPT1A*, *ACADM*, *COX2*, *NDUFA4*, *NDUFB6* et *CYTB* impliqués dans le transport et le catabolisme des acides gras, ainsi que dans le transport d'électrons, sont tous sous-exprimés chez les canetons du groupe R. Ces résultats suggèrent une moindre absorption des acides gras par le foie et une moindre conversion en esters d'acyl-CoA ainsi qu'une réduction de l'activité mitochondriale dans les foies des canards du groupe R en lien avec la teneur plus faible en acides gras libres plasmatiques. Une fois encore, ces hypothèses sont à valider par des études d'expression protéique et/ou d'activités enzymatiques.

### 1.3. Interactions entre le métabolisme du monocarbonate, les mécanismes épigénétiques et le métabolisme énergétique

Nos résultats suggèrent à la fois (i) une moindre activité du métabolisme du monocarbonate et donc une moindre disponibilité en groupes méthyle et (ii) une moindre production d'enzymes impliquées dans des mécanismes épigénétiques (méthylation d'ADN, désacétylation d'histones) dans le foie des canetons du groupe R. Ceci peut conduire à modifier la structure chromatidienne ou moduler le niveau de méthylation des sites spécifiques au niveau de promoteurs de gènes et ainsi induire des modifications du niveau d'activité de certaines voies du métabolisme énergétique (Figure 1). Bien qu'elles restent à confirmer, ces modifications métaboliques établies pendant le développement embryonnaire pourraient induire les effets à long terme que nous observons sur le métabolisme énergétique. En effet, à 12 semaines d'âge, les mulards issus de canes restreintes en méthionine ont un taux de lipides hépatiques et un poids de gras abdominal plus faibles et, après gavage, le poids du foie gras est diminué de plus de 10 % (495 g *versus* 546 g ; P = 0,003) (voir l'article de Bodin et al. intitulé « Programmation nutritionnelle du métabolisme hépatique chez le canard mulard : données zootechniques » lors de ces 14èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras).

## CONCLUSION

Ces travaux soulignent le rôle des donneurs de méthyle disponibles dans l'alimentation maternelle sur la programmation du métabolisme hépatique. Une fois établie, cette programmation métabolique perdure dans le temps et impacte les performances de gavage du canard mulard.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bodin L. et al. 2019. Poultry Sci 98, 5590–5600.  
Bustin S.A. et al. 2009. Clin Chem 55, 611–622.  
Cai D. et al. 2017. In Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics, Springer International Publishing AG 2017.  
Chango A. and Pogribny I.P. 2015. Nutrients 7, 2748–2770.  
Chavatte-Palmer P. et al. 2016. Int J Environ Res Public Health 13.  
Clare C.E. et al. 2019. Annu Rev Anim Biosci 7, 263–287.  
Dixon L.M. et al. 2016. Poultry Sci 95, 489–499.  
Gilmour A. et al. 2015. VSN International Ltd, Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK.  
Hou Z. et al. 2018. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 218, 30–36.  
Jha, R., et al. 2019. Front Vet Sci 6, 82.  
Métayer Coustard S. et al. 2019. INRA Prod. Anim. 32, 417e–430e.  
Pfaffl M.W. 2001. Nucleic Acids Res 29, e45.  
Sinclair K.D. et al. 2016. Reprod Fertil Dev.  
Vandesompele J. et al. 2002. Genome Biol 3, RESEARCH0034.  
Voillet V. et al. 2018. Mol Cell Proteomics 17, 672–693.

**Figure 1 :** Schéma des interactions possibles entre le métabolisme du monocarbone, les mécanismes épigénétiques et le métabolisme énergétique

