



HAL
open science

Détection de QTL d'expression de protéines de foie gras de canard mulard

Yoannah François

► **To cite this version:**

Yoannah François. Détection de QTL d'expression de protéines de foie gras de canard mulard. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2014. Français. NNT: . tel-02801398

HAL Id: tel-02801398

<https://hal.inrae.fr/tel-02801398>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

École doctorale des sciences exactes et leurs applications - ED211

Présentée et soutenue le 21 Octobre 2014

par **Yoannah FRANCOIS**

pour obtenir le grade de docteur

de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour

Spécialité : Physiologie et biologie des organismes, populations, interactions

DETECTION DE QTL D'EXPRESSION DE PROTEINES DE FOIE GRAS DE CANARD MULARD

MEMBRES DU JURY

RAPPORTEURS

- Elisabeth Le Bihan-Duval
- Brigitte Picard

Directrice de Recherches INRA Tours
Directrice de Recherches INRA Clermont-Ferrand

EXAMINATEURS

- Sandrine Skiba
- Olivier Demeure
- Christel Marie-Etancelin

Directrice de Recherches INRA St Pée sur Nivelle (Présidente du Jury)
Chargé de Recherches INRA Rennes
Ingénieur de Recherche INRA Toulouse

DIRECTEURS

- Stéphane Davail
- Caroline Molette

Professeur, IUT de Mont de Marsan
Maître de Conférences INPT-ENSAT

Remerciements

Les travaux entrepris au cours de cette thèse ont été réalisés au sein de l'UMR1289 INRA / INPT-ENSAT / INPT-ENVY TANDEM (Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystèmes et Métabolisme), de l'UR631 INRA SAGA (Station d'Amélioration Génétique des Animaux et de l'UMR444 INRA / INPT-ENVY LCG (Laboratoire de Génétique Cellulaire), aujourd'hui fusionnés au sein de l'UMR1388 INRA / INPT-ENSAT / INPT-ENVY GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevages).

A ce titre, je tiens à remercier Xavier Fernandez, Christèle Robert-Granié et Martine Yerle pour m'avoir tour à tour accueillie dans leurs unités.

Je remercie Stéphane Davail, Professeur à l'IUT de Mont de Marsan, et Caroline Molette, Maître de Conférences à l'INPT-ENSAT pour avoir codirigé cette thèse.

Je remercie également le Conseil Général des Landes pour avoir financé ma bourse de thèse.

Je remercie Elisabeth Le Bihan-Duval, Directrice de Recherches à l'INRA de Tours et Brigitte Picard, Directrice de Recherches à l'INRA de Clermont-Ferrand, pour avoir accepté de participer au jury de thèse en tant que rapportrices. Je remercie également Sandrine Skiba, Directrice de Recherche à l'INRA de St Pée sur Nivelle, pour avoir accepté de participer au jury en tant de présidente du jury, et Olivier Demeure, Chargé de Recherches à l'INRA de Rennes, pour avoir accepté de participer à ce jury en tant qu'examineur.

Parce que ces travaux sont un travail d'équipe :

Mille mercis à Caroline Molette, Christel Marie-Etancelin et Alain Vignal pour leur encadrement au quotidien. Merci pour tous vos conseils, vos encouragements, votre aide, pour toutes ces discussions enrichissantes, pour votre sympathie, votre humanité et votre disponibilité. Je pense sincèrement avoir eu de la chance de vous avoir autour de moi durant ces 3 années.

Merci Caroline pour tes conseils, tes investissements, tes encouragements, ta disponibilité et les amorces.

Merci Christel pour ta gentillesse et ta disponibilité, pour tous tes conseils et pour les cartes.

Merci Alain pour les discussions enrichissantes, pour les questions soulevées, pour les cartes et les corrections d'anglais !

Je tiens également à remercier Sandrine Lagarrigue, Christian Diot, Jean-Michel Elsen et Xavier Fernandez pour leur participation à mon comité de thèse. Merci pour ces échanges, pour vos conseils et propositions dans l'avancement de des travaux ainsi que pour votre soutien.

Je remercie également à Magali San Cristobal pour ses précieux conseils sur l'application des statistiques.

Un grand merci à Nathalie Marty-Gasset pour m'avoir initiée à l'électrophorèse 2D, qui après quelques 360 gels n'a plus beaucoup de secrets pour moi. Merci pour ta présence, ta gentillesse, ta culture cinématographique et musicale.

Merci également à Emmanuelle Labarthe pour avoir pris en charge l'extraction des ARN et le Fluidigm.

Je remercie tout le personnel des 3 laboratoires ne formant plus qu'un dans lequel s'est déroulé cette thèse. Je ne peux citer tout le monde, mais je vais essayer de n'oublier personne. Merci à Cécile Bonnefont pour tes conseils et ta gentillesse, à Hélène Manse pour ta gentillesse et ta disponibilité, à Corinne Pautot pour ta bonne humeur et Stéphane pour ta gentillesse et les brioches. Merci aux membres du groupe palmipède pour ces moments partagés si agréables.

Je remercie également tous mes coloc' de bureau, de labo, compagnons de fortune et d'infortune, de repas, de soirées... Merci à Julien Arroyo et Mickael Rey, pour leur bonne humeur, leurs encouragements. Merci à Sahar Awde d'avoir partagé le bureau (côté ENSAT) et le labo pendant tous ces mois, merci de m'avoir fait partager ta culture (surtout les gâteaux libanais !!). Merci à Carole Arnoux, Florian Cappelleso, Viviana Lazzarotto, Nadia Yacoubi, Anaïs Fernandez, pour leur compagnie, leur bonne humeur. Merci à Réjane Monteville, Emilie Cobo et Maxime Banville d'avoir successivement partagé mon bureau (côté SAGA). Merci à Diane Buisson, Céline

Carillier, Sophie Brard, Samira Fathalla, Julien Jacquin, Charlotte Alain, Chloé Sidani... pour tous nos échanges divers et variés.

Je souhaite remercier mes proches. Merci à Christèle et Jean pour m'avoir gracieusement hébergée à mon arrivée sur Toulouse, merci à la Olivier, Maider, Iban, Elaia et Intza pour m'avoir accueillie chez eux lors de mes escapades paloises, merci à mes amis de BeO pour m'avoir aidée à me sortir la tête de la thèse et à me changer les idées et à ma famille pour leur soutien et encouragement. Un merci particulier à mes parents leur soutien infailible et indéfectible si réconfortant, leur pragmatisme et leur réalisme. Enfin, last but not least, un immense merci à ma moitié pour le sacrifice de notre vie à 2 durant ces trois années. Merci pour ton soutien, merci de m'être resté.

Résumé

L'objectif de ce projet était de comprendre comment l'expression du génome influence les caractères de qualité du foie gras, tels que le poids de foie, le taux de fonte et les teneurs, en lipides et protéines, et d'identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents. Afin de répondre à ces objectifs, nous avons dans un premier temps étudié l'expression différentielle de protéines selon les phénotypes des foies des canards mulards puis dans un second temps, nous avons entrepris d'identifier des QTL phénotypiques et protéiques (pQTL) à l'aide d'une nouvelle carte génétique composée de marqueurs SNP et microsatellites.

Tout d'abord, une optimisation du dispositif expérimental a été entreprise : 3 famille F1, composées de 98 canes backcross et de leurs 294 fils mulards ont été sélectionnés pour leur contribution à des QTL existants liés à la qualité du foie gras.

La première approche nous a permis de montrer que les foies ont des profils protéiques et métaboliques différents selon leur phénotype. Ainsi, les foies légers qui fondent peu, avec une faible teneur en lipides mais une forte teneur en protéines présentent un processus anabolique par la surexpression de protéines impliquées dans les métabolismes lipidiques, glucidiques, de synthèse. Au contraire, les foies lourds, fondant beaucoup, avec une forte teneur en lipides mais une faible teneur en protéines présentent des mécanismes de cytoprotection et de réponse au stress.

La seconde approche nous a permis de mettre en évidence 30 QTL relatifs à des phénotypes de qualité du foie gras et 50 pQTL relatifs à différentes protéines. Sept chromosomes se démarquent par la ségrégation de plusieurs QTL et pQTL permettant d'émettre des hypothèses quant aux fonctions des gènes sous-jacents à ces QTL. Entre autres, le locus d'APL15 semble lié à la glycolyse et celui d'APL18 à des processus de survie cellulaire.

L'ensemble de ces résultats permet ainsi non seulement d'identifier les voies métaboliques impliquées dans la qualité du foie, mais également d'établir un lien entre les caractères, les protéines et les loci des QTL suggérant un déterminisme génétique de ces voies métaboliques impliquées. Ces relations nécessitent d'être approfondies afin de préciser les processus et les gènes impliqués dans la qualité du foie gras.

Mots clés : Foie gras ; Canard mulard ; Qualité ; Taux de fonte ; Protéomique ; QTL ; pQTL

Abstract

The aim of this project was to understand how the genome expression influences liver quality traits such as liver weight, melting rate, lipid and protein rates, and to identify the molecular mechanisms underlying it. First, we studied the differential expression of proteins according to liver quality traits of mule ducks. Then we carried out detections of uni-trait and multi-traits phenotypic QTL and protein QTL using a new genetic map containing SNP and microsatellite markers.

In preamble to the study, the optimization of the experimental disposal was necessary: 98 backcross dams and their 294 mule sons, composing 3 F1 families were selected because of their contribution to the likelihood of existing QTL related to foie gras quality.

The first study showed that livers presented different protein and metabolic profiles according to their phenotypes. Indeed, light livers, with low melting rate, low lipid rate and high protein rate show an over-expression of proteins involved in lipid, glucid or in synthesis metabolism, suggesting an anabolism process. On the contrary, heavy livers, with high melting rate, high lipid rate and low protein rate show cytoprotection and response to stress mechanisms.

The second study highlighted 30 QTL related to liver quality traits and 50 pQTL related to different proteins. In particular, 7 chromosomes segregated several QTL and pQTL, permitting to assess hypothesis on the functions of the genes underlying these QTL regions. As an example, the APL15 locus seems linked to glycolysis and the APL18 one seems linked to cell survival ones.

All these results helped in identifying metabolic pathways implicated in liver quality as well as establishing a link between traits, proteins and the QTL loci, suggesting a genetic determinism of these pathways. These relationships need to be further studied in order to bring precision to the process and to determine more precisely the genes implicated in the foie gras quality traits.

Keywords : Foie gras ; Mule duck ; Quality ; Melting Rate ; Proteomic ; QTL ; pQTL

Sommaire

Remerciements	3
Résumé	9
Abstract	11
Sommaire	13
Liste des Publications	21
Liste des abbréviations	23
Liste des Figures	31
Liste des Tableaux	35
INTRODUCTION	39
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	45
Première partie	47
1. Histoire du canard	47
1.1. Phylogénie –taxonomie	47
1.2. Les canards communs	47
1.3. Le canard de Barbarie	49
1.4. Le canard mulard	49
1.5. Les différences d’aptitude à la production de foie gras entre génotypes	51
2. Métabolisme de la stéatose hépatique	53
2.1. La lipogenèse <i>de novo</i> stimulée par alimentation	53
2.1.1. Lipogenèse hormono-dépendante	53
2.1.2. Synthèse des acides gras, mise en jeu de différentes enzymes EM, FASN, ACC	55
2.2. Le devenir des lipides synthétisés par les hépatocytes	57
2.2.1. Le devenir des Acides Gras	57
2.2.2. Transport des triglycérides vers les tissus périphériques	59
2.2.3. Stockage des triglycérides associé à la stéatose chez les palmipèdes	61
3. Production et qualité du foie gras	63

3.1.	Réglementations et critères de qualité du foie gras _____	63
3.2.	Facteurs de variations du rendement technologique _____	65
3.2.1.	Conditions d'élevages et d'abattage _____	65
3.2.2.	Facteurs biochimiques _____	69
3.2.2.1.	Composition lipidique du foie gras _____	69
3.2.2.2.	Composition protéique _____	71
3.2.3.	Facteurs génétiques _____	71
4.	Conclusion _____	73
Deuxième partie _____		77
1.	QTL d'abondance de protéines (PQL ou pQTL) _____	77
1.1.	Les premiers pas. _____	77
1.2.	Essor du sujet de recherche _____	79
2.	Comparaison de méthodes de quantification et d'identification de protéines _____	81
2.1.	Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle _____	81
2.2.	Analyse protéomique par shotgun _____	83
2.3.	Comparaison des méthodes Electrophorèse bidimensionnelle et MudPIT. _____	85
3.	Conclusion _____	87
<i>PRE-REQUIS ET PRESENTATION DU DISPOSITIF _____</i>		91
1.	Description du dispositif expérimental _____	93
2.	Phénotypage _____	95
3.	Cartes génétiques _____	97
3.1.	Carte génétique de microsatellites (Figure 13) _____	97
3.2.	Carte génétique mixte alliant SNP et microsatellites (Figure 14) _____	97
4.	Détections de QTL phénotypiques _____	99
4.1.	Principes de la détection de QTL dans ce dispositif _____	99
4.2.	QTL liés à la qualité du foie gras _____	99
5.	Conclusion _____	101
<i>MATERIEL ET METHODES _____</i>		103

1. Analyse par protéomique _____	105
1.1. Electrophorèse Bidimensionnelle des protéines solubles du foie gras _____	105
1.1.1. Extraction et dosage des protéines _____	105
1.1.2. Première dimension - Isoélectrofocalisation _____	105
1.1.3. Seconde dimension – SDS-PAGE (Sodium DodecylSulfate-Polyacrylamide Gel of Electrophoresis) _____	107
1.1.4. Analyse d'image _____	109
1.1.5. Identification des spots d'intérêt _____	109
1.1.5.1. Digestion des protéines _____	109
1.1.5.2. Analyse Nano-LC-MS/MS _____	111
1.1.5.3. Recherche dans les bases de données et identification des protéines. _____	111
1.2. Analyse statistique _____	113
1.2.1. Normalisation des données _____	113
1.2.2. Analyses de variance – expressions différentielles _____	115
1.2.3. Régression – Expression différentielle _____	115
2. Détections de QTL et de pQTL _____	117
2.1. Détections de QTL uni-caractère _____	117
2.2. Détection de QTL multi-caractères _____	119
<i>OPTIMISATION DE LA POPULATION _____</i>	<i>121</i>
1. Etapes d'optimisation de la population de canes Backcross _____	123
2. Etapes d'optimisation de la population de canards mulards _____	125
<i>EXPRESSION DIFFERENTIELLE DE PROTEINES EN RELATION AVEC LES CARACTERES DE QUALITE DU FOIE GRAS _____</i>	<i>129</i>
1. Etude des niveaux d'expressions protéiques selon les classes de poids de foie, de taux de fonte, et de teneur en protéines et lipides. _____	131
1.1. Etude des niveaux d'expressions protéiques selon les classes de poids de foie, de taux de fonte et de teneur en protéines. _____	131
1.2. Complément de l'article : étude des niveaux d'expressions protéiques selon les classes de teneurs en lipides. _____	161
2. Etude des niveaux d'expressions protéiques selon un gradient linéaire de poids de foie, de taux de fonte et de teneur en protéines. _____	167
3. Conclusion _____	175

DETECTIONS DE QTL ET DE pQTL _____ 177

1. Détections de QTL phénotypiques pour les groupes de liaisons GL2c/APL02 et GL09/APL09 _____	179
1.1. Carte microsatellites des groupes de liaisons GL2c et GL09 _____	181
1.2. Carte mixte – groupe de liaisons APL02 _____	183
1.2.1. QTL uni-caractères _____	183
1.2.2. QTL phénotypiques multi-caractères _____	189
1.3. Carte mixte – groupe de liaisons APL09 _____	189
2. Détection de pQTL – Groupes de liaisons GL2c/APL02 et GL09/APL09 _____	193
2.1. Cartes microsatellites – Groupes de liaisons GL2c et GL09 _____	193
2.1.1. pQTL uni-caractère (GL2c et GL09) _____	193
2.1.2. QTL multi-caractères protéines/phénotypes (GL2c et GL09) _____	195
2.2. Carte mixte – Groupes de liaisons APL02 et APL09 _____	197
2.2.1. pQTL uni-caractères (APL02 et APL09) _____	197
2.2.2. QTL multi-caractères (APL02) _____	199
2.2.2.1. QTL multi-caractères protéines/protéines _____	199
2.2.2.2. QTL multi-caractères protéines/phénotypes _____	201
3. Détections de QTL/pQTL tous GL confondus – carte mixte _____	203
3.1. Détection des QTL phénotypiques et pQTL en uni-caractère _____	203
3.1.1. QTL phénotypiques _____	203
3.1.2. QTL de protéines _____	205
3.2. Détection de QTL multi-caractères _____	207
4. Bilan des détections de QTL et pQTL, uni- et multi-caractères. _____	221
5. Discussion _____	225

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES _____ 235

ANNEXE _____ 257

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____ 268

Liste des Publications

Article scientifique :

François, Y., Marie-Etancelin, C., Vignal, A., Viala, D., Davail, S., Molette, C., 2014. Mule Duck “Foie Gras” Shows Different Metabolic States According to Its Quality Phenotype by Using a Proteomic Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 7140–7150.

Communications :

François, Y., Marie Etancelin, C., Molette, C., Vignal, A., Davail, S. (2013). Optimisation d’une population expérimentale de canes communes (*Anas platyrhynchos*) et de leurs descendants mulards : utilisation de données de QTL. *10èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras* (p. 1-5). Poster.

François, Y., Marie Etancelin, C., Molette, C., Vignal, A., Davail, S. (2013). Identification of QTL of transcripts (eQTL) and of proteins (pQTL) on foie gras of mule ducks. *8th European Symposium on Poultry Genetic*, Venise, ITA (2013-09-25 - 2013-09-27). Poster

François, Y., Molette, C., Vignal, A., Davail, S., Marie-Etancelin, C., (2014). Detection Of Pleiotropic QTL Related To Protein Expression And Foie Gras Quality Traits. *10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*, Vancouver.

Vignal A., **François, Y.**, Molette, C., Marie-Etancelin, C. (2014) New duck genetic maps : a tool for QTL and proteinQTL (pQTL) detection. *34th International Society for Animal Genetics Conference*, Xi’an, China.

François, Y., Marie-Etancelin, C., Vignal, A., Viala, D., Davail, S., Molette, C. (2014) Mule duck « foie gras » show different metabolic states according to their quality phenotypes by using a proteomic approach. Comparison of two statistical methods. *Final Showcase Meeting of Farm Animal Proteomics*, Milan, Italie

Liste des abbréviations

2DE	Electrophorèse Bidimensionnelle
ACADS	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase
ACC	AcétylCoA carboxylase
AG	Acide Gras
AGMI	Acide Gras MonoInsaturé
AGPAT	1-AcylGlycerol 3-Phosphate O-AcylTransferase
afoie ou La	Indice de rouge
ALB	Albumine
AKR1A1	Aldo-keto reductase family 1 member A1
ALDH7A1	Aldehyde Dehydrogenase famille7 membre A1
ANX	Annexin (A2 ou A5)
APL	Chromosome du canard (<i>Anas Platyrhynchos</i>)
APO	Apolipoprotein
ATPB5	ATP Synthase
AX/CX/SCX	Anion eXchange/Cation eXchange/Strong Cation eXchange
BC	Backcross
bfoie ou Lb	Indice de jaune
CA2	Carbonic Anhydrase 2
CACT	Carnitine Acyl-Carnitine Translocase
CACNA1B	calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit
CCT7	Chaperonin containing TCP1 subunit 7
Clp	Calpaïne
Cts	Cathepsin
CPT	Carnitine Palmitoyl Transferase
CSMD2	CUB and Sushi multiple domains 2
DGAT	DiacylGlycerol AcylTransferase
DLAT	DihydroLipoamide AcetylTransferase
DSTN	Destrin
DTT	DiThioThréitol
EBF2	early B-cell factor 2

EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EEF2	Eukariotic Elongation Factor 2
EIF3I	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I
EM	Enzyme Malique
ENO1	alpha-enolase
ETFA	Electron transfert flavoprotein alpha
ETHE1	Persulfide dioxygenase ETHE1
ESD	S-formylglutathione hydrolase
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FASN	Fatty Acid Synthase
FATP	Fatty Acid Transport Protein
FBRSL1	Fibrosin-like 1
FKBP4	FK 506 Binding Protein 4
FRG1	protein FRG1
G6PDH	Glucose 6-Phosphate Déhydrogenase
GGA	Chromosome de la poule <i>Gallus Gallus</i>
GPAT	Glycerol 3-Phosphate Acyl Transferase
GS	Glutamine Synthase
HAAO	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase
HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha
HDL	High Density Lipoprotein
HIBCH	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase
HPLC	Chromatographie Liquide à haute performance
HSP	Heat Shock Protein
HYOU1	Hypoxia Up-regulated Protein1
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IEF	IsoElectroFocalisation
IGP	Indication Géographique Protégée
IMMT	Mitochondrial inner membrane protein-like

LC-MS/MS	Chromatographie Liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LDL	Low Density Lipoprotein
Lfoie ou LI	Luminance du foie
lipFoie	Teneur en lipides estimée sur foie frais
LMF1	Lipase Maturation Factor 1
LR	Label Rouge
MALDI-TOF	Matrix –Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight mass spectrometry
MDH1	Malate Dehydrogenase
MMP	Matrix Metalloproteinase
MTTP	Proteine Microsomale de Transfert des Triglycérides
MudPIT	Multi dimensional Protein Identification Technology
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NCAPH	non-SMC condensin I complex, subunit H
pfoie	Poids de foie
PARK7	DJ-1
PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3
PFN	Profilin
PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1
PHB	Prohibitin
PKN3	Proteine Kinase 3
PLIN	Perilipin
PRDX	Peroxiredoxin (3, 4 ou 6)
PRPS2	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2
PSMA1	Proteasome Subunit Alpha
protFoie	teneur en protéines estimée sur foie frais
QTL	Quantitative Trait Loci
pQTL/eQTL	protein Quantitative Trait Loci / Quantitative Trait Loci d'expression de transcrit
Rab GDP	GDP dissociation inhibitor beta
RE	Reticulum Endoplasmique
RPS12	Ribosomal Protein S12

SCD1	Stearoyl-CoA Desaturase Isoform 1
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel of Electrophoresis
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRRM4	Serine/arginine repetitive matrix protein 4
TAL	T-cell acute lymphocytic leukemia protein
TCP1	T-complex protein 1 subunit alpha
TG	Triglycéride
TPI	Triose Phosphate Isomerase
TTR	Transthyretin
txcoll	teneur en collagène
txfonte	taux de fonte
txlipF	teneur en lipides estimée sur foie sec
txprotF	teneur en proteïns estimée sur foie sec
VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
VCP	transitional endoplasmic reticulum ATPase
VLDL	Very Low Density Liporprotein
yrdC	N(6)-threonylcarbamoyltransferase domain containing

Liste des Figures

Figure 1: Phylogénie de la famille Anatidae de l'ordre des Anseriformes	46
Figure 2 : Régulation de la glycolyse et de la lipogenèse par l'insuline. D'après Saltiel and Kahn (2001)..	54
Figure 3 : Processus de la lipogenèse.	52
Figure 4 : Devenir des acides gras au sein des hépatocytes.	56
Figure 5 : Formation de VLDL pour le transport de TG vers les tissus périphériques.	58
Figure 6 : Différences d'aptitudes à la stéatose hépatique entre canard de Barbarie et canard Pékin selon les étapes métaboliques d'après Baéza et al. (2013)..	62
Figure 7 : Principe de la méthode d'électrophorèse bidimensionnelle.	80
Figure 8 : Alignement des gels 2DE puis obtention d'une carte du protéome de l'échantillon en question	82
Figure 9 : Principe de la chromatographie liquide MS/MS pour analyse protéomique. D'après Motoyama et Yates III, 2008.....	82
Figure 10 : Exemple de séparation multidimensionnelle. D'après Delahunty et Yates III, 2007. .	84
Figure 11 : Différence de résolution en réduisant l'éventail de pH utilisé pour séparer les protéines de 4-8 (gauche) à 5-6 (droite). D'après Rabilloud <i>et al.</i> (2010).....	86
Figure 12 : Dispositif de croisement en retour entre deux souches de canard commun.	92
Figure 13 : Carte génétique composée de 102 marqueurs microsatellites.	94
Figure 14 : Carte génétique mixte (en cM) alliant marqueurs microsatellites et SNP (27 groupes de liaisons).....	96
Figure 15 : Critères d'optimisation de la population	122
Figure 16 : Significativité atteinte par les QTL détecté à chaque étape d'optimisation.	122
Figure 17 : Seuils obtenus lors de 100 simulations de détection de QTL.	124
Figure 18 : Schéma récapitulatif des différents profils protéiques (de A à F) selon les classes phénotypiques des foies.	165
Figure 19 : Diagramme de Venn des 30 spots protéiques ayant un profil d'expression différentiel selon les caractères phénotypiques.....	166
Figure 20 : Répartition des spots protéiques mis en évidence par chaque méthode d'étude.	170

Figure 21 : Evolution des valeurs d'expression des HSP entre les différentes classes de taux de fonte.....	172
Figure 22 : Schéma récapitulatif des profils protéiques selon les classes phénotypiques des foies gras.	174
Figure 23 : Cartes des groupes de liaison GL2c et 09 de la carte microsatellite et des chromosomes APL02 et APL09 de la carte mixte.	178
Figure 24 : Courbes de vraisemblance des QTL identifiés sur GL2c de la carte microsatellites.	180
Figure 25 : Courbes de vraisemblances des QTL identifiés sur GL09 de la carte microsatellites.	182
Figure 26 : Carte génétique du groupe de liaison APL02 de la carte mixte et courbes de vraisemblances des QTL obtenus.....	184
Figure 27 : Courbes de vraisemblance obtenues sur APL09 de la carte mixte et carte du groupe de liaisons.....	190
Figure 28 : Courbes de vraisemblance des pQTL co-localisant sur APL02 et du pQTL multi-caractère associé.....	198
Figure 29 : Courbes de vraisemblance des QTL bi- et tri-caractères pléiotropiques identifiés sur APL02.	200
Figure 30 : Courbes de vraisemblance des pQTL uni- et bi-caractères obtenus sur APL04.....	208
Figure 31 : Courbes de vraisemblance des QTL uni- et bi-caractères relatifs à ENO1 et CCT7 sur APL15	210
Figure 32 : Courbes de vraisemblance des QTL uni- et bi-caractères identifiés sur APL16.	212
Figure 33 : Courbes de vraisemblances du pQTL uni-caractère, puis des QTL bi- et tri-caractères de APL16.....	213
Figure 34 : Courbes de vraisemblance des pQTL uni- et bi-caractères obtenus sur APL18.....	216
Figure 35 : Courbes de vraisemblance des QTL identifiés sur APL23.....	218
Figure 36 : Courbes de vraisemblance des pQTL identifiés sur APL23.....	220
Figure 37 : Premier essai de carte et de détections de QTL sur APL09.....	226

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Performances moyennes (\pm ET) et effet du génotype et du gavage sur le poids de foie et de gras abdominal de canards âgés de 14 semaines, gavés (G, n=8) ou non (T, n=8,).	50
Tableau 2 : Héritabilités (diagonale) et corrélations génétiques (au-dessus et en dessous de la diagonale) des caractères de qualité du foie gras.	72
Tableau 3 : Différences notables entre l'analyse par Electrophorèse bidimensionnelle ou par MudPIT	86
Tableau 4 : QTL phénotypiques liés aux caractères de qualité du foie gras mis en évidence pour le dispositif expérimental	98
Tableau 5 : Etapes de l'électrofocalisation	106
Tableau 6 : Répartition en quartiles des valeurs phénotypiques.	114
Tableau 7 : Evolution de la significativité des QTL entre l'étape 1 (7 familles) et l'étape 6 (dispositif optimisé).....	126
Tableau 8 : Répartition en quartiles des valeurs phénotypiques correspondant aux teneurs en lipides.	160
Tableau 9 : Abondance différentielle des protéines selon lipFoie.	160
Tableau 10 : Abondance différentielle des protéines selon txlipF.....	162
Tableau 11 : Protéines d'abondance différentielle selon lipFoie et txlipF.....	162
Tableau 12 : Liste des 22 spots identifiés comme protéine et mis en évidence par l'étude de l'expression protéique selon les teneurs en lipides.	164
Tableau 13 : Spots protéiques significativement corrélés à un seul caractère	168
Tableau 14 : Spots protéiques significativement corrélés à 2 ou 3 caractères simultanément. ...	168
Tableau 15 : Spots protéiques significativement corrélés simultanément à pfoie, txfonte, protFoie et txprotF.	170
Tableau 16 : Liste des spots identifiés et mis en évidence uniquement par la méthode de régression (n=10) / par l'ANOVA (n=4) comme différentiellement exprimés selon les valeurs phénotypiques.....	176
Tableau 17 : QTL identifiés sur les groupes de liaisons 2c et 09 de la carte de microsatellites ..	180
Tableau 18 : QTL identifiés sur le groupe de liaisons APL02 de la carte SNP-microsatellites ..	182

Tableau 19 : QTL phénotypiques multi-caractères aux positions des SNP057-SNP059 d'une part et SNP065 d'autre part	188
Tableau 20 : QTL identifiés sur le chromosome APL09 de la carte mixte (SNP-microsatellites)	188
Tableau 21 : pQTL identifiés sur les groupes de liaisons GL2c et GL09 de la carte microsatellites	192
Tableau 22 : QTL multi-caractères identifiés sur le groupe de liaison GL2c de la carte microsatellite.	194
Tableau 23 : QTL multi-caractères identifiés sur le groupe de liaison GL09 de la carte microsatellites.....	194
Tableau 24 : pQTL identifiés sur les chromosomes APL02 et APL09 de la carte mixte	196
Tableau 25 : QTL multi-caractères pléiotropiques identifiés sur APL02	200
Tableau 26 : QTL phénotypiques à au moins 5% CW identifiés sur l'ensemble des groupes de liaisons de la carte mixte à l'exception des GL02 et 09.....	202
Tableau 27 : QTL identifiés sur les groupes de liaison de la carte microsatellite par Kileh-Wais <i>et al.</i> (2012)	202
Tableau 28 : pQTL identifiés à au moins 1% CW sur groupes de liaisons APL01 à APL16 de la carte mixte à l'exception des APL 02 et 09.....	204
Tableau 29 : pQTL identifiés à au moins 1% CW sur groupes de liaisons APL18 à APLZ de la carte mixte.	206
Tableau 30 : QTL bi-caractères mis en évidence sur APL15 (carte mixte).....	208
Tableau 31 : QTL bi-caractères protéine/phénotypes identifiés sur APL15.....	210
Tableau 32 : pQTL bi-caractères identifiés sur APL18 pour chaque intervalle de confiance	214
Tableau 33 : QTL bi-caractères mis en évidence sur le APL23 (carte mixte).....	218
Tableau 34 : QTL bi-caractères protéine/phénotypes identifiés sur APL23.....	220
Tableau 35 : Gènes du génome de la poule présents sous les marqueurs des QTL majeurs	228
Tableau 36 : Liste des pQTL identifiés au moins à 5% CW sur l'ensemble des chromosomes..	259
Tableau 37 : Liste des spots identifiés et présentant des QTL à au moins 5% sur la carte microsatellite (1) et à au moins 1% CW sur la carte mixte (2)..	265



INTRODUCTION

La France est le premier producteur de foie gras mondial avec plus de 19000 T produites en 2012 (Comité Interprofessionnel du Foie Gras, 2013), représentant 72% de la production mondiale. Ce produit traditionnel français provient à 97% de canards, les 3% restant provenant des oies. Le foie gras de canard, traditionnellement issu du gavage de canards de Barbarie (*Cairina Moschata*), est aujourd'hui issu à 95 % du gavage de canards mulards. Ce canard mulard utilisé pour la production de foie gras est un mâle stérile et hybride, provenant d'un croisement entre une femelle de souche commune (*Anas Platyrhynchos*) et un mâle de Barbarie.

Le foie gras est un produit riche en lipides, ce qui lui confère ses qualités organoleptiques et permet sa valorisation. La perte de ces lipides lors de la cuisson est alors un problème majeur à la fois pour les transformateurs mais aussi pour le consommateur. Le taux de fonte, mesuré par le pourcentage de graisse perdue à la cuisson par rapport au poids du foie, est le principal critère de qualité du foie gras. Il est réglementé et ne doit pas dépasser 30% du produit fini (Décret n°93-999 du 9 août 1993, relatif aux préparations à base de foie gras). L'amélioration de ce taux de fonte est devenue un des principaux objectifs des industries. Celui-ci est en effet variable selon les foies, même au sein d'une même gamme de poids. Par ailleurs, l'exsudation des graisses se voit dans les produits commercialisés et peut nuire à leur consommation ; l'homogénéisation de l'exsudation dans les produits finis serait alors profitable.

La variabilité des facteurs de qualité du foie gras a tout d'abord été étudiée au travers de différents aspects techniques comme l'alimentation (Latil *et al.* 1996), la préparation au gavage (Babilé *et al.* 1993), la durée de jeûne avant abattage ou encore l'itinéraire post-mortem des foies (Rousselot-Pailley *et al.* 1992). Plus récemment, la variabilité de ces facteurs de qualité a été étudiée au travers de la composition biochimique des foies. Aucun lien n'a pu être démontré entre le taux de fonte et la composition lipidique des foies (Molee *et al.* 2005). D'un point de vue protéomique, en revanche, Théron *et al.* (2011) ont montré des différences d'abondance de protéines entre des foies à fonte faible et des foies à fonte élevée pour une même gamme de poids de foie et de teneur en lipides, mettant par ailleurs en évidence différents processus métaboliques. D'un point de vue génétique, des détections de QTL relatifs à différents caractères de qualité du foie gras ont été entreprises par Kileh-Wais *et al.* (2013) mettant en évidence 17 QTL relatifs au poids de foie, au taux de fonte, aux teneurs en protéines, lipides ou collagène ou encore relatifs aux indices de rouge, de jaune ou à la luminance.

L'objectif de cette étude est de comprendre comment l'expression du génome influence les caractères de qualité du foie gras et de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents par l'étude des protéines contenues dans ces foies. Dans ce but, le dispositif expérimental issu du programme ANR « GeneCan » et utilisé par Kileh-Wais *et al.* (2013) a été repris et optimisé et en plus des caractères phénotypiques déjà mesurés, les protéines solubles hépatiques des animaux retenus ont été extraites, quantifiées et identifiées.

La première approche suivie a pour objectif de comprendre les mécanismes métaboliques responsables de la variabilité des caractères de qualité du foie gras en identifiant les protéines présentant des profils d'expression différents selon le phénotype (poids, taux de fonte, teneur en protéines...) des foies ainsi que les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées. Contrairement à l'étude de Théron *et al.* (2011), nous ne nous sommes pas restreints à une gamme de poids ou de teneur en lipides.

La seconde et principale approche a pour objectif d'identifier des loci responsables des variations phénotypiques et des variations d'abondance protéique par détectons de QTL phénotypiques et de QTL de protéines (pQTL). Parallèlement à ce travail, une nouvelle carte génétique composée de marqueurs SNP et microsatellites a été construite. Les détectons de QTL pour les caractères de qualité du foie et pour les protéines solubles ont été effectuées sur le génome des canes backcross à partir des performances de leurs fils mulards, en uni-caractère puis en multicaractères afin d'identifier des liens entre les phénotypes et les protéines aux loci correspondants.

Les deux approches de cette étude nous permettront ainsi de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les caractères de qualité des foies, mais également d'identifier des loci et/ou protéines impliqué(es) dans la variabilité de ces caractères. Suite à l'étude bibliographique détaillant les processus moléculaires de la stéatose et les facteurs de variation du taux de fonte, un chapitre de pré-requis est proposé pour présenter le dispositif expérimental initial ainsi que les résultats antécédents à cette étude. L'optimisation du dispositif expérimental est décrite dans un chapitre en préambule des résultats, puis ceux-ci sont détaillés dans deux chapitres correspondant aux deux approches étudiées.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

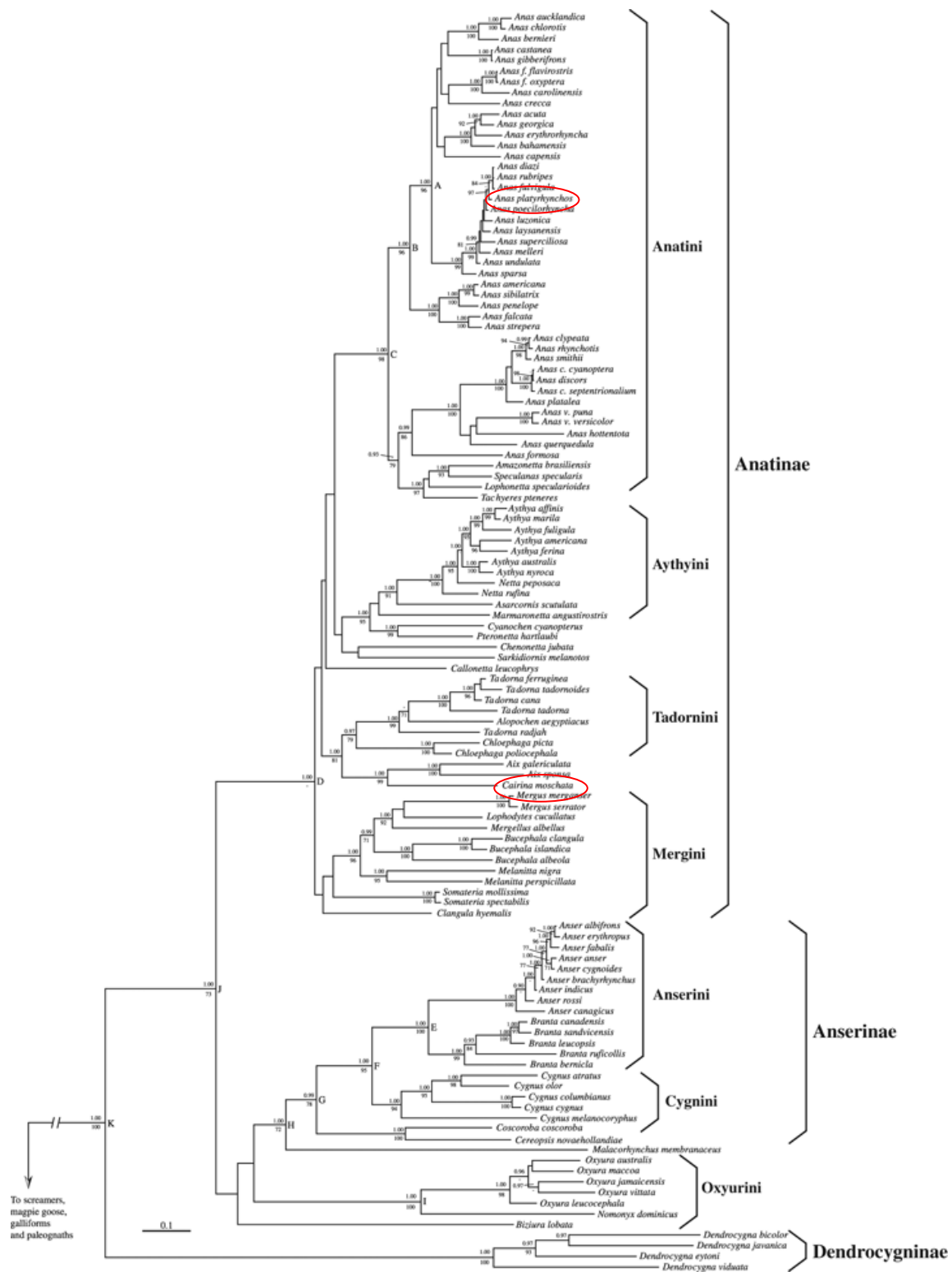


Figure 1: Phylogénie de la famille Anatidae de l'ordre des Anseriformes
 D'après Gonzalez *et al.* 2009, *Journal of Zoology*
 Volume 279, Issue 3, pages 310-318, 12 AUG 2009 DOI: 10.1111/j.1469-7998.2009.00622.x
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-7998.2009.00622.x/full#f1>

Première partie

1. Histoire du canard

1.1. Phylogénie –taxonomie

Les palmipèdes, canards, oies et cygnes, appartiennent à la famille des Anatidae de l'ordre des Anseriformes. Au sein de cette famille, les canards forment un taxon à part entière, la sous-famille des Anatinae, au même titre que les oies et cygnes formant la sous-famille des Anserinae (Gonzalez *et al.* 2009, **Figure 1**). Au sein de la sous-famille des Anatinae, les canards se répartissent en tribus. Ainsi, la plupart des canards domestiques appartient à la tribu des Anatini et descend du canard « mallard » plus communément appelé canard colvert (genre : *Anas*, espèce : *Platyrynchos*). Les canards de Barbarie, eux aussi domestiqués, n'appartiennent pas au genre *Anas*, mais sont issus de la tribu des Cairinini (genre : *Cairina*, espèce : *Moschata*). Si les deux genres sont nommés « canards », la divergence entre les deux espèces serait estimée à 13,5 Millions d'années (Ma) (www.timetree.org) soit une distance plus importante que celle existant entre l'homme (*Homo*) et le chimpanzé (*Pan*) et qui est estimée à 6,1 Ma.

1.2. Les canards communs

Les canards communs sont issus du canard colvert (*Anas Platyrynchos*) dont il existe 7 sous-espèces. Ils vivent dans des zones humides, aux abords de lacs et de cours d'eau et sont retrouvés dans tout l'hémisphère nord. Les canards communs auraient été domestiqués depuis plus de 4000 ans en Chine. Ils sont aujourd'hui élevés pour la production de viande et d'œufs et des différenciations ont été menées entre les souches à viande (Pékin, Rouen, Aylesbury) et les souches pondeuses (Coureur Indien, Khaki Campbell, Tsaiya, Shao-Xing...).

Selon la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture), la Chine est le premier pays producteur de canards avec 69% de la production de viande de canard mondiale en 2012 (plus de 2,9 M de tonnes). Le canard Pékin est le plus populaire pour la production de viande, notamment en raison de sa croissance rapide, du développement de ses plumes et de sa capacité d'engraissement des tissus périphériques. Il a été importé aux Etats-Unis et au Royaume-Uni avant d'arriver en Europe continentale au début du XXe siècle. Aujourd'hui

les sélectionneurs ont créé des lignées d'aptitudes différentes : les lignées paternelles d'une part, sélectionnées pour la vitesse de croissance et les lignées maternelles d'autre part, sélectionnées pour leurs capacités de reproduction.

La France est le deuxième pays producteur et consommateur de canards dans le monde avec 6,9% de la production mondiale (FAO – 2012). Cependant, peu de types de canards sont utilisés : le canard Rouen, dont la production est anecdotique, est traditionnellement utilisé pour sa viande contrairement au canard Pékin qui n'est pas élevé pour sa viande comme en Chine ou en Allemagne, mais pour ses capacités de reproduction. Les canes Pékins sont les mères des canards mulards et sont généralement des canes issues de croisement entre des lignées sélectionnées pour le poids corporel et pour la production d'œufs respectivement.

1.3. Le canard de Barbarie

Les canards de Barbarie sont originaires des forêts humides d'Amérique centrale et du nord de l'Amérique du Sud. Ils ont été domestiqués durant la période pré-colombienne et ont été introduits en Europe par les espagnols. Ils vivent dans les marais, lagons et rivières de basse altitude à proximité de forêts pour se percher la nuit. Ils sont dociles et facilement adaptables à différents environnements, notamment aux climats chauds.

Dans le nord de la France, le canard de Barbarie était traditionnellement utilisé comme canard à rôtir, tandis que dans le sud du pays, il était plutôt utilisé pour la production de foie gras et de magret, en raison de sa viande très goûteuse, moins grasse et avec moins d'épaisseur de peau que celle des canards Pékins. Aujourd'hui, seulement 5% de la production de foie gras de canard provient du canard de Barbarie. Celui-ci est principalement élevé pour la production de viande maigre : du fait du fort dimorphisme sexuel, les mâles pour les morceaux de découpe et les femelles pour la vente de carcasses entières. Les canards de Barbarie sont également utilisés comme père des canards mulards pour la production de foie gras.

1.4. Le canard mulard

Le canard mulard est un animal hybride issu du croisement entre 2 genres de canards : un mâle de Barbarie (*Cairina Moschata*) et une femelle commune (*Anas Platyrhynchos*), généralement

Tableau 1 : Performances moyennes (\pm ET) et effet du génotype et du gavage sur le poids de foie et de gras abdominal de canards âgés de 14 semaines, gavés (G, n=8) ou non (T, n=8). D'après Chartrin *et al.* 2003.

Génotypes		Barbarie	Mulard	Pékin	Effet du génotype	Effet du gavage	Interaction
Poids vif (g)	G	6393 \pm 441	6473 \pm 351	5999 \pm 353	***	***	**
	T	5418 \pm 245	4455 \pm 392	4623 \pm 426			
Foie (g)	G	467 \pm 90	494 \pm 97	318 \pm 75	***	***	***
	T	77 \pm 7	61 \pm 13	56 \pm 11			
Gras abdominal (g)	G	220 \pm 23	224 \pm 42	265 \pm 22	***	***	ns
	T	109 \pm 20	73 \pm 35	155 \pm 29			

, * : Effet significatif à $p < 0,01$, $0,001$ respectivement ; ns : non-significatif

Pékin. De ce fait, le mulard est un individu stérile dont le maintien nécessite celui des deux espèces parentales. Les techniques d'insémination artificielle ont permis la popularisation de l'élevage de canards mulards. En France, il est principalement élevé pour la production de foie gras – la carcasse étant valorisée grâce aux magrets et aux cuisses – et est aujourd'hui à l'origine de 95 % de la production de foie gras de canard. Tous les mulards, mâles et femelles, peuvent être gavés. En France, cependant, seuls les mâles le sont (NB : ce critère est requis par le cahier des charges de l'IGP – indication géographique protégée), les femelles pouvant être tout de même être utilisées pour leur chair. Le canard mulard est reconnu pour la qualité de ses foies gras, son aptitude au gavage et sa résistance aux maladies et à des conditions climatiques variées. Il présente une meilleure aptitude au gavage que son meilleur parent : il bénéficie d'un effet d'hétérosis, la complémentarité entre les effets génétiques favorables du mâle Barbarie et les effets maternels favorables de la cane Pékin, notamment pour des caractères tels que le poids de foie ou le gain de poids en gavage (Brun *et al.* 2005).

Le croisement réciproque, un mâle Pékin avec une cane de Barbarie, produit des canards appelés Henny. Ces canards sont également aptes à produire du foie gras, mais leurs performances sont plus proches de celles du canard de Barbarie que de celles du mulard (Larzul *et al.* 2006). De plus, la cane de Barbarie a des capacités de ponte plus faibles que la cane Pékin (90 à 105 œufs par an contre près de 300 pour la cane Pékin). Si le taux de fertilité est légèrement plus faible dans le cadre d'un croisement mâle Pékin x femelle Barbarie (45,9%) que dans le cadre du croisement mâle Barbarie x femelle Pékin (47,8%), le pourcentage d'inséminations fructueuses est estimé à 45,8% dans le premier cas contre 72% dans le second (Brun *et al.* 1999).

1.5. Les différences d'aptitude à la production de foie gras entre génotypes

Chez les palmipèdes migrateurs, la stéatose est un moyen naturel et réversible (Hermier *et al.* 1999) de constituer les réserves d'énergie en vue des grandes migrations (Odum *et al.* 1960). Cette capacité de stockage est exploitée depuis 2500 avant J.C. : les égyptiens engraisaient les oies pour nourrir la population. Cependant, tous les palmipèdes ne sont pas aptes à produire du foie gras. Des comparaisons de cette capacité ont été entreprises entre le canard de Barbarie, le canard Pékin et le canard mulard (Baéza *et al.* 2005). Ainsi, lors du gavage, pour une même quantité d'aliment consommée, les canards de Barbarie et les mulards développent un foie plus lourd que le canard Pékin (Tableau 1). Les mulards développent également un foie plus lourd que les canards de Barbarie lorsque ceux-ci sont nourris selon leurs capacités maximales d'ingestion. En

revanche, le canard Pékin présente un engraissement périphérique plus prononcé que les canards mulards et de Barbarie, le canard mulard ayant un engraissement intermédiaire. Ces performances zootechniques résulteraient d'une capacité supérieure des canards de Barbarie et mulards à synthétiser et stocker les lipides dans le foie (Saez *et al.* 2009) ainsi qu'à celle des canards Pékins à exporter les lipides (Saez *et al.* 2012).

2. Métabolisme de la stéatose hépatique

La stéatose hépatique se caractérise par une accumulation des graisses dans le foie, sous forme de triglycérides (TG). Elle résulte d'un déséquilibre entre la synthèse des TG au sein des hépatocytes et leur exportation vers les tissus périphériques. Chez les mammifères comme l'Homme, le stockage des graisses se fait habituellement dans les tissus périphériques. La stéatose hépatique, appelée NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease), correspond alors à un dysfonctionnement du foie pouvant être associé à des maladies métaboliques telles que l'obésité ou la résistance à l'insuline. En revanche chez les oiseaux comme chez les mammifères, le foie est le principal site de la lipogenèse, leur capacité à synthétiser les lipides étant très limitée dans les tissus périphériques. Les triglycérides peuvent provenir des lipides présents dans l'alimentation, mais également d'une lipogenèse *de novo* stimulée par l'apport en glucides issus de l'alimentation, ce qui est le cas lors de la stéatose.

2.1. La lipogenèse *de novo* stimulée par alimentation

Lipogenèse hormono-dépendante

Les palmipèdes et notamment les canards sont principalement nourris avec du maïs, que ce soit lors de la phase d'élevage ou dans la phase de gavage. Le maïs est composé à 60% d'amidon, un glucide complexe hydrolysé en glucose par les enzymes intestinales. L'apport de glucose par l'alimentation stimule alors la lipogenèse *de novo* par le biais d'hormones pancréatiques. En effet, la lipogenèse *de novo* est un processus hormono-dépendant régulé par l'insuline et le glucagon, tous deux sécrétés par le pancréas (Goodridge, 1987). Lors d'un repas, l'apport de glucose

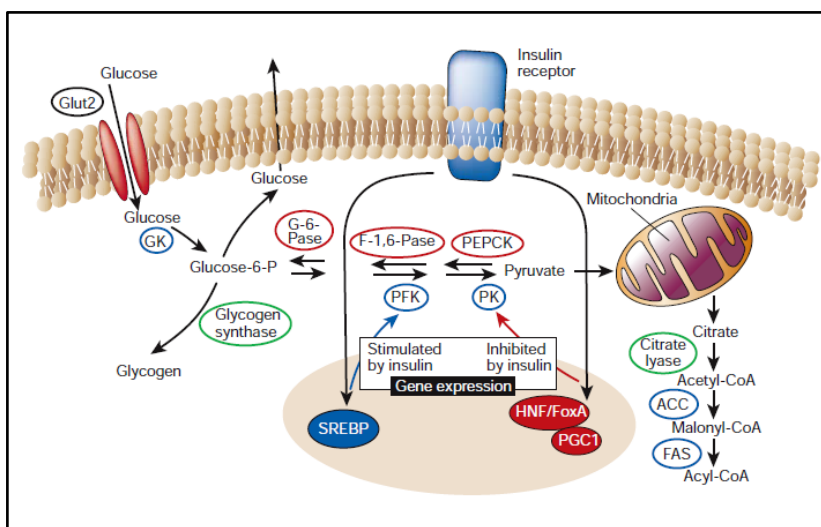


Figure 2 : Régulation de la glycolyse et de la lipogénèse par l’insuline. D’après Saltiel and Kahn (2001). Les enzymes dont l’expression du gène codant est stimulée/inhibée par l’insuline sont entourées en bleu/rouge, respectivement. Les hormones régulatrices sont entourées en vert.

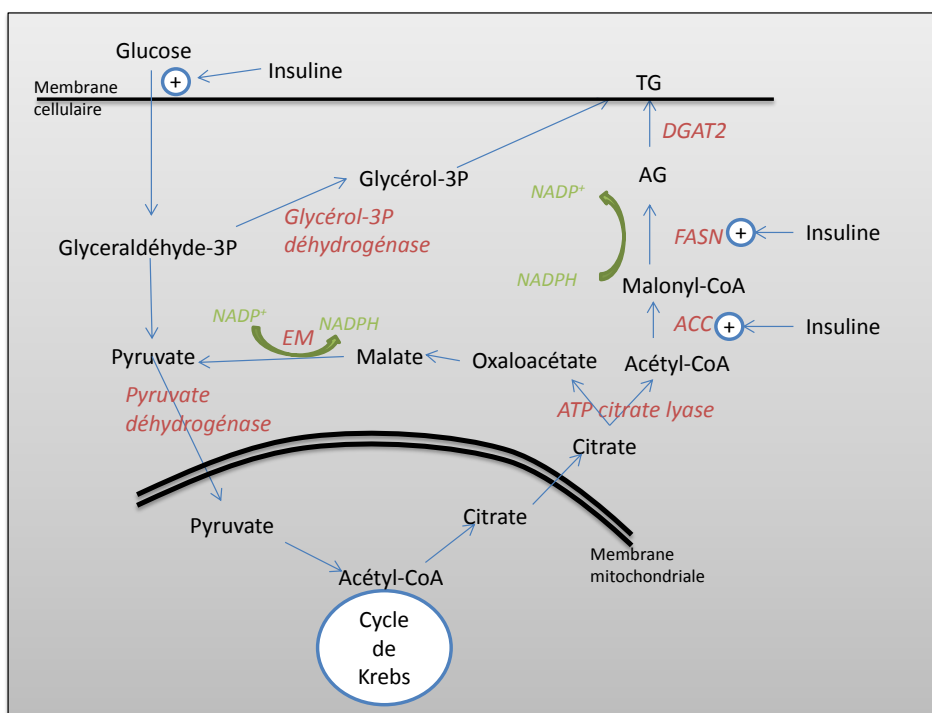


Figure 3 : Processus de la lipogénèse. Les enzymes sont renseignées en rouge, les métabolites intermédiaires sont en noir. EM = Enzyme malique, 3P = 3 phosphate ; ACC = Acétyl CoA Carboxylase ; FASN = Fatty Acid Synthase ; DGAT2 = Diglycerol acétyl transférase 2 ; AG = Acide Gras ; TG = Triglycéride. L’insuline active l’ACC et la FASN ainsi que l’entrée du glucose dans la cellule.

augmente la glycémie. L'insuline va alors la réguler en stimulant la lipogenèse et le surplus de glucose est alors stocké sous forme de triglycérides. Entre deux repas, ou même lors d'un jeûne, la glycémie diminue. Le glucagon est alors sécrété et prend le relais de l'insuline. Il a pour rôle d'inhiber la lipogenèse et de favoriser la glycogénolyse *i.e.* la synthèse de glucose à partir des réserves énergétiques du foie. Ainsi, de nombreuses enzymes des processus glycolytiques et lipogéniques sont régulées par l'insuline (**Figure 2** – Saltiel and Kahn, 2001). Les enzymes Glucokinase, Phosphofructokinase de la glycolyse ou encore Acétyl-CoA carboxylase, Fatty acid synthase de la lipogenèse sont ainsi activées par l'insuline alors que les enzymes de la glucogénolyse comme la Glucose-6- phosphatase sont inhibées.

Synthèse des acides gras, mise en jeux de différentes enzymes EM, FASN, ACC

Suite à la glycolyse, le pyruvate synthétisé est transféré dans la mitochondrie afin d'initier le cycle de Krebs et de fournir la cellule en énergie (**Figure 3**). Le citrate mitochondrial peut alors soit prendre part au cycle de Krebs, soit être transféré vers le cytoplasme. Ce transfert est suivi d'une scission en oxaloacétate et en acétyl-CoA par la citrate lyase. D'un côté, l'oxaloacétate sera transformé successivement en malate par la malate déshydrogénase puis en pyruvate par l'enzyme malique (EM). Ce pyruvate cytoplasmique est ensuite transféré dans la mitochondrie pour alimenter le cycle de Krebs. D'un autre côté, l'acétyl-CoA initie le processus de synthèse des Acides Gras (**AG**).

L'acétyl-CoA est un métabolite clé de la lipogenèse ; son utilisation pour la synthèse de malonyl-CoA par l'action de l'Acétyl-CoA Carboxylase (**ACC**) est prépondérante. L'ACC régule donc la lipogenèse : son activité augmente lors du gavage (Baéza *et al.* 2013) et est d'autant plus importante que l'aptitude de l'animal à la stéatose est grande. Chartrin *et al.* (2006) ont ainsi montré que le canard de Barbarie, plus apte à la stéatose que le canard Pékin, présente une activité de l'ACC plus importante, suggérant une lipogenèse plus intense. L'activité lipogénique peut être caractérisée par l'activité de l'enzyme malique (**EM**). La réaction enzymatique transforme le malate en pyruvate et permet également la production du cofacteur NADPH nécessaire à la lipogenèse car utilisé lors de la formation des acides gras. Si l'activité de l'EM est plus importante

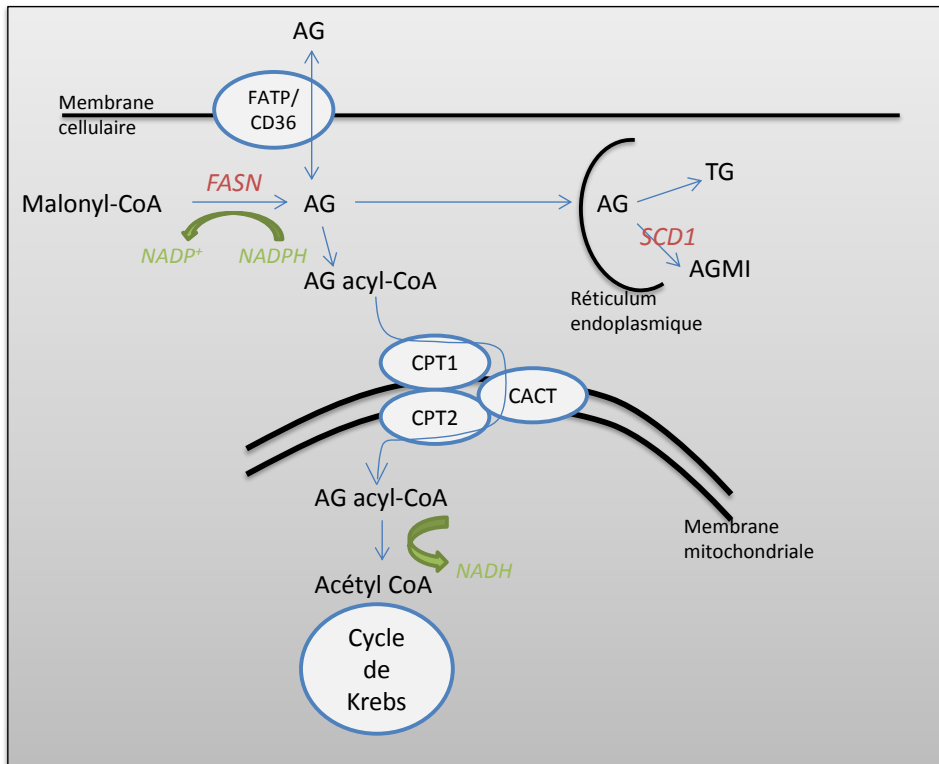


Figure 4 : Devenir des acides gras au sein des hépatocytes. Les enzymes sont renseignées en rouge, les métabolites intermédiaires sont en noir. AG : Acide Gras ; FASN : Fatty Acid Synthase ; SCD1 : Stéaroyl-CoA Desaturase isoforme 1 ; FATP : Fatty Acid Transport Protein ; TG : Triglycéride ; AGMI : Acide Gras MonoInsaturé ; CPT : Carnitine Palmitoyl Transferase ; CACT : Carnitine Acyl-Carnitine Translocase

chez les oiseaux que chez les mammifères (Iritani *et al.* 1984), des études ont montré une activité plus importante chez les animaux gavés (Chartrin *et al.* 2006) que chez les animaux non gavés.

La Fatty Acid Synthase (**FASN**) permet la synthèse des acides gras (**AG**) à partir du malonyl-CoA. De la même manière que l'ACC, cette enzyme a une activité qui augmente lors du gavage et qui est plus élevée chez le canard de Barbarie que chez le canard Pékin (Baéza *et al.* 2005). De plus, le gène codant pour cette enzyme est surexprimé chez les lignées « grasses » de poulets (Bourneuf *et al.* 2006) et de la même manière que l'enzyme, le niveau d'expression du gène augmente avec le gavage (Hérault *et al.* 2010), soulignant l'activité lipogénique intense des foies au cours du gavage.

2.2. Le devenir des lipides synthétisés par les hépatocytes

Le devenir des Acides Gras

Les AG synthétisés par les cellules hépatiques peuvent ensuite être transformés, transportés vers d'autres tissus, oxydés ou encore estérifiés. La Stéaroyl-CoA Desaturase isoform 1 (**SCD1**) catalyse les AG en acides gras monoinsaturés (**AGMI**). Cette transformation se fait au niveau du réticulum endoplasmique et les AGMI en résultant serviront ensuite à la synthèse des TG dont ils sont les composants principaux (**Figure 4**). En 1992, Douaire *et al.* ont montré une corrélation positive entre le taux hépatique de SCD1 et l'adiposité des poulets. Par ailleurs, d'autres études ont montré que l'insuline ou un régime riche en carbohydrates pouvait réguler l'expression du gène *SCD1* (Waters et Ntambi, 1994). *SCD1* semble un gène important pour la capacité à l'engraissement. En effet, il a été identifié comme surexprimé dans des foies de poulets « gras » par rapport à des foies de poulets maigres (Bourneuf *et al.* 2006). Chez les canards et les oies, *SCD1* est surexprimé sous l'effet du gavage (Hérault *et al.* 2010, Zhu *et al.* 2011). Hérault *et al.* (2010) montrent par ailleurs une expression plus élevée de *SCD1* chez le canard Pékin que chez le canard de Barbarie, contrairement à la *FASN*, suggérant que cette différence explique les différences d'aptitude au gavage entre les deux espèces.

Les AG libres peuvent être pris en charge par différents transporteurs au sein des cellules hépatiques. La Fatty Acid Binding Protein 1 (**FABP1**), forme hépatique de la FABP, lie les AG pour les transporter au sein de la cellule entre les différents compartiments cellulaires. CD36, aussi

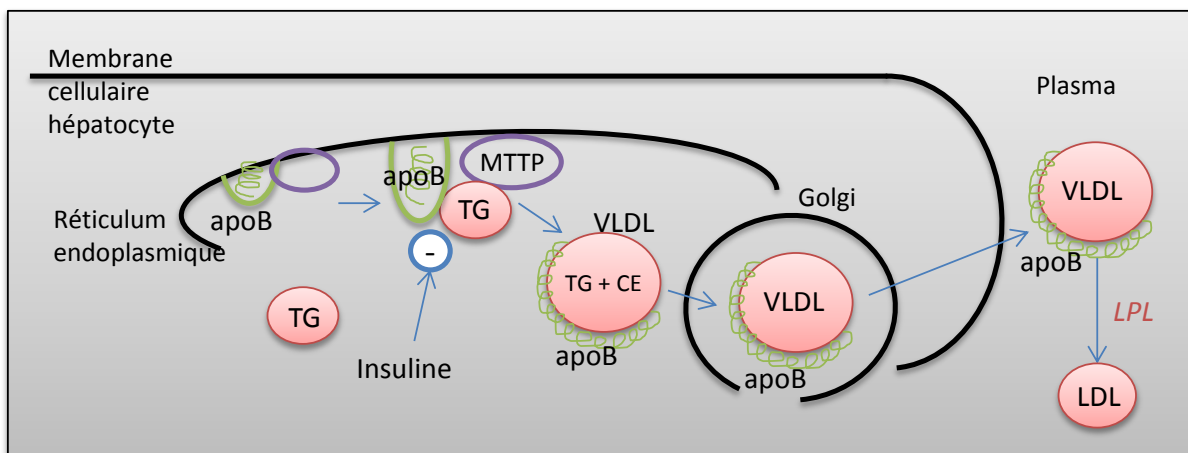


Figure 5 : Formation de VLDL pour le transport de TG vers les tissus périphériques. APOB : Apolipoprotéine B représentée en vert, TG : Triglycéride ; MTPP : Protéine de Transfert des TG ; CE : Ester de Cholestérol ; VLDL : Very Low Density lipoprotein ; LPL : Lipoprotéine Lipase

appelé Fatty Acid Transport Protein (**FATP**), est un transporteur membranaire capable de lier les AG et semblerait permettre la diffusion des AG hors de la cellule (Hajri et Abumrad, 2002), cependant, la diffusion des lipides sous forme d'AG n'est pas la principale forme de prise en charge des AG.

Les AG des hépatocytes peuvent être oxydés au sein de la mitochondrie dans le but de produire de l'énergie. Si les AG à courte chaîne carbonée peuvent entrer passivement au sein de la mitochondrie, les AG à longue chaîne carbonée doivent être transformés en AG acyl-CoA puis pris en charge par un complexe enzymatique (**Figure 4**). La prise en charge successive par la Carnitine Palmitoyl Transferase 1 (**CPT1**), la Carnitine Acyl-Carnitine Translocase (**CACT**) puis par la Carnitine Palmitoyl Transferase 2 (**CPT2**) permet ainsi aux AG de franchir les membranes mitochondriales. La beta-oxydation génère alors de l'acétyl-CoA et du NADH qui seront utilisés dans le cycle de Krebs pour produire de l'énergie.

Une autre prise en charge des AG au sein des hépatocytes est l'estérification. Celle-ci est réalisée par 3 enzymes qui interviennent de façon successive : la glycerol-3-phosphate acyltransferase (**GPAT**), la 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase (**AGPAT**) et la diacylglycerol acyltransferase (**DGAT**). Par la création d'une liaison ester entre un alcool et un AG, ces réactions permettent la formation de TG qui constituent la majorité des lipides stockés lors de la stéatose (>95%, Fernandez *et al.* 2011).

Transport des triglycérides vers les tissus périphériques

Les TG synthétisés dans le foie par la lipogenèse peuvent soit être stockés au sein même du foie ou exportés vers les tissus périphériques. L'exportation des TG se fait via la formation de Very Low Density Lipoprotein (**VLDL**).

Une fois les acides gras estérifiés en TG, ceux-ci sont pris en charge par la Protéine Microsomale de Transfert des TG (**MTTP**) au sein du réticulum endoplasmique (**RE, Figure 5**). C'est une protéine composée de deux sous-unités localisée dans la lumière du RE. Elle a pour fonction de transporter essentiellement les molécules hydrophobes (TG et EC) jusqu'au site d'assemblage des lipoprotéines. Différentes fonctions de MTTP ont été rapportées par Hussain *et al.* (2012) montrant notamment que le knockout de MTTP ou une déficience en MTTP augmentait la concentration en TG et en cholestérol des foies. La formation des VLDL met en jeu

l'apolipoprotéine B (**apoB**), une protéine constitutive de l'enveloppe hydrophile des lipoprotéines. C'est la protéine majoritaire de la structure des VLDL. La protéine en cours de synthèse est associée à la membrane du RE afin de permettre une translocation protégée des protéases. Une fois dans la lumière du RE, elle est immédiatement liée par les TG apportés par MTTP ainsi que par les autres composants pour donner naissance aux VLDL. ApoB est synthétisée en excès pour répondre aux besoins de sécrétion des VLDL, d'autant que la quantité de VLDL sécrétés dépend de la quantité de protéines échappant à la dégradation. Différentes études ont ainsi montré le rôle prépondérant de la régulation de la protéine apoB pour la formation des VLDL notamment par l'insuline (Haas *et al.* 2013). L'insuline favoriserait, selon eux, la dégradation d'apoB au travers de différents mécanismes. Une des raisons de la dégradation d'apoB peut-être une trop faible quantité de TG apporté par MTTP. Cela provoquerait une mauvaise conformation d'apoB dans la lumière du RE et donc sa dégradation.

La sécrétion de TG hors des hépatocytes est donc régulée par la disponibilité d'apoB sous l'influence de l'insuline qui semble être un régulateur important. Les VLDL, une fois formées au sein du RE puis de l'appareil de Golgi, sont ensuite exportées dans le plasma où elles sont hydrolysées par la lipoprotéine lipase. Les VLDL sont ainsi dégradés en IDL (Intermediate Density Lipoprotein) puis en LDL (Low Density Lipoprotein) par la lipase hépatique sécrétée par le foie. Ces LDL et les AG les composant peuvent alors être captés par les tissus périphériques et les hépatocytes.

Stockage des triglycérides associé à la stéatose chez les palmipèdes

Chez les palmipèdes, la stéatose se traduit par une accumulation des TG au sein même des hépatocytes. L'alimentation riche en glucides apportée par le gavage stimule fortement la lipogénèse *de novo*. Le stockage des TG dans le foie résulte alors d'un déséquilibre entre les capacités de synthèse des TG par les hépatocytes et les capacités d'exportation de ces TG ainsi que de celles de captage des tissus périphériques. Les différences de capacité à produire du foie gras entre les différents génotypes s'explique ainsi au niveau moléculaire. Diverses études comparant des canards Pékins et des canards de Barbarie ont ainsi montré une activité de lipogénèse et de stockage plus importante chez le Barbarie que chez le canard Pékin. D'un point de vue enzymatique, Chartrin *et al.* (2006) ont montré une activité de l'enzyme ACC plus importante dans les foies des canards de Barbarie gavés que dans ceux des canards Pékins gavés

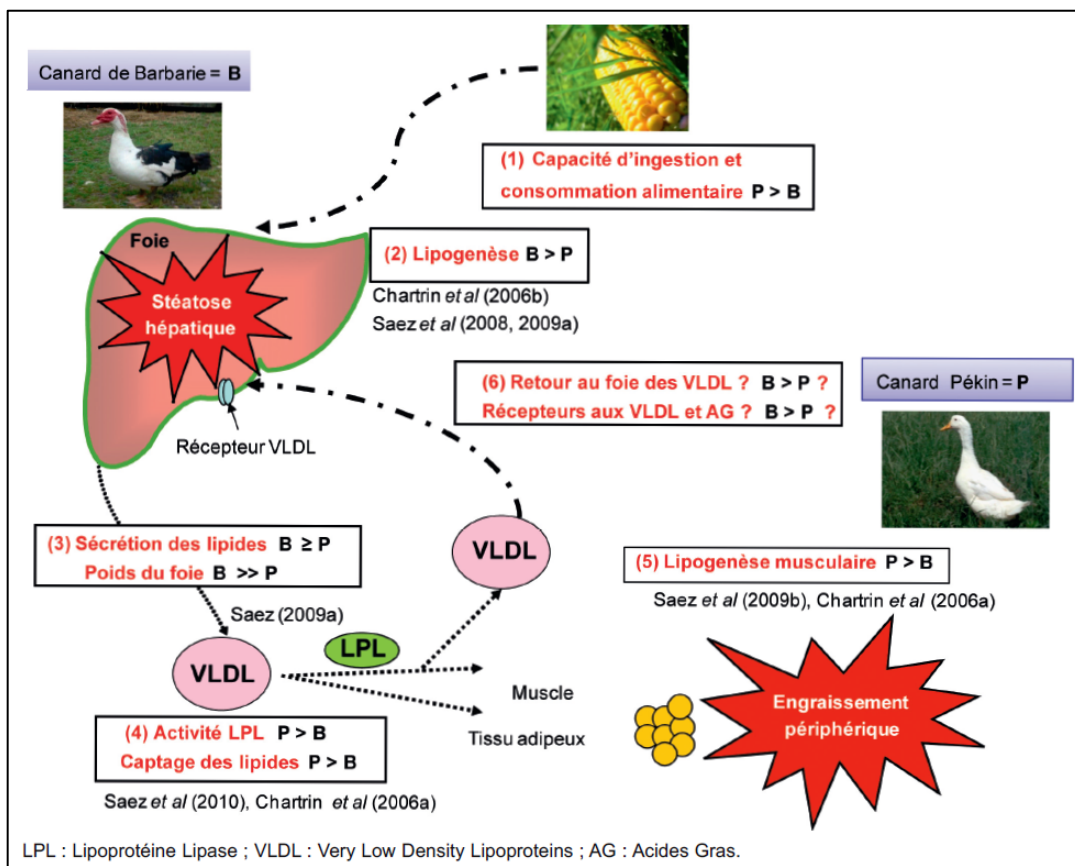


Figure 6 : Différences d'aptitudes à la stéatose hépatique entre canard de Barbarie et canard Pékin selon les étapes métaboliques d'après Baéza et al. (2013).

(2,24 nmol/mg de protéine contre 0,82), le mulard présentant une activité intermédiaire. En revanche, G6PDH et EM présentent une activité plus faible chez le canard de Barbarie que chez le canard Pékin. Hérault *et al.* (2010) ont par ailleurs montré des différences d'expression de certains gènes : la *FASN*, impliquée dans la synthèse des lipides, est plus exprimée chez le canard de Barbarie que chez le canard Pékin alors que d'autres gènes comme *SCD1*, *DGAT2*, *apoB* ou *CPT1A*, impliqués dans l'exportation des TG sont moins exprimés chez le canard de Barbarie que chez le canard Pékin. Ainsi, malgré une sécrétion de VLDL hépatiques plus importante chez le canard de Barbarie que chez le canard Pékin, celle-ci semble insuffisante pour équilibrer la balance stockage/exportation (Saez *et al.* 2008). Ces résultats ont été résumés par Baéza et al. (2013 –**Figure 6**).

3. Production et qualité du foie gras

3.1. Réglementations et critères de qualité du foie gras

En France, le foie gras est un produit traditionnel faisant partie du patrimoine culturel et gastronomique français depuis 2006 (Loi n°2006-11 du 5 janvier 2006 d'orientation agricole ajoutée à l'article L654-27-1 du code rural français). L'appellation des produits issus du foie gras est réglementée par la législation française (Décret n°93-999 du 9 août 1993, relatif aux préparations à base de foie gras). Ainsi, seuls 3 produits bénéficient de l'appellation foie gras :

- Le foie gras entier d'oie ou de canard est un produit composé d'un foie gras entier ou d'un ou plusieurs lobes de foie gras ainsi que d'un assaisonnement.
- Le foie gras d'oie ou de canard est un produit composé de morceaux de lobes de foie gras agglomérés ainsi que d'un assaisonnement.
- Le bloc de foie gras d'oie ou de canard est un produit composé de foie gras reconstitué ainsi que d'un assaisonnement.

En plus de la législation, des labels de qualité tels que l'Indication Géographique Protégée (IGP) ou le Label Rouge (LR) peuvent imposer des cahiers des charges plus précis notamment concernant l'espèce et/ou le sexe du canard élevé mais aussi concernant les pratiques d'élevage et de gavage. Par exemple, les foies gras bénéficiant de l'appellation IGP doivent nécessairement être issus de canards mâles, mulards ou Barbarie.

Le foie gras est principalement composé de lipides (autour de 55% de la matière fraîche) qui donnent au produit ses qualités organoleptiques. Il est donc important que le foie conserve ses lipides lors de la cuisson et cette capacité est le principal critère de qualité des foies gras. La perte lipidique lors de la cuisson, appelée aussi fonte, est estimée par le rapport entre l'exsudat et le poids de foie frais (en pourcentage). Ce taux de fonte est un critère très variable et est réglementé par la législation française (Décret n°93-999 du 9 août 1993) : il ne doit pas dépasser 30%. La fonte à la cuisson est donc une problématique essentielle pour les acteurs de la filière, la variabilité de ce critère ayant pour conséquence une hétérogénéité des produits de foie gras et une diminution des qualités organoleptiques du produit transformé. Maîtriser cette variabilité est donc primordial d'autant que de nombreux facteurs l'influencent.

3.2. Facteurs de variations du rendement technologique

De nombreuses études ont été menées à différents niveaux afin de comprendre les causes de la variabilité de la fonte (pour revue, voir Théron *et al.* 2013).

Conditions d'élevages et d'abattage

Les facteurs d'élevage influençant la qualité du produit ont été étudiés afin de les connaître et de les maîtriser. Ces études ont porté tant sur la préparation des animaux au gavage que sur leur alimentation au cours du gavage ou que sur la durée de la période de gavage.

A la fin de la période d'élevage, les animaux qui seront mis en gavage, sont rationnés soit en temps, soit en quantité, afin d'habituer le jabot à recevoir de grandes quantités de nourriture et de mieux valoriser le maïs de gavage (Robin *et al.* 2002). En effet, l'alimentation des animaux lors

de la période de gavage est prépondérante : l'ingestion d'une quantité importante de nourriture dès le début de gavage permettait d'obtenir des foies plus lourds en fin de gavage et semblait améliorer la qualité technologique des foies gras (Babilé *et al.* 1993, Baudonnet, 1993). Enfin, il a été montré que la diminution de la durée de gavage permettait une diminution de la fonte à la cuisson de par la diminution de la teneur en lipide des foies (Robin *et al.* 2002).

Outre les conditions d'alimentation, la composition des pâtés de gavage a également une influence sur la qualité des foies gras. Le maïs est le principal composant des pâtés de gavage et l'addition de protéines ou d'acides aminés permet un gain de poids de foie plus important et un taux de fonte plus faible (observé chez l'oie, Blum *et al.* 1971). A la fin de la période de gavage (entre 21 et 25 repas), il est réglementairement imposé de faire jeûner les animaux avant abattage afin de permettre la vidange du tractus digestif et ainsi assurer une bonne qualité sanitaire des produits lors de l'abattage des animaux. Cependant, ce délai postprandial influe sur le rendement technologique : chez l'oie, le rendement technologique diminuerait de 6 points entre 6h et 12h de jeûne (Rousselot-Pailley *et al.* 1992) ; chez le canard mulard, il diminuerait de 9 points entre 9h et 15h de jeûne (Données non publiées).

Parmi les facteurs influençant le rendement technologique, nous pouvons également compter le transport des animaux jusqu'à l'abattoir. Ainsi, Fernandez *et al.* (2011) ont montré que la durée de transport influencerait la qualité des produits de par le stress induit. En revanche, le temps d'attente après transport ou la méthode d'étourdissement n'aurait aucun effet sur la qualité des foies (Fernandez *et al.* 2009).

Après abattage, l'éviscération peut se faire de deux manières : à chaud lorsque le foie est retiré sur la chaîne d'abattage ou à froid lorsque le foie est retiré de la carcasse réfrigérée. Différentes études ont montré une détérioration du rendement technologique lors d'éviscérations à froid aussi bien chez l'oie (Babilé et Auvergne 1986, Rousselot-Pailley *et al.* 1992) que chez le canard (Castaing et Robin 1990). En effet, cette méthode d'éviscération induit un refroidissement lent du foie favorisant le maintien d'une activité enzymatique catabolique.

Si les facteurs zootechniques et techniques impliqués dans la variabilité de la fonte sont aujourd'hui maîtrisés et donc limités, d'autres facteurs ont un rôle prépondérant.

Facteurs biochimiques

Le taux de fonte est phénotypiquement fortement corrélé au poids de foie ($r=0.67$ - Marie-Etancelin *et al.* 2008) et la variabilité du poids de foie explique 33 % de la variabilité du taux de fonte (Théron *et al.* 2013). Cependant, même lorsque l'on se place dans une gamme de poids réduite de 550g à 650g (correspondant aux foies destinés à devenir du foie gras entier), la variabilité du taux de fonte reste élevée (54%) et le poids n'en explique que 14 %. Outre le poids de foie, le rapport entre le taux de protéines et le taux de lipides est également positivement corrélé au taux de fonte aussi bien chez le canard de Barbarie que chez le canard mulard ($r=0,83$ et $0,93$ respectivement, Baudonnet, 1993). Le taux de fonte est cependant négativement corrélé aux taux de protéines ($r=-0.54$, Théron *et al.* 2012). Un modèle de prédiction du taux de fonte à partir de la composition chimique des foies a par ailleurs été proposé par Théron *et al.* (2012) : celui-ci, mettant en jeu la matière sèche, le taux de protéines et le poids de foie, n'explique cependant que 43% de la variabilité du taux de fonte.

Composition lipidique du foie gras

Les lipides sont un des principaux composants des hépatocytes et représentent plus de 50% de la matière fraîche du foie gras. Des études ont été entreprises afin de déterminer les éventuelles relations entre le rendement technologique des foies et leur composition lipidique. Le gavage entraîne en effet une élévation du stockage des lipides, un accroissement de l'organe et donc un agrandissement des structures membranaires ainsi qu'une élévation de la teneur en acide oléique due à l'accumulation des TG en fin de gavage (Baudonnet, 1993). Une des hypothèses pouvant expliquer la fonte lipidique était la fragilité des membranes plasmiques des hépatocytes. Chez l'oie, l'accroissement des structures membranaires et l'augmentation de la teneur en acide oléique semblent être étroitement liées au rapport cholestérol/phospholipides des membranes, rapport qui augmente au cours du gavage (Cazeils *et al.* 1999). Par ailleurs, il semblerait qu'une forte augmentation de ce rapport serait associée à une augmentation du taux de fonte. Chez le canard, cependant, il n'a pas été mis en évidence de différence de composition des membranes lipidiques liée au taux de fonte (Molee *et al.* 2005), ni de lien spécifique entre la composition en TG des hépatocytes de canards et la fonte (Théron, 2011). Les TG étant synthétisés dans le foie, cela semble cohérent avec la non-observation de dérive du métabolisme au sein des hépatocytes.

Composition protéique

Jusqu'à récemment, peu d'études s'étaient intéressées à l'expression des protéines des hépatocytes issus de canards gras. Théron *et al.* (2011) ont étudié l'expression des protéines hépatiques précocement *post-mortem*. Pour une même gamme de poids de foie et une même teneur en lipides, les expressions protéiques ont été comparées entre les foies à taux de fonte faible et ceux à taux de fonte élevée. Les résultats montrent une surexpression des protéines impliquées dans les processus anaboliques dans les foies à fonte faible alors que les foies à fonte élevée présentent principalement une surexpression de protéines impliquées dans les mécanismes de défense. Parmi les protéines anaboliques de la fraction soluble, de nombreuses protéines sont impliquées dans le métabolisme des lipides et/ou des glucides comme l'alpha-enolase, la triose phosphate isomerase, ou la malate dehydrogenase. Les protéines ribosomales, retrouvées dans la fraction protéique insoluble, sont également comptées dans les protéines anaboliques. Les protéines impliquées dans les mécanismes de défense sont impliquées dans les processus d'oxydoréduction comme la peroxiredoxin 3 ou l'aldehyde dehydrogenase 2, la Heat shock protein 27 ou encore la calponin-1.

L'étude de l'évolution de l'expression des protéines *post-mortem* par Théron *et al.* (2013) met en évidence une diminution des expressions avec le temps. L'activité oxydo-réductrice et l'activité protéolytique diminue ainsi. Cette étude met également en évidence une forte concentration de protéines du cytosquelette, probablement due à l'hydrolyse de ces protéines. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les mécanismes de protéolyse seraient impliqués dans les mécanismes de fonte lipidique. Cette hypothèse a été confirmée par Awde *et al.* (2014) qui a montré une plus grande activité protéolytique dans des foies à fonte élevée (36%). La Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2), les cathepsin (Cts) et calpains (Clp) ont en effet des activités plus importantes au sein des foies à fonte élevée que dans ceux à fonte faible.

Facteurs génétiques

Chez les canards, deux espèces sont utilisées pour la production de foie gras : le canard de Barbarie et le canard mulard, issu du croisement entre une cane commune et un canard de Barbarie. Malgré les relations de parenté existant entre les deux espèces, le rendement

Tableau 2 : Héritabilités (diagonale) et corrélations génétiques (au-dessus et en dessous de la diagonale) des caractères de qualité du foie gras. D'après Marie-Etancelin *et al.* (2011)

	pfoie	txfonte	lipFoie	protFoie
pfoie	0.18 ± 0.03 0.09 ± 0.03	+0.80 ± 0.07	+0.86 ± 0.06	-0.93 ± 0.04
txfonte	+0.79 ± 0.13	0.19 ± 0.04 0.08 ± 0.03	+0.87 ± 0.05	-0.86 ± 0.05
lipFoie	+0.79 ± 0.12	+0.93 ± 0.06	0.16 ± 0.03 0.06 ± 0.03	-0.96 ± 0.03
protFoie	-0.81 ± 0.10	-0.89 ± 0.08	-0.89 ± 0.08	0.17 ± 0.03 0.09 ± 0.03

Les valeurs obtenues dans la lignée maternelle (canes communes) sont notées en orange, celles dans la lignée paternelle (canards de Barbarie) sont notées en bleu. pfoie : poids de foie ; txfonte : taux de fonte ; lipFoie : taux de lipides ; protFoie : Taux de protéines.

technologique des foies gras diffère, de même que les poids de foie. Ces deux phénotypes, fortement et positivement corrélés intra-espèce, ne le sont pas inter-espèce. Ainsi, les foies gras issus de canards de Barbarie sont plus légers (entre 430 et 560g) que ceux issus de canards mulards (entre 500 et 700g, Guy *et al.* 1999) mais présentent un taux de fonte plus élevé (45% contre 35%, Babilé *et al.* 1989). Le patrimoine génétique maternel du canard mulard, qui est un hybride, semble également avoir une influence sur ses propres performances. Rouvier *et al.* (1994) ont montré des différences de performances entre mulards de mère Tsaiya et ceux issus d'une mère Pékin. Ces différences se font en faveur des mulards issus de la cane Pékin comme pour le poids de foie (641g pour une mère Pékin contre 441g pour une mère Tsaiya) à l'exception du taux de fonte (46% pour une mère Pékin contre 35% pour une mère Tsaiya). Les mulards issus de mères hybrides (Tsaiya x Pékin ou Pékin x Tsaiya) présentaient des performances intermédiaires.

Chez le canard de Barbarie, le taux de fonte présente une héritabilité pouvant aller de 0,23 à 0,59 (Babilé, 1989, Fernandez, 1988, respectivement) attestant d'une forte variabilité génétique. Le canard mulard étant stérile, la sélection des performances de celui-ci s'effectue au sein des lignées parentales. Ainsi, l'héritabilité du taux de fonte du foie du mulard est donc estimée dans les lignées maternelle (0,18, Poujardieu *et al.* 1994) et paternelle (0,08, Marie-Etancelin *et al.* 2011); héritabilité partielle par construction plus faible que dans une population pure. Les corrélations génétiques entre le taux de fonte et les différentes caractéristiques du foie sont, elles, élevées aussi bien du côté maternel que paternel (**Tableau 2**).

4. Conclusion

Cette étude bibliographique montre que la mise en place de la stéatose hépatique en réponse au gavage des animaux met en jeu un métabolisme complexe aussi bien glucidique, lipidique, structural que protectif. Si le processus est hormono-dépendant et stimulé par l'afflux massif de glucose, les enzymes clés de la glycolyse et de la lipogénèse telles que la FASN, l' α -enolase, la TPI, l'EM ou encore l'ACC sont fortement mises en jeu. Outre les protéines de ces voies métaboliques, la stéatose implique aussi une modification de la structure des hépatocytes comme la formation d'inclusions lipidiques intracellulaires et donc une mise en jeu des protéines de structures telles que la troponine ou la perilipin (PLIN). Par ailleurs, des études ont montré l'implication d'enzymes de réponse au stress, de cytoprotection (Théron *et al.* 2013).

Toutes ces protéines jouant des rôles importants dans la stéatose, leurs gènes codants ainsi que leurs régulateurs constituent un vivier qu'il peut être intéressant d'étudier. Dans le cadre de cette étude consistant à étudier l'influence de l'expression des gènes sur la qualité des foies gras, ce vivier de gènes constitue une base de recherche importante que nous allons exploiter. Il peut en effet être intéressant de mettre en relation phénotypes, protéines et gènes afin de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la qualité du foie gras.

Deuxième partie

Les QTL phénotypiques et les eQTL (QTL d'expression de transcrits) sont des sujets d'études très répandus, notamment grâce à l'essor des techniques de séquençage, de génotypage et de quantification des transcrits de gènes. Les études de QTL relatifs à des abondances de protéines sont plus sporadiques et moins connues. Aussi il semblait intéressant de faire un rapide tour d'horizon des travaux effectués sur ce sujet. Les abondances de protéines sont des phénotypes s'obtenant par des méthodes spécifiques de séparation, de quantification et d'identification. Les principes de deux méthodes sont présentés et comparés.

1. QTL d'abondance de protéines (PQL ou pQTL)

1.1. Les premiers pas.

La cartographie de QTL a émergé au milieu des années 1980 à l'aide de marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – Paterson *et al.* 1988) pour des caractères tels que la masse de la tomate ou encore son pH. L'étude de ces régions s'est ensuite développée avec la mise en place de nouveaux marqueurs génétiques (microsatellites puis SNP – Single Nucleotide Polymorphism) permettant de cartographier de plus en plus finement les génomes. Si la notion de eQTL n'a émergé qu'au début des années 2000, celle de pQTL (QTL d'abondance de protéines ou PQL) a émergé dès le début des années 1990. En 1986, Zuckerkandl définissait le lexotype d'une cellule comme l'ensemble des caractères quantitatifs issus des produits macromoléculaires des gènes d'une cellule, à savoir les ARN, les protéines, les métabolites... Damerval *et al.* (1987) puis Leonardi *et al.* (1991) ont ensuite montré un lien entre la variabilité des quantités de protéines et celle des caractères phénotypiques, mais également que la variabilité de l'expression du génome (appelée PAP – Protein Amount Polymorphism) influençait la variabilité protéique quantitative développant ainsi la notion de PQL ou pQTL.

1.2. Essor du sujet de recherche

En 1994, Damerval *et al.* confirment le lien entre polygénie et variation protéique. C'est à ma connaissance le premier article où il est clairement question de PQL (ou pQTL). Leurs travaux ont en effet mis en évidence 70 PQL relatifs à 42 polypeptides de coléoptiles de maïs. Depuis, les études de pQTL se sont développées, probablement grâce à l'évolution des outils à disposition : cartes génétiques plus denses, génomes séquencés. Par ailleurs, nous avons remarqué que ces études étaient principalement réalisées sur les végétaux avec l'électrophorèse bidimensionnelle comme outil pour quantifier les protéines. En 2009, des PQL colocalisés avec des QTL de tolérance au gel ont été mis en évidence chez le pois (Dumont *et al.* 2009) permettant d'attribuer des fonctions aux PQL. Chez le pois (Bourgeois *et al.* 2011) et chez l'orge (Witzel *et al.* 2010), la détection de cis- ou trans-PQL et la co-localisation de pQTL et de QTL, respectivement permettait de mettre en évidence des gènes candidats. Plus récemment, l'étude de pQTL semble s'étendre à l'animal (souris ou lignées cellulaires humaines) avec comme outil de mesure protéique la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Par exemple, chez la souris, Holdt *et al.* (2013) ont analysé le protéome plasmatique de souris par la méthode de MALDI-TOF MS et une co-ségrégation de QTL et de pQTL leur ont permis d'identifier un gène causal affectant l'abondance de protéines plasmatiques.

Différentes stratégies existent dans le traitement de données de pQTL. Comme expliqué par Consoli *et al.* 2001, une colocalisation entre un pQTL et un QTL peut permettre d'identifier un lien entre la protéine et le phénotype et donc de mettre en évidence une protéine candidate. Lorsque la position des gènes est connue, sur la carte génétique, et que le gène codant la protéine colocalise avec le pQTL, cela met en évidence un gène candidat. Lorsque la position des gènes n'est pas connue ou que le gène ne co-localise pas avec le pQTL, l'interprétation devient plus complexe puisqu'il n'y a pas de linéarité entre les niveaux d'expression (Jansen *et al.* 2009). En effet, une variation du génotype peut affecter l'expression de protéines sans pour autant affecter celle du transcrite correspondant. Par ailleurs, certaines régions génomiques peuvent affecter aussi bien des phénotypes que des protéines ou des transcrits. Ces régions ont été définies comme des « hot spots » de QTL par Fu *et al.* (2009) et semblent être liées aux « hub » gènes, c'est-à-dire liées aux gènes régulateurs ayant des fonctions importantes dans les processus biologiques.

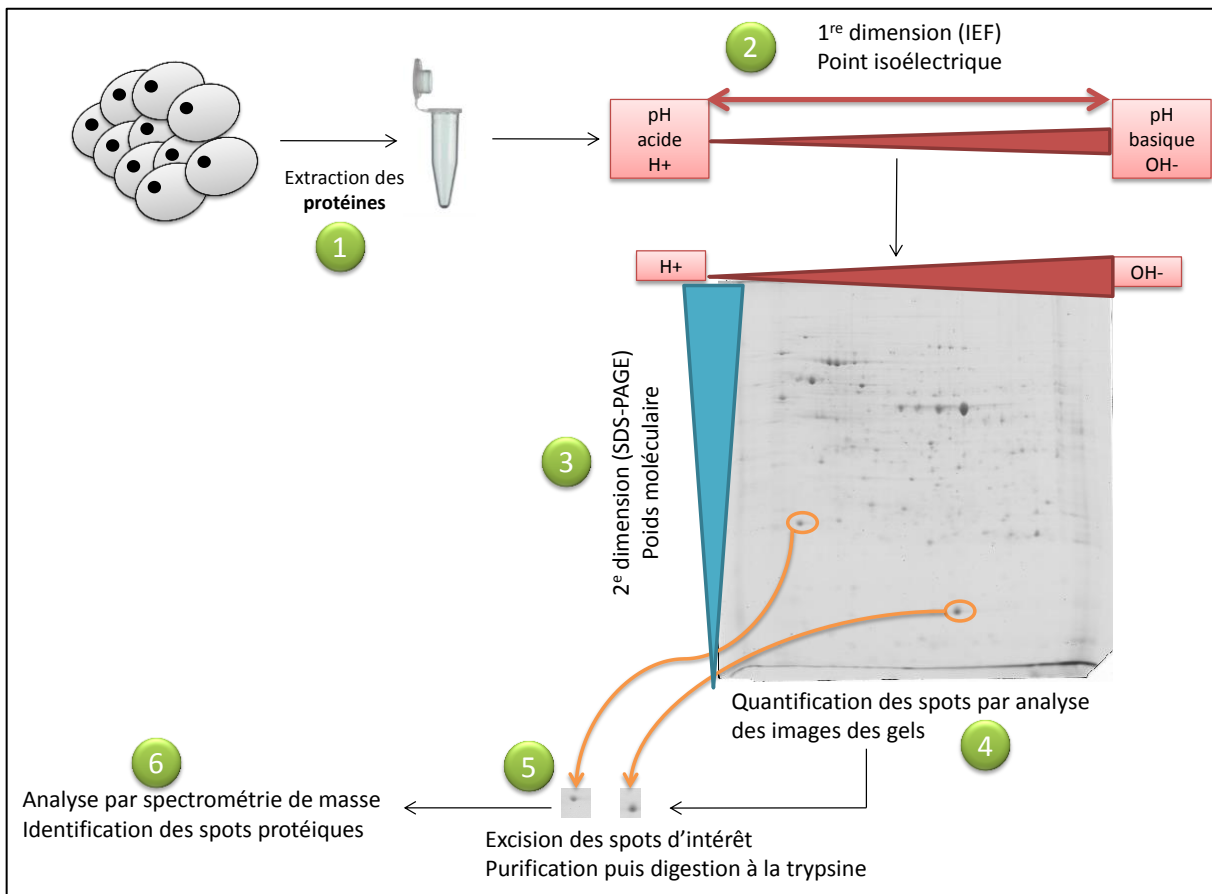


Figure 7 : Principe de la méthode d'électrophorèse bidimensionnelle. 1. Les protéines solubles sont extraites des échantillons dans un tampon à faible force ionique. 2. L'extrait protéique est chargé sur un gel d'acrylamide IPG (Immobilized pH gradient) et les protéines sont séparées sur ce gel selon leur point isoélectrique. 3. La seconde séparation se fait sur gel SDS-PAGE pour séparer les protéines selon leur poids moléculaire. 4. La quantification des spots protéiques se fait par analyse d'image après numérisation des gels. 5. Les spots à identifier sont excisés du gel. La protéine contenue est purifiée, digérée en peptides pour permettre l'identification par spectrométrie de masse (6).

2. Comparaison de méthodes de quantification et d'identification de protéines

Différentes méthodes peuvent être mises en place afin de séparer et de quantifier les protéines d'un échantillon. La plus ancienne et la plus communément utilisée est l'électrophorèse bidimensionnelle (**2DE**) mise au point dès les années 1970 (O'Farrell, 1975 ; Klose, 1975), qui permet de séparer des protéines dans un gel en fonction de leur point isoélectrique et de leur poids moléculaire. Celles-ci sont ensuite identifiées par spectrométrie de masse. Une deuxième méthode plus récente est la chromatographie en phase liquide (**LC** – Link *et al.* 1999), qui permet de combiner directement la séparation des protéines et peptides et l'analyse au spectromètre de masse. Ces deux méthodes sont présentées ici.

2.1. Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle

Lors d'une électrophorèse bidimensionnelle (**Figure 7**), les protéines sont tout d'abord séparées selon leur point isoélectrique dans un gradient de pH immobilisé dans un gel d'acrylamide puis une seconde fois selon leur poids moléculaire sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les gels de poly-acrylamide sont ensuite colorés : au nitrate d'argent, au bleu de coomassie colloïdal ou encore par fluorescence en pré- ou post-électrophorèse (Rabilloud et Lelong 2011). Selon ces auteurs, le nitrate d'argent, bien que très sensible (limite de détection < 1 ng rapporté par Miller *et al.* 2006), manque de linéarité (1 à 2 ordres de magnitude - Miller *et al.* 2006) et d'homogénéité en fonction des acides aminés présents dans la séquence et est peu compatible avec la spectrométrie de masse. Le bleu de Coomassie, en revanche, est plus linéaire (2 à 3 ordres de magnitudes), homogène et compatible avec un spectromètre bien que moins sensible (limite de détection à 20 ng) et est aujourd'hui le plus utilisé. Par ailleurs, dans le but de quantifier les spots protéiques, la fluorescence semble être la méthode la plus efficace devant la coloration au Bleu de Coomassie (Berth *et al.* 2007). Cette méthode de coloration est plus linéaire que les deux autres (jusqu'à 5 ordres de magnitude) et sensible (limite < 1ng selon le fluorophore utilisé – Miller *et al.* 2006). Cependant, elle nécessite un équipement spécifique à l'utilisation de la fluorescence et est plus coûteuse.

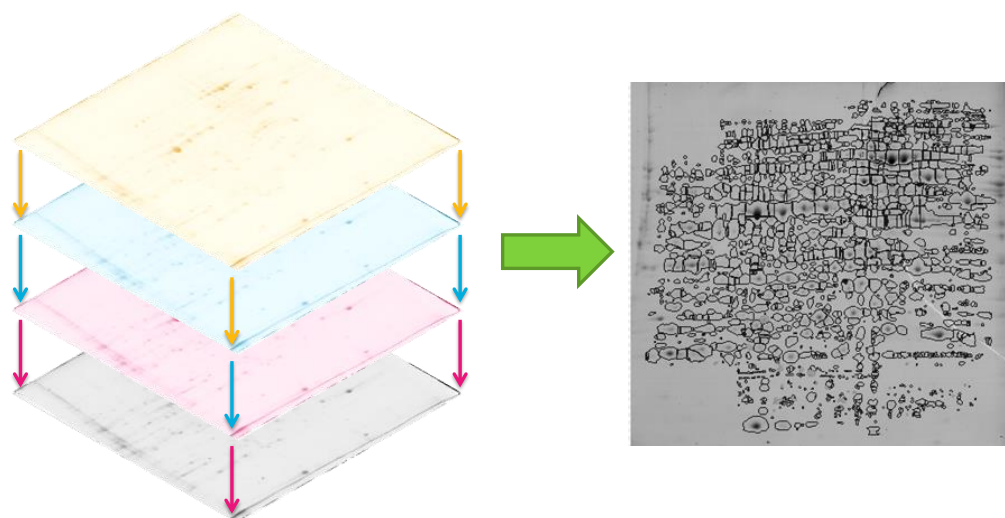


Figure 8 : Alignement des gels 2DE puis obtention d'une carte du protéome de l'échantillon en question

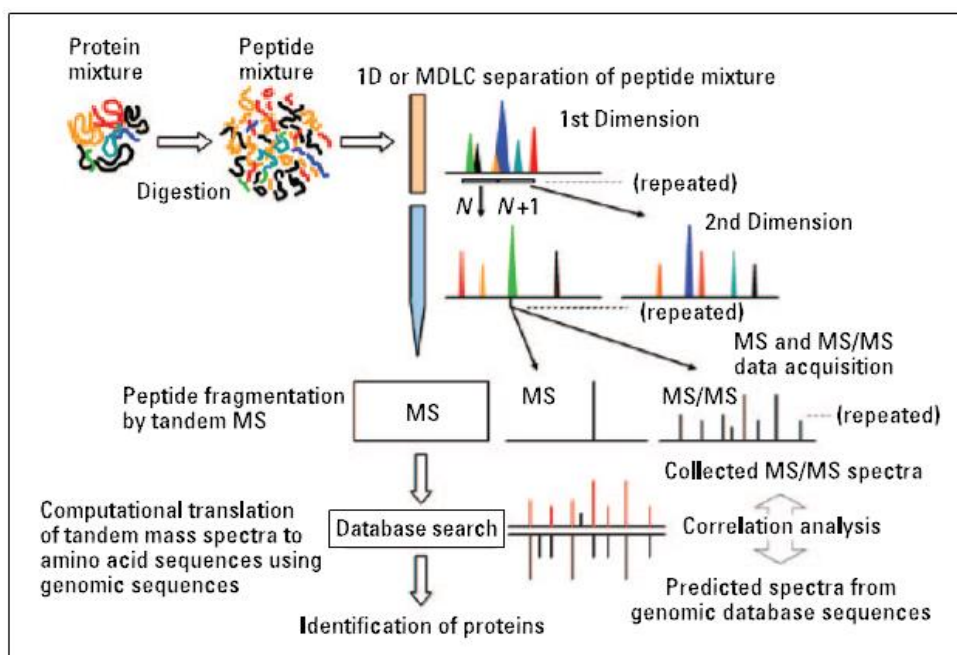


Figure 9 : Principe de la chromatographie liquide MS/MS pour analyse protéomique. D'après Motoyama et Yates III, 2008. Les extraits protéiques sont digérés en extraits peptidiques. Les peptides sont séparés par chromatographie liquide (LC) en une ou plusieurs dimensions (MDLC). Les peptides sont alors analysés, quantifiés et identifiés par spectrométrie de masse.

Une fois la coloration réalisée, la quantification des protéines se fait à partir de l'intensité des spots présents sur les gels. La marche à suivre est détaillée par Berth *et al.* (2007) : les gels sont numérisés afin de pouvoir traiter les informations par informatique. Avec l'aide d'un logiciel d'analyse de gels 2D, les images de gels sont superposées et alignées spot à spot afin de corriger les variations de position. Une image consensuelle qualifiée de carte du protéome résulte de la superposition des images des différents gels et permet de connaître la position et la forme des spots (**Figure 8**). Pour chaque spot de chaque image, la pixellisation tient lieu de valeur d'abondance et permet d'obtenir un profil d'expression. Ces données permettent ainsi d'identifier les spots d'intérêt, de les marquer dans le but d'en identifier les protéines et de poursuivre les analyses entamées.

Les spots d'intérêts sont ensuite excisés et les protéines présentes sont digérées en complexes peptidiques après diverses étapes de lavage du gel. Les extraits peptidiques sont ensuite analysés en LC-MS/MS : les peptides sont élués dans un gradient de solvant puis identifiés par spectrométrie de masse.

2.2. Analyse protéomique par shotgun

Le principe de l'analyse par shot gun consiste à identifier l'ensemble (le maximum) des protéines présentes dans un échantillon en s'affranchissant au maximum de l'étape de séparation sur gel de poly-acrylamide. Il existe deux stratégies différant sur l'utilisation ou non de gels. Premièrement, une fois les protéines extraites de l'échantillon, l'extrait peut être directement injecté dans le chromatographe en phase liquide pour que les différents peptides puissent être séparés (en une seule ou plusieurs dimensions, **Figure 9**) puis identifiés par spectrométrie de masse. Cette méthode est dite « gel free » dans la mesure où aucun gel n'est utilisé pour séparer les protéines avant identification. Une méthode intermédiaire entre les méthodes de séparation sur gel et sans gel consiste à séparer les protéines selon leur poids moléculaire (PM) sur gel SDS-PAGE afin d'augmenter le nombre de protéines identifiées ensuite. Une autre méthode a été développée s'inspirant des séparations effectuées en 2DE : la méthode OFFGEL consiste à séparer des peptides selon leur pI par isoélectrofocalisation (IEF). Les peptides issus de la digestion des protéines sont en effet séparés sur des strips IPG de gradient de pH. En arrivant à leur pI, les

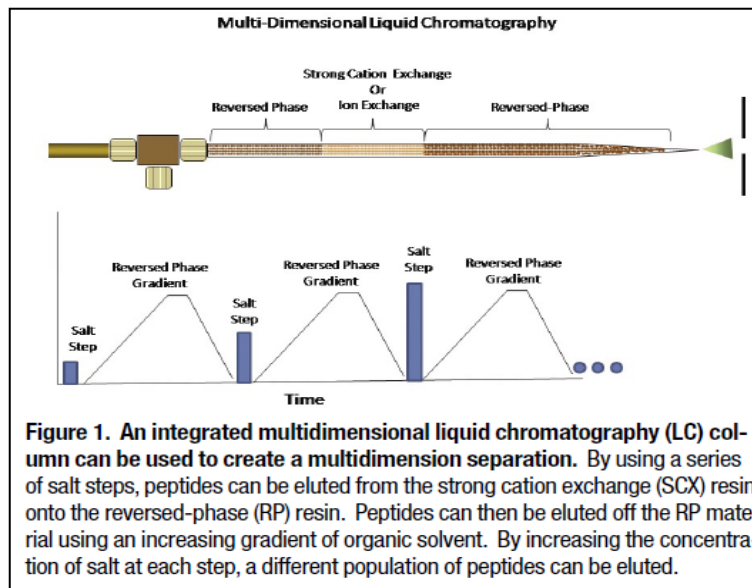


Figure 10 : Exemple de séparation multidimensionnelle. D'après Delahunty et Yates III, 2007.

peptides se solubilisent et peuvent être aisément récupérables (Manadas *et al.* 2009 – www.home.agilent.com) avant d'être soumis à la deuxième dimension par LC.

En chromatographie liquide monodimensionnelle, différentes méthodes de séparation des protéines peuvent être utilisées (Abdallah *et al.* 2012) : la première utilise les échanges d'ions (IEC – Ion Exchange Chromatography). Ces échanges se font sur colonne de chromatographie par transfert d'anions (AX) ou de cations (CX). Par exemple, une chromatographie SCX (Strong Cation eXchange) permet aux peptides chargés positivement de s'accrocher à la colonne et d'être séparés selon leur charge. Une deuxième méthode est la chromatographie en phase inversée (RP – Reverse Phase) qui permet une séparation des peptides selon leur hydrophobicité.

Les méthodes d'analyses multidimensionnelles permettent une meilleure couverture du protéome étudié et des complexes protéiques de par l'orthogonalité de séparation des différentes dimensions. En MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology), 2 dimensions sont utilisées (**Figure 10** – Delahunty et Yates, 2007) : la première est la séparation par échange de cations SCX (strong cation exchange) couplée à la RP. Cette dernière est la plus utilisée dans le cadre des shotgun pour sa compatibilité avec la spectrométrie de masse.

2.3. Comparaison des méthodes Electrophorèse bidimensionnelle et MudPIT.

Un des avantages majeurs de la 2DE est sa puissance de séparation d'extraits protéiques complexes. Cette résolution permet en effet de mettre en évidence plus d'un millier de spots protéiques correspondant à quelques centaines de protéines différentes ainsi que des protéines comportant des modifications jouant sur leur pI ou sur leur PM. Cependant, malgré la puissance de résolution, les protéines de faible abondance sont peu identifiables, à moins d'augmenter la quantité de protéines totales à déposer, ce qui aura le désavantage de cacher les protéines de faible abondance derrière celles de plus forte abondance qui auront des spots plus gros. De plus, la co-migration de protéines sous forme d'un même spot rend l'identification et l'interprétation difficile (Gygi *et al.* 2000). Cette difficulté peut être dépassée au besoin en réduisant l'éventail du gradient de pH pour rendre la séparation des protéines plus efficaces (Westbrook *et al.* 2001). Rabilloud *et*

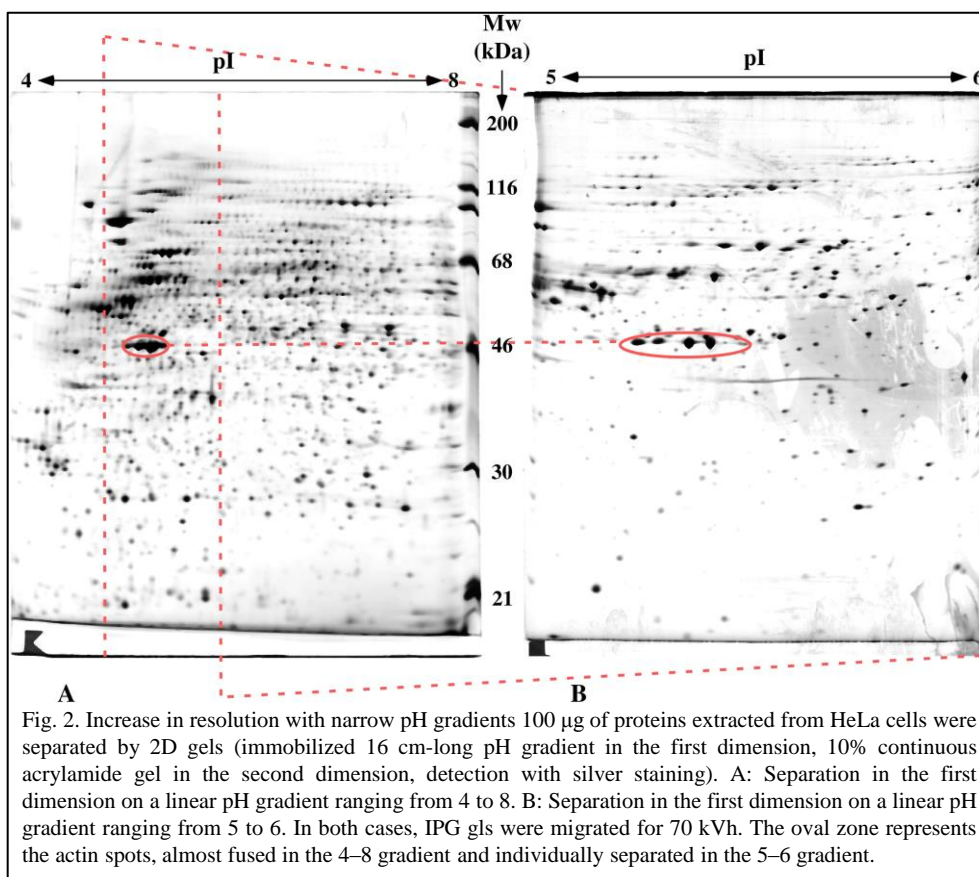


Figure 11 : Différence de résolution en réduisant l'éventail de pH utilisé pour séparer les protéines de 4-8 (gauche) à 5-6 (droite). D'après Rabilloud *et al.* (2010).

Tableau 3 : Différences notables entre l'analyse par Electrophorèse bidimensionnelle ou par MudPIT

	2D-PAGE	MudPIT
Dynamic range	En bleu de coomassie : à partir de protéines exprimées à 100 copies/cellule pour 200 mg déposés.	10000 :1
Nb Protéines identifiées	quelques centaines	>1000
Catégories de protéines	Protéines solubles Modification post-traductionnelles	Toutes protéines
Quantification	Des spots protéiques par analyse d'image avant identification	Des peptides issus de la colonne de chromatographie par spectrométrie de masse

al. (2010) ont ainsi montré qu'en réduisant le gradient de pH de 4-8 à 5-6 : des spots protéiques mélangés dans le premier cas (pH 4-8) sont distincts dans le second (pH 5-6 - **Figure 11**).

Bien que la 2DE ne soit pas complètement automatisée et donc nécessite de la main d'œuvre, le fait de pouvoir quantifier les spots protéiques en amont du processus d'identification est un avantage en termes de temps : Rabilloud et Lelong (2011) estiment ainsi une division par 10 du temps passé en spectrométrie de masse lorsqu'une sélection des spots d'intérêt est faite par analyse d'image (**Tableau 3**). En effet, en analyse par « shotgun », si les protéines d'un échantillon sont fragmentées en peptides puis quantifiées et identifiées avec une possibilité de détecter les différences d'abondance entre protéines allant de 1 à 10000 (dynamic range - soit en pratique des protéines exprimées selon des valeurs allant de 100 à 1 000 000 copies par cellules en MudPIT), les spectres peptidiques sont très nombreux et complexes, nécessitant un temps d'analyse très long.

La 2DE, malgré sa puissance de résolution, permet difficilement l'analyse de protéines hydrophobes, notamment membranaires du fait de l'incompatibilité entre le détergent utilisé pour dissoudre les membranes cellulaires et l'IEF (Rabilloud *et al.* 2010). Le MudPIT outrepassé cette difficulté en permettant de quantifier et d'identifier des protéines membranaires non analysables par 2DE. Par exemple, sur un total de 1484 protéines identifiées, Washburn *et al.* (2001) ont mis en évidence 131 protéines comportant au moins 3 domaines transmembranaires par MudPIT chez *S. cerevisiae*.

3. Conclusion

Peu d'études ont été entreprises sur les QTL d'abondance de protéines (pQTL). Si plusieurs ont déjà été entreprises chez les végétaux, ces études concernant les animaux sont très récentes. Pourtant, ce sujet d'étude, couplé à l'étude de QTL phénotypiques et à la connaissance des génomes (positions des gènes...) semble être très utile dans la compréhension des mécanismes moléculaires de régulation des protéines et des phénotypes, dans l'identification de gènes

candidats. En effet les protéines se situent à un niveau intermédiaire d'expression du génome entre les ARN et les phénotypes. La confrontation des différents niveaux d'expression et notamment lors d'une colocalisation entre QTL et pQTL semble alors intéressante. Lors de ce travail de thèse, des détections de QTL ainsi que de pQTL ont été effectuées et présentées dans ce document. Ces deux niveaux d'expression (QTL et pQTL) ont ainsi pu être confrontés et seront probablement confrontés à un 3^e niveau (eQTL) à l'avenir.

Comme il a déjà été précisé, l'obtention des abondances de protéines passe par des méthodes d'analyse par protéomique. Si la méthode de MudPIT semble la plus complète en termes de quantité de protéines identifiées, lors de ce travail nous nous sommes concentrés sur une plus petite fraction du protéome : le protéome soluble. Basés sur l'hypothèse que les foies gras à fonte faible présentent un profil protéique différent des foies à fonte élevée, nous avons voulu aller plus loin dans l'analyse du protéome en étudiant l'influence du génome et de son expression sur les protéines et la qualité du foie gras.

PRE-REQUIS ET PRESENTATION DU DISPOSITIF

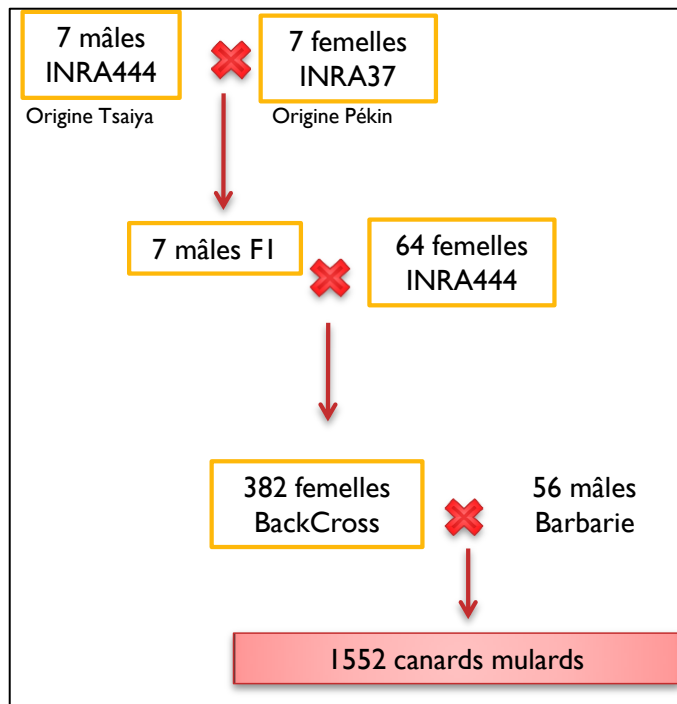


Figure 12 : Dispositif de croisement en retour entre deux souches de canard commun. Les canards communs des différentes générations (entourés en jaune) ont été génotypés pour les marqueurs de la carte génétique. Les canards mulards servent au testage sur descendance de leurs mères backcross.

1. Description du dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé pour ce projet est issu du programme ANR « GeneCan » (Marie-Etancelin *et al.* 2008). Il s'agit d'un dispositif de croisement en retour (ou Backcross) entre les souches de canard communs INRA 37 et INRA 444 mis en place pour rechercher des QTL phénotypiques (**Figure 12**). Les canards de la lignée INRA 444 ont des origines Tsaiya et ont été sélectionnés sur la durée de leur période de fertilité. Les animaux de la lignée INRA 37 sont des canards Pékin lourds. Ces deux lignées ont été choisies pour leur divergence sur différents caractères zootechniques telles que la croissance, la reproduction, ainsi que chez leurs descendants mulards telles que l'aptitude au gavage ou la qualité des produits. Rouvier *et al.* (1994) ont montré une différence significative de poids de foie et de taux de fonte entre les canards mulards nés d'une cane Tsaiya, ceux nés d'une cane Pékin ou ceux nés d'une cane hybride Tsaiya/Pékin (peu importe le sens de croisement).

Sept mâles INRA 444 ont été croisés chacun avec 1 cane INRA 37 pour obtenir 7 mâles F1 qui ont été accouplés à des canes INRA 444. Ce croisement en retour a permis l'obtention de 382 femelles communes backcross (**BC**). Ces canes ont fait l'objet d'un testage sur descendance : elles ont été croisées avec des canards de Barbarie et ont engendré 1552 canards mulards (entre 1 et 8 mulards par cane BC).

Le dispositif animal a été généré sur trois années consécutives. Quatre familles de BC ont été produites la 1^{re} année et 3 familles la 2nd année (Décrit par Kileh-Wais *et al.* 2013). Les mulards issus des BC de la 1^{re} année ont été produits la 2^{ème} année en deux lots d'éclosion et ceux issus des BC de la 2nd année ont été générés la 3^{ème} année également en 2 lots d'éclosion. Les canards mulards ont été élevés pendant 12 semaines (chaque année en 2x8 lots) puis gavés pendant une période de 12 jours. Chaque année, deux gaveurs sont intervenus auprès des animaux pour un total de 3 gaveurs sur l'ensemble du dispositif.

Les animaux ont été abattus à la fin de la période de gavage. A 20 min *post-mortem*, des échantillons de foie ont été prélevés par une petite incision au niveau de l'abdomen et congelés dans de l'azote liquide pour les analyses biochimiques. Les carcasses ont été réfrigérées pendant

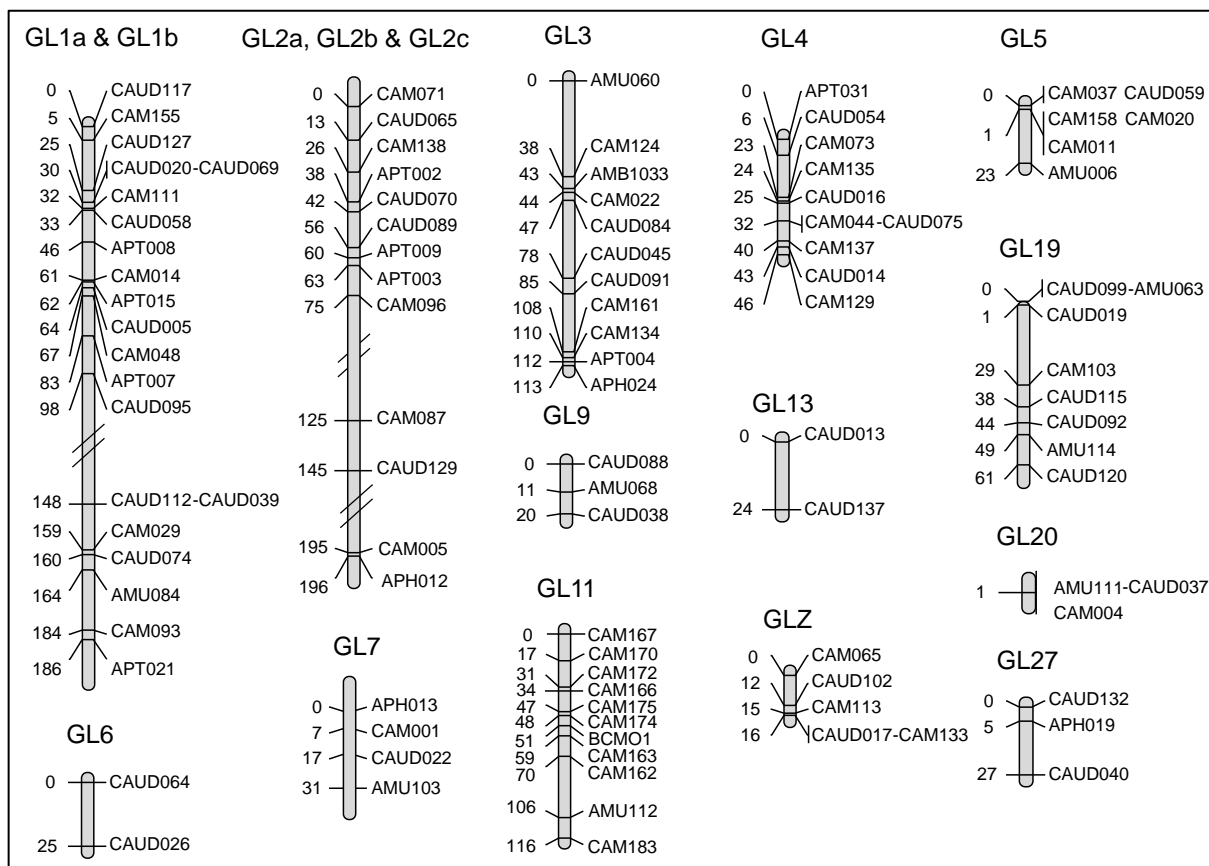


Figure 13 : Carte génétique composée de 102 marqueurs microsatellites.

24h à 4°C puis éviscérées et les foies ont pu ainsi être collectés pour effectuer les mesures de qualité notamment.

2. Phénotypage

De nombreuses mesures phénotypiques ont été récoltées chez les canes BC d'une part pour des caractères liés à la fertilité, à la reproduction et à l'efficacité alimentaire ; chez leurs fils mulards d'autre part afin de réaliser le testage sur descendance pour des caractères liés à la croissance, au métabolisme énergétique, à l'aptitude au gavage et la qualité des magrets et foie gras. Au total, 16 caractères ont été mesurés chez la cane BC et 48 chez le mulards.

Les phénotypes mesurés sur les foies des canards mulards sont liés à la qualité du foie gras. Les poids de foie (**pfoie**) de tous les animaux ont été collectés juste après éviscération (24h *post-mortem*). La couleur du foie (caractérisée par les coordonnées trichromatiques définies par la Commission Internationale de l'éclairage (CIE. 1976)) a été mesurée par : la luminance (**Ll**), l'indice de rouge (**La**) et l'indice de jaune (**Lb** – ou L*, a* et b*, respectivement, abréviations CIE) à l'aide d'un chromamètre (CR 300 Minolta). Les taux de lipides et de protéines ont été estimés avec un spectrophotomètre à proche infrarouge (FOSS NIRSystem) sur du foie broyé (Marie-Etancelin *et al.* 2010). Les résultats sont ensuite exprimés en pourcentage de poids de foie frais (**lipFoie** et **protFoie**, respectivement) ou en pourcentage de poids de foie sec (**txlipF** et **txprotF**, respectivement). Le taux de fonte (**txfonte**) permet de renseigner le rendement technologique. Il correspond à la quantité de lipides perdue par le foie lors de la cuisson. Il a été mesuré en stérilisant 60g de foie réfrigéré (24h *post-mortem*) pendant 50 min à 105°C et est exprimé en pourcentage du foie avant cuisson. Le taux de collagène (**txcoll**) a été déterminé selon la méthode de Woessner (1961).

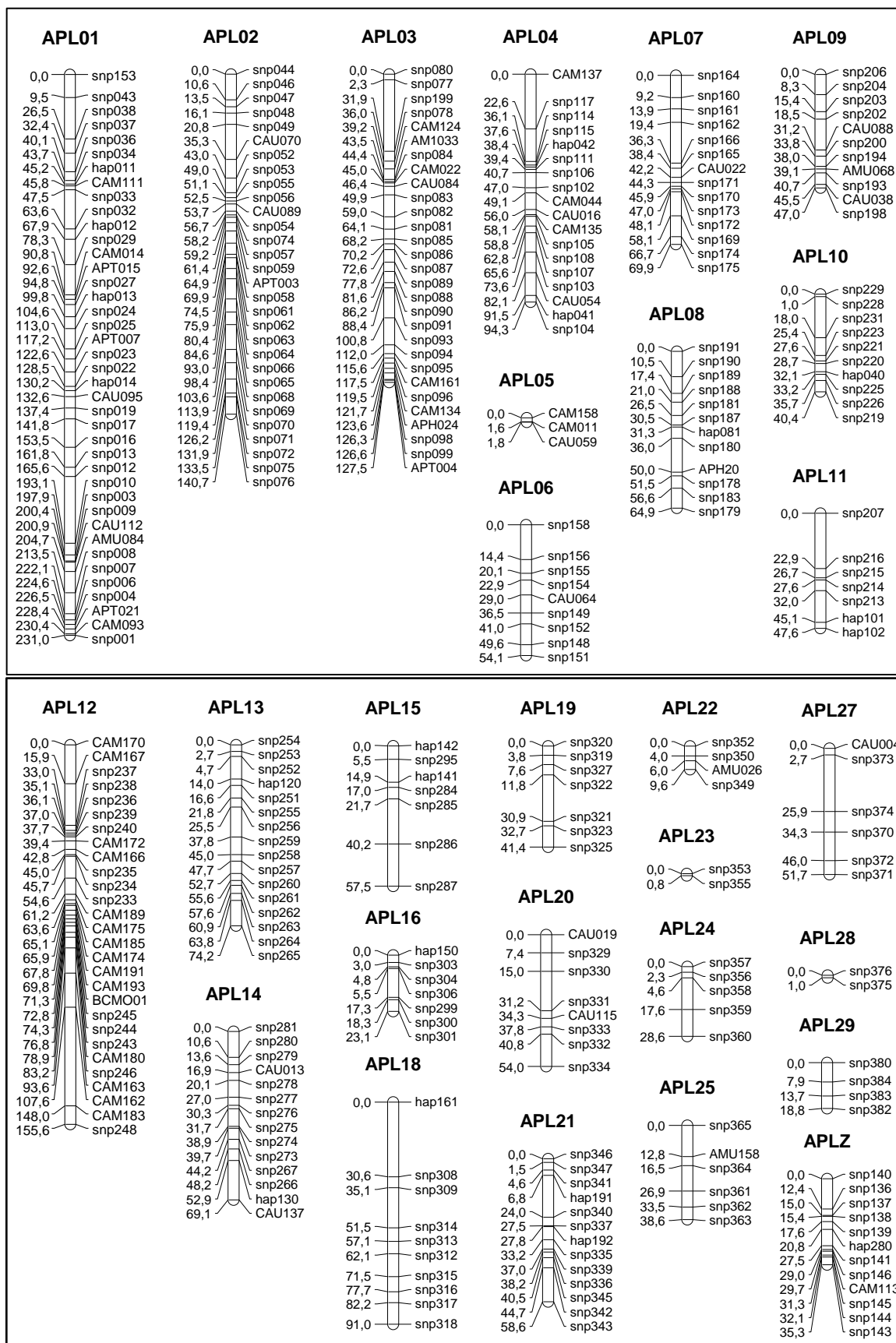


Figure 14 : Carte génétique mixte (en cM) alliant marqueurs microsatellites et SNP (27 groupes de liaisons)

3. Cartes génétiques

3.1. Carte génétique de microsatellites (Figure 13)

Une carte génétique composée de microsatellites a été construite pour les détections de QTL. Un peu plus de 150 marqueurs microsatellites spécifiques du canard ont été développés par le laboratoire de Génétique Cellulaire (INRA; Fève *et al.* 2008) et obtenus à partir des bases de données internationales de séquences nucléotidiques (GenBank/EMBL/DDBJ). Cent-cinq marqueurs microsatellites ont été sélectionnés en premier lieu par la présence d'une séquence similaire sur le génome de la poule, puis pour l'informativité de ces marqueurs chez au moins 3 des 7 pères F1 (un marqueur est informatif pour un animal si celui-ci est hétérozygote pour ce marqueur) et enfin pour la fiabilité des génotypes contrôlée à l'aide du logiciel GeneMapper V4.0 (Fève *et al.* 2008). Quatre-vingt-onze marqueurs ont dans un premier temps été positionnés sur 16 groupes de liaisons par analyse des taux de recombinaison à l'aide du logiciel Crimap V2.4 (Kileh-Wais *et al.* 2013). Le groupe de liaison 11 a été développé ultérieurement et compose désormais cette carte génétique, portant le nombre de marqueurs à 102. Les 17 groupes de liaisons sont répartis sur 14 chromosomes ; cette répartition a été obtenue par homologie de séquences des marqueurs avec ceux des chromosomes du poulet. Les canes BC, les pères F1 ainsi que les grands parents INRA444 et INRA37 ont été génotypés pour ces marqueurs.

3.2. Carte génétique mixte alliant SNP et microsatellites (Figure 14)

Afin d'augmenter le nombre de marqueurs et d'améliorer la couverture du génome, un ensemble de marqueurs SNP a été développé à partir du séquençage des 7 pères F1 du dispositif. Une nouvelle carte génétique a ainsi pu être construite avec 311 SNP informatifs et 82 marqueurs microsatellites ordonnés en 27 groupes de liaison (Vignal *et al.* 2014).

Tableau 4 : QTL phénotypiques liés aux caractères de qualité du foie gras mis en évidence pour le dispositif expérimental

Caractères / Groupes de liaisons		1b	2b	2c	03	09	13	20
QTL unicaractères	Taux de fonte			5%		5%		
	Poids de foie			1%		1%		1%
	Teneur en lipides (lipFoie)			1%		5%		
	Teneur en protéines (protFoie)			1%		1%		
	Taux de collagène			5%				5%
	Indice de couleur rouge		5%			1%		
	Indice de couleur jaune	5%		5%	5%			
	Luminance						5%	
QTL multi-caractères	Taux de fonte x teneur en protéines			0,5%				
	Teneur en lipides x teneur en protéines					0,5%		

4. Détections de QTL phénotypiques

4.1. Principes de la détection de QTL dans ce dispositif

La détection de QTL consiste à tester les différences phénotypiques au sein des descendants en fonction de l'origine de leurs allèles aux marqueurs. Le dispositif GeneCan se rapproche du dispositif dit « Petites filles » : les détections de QTL ont été entreprises sur les canes BC pour l'ensemble des caractères, y compris ceux mesurés chez les mulards. Dans ce cas, les performances des BC correspondent alors à la moyenne des performances de leurs fils mulards respectifs. Le modèle utilisé est décrit par Kileh-Wais *et al.* (2013) et permet de prendre en compte le nombre de fils par BC (N=1 à 8), les variances génétiques et résiduelles ainsi que l'héritabilité du caractère étudié.

Pour chaque caractère et le long de chaque groupe de liaisons, les rapports de vraisemblance entre l'hypothèse d'absence de QTL et l'hypothèse alternative qu'il existe un QTL ont été comparés, ce qui a permis l'identification de QTL significatifs avec des valeurs seuils à 5 % et 1 %. Ces rapports de vraisemblance correspondent à la somme des rapports de vraisemblance de chaque famille de père F1, chaque famille contribuant à sa manière à la vraisemblance globale. La contribution à la vraisemblance des backcross est fonction de la précision du phénotype, c'est-à-dire fonction du nombre de descendants mulards par cane et de l'héritabilité des caractères.

4.2. QTL liés à la qualité du foie gras

Les primo-détections de QTL pour l'ensemble des phénotypes mesurés ont été entreprises avec la carte génétique composée de 91 microsattellites. Pour l'ensemble des phénotypes mesurés, 74 QTL ont été mis en évidence (Kileh-Wais *et al.* 2013). Dix-sept QTL ont été identifiés pour les 8 caractères de qualité du foie gras (mentionnés ci-dessus) sur 7 groupes de liaisons différents dont 11 QTL répartis sur seulement 2 groupes de liaisons : 6 QTL sur le groupe de liaison 2c et 5 sur le groupe de liaison 9 (**Tableau 4**). Des détections de QTL multi-caractères avaient également été entreprises et avaient mis en évidence des QTL très significatifs impactant plusieurs caractères sur ces deux groupes de liaison. Deux QTL pléiotropiques ont ainsi été identifiés sur le groupe de

liaison 2c en combinant le taux de fonte avec le taux de protéines d'une part et avec le taux de collagène d'autre part. Un 3^e QTL pléiotropique a été mis en évidence sur le groupe de liaison 9 en combinant le taux de protéines et le taux de lipides (Kileh-Wais *et al.* 2013).

5. Conclusion

Les résultats de ces primo-détections de QTL sont à la base des travaux présentés dans ce mémoire. Le dispositif expérimental utilisé est le même mais les 17 QTL uni-caractères et principalement les 11 QTL ségrégant sur les groupes de liaisons GL2c et GL09 ont été étudiés afin d'optimiser ce dispositif et de réduire le nombre d'échantillons à analyser. Afin d'approfondir ces premiers résultats, d'autres détections de QTL phénotypiques ainsi que de des QTL de protéines ont été entreprises avec la carte génétique de microsatellites ayant permis ces primo-détections, mais également avec la carte génétique mixte qui a été construite.

MATERIEL ET METHODES

1. Analyse par protéomique

1.1. Electrophorèse Bidimensionnelle des protéines solubles du foie gras

Extraction et dosage des protéines

Les échantillons de foie gras de canard mulards sont broyés dans de l'azote liquide à l'aide d'un broyeur à bille Retsch MM 400 (Retsch®, Haan, Allemagne). 300 mg de poudre sont ensuite prélevés et remis en suspension dans 1,2 ml de tampon Tris 40 mM HCl, EDTA pH 8 comprenant un inhibiteur de protéases. L'ensemble est homogénéisé pendant 1 heure à 4°C à l'aide du broyeur à bille Retsch puis centrifugé 10 min à 4°C et 10 000 G. Après avoir retiré le gras présent en surface des échantillons, les tubes sont remis sous agitation pendant 20 min à 4°C puis centrifugés pendant 10 min à 4°C et 10 000 g. Le surnageant correspondant à la fraction protéique hydrosoluble est conservé à -80°C. L'extraction de la fraction non soluble des protéines se faisant avec des produits incompatibles avec l'électrophorèse bidimensionnelle, seule la fraction protéique soluble est extraite et analysée dans ce projet.

Les extraits protéiques sont ensuite dosés selon la méthode de Bradford (1976) à l'aide d'un lecteur de plaque 96 puits. La gamme étalon est préparée avec de la sérum albumine bovine dans les mêmes conditions que les échantillons. Cinq µl d'échantillon, d'un point de gamme ou d'eau sont incubés avec 250 µl de réactif de Bradford pendant 10 minutes et l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 595 nm. Le calcul des concentrations protéiques se fait ensuite à partir de la droite étalon.

Première dimension - Isoélectrofocalisation

Cette étape permet de séparer les protéines selon leur point isoléctrique sur une bande de gel de 17 cm (strip) de gradient de pH de 5 à 8, grâce au système Protean IEF cell system (Bio-RAD). Les extraits protéiques sont mélangés à un tampon de solubilisation / réhydratation à raison de 500 µg de protéines déposées sur les strips. Le tampon est préparé à partir d'une solution mère composée d'urée 7M, de thiourée 2M et de CHAPS 2% et complétée par du DTT 1%, des

Tableau 5 : Etapes de l'électrofocalisation

	Etape 1	Etape 2	Etape 3	Etape 4	Etape 5	Etape 6	Etape 7
Voltage a atteindre	↗ 50 V	250 V	↗ 500 V	↗ 1000 V	1000 V	↗ 6000 V	6000 V
Durée de l'étape	50 Vh ~1h	500 Vh ~2h	1h	2h	1000 Vh ~1h	4h	80 000 Vh ~14h

Les flèches signifient que la montée en tension se fait de façon linéaire. L'absence de flèches signifie que la montée en tension se fait de façon rapide. La focalisation se fait alors sur la durée indiquée en heure (h) ou en Volt-horaire (Vh).

ampholytes pH 5-8 0,4% (v/v), des ampholytes pH 3-10 Non Linéaire 0,2% (v/v) et 0,0002% de Bleu de Bromophénol. Après 15 min de réhydratation passive à température ambiante, 2 ml d'huile minérale sont déposés sur chaque strip. Ceux-ci sont ensuite réhydratés passivement à 20°C pendant 16 heures puis un papier Wicks (Bio-RAD) imbibé d'eau déminéralisée est déposé entre chaque électrode et le strip. Un courant de 50 V permet ensuite une réhydratation active des strips pendant 6 heures avant la mise en route de l'isoélectrofocalisation. Celle-ci comporte 7 étapes dont le voltage et la durée sont définis dans le tableau ci-contre (Tableau 5). A l'issue de la première dimension, les strips sont rincés dans de l'eau déminéralisée puis conservés à -20°C en attendant la seconde dimension.

Seconde dimension – SDS-PAGE (Sodium DodecylSulfate-Polyacrylamide Gel of Electrophoresis)

La migration en seconde dimension permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire dans des conditions dénaturantes. Avant la mise en place de cette étape, les strips doivent être ré-équilibrés. Les solutions d'équilibration sont préparées à partir d'une solution mère composée de Tris HCl 1,5M pH 8,8 50 mM, de glycérol 30 %, de SDS 2 % et d'urée 6M. Ils sont incubés une première fois pendant 15 minutes dans 10 ml de la solution d'équilibration de DiThioThréitol (DTT) à 1 % puis une seconde fois pendant 20 minutes dans 10 ml de solution d'équilibration d'iodoacétamide à 2,5 % contenant quelques grains de Bleu de Bromophénol.

Les strips sont ensuite rincés dans 5 ml de tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1 % SDS, pH 8,3) et déposé à la surface des gels SDS-PAGE à une concentration de 12 % d'acrylamide. Grâce au système Protean II XL system (Bio-RAD), la migration se fait à raison de 40 V la première heure puis 110 V sur la nuit et est interrompue lorsque le front de migration atteint le bas du gel.

A la fin de la migration, les gels sont rincés 3 fois 10 minutes dans de l'eau permutée avant d'être mis à colorer pendant la nuit dans du bleu page blue G250 (FERMENTAS) à raison de 200 ml de colorant par gel sous légère agitation. Les gels ainsi colorés sont ensuite rincés dans de l'eau permutée.

Analyse d'image

Les gels sont scannés (Image Master 2D Platinum, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) avant d'être analysés via le logiciel Samespots® (TotalLab Ltd, Newcastle-upon-Tyne, UK). L'image du gel « pool », obtenu avec un mélange des extraits protéiques de tous nos échantillons est considérée comme image de référence. Toutes les autres images sont alors alignées, spot à spot, sur cette image de référence. Cet alignement permet ainsi au logiciel de détecter les spots présents sur les images et d'estimer une valeur d'intensité pour chaque spot et pour chaque gel.

Identification des spots d'intérêt

Les gels conservés sous vide d'air sont réhydratés. Les spots d'intérêts sont ensuite excisés à l'aide de cônes de pipettes coupés à la taille des spots puis déposés dans des tubes de 1,5 ml. L'identification des spots se fait ensuite à la Plateforme d'Exploration du Métabolisme à l'INRA de Theix, avec le protocole suivant :

Digestion des protéines

Le bleu de Coomassie, utilisé pour la coloration des gels doit être éliminé. Les spots excisés sont mis à incuber pendant 30 minutes dans 100 µl d'une solution de bicarbonate d'ammonium 25 mM et d'acétonitrile 95/5 (v/v). Après élimination de la solution, les spots sont incubés pendant 30 minutes dans 100 µl d'une solution de bicarbonate d'ammonium 25 mM et d'acétonitrile 50/50 (v/v). cette incubation est répétée une fois puis les spots sont déshydratés dans 200 µl d'acétonitrile 100%. Après élimination de la solution d'acétonitrile, les spots sont séchés avec un Speed Vacuum. Les protéines contenues dans les spots sont ensuite digérées en peptides par hydrolyse à la trypsine. Chaque spot est incubé pendant 5h à 37°C dans 12 µl d'une solution de trypsine, préparée à 12,5 ng/µl de trypsine (V5111, Promega) dans 25mM de bicarbonate d'ammonium.

L'extraction des peptides s'est faite par l'ajout de 9,6 µl d'acétonitrile 100% suivi de 10 min de sonication. Les digestions sont ensuite concentrées dans le SpeedVac pendant 5 minutes pour éliminer l'acétonitrile, puis transférés dans des tubes à HPLC avant l'analyse LC-MS/MS.

Analyse Nano-LC-MS/MS

Les extraits de peptides ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance nano débit (Ultimate 3000 RSLC, Dionex, Voisins le Bretonneux, France). Huit μL de l'extrait peptidique sont chargés à un débit de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ sur une colonne de pré-concentration (5 cm de longueur X 100 μm I.D., Acclaim PepMap 100 C18, 5 μm , 100A nanoViper) équilibrée dans de l'eau avec de l'Acide Trifluoroacétique 0.05%. L'analyse se fait ensuite selon l'hydrophobicité des peptides à l'aide d'une colonne nanocapillaire de 15 cm de long X 75 μm I.D., 2 μm , 100 Å (Acclaim PepMap 100 C18, Dionex) équilibrée dans de l'eau avec de l'acide formique 0.5%. Les peptides sont ensuite élués en utilisant un gradient de solvant augmentant linéairement de 4% à 50% d'acétonitrile dans 0.5% d'acide formique à un débit de 300 nl/min pendant 45 min.

L'identification des peptides a été entreprise à l'aide d'un spectromètre de masse LTQ VELOS (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France). L'éluat de peptide a été électronébulisé en mode ion-positif à 2.7 kV au travers d'une source d'ions et avec une CID (Collision Induced Dissociation) en mode 10 (c'est-à-dire que pour un scan complet, les 10 pics les plus intenses sont analysés en MS/MS). L'acquisition des spectres MS (400 – 1400 m/z) a été faite en utilisant une exclusion dynamique de 2 répétitions (20s de répétition, 120s d'exclusion). En MS/MS, la largeur d'isolation pour les ions a été fixée à 1m/z, les espèces ne comptant qu'une charge ont été écartées, et 35 % de l'énergie de collision est considérée comme une activation par défaut de 0.25.

Recherche dans les bases de données et identification des protéines.

Les recherches sont réalisées avec le logiciel Thermo Proteome Discoverer 1.4 (V1.4.0.288) et le logiciel MASCOT (V2.3, www.matrixscience.com). La base de données utilisée est la base UniP_tax_Aves (150722 séquences) avec les paramètres suivants : une masse peptidique tolérée de 1.5 Da, une masse des fragments tolérée de 0.5 Da et un maximum de 2 mauvais clivages autorisé. L'identification d'une protéine était considérée comme valide quand au moins 2 de ses peptides obtenait un score Mascot significatif >48. L'identification de protéines ne comprenant que 2 peptides a été effectuée manuellement.

Cette méthode d'identification n'a pas permis d'annoter l'ensemble de nos spots. Pour ceux-ci, les séquences peptidiques ont été annotées manuellement. Un alignement des séquences a été entrepris à l'aide de BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) sur les protéines non redondantes de la base de données toutes espèces. Pour chaque spot, l'alignement a été fait pour les 3 plus longs peptides et l'annotation était validée selon 3 critères : la e-value, le taux d'homologie et la conservation entre espèces. Trois scénarios sont alors possibles pour l'identification d'un spot : il peut présenter une protéine majoritaire, un mélange d'une même protéine identifiée dans des espèces différentes ou un mélange de différentes protéines. Un spot est alors considéré comme identifié lorsque le pourcentage cumulé de présence d'une protéine atteint 70%.

1.2. Analyse statistique

Normalisation des données

Les valeurs d'intensité obtenues grâce au logiciel Samespots[®] sont normalisées en utilisant la procédure GLM du logiciel SAS[®] afin tenir compte aussi bien des biais techniques de l'électrophorèse bidimensionnelle que des aspects zootechniques. La somme des intensités de chaque gel a été placée en covariable du modèle de normalisation et 6 facteurs ont été retenus :

- L'effet nombre de gaveurs : 3 gaveurs inégalement répartis sur les 3 familles
- L'effet lots d'éclosions : 2 lots d'éclosion
- L'aspect général du gel : les valeurs d'intensité peuvent avoir été biaisées par un gel cassé ou flou.
- L'effet dû à la première dimension d'électrophorèse : 30 séries d'IEF de 12 gels.
- L'effet dû à la deuxième dimension d'électrophorèse : 2 groupes de SDS-PAGE par série d'IEF
- L'interaction entre les deux dimensions d'électrophorèse : 60 niveaux correspondant à l'ordre chronologique de passage des échantillons.

Les intensités de spot ainsi normalisées correspondent alors aux valeurs résiduelles de ce modèle et seront utilisées pour les analyses qui suivent.

Tableau 6: Répartition en quartiles des valeurs phénotypiques.

	Quartile 1	Quartile 2	Quartile 3	Quartile 4
pfoie (g)	394 ± 75	531 ± 27	621 ± 25	731 ± 59
txfonte (%)	18,7 ± 5,1	34,8 ± 5	46,5 ± 2,5	55,2 ± 3,9
protFoie (%)	6,2 ± 0,4	7,1 ± 0,2	7,9 ± 0,2	9,4 ± 1,0
txprotF (%)	9,0 ± 0,7	10,7 ± 0,4	12,4 ± 0,5	16,3 ± 2,9
lipFoie(%)	44.4 ± 4.8	50.9 ± 1.1	54.1 ± 0.8	57.2 ± 1.3
txlipF (%)	74.7 ± 3.8	79,2 ± 0.6	81,1 ± 0.5	82.9 ± 0.9

pfoie : poids de foie, txfonte : taux de fonte exprimé en pourcentage du poids du produit fini, protFoie et txprotF : teneurs en protéines exprimées en pourcentage du poids de foie frais et sec, respectivement ; lipFoie et txlipF : teneurs en lipides exprimées en pourcentage du poids de foie frais et sec, respectivement.

Analyses de variance – expressions différentielles

Nous nous sommes intéressés à 6 caractères : le poids de foie (**pfoie**), le taux de fonte (**txfonte**), le taux de protéines estimé sur matière fraîche (**protFoie**) et celui estimé sur matière sèche (**txprotF**), puis dans un second temps, au taux de lipides estimé sur matière fraîche (**lipFoie**) et au taux de lipides estimé sur matière sèche (**txlipF**). Pour chaque caractère, les échantillons ont été regroupés en 4 groupes de valeur correspondant aux 4 quartiles (**Tableau 6**).

Pour chacun des 6 caractères (ayant 294 valeurs d'échantillons) et chacune des 326 intensités de spot, nous avons entrepris une analyse par ANOVA en utilisant la procédure GLM du logiciel SAS[®]. Trois effets ont été pris en compte :

- L'effet de la répartition des échantillons en groupes de valeurs : 4 quartiles pour chaque caractère.
- L'effet famille : nos échantillons se répartissent en 3 groupes de famille
- L'interaction des deux effets précédents : 12 niveaux

Les p-values obtenues ont été corrigées par la méthode de Benjamini-Hochberg. Pour chaque caractère et chaque effet fixe, les 326 p-values (p) sont triées dans l'ordre décroissant : la première valeur porte le rang (k) 0 et la dernière, le rang 325. La p-value corrigée (q) se définit comme tel : $q = p \left(\frac{326}{326-k} \right)$. L'effet d'un caractère sur un spot est alors déclaré significatif lorsque $q < 0,1$. Pour chaque caractère, les moyennes des quartiles ont été comparées 2 à 2 (6 tests par caractère) pour déterminer les différences significatives entre quartiles. Le seuil de significativité a été corrigé par la méthode de Bonferroni : le seuil de 5 % a été divisé par 6. Les spots présentent une expression différentielle entre 2 quartiles lorsque p-value $< 0,05 / 6$.

Régression – Expression différentielle

Une deuxième méthode a été utilisée afin d'évaluer l'effet de la valeur phénotypique sur le niveau d'expression des spots. Une régression a été entreprise entre les valeurs de chaque caractère et les abondances de chaque spot par la procédure REG du logiciel SAS[®]. Les p-values ont ensuite été corrigées par la méthode de Benjamini-Hochberg de la même manière que précédemment. Les spots étaient considérés comme significativement affectés par un caractère lorsque la p-value corrigée équivalait à $q < 0,1$.

2. Détections de QTL et de pQTL

2.1. Détections de QTL uni-caractère

Les détections de QTL ont été entreprises sur les femelles BC de notre dispositif comme décrit précédemment. Les détections ont été faites via le logiciel QTLMAP (Elsen et al. (1999), V0.9.6.) par analyse de liaison selon la méthode de cartographie d'intervalle (Lander et Botstein, 1989), caractère par caractère. Les détections ont été effectuées en considérant qu'un seul QTL par chromosome pouvait influencer la distribution des caractères. A chaque intervalle, deux hypothèses ont été testées :

- H0 : Il n'y a pas de QTL influençant la distribution du caractère
- H1 : Il y a un QTL qui influence la distribution du caractère

Le rapport des vraisemblances H1/H0 est alors calculé. La significativité du rapport des vraisemblances a été estimée à l'aide de 10000 simulations selon la méthode de Churchill et Doerge (1994). Les QTL sont alors considérés significatifs lorsque le maximum de vraisemblance atteint le seuil de 5% au niveau du chromosome. Les détections de QTL liés aux caractères de qualité du foie gras ont été entreprises de la même manière que Kileh-Wais *et al.* (2013). Les caractères étudiés sont le poids de foie, le taux de fonte, le taux de lipides, le taux de protéines, le taux de collagène, la luminance du foie, l'indice de couleur rouge et l'indice de couleur jaune, ainsi que les abondances de protéines correspondant à chaque spots protéiques. Tous les caractères ont préalablement été corrigés pour des effets fixes en utilisant la procédure GLM du logiciel SAS[®]. Pour tous les caractères, les lots d'éclosion et le nombre de gaveur ont été pris en compte, en ajoutant 4 autres effets détaillés précédemment pour les abondances de protéines. Les valeurs résiduelles de ces modèles ont été conservées et la performance de chaque BC estimée comme étant la moyenne des résiduelles de ses fils mulards.

Lorsque les rapports de vraisemblances présentaient 2 maxima significatifs pour un même chromosome, une analyse a été refaite en considérant que 2 QTL sur le même chromosome pouvaient affecter la distribution d'un même caractère. A chaque intervalle de confiance, deux hypothèses ont alors été testées :

- H1 : Il y a 1 QTL qui influence la distribution du caractère étudié
- H2 : Il y a 2 QTL qui influencent la distribution du caractère étudié

La significativité des rapports de vraisemblance a été estimée de la même manière que précédemment.

Dans un premier temps, ces détections ont été entreprises sur les groupes de liaison de la carte génétique microsatellites en se focalisant sur les GL2c et 9, puis dans un deuxième temps pour les mêmes caractères sur la carte génétique mixant SNP et microsatellites.

2.2. Détection de QTL multi-caractères

Lorsque des QTL uni-caractères co-localisent sur un même intervalle de confiance, les caractères correspondants (caractère de qualité ou spot protéique) ont été associés 2 à 2 afin d'entreprendre des détections de QTL bi-caractères ou 3 par 3 pour des détections de QTL tri-caractères. Les 2 (ou 3) caractères pris en compte sont associés par une analyse discriminante à l'aide du logiciel QTLMAP qui détermine la meilleure combinaison linéaire à chaque locus étudié. Les détections sont alors effectuées à chaque locus par analyse de liaison uni-variée de la combinaison linéaire au locus en question. Deux hypothèses ont été testées :

- H0 : Il n'y a pas de QTL influençant la distribution des caractères
- H2 : Il y a un QTL qui influence la distribution des deux caractères

De la même manière que précédemment, la significativité du rapport de vraisemblance est estimé à l'aide de 10000 simulations. Dans le cas où le QTL bi- (ou tri-)caractères atteint une meilleure significativité que le plus fort des QTL uni-caractères correspondants, nous posons alors l'hypothèse que le QTL étudié est pléiotropique, c'est-à-dire qu'il affecte les 2 (ou 3) caractères considérés en même temps et de la même manière.

OPTIMISATION DE LA POPULATION

Etape 1	7 familles de père F1	382 BC / 1552 mulards
Etape 2	3 familles informatives (2/GL)	150 BC / 672 mulards
Etape 3	BC avec au moins 3 descendants mulards	131 BC / 639 mulards
Etape 4	BC avec allèle au QTL connu	112 BC / 545 mulards
Etape 5	BC d'une fratrie d'au moins 3 BC	98 BC / 472 mulards
Etape 6	Exactement 3 mulards choisis par BC	98 BC / 294 mulards

Figure 15 : Critères d'optimisation de la population

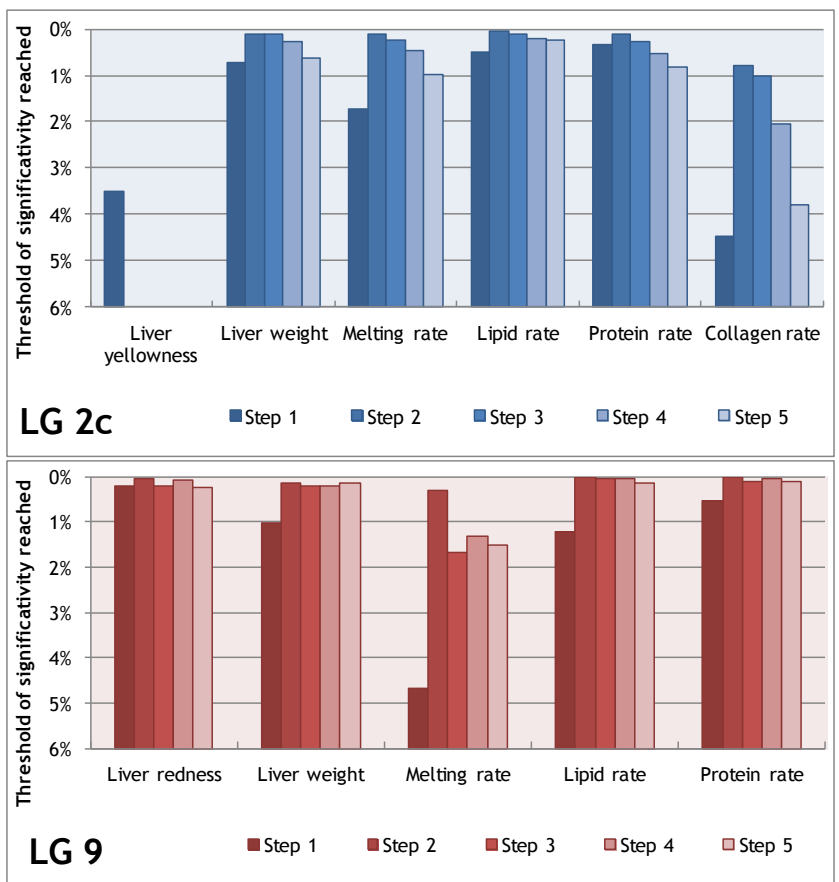


Figure 16 : Significativité atteinte par les QTL détecté à chaque étape d'optimisation.

Le dispositif animal initial est composé de 7 mâles F1 correspondant à nos 7 pères de familles, de 382 femelles BC ainsi que de 1552 canards mulards. Afin de pouvoir mener à bien les analyses par protéomique et par transcriptomique, réduire le nombre d'animaux à étudier s'est avéré nécessaire. Nous avons donc choisi d'optimiser la population à étudier en gardant une structure familiale et en se focalisant sur les familles de plus grand intérêt pour l'étude de la qualité du foie gras. L'optimisation s'est donc faite en suivant différents critères de « sélection » et a porté aussi bien sur les mères BC que sur leurs fils mulards (**Figure 15**).

1. Etapes d'optimisation de la population de canes Backcross

Les premières détections de QTL effectuées sur les caractères de qualité du foie avaient mis en évidence 11 QTL co-localisant sur 2 groupes de liaisons. Parmi les 7 familles du dispositif, 3 participaient majoritairement aux vraisemblances des QTL : les familles 1 et 7 (43963 et 57900 respectivement) pour le GL 2c et 1 et 6 (43963 et 57893, respectivement) pour le GL 9. Nous avons donc choisi de conserver ces 3 familles (1, 6 et 7) d'intérêt pour notre dispositif optimisé.

- Pour s'assurer une estimation des performances des BC suffisamment robuste, les BC comptant moins de 3 mulards ($N=1$ ou 2) dans leur descendance ont été écartées.
- Parmi ces canes, seules celles informatives, c'est-à-dire dont les allèles paternels sont connus à $p>0,95$, sont gardées car elles sont utiles à la détection de QTL.
- Enfin, pour ne pas introduire un biais qui correspondrait à un effet grand-maternel, les canes appartenant à une fratrie de moins de 3 sœurs BC ont été écartées.

Dans le but de suivre l'évolution de la significativité des QTL initiaux avec la réduction de l'effectif, des détections de QTL ont été entreprises pour les caractères de qualité du foie à chaque étape, sur les deux groupes de liaison (**Figure 16**). Le passage de 7 familles (étape 1) aux 3 familles d'intérêt (étape 2) améliore la significativité de 10 des 11 QTL initiaux. Cette amélioration s'explique par le fait que les 3 familles sélectionnées sont les 3 familles porteuses de ces QTL. La seule exception correspond au QTL lié à l'indice de couleur jaune sur le GL 2c : il est porté par les familles 2 et 6 (43968 et 57893) alors que les familles d'intérêt du GL 2c sont les familles 1 et 7 (43963 et 57900). Les autres étapes (étapes 2 à 5) d'optimisation de la population

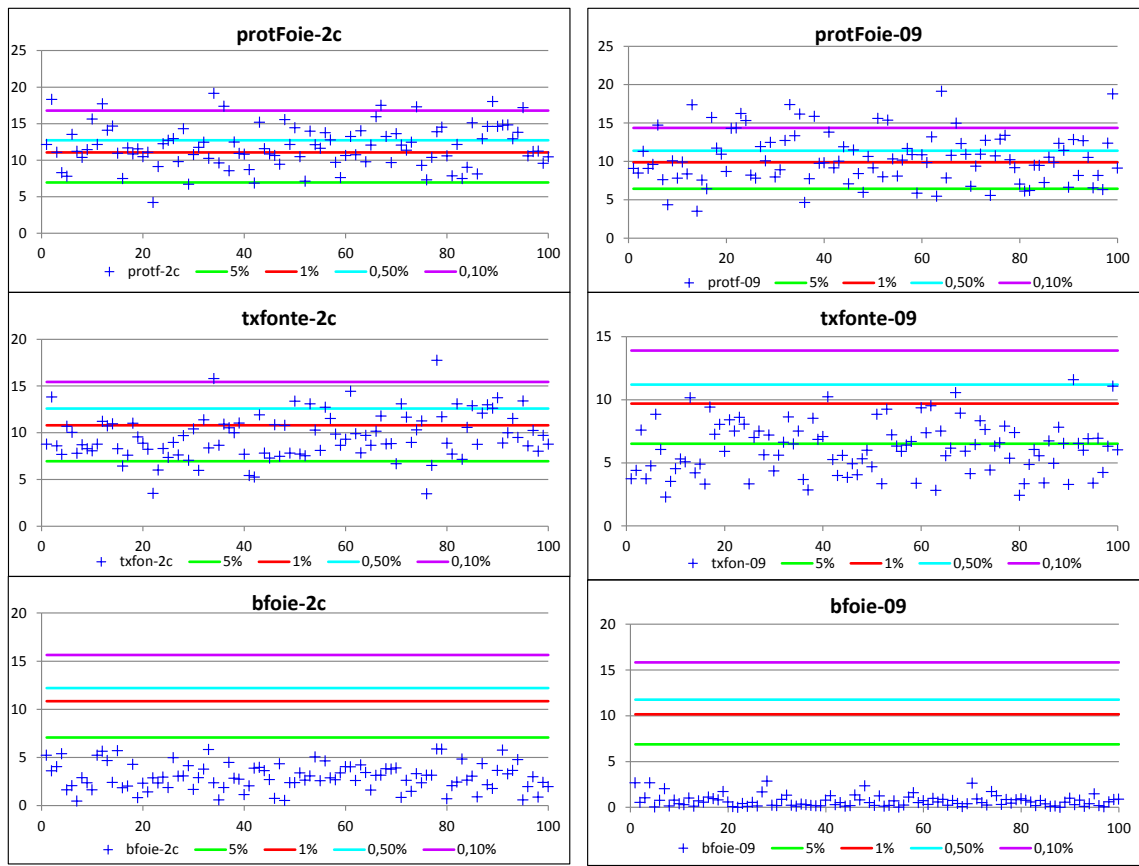


Figure 17 : Seuils obtenus lors de 100 simulations de détection de QTL. Exemples sur 3 caractères.

de BC ne semblent pas affecter drastiquement la significativité des QTL. Si celle-ci a tendance à diminuer, elle ne présente pas d'évolution forte. Ces différentes étapes nous ont ainsi permis de diminuer le nombre de BC étudiées de 382 à 98, portant le nombre de mulards à 472.

2. Etapes d'optimisation de la population de canards mulards

Quatre-cent soixante-douze mulards étant encore un nombre trop important pour entreprendre les analyses envisagées, nous nous sommes fixés un maximum de 300 animaux à ne pas dépasser.

Considérant qu'il était nécessaire de garder un minimum de 3 mulards par cane backcross, nous avons mesuré l'impact d'un choix de 3 mulards par backcross sur la puissance de détection de QTL. Cent tirages aléatoires de 3 mulards parmi N (N=1 à 8) de chaque BC ont été effectués chacun étant suivi d'une détection de QTL pour chacun des deux groupes de liaisons (**Figure 17**).

Sans surprise, si l'on considère un QTL non significatif (bfoie – étape 5), un choix de 3 mulards par BC n'aura pas d'impact sur le seuil de significativité atteint. Si l'on considère un QTL significatif à 5% (txfonte - 2%) à l'étape 5, le risque de perdre ce QTL lors d'un choix aléatoire de 3 mulards par BC est de 57%. En revanche, pour un QTL significatif à 0,5% à l'étape 5 (protFoie), le risque de le perdre lors du choix aléatoire est de 10%. Plus le QTL étudié est fort, moins il risque de disparaître en réduisant la population du dispositif.

Aussi, afin de maximiser nos chances de conserver les QTL existant et pour conserver un dispositif suffisamment robuste, nous avons entrepris un choix orienté de 3 mulards par BC en suivant les deux règles suivantes :

- Conserver les mulards présentant des valeurs de performances extrêmes et un mulard aux performances moyennes afin de conserver la variabilité phénotypique existante sans se limiter aux seuls individus extrêmes.
- Rester au plus proche des performances moyennes initiales des BC : la moyenne sur 3 mulards doit être comparable à la moyenne sur N mulards.

Les caractères pris en comptes pour ces deux critères de sélection sont le poids de foie, le taux de fonte ainsi que les taux de lipides et de protéines. Ce sont 4 caractères majeurs pour la qualité du foie gras. Ce choix de 3 mulards par BC porte le nombre de canards mulards à étudier à 294.

Tableau 7 : Evolution de la significativité des QTL entre l'étape 1 (7 familles) et l'étape 6 (dispositif optimisé).

	GL2c		GL09	
	Etape 1	Etape 6	Etape 1	Etape 6
Taux de fonte	5%	5%	5%	5%
Poids de foie	1%		5%	1%
Teneur en lipides	0.5%	5%	5%	5%
Teneur en protéines	0.5%	5%	1%	1%
Taux de collagène	5%			
Indice de couleur rouge			0.5%	1%
Indice de couleur jaune	5%			
Luminance				

Notre dispositif comporte ainsi 3 familles de pères F1 (43963, 57893, 57900), 98 mères BC et 294 mulards. Des détections de QTL ont ensuite été entreprises afin d'évaluer la puissance de notre dispositif (**Tableau 7**)

Le choix de 3 mulards par BC nous permet de garder une puissance de détection sur 8 des 11 QTL initiaux. La perte de puissance est plus importante sur le GL 2c que sur le GL 9 avec la perte de 3 QTL sur 6. Cependant, le QTL lié à l'indice de couleur jaune a disparu dès l'étape 2 car il n'était pas porté par les familles sélectionnées. De la même manière, la perte du QTL lié au taux de collagène s'explique par le fait que le choix arbitraire des 3 mulards s'est fait au regards des 4 caractères principaux que sont le poids de foie, le taux de fonte, les teneurs en lipides et protéines ; les animaux gardés ne contribuent donc pas à l'existence d'un QTL relatif au taux de collagène. Nous avons tout de même pu conserver une puissance de détection puisque les autres QTL portés par les 3 familles d'intérêt sont toujours présents après réduction de l'effectif utilisé.

**EXPRESSION DIFFERENTIELLE DE
PROTEINES EN RELATION AVEC LES
CARACTERES DE QUALITE DU FOIE
GRAS**

1. Etude des niveaux d'expressions protéiques selon les classes de poids de foie, de taux de fonte, et de teneur en protéines et lipides.

La première partie de ce travail a consisté à étudier les mécanismes impliqués dans la qualité du foie gras à travers une analyse protéomique. Nous avons ainsi étudié les profils d'expression de protéines selon les performances phénotypiques de foies gras de canards mulards. En 2011, Théron *et al.* avaient étudié l'influence de la composition protéique sur la variabilité du taux de fonte pour des foies des gammes de poids et de teneur en lipides équivalents. Plus récemment, Kileh-Wais *et al.* (2013) ont mis en évidence des QTL relatifs aux caractères de qualité comme le poids de foie, le taux de fonte, les teneurs en protéines et lipides.

Cette première étude avait donc pour objectif de déterminer les protéines impliquées dans la variabilité des caractères tels que le poids de foie, le taux de fonte ou encore la teneur en protéines. Des analyses de variances ont été entreprises déterminant ou non des niveaux d'expressions protéiques différents selon la classe de poids, de fonte ou de teneur en protéine du foie. Cette analyse a fait l'objet d'une publication dans le Journal of Agricultural and Food Chemistry (François *et al.* 2014). Les mêmes analyses ont ensuite été entreprises selon les classes de teneur en lipides des foies gras, dans le but de compléter notre étude. Une deuxième méthode d'analyse a ensuite été utilisée : les niveaux d'expression protéique ont été étudiés par régression linéaire, et les résultats obtenus confrontés à ceux provenant de l'ANOVA. Ces trois études sont présentées ici.

1.1. Etude des niveaux d'expressions protéiques selon les classes de poids de foie, de taux de fonte et de teneur en protéines.

Les résultats de cette partie seront présentés au sein de l'article publié suivant :

“Mule duck « Foie gras » shows different metabolic states according to its quality phenotype by using a proteomic approach”

François Y., Marie-Etancelin C., Vignal A., Viala D., Davail S., Molette C. Journal of Agricultural and Food Chemistry 62 : 7140-7150, 2014

Résumé des résultats obtenus.

Les niveaux d'abondance des spots protéiques obtenus par électrophorèse bi-dimensionnelle ont été étudiés selon la classe phénotypique des foies. Les caractères pris en compte dans un premier temps sont le poids de foie (**pfoie** ou **LW** dans l'article), le taux de fonte (**txfonte** ou **MR** dans l'article), les teneurs en protéines estimées sur matière fraîche (**protFoie** ou **LprotCc** dans l'article) et sur matière sèche (**txprotF** ou **LprotDc** dans l'article).

Vingt-trois spots protéiques correspondant à 20 protéines présentent des abondances différentielles selon la classe d'au moins un caractère (poids de foie, taux de fonte, teneur en protéines). Ces protéines appartiennent à différentes voies métaboliques comme la glycolyse, le métabolisme des lipides, la réponse au stress oxydatif, le transport ou encore les processus anaboliques et cataboliques.

Une protéine est différentiellement exprimée selon les trois caractères à la fois (Fatty Acid Synthase - **FASN**), et 7 autres protéines ont des abondances différentielles selon 2 des 3 caractères : FK506 binding protein 4 (**FKBP4**) selon pfoie (**LW**) et txfonte (**MR**) ; ester hydrolase (**C11orf54**), peroxiredoxin 6 (**PRDX6**), alpha-enolase (**ENO1** – spot 1403) selon pfoie (**LW**) et txprotF (**LprotDc**) et apolipoprotein A1 (**APOA1**), albumin (**ALB**) et transitional endoplasmic reticulum ATPase (**VCP**) selon txfonte (**MR**) et txprotF (**LprotDc**). Pour ces 8 protéines, nous avons pu constater des profils d'expression opposés selon les caractères, notamment entre pfoie et txfonte d'un côté et txprotF de l'autre : presque systématiquement, les protéines avec une expression élevée pour des foies lourds et/ou à fonte élevée ont une expression faible pour des foies à forte teneur en protéines, et inversement, les protéines avec une expression élevée pour des foies légers et/ou à fonte faible ont une expression élevée pour des foies à fonte faible et/ou à forte teneur en protéines.

Les 14 spots protéiques restants (correspondant à 12 protéines uniques) sont affectés par un seul des 3 caractères : le poids de foie (**LW**) affecte les abondances des protéines Hypoxia up-regulated protein 1 (**HYOU1**), Annexin 5 (**ANXA5** – spot 1854), Fatty Acis Binding Protein 1 (**FABP1**), Glutamine Synthase (**GS**) et Malic Enzyme (**ME1**), le taux de fonte (**MR**) affecte les protéines Heat shock Protein 70kDa (**HSPA5**), Heat Shock protein 60 kDa (**HSPD1**), S-formylglutathione hydrolase, Mitochondrial inner membrane protein-like (**IMMT**), Dihydrolipoamide S-acetyltransferase (**DLAT**) et Annexin A5 (**ANXA5** – spot 1914) et la teneur

en protéines (**txprotF** ou **LprotDc**) affecte alpha-enolase (**ENO1** – spots 1414 et 1427), Trifunctional enzyme subunit alpha (**HADHA**) et prohibitin (**PHB**).

En regardant la distribution des protéines selon les classes phénotypiques, nous avons pu mettre en évidence 2 groupes en lien avec les 2 tendances d'expression décrites ci-avant. Nous pouvons en effet remarquer que les protéines d'abondance élevée dans les foies lourds, à fonte élevée ou à teneur en protéines faible sont des protéines de réponse au stress, de transport ou de glycolyse alors que les protéines au profil d'expression inverse sont des protéines appartenant aux processus de synthèse, d'anabolisme, de transport ou de régulation de transcription.

Nos résultats montrent ainsi que les foies de fonte faible (<26%) ainsi que les foies légers (<600g) présentent une forte abondance de protéines de l'anabolisme alors que les foies à fonte élevée (>40%) et les foies lourds (>600g) présentent une forte abondance de protéines de réponse au stress qui semble indiquer que les hépatocytes seraient dans un état de cytoprotection.

Mule Duck “Foie Gras” Shows Different Metabolic States According to Its Quality Phenotype by Using a Proteomic Approach

Yoannah François,^{†,‡,§} Christel Marie-Etancelin,^{‡,§} Alain Vignal,^{‡,§} Didier Viala,^Δ Stéphane Davail,[†] and Caroline Molette^{*,‡,§}

[†]Université de Pau et des Pays de l'Adour, UMR5254 Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux – Equipe Environnement et Microbiologie (IPREM-EEM), 40004 Mont de Marsan Cedex, France

[‡]Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage (GenPhySE), F-31326 Castanet-Tolosan, France

^{*}Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse – Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (INPT ENSAT), UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage (GenPhySE), F-31326 Castanet-Tolosan, France

[§]Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse – Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (INPT ENVT), UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage (GenPhySE), F-31076 Toulouse, France

^ΔInstitut National de la Recherche Agronomique, U0370 Plate-Forme d'Exploration du Métabolisme (PFEM), Composante Protéomique, Theix, F-63122 Saint Genès Champanelle, France

Supporting Information

ABSTRACT: This study aimed at identifying the mechanisms implicated in “foie gras” quality variability through the study of the relationships between liver protein compositions and four liver quality phenotypes: liver weight, melting rate, and protein contents on crude or dry matter. Spots of soluble proteins were separated by bidimensional electrophoresis, and the relative abundance of proteins according to quality traits values was investigated. Twenty-three protein spots (19 unique identified proteins) showed different levels of abundance according to one or more of the traits' values. These abundance differences highlighted two groups of livers with opposite trends of abundance levels. Proteins of the first group, associated with low liver weight and melting rate, are involved in synthesis and anabolism processes, whereas proteins of the second group, associated with high liver weight and melting rate, are proteins involved in stress response. Altogether, these results highlight the variations in metabolic states underlying foie gras quality traits.

KEYWORDS: *anabolism, foie gras, mule duck, proteomics, quality traits, stress response*

■ INTRODUCTION

France is the main producer of “foie gras” (72% of world production), and 97% of this production comes from ducks. Foie gras is rich in lipids, and as this high fat content is responsible for its organoleptic qualities, too much fat loss during the cooking process is a major problem. Therefore, to assess quality, the main criterion used is the processing yield, or melting rate, measured by the amount of fat lost during the cooking process. This criterion is regulated on the French market, which imposes a maximum fat loss of 30%.¹ The variability factors of foie gras quality were first studied through the zootechnical^{2,3} and technical aspects.^{4,5} These factors are now well-known and controlled, but the variability in processing yield remains high. Therefore, further studies at the biochemical level were performed. Attempts at finding relationships between lipid composition and foie gras quality failed at finding a link between fatty acid composition and fat loss variability.^{6,7} More recently, Theron et al.⁸ used a proteomics approach to explore the influence of protein composition on fat loss variability for a limited range of liver weight and liver lipid contents. Finally, Kileh-Wais et al.⁹ identified QTL related to several foie gras quality traits such as liver weight, lipid rate, protein rate, melting rate, color lightness,

and collagen rate, although the genes underlying these QTL still have to be discovered.

In this context, the aim of the present study is to decipher mechanisms involved in the quality of foie gras by means of a proteomics approach using 2D gel electrophoresis. A larger range of liver weight values is used than in the previous study of Theron et al.⁸ Finally, to deepen our understanding of the mechanism underlying foie gras quality variability, more complex traits are measured, namely, the proportion of protein content in crude liver (crude liver protein content) and in dry liver (dry liver protein content) in addition to the classical liver weight and melting rate traits. It can be noted that the two protein content traits are very highly correlated and are also correlated to the melting rate in either a phenotypic¹⁰ or genetic point of view.¹¹ The proteomics approach allowed the identification of proteins present at different levels of abundance in the samples studied, in relation to the melting rate level alone or to the other traits. Thereafter, biological pathway analysis gives some information on the metabolic state

Received: February 11, 2014

Revised: May 11, 2014

Accepted: June 29, 2014

Published: June 30, 2014

of the livers in relation to their phenotypes and allows us to better understand the biological mechanisms underlying the variations of foie gras technological quality. This could in turn suggest new and more adapted farming practices aimed at reducing variability.

MATERIALS AND METHODS

Experimental procedures were performed in accordance with French National Guidelines for the care and use of animals for research purposes (Certificate of Authorization to Experiment on Living Animals no. 7740, Ministry of Agriculture and Fish Products).

Animal Design. The animals studied here are male mule ducks, produced within the framework of a QTL detection experiment based on a grandson design,⁹ in which they are measured to estimate the value of their common duck (*Anas platyrhynchos*) mothers. Two common duck parental lines were crossed: the heavy Pekin INRA37 and the Kaiya INRA444 to produce 7 F1 males, of which 3 were mated to 20 INRA444 female common ducks to produce 98 backcross (BC) female common ducks in 3 F1 half-sib families. These BC ducks were then crossed with 23 Muscovy (*Cairina moschata*) drakes to produce a total of 294 mule ducks in two hatching batches. The mule ducks were bred from 0 to 12 weeks of age in growing batches of 50 animals.¹¹ At 12 weeks of age, ducks were overfed in two successive series for a period of 12 days. Each overfeeding series was performed by two different crammers (one for the morning and one for the evening and a total of three crammers for all batches). Animals were slaughtered at the end of the overfeeding period. Livers were sampled at 20 min post-mortem by a small slit in the animal abdomen and frozen in liquid nitrogen for biochemical analyses. Carcasses were refrigerated for 24 h at 4 °C. Then, they were eviscerated and livers collected for foie gras preparation.

Data Recording. Liver Quality Traits. Phenotypic measures were collected on mule ducks. Liver weights (LW) were collected just after evisceration at 24 h post-mortem. The liver melting rate (MR), corresponding to fat loss during cooking, is measured by sterilizing 60 g of refrigerated liver for 50 min at 105 °C. It is expressed as a percentage of the liver quantity before cooking. Protein contents were estimated using a near-infrared spectrophotometer (FOSS NIRSystem) on ground liver.¹² The results are expressed as a percentage of fresh liver weight (crude liver protein content, LprotC, %) or as a percentage of dry liver weight (dry liver protein content, LprotDc, %) to limit the impact of liver lipid contents on the trait.

Analyses of Soluble Proteins by Bidimensional Electrophoresis. The bidimensional electrophoresis method for foie gras analyses was described by Theron et al.⁸ and was performed here on the foie gras samples of all 294 mule ducks taken at 20 min post-mortem.

For protein extraction, the fatty liver samples, stored frozen at -80 °C, were ground in liquid nitrogen to obtain a fine powder. Three hundred micrograms of this powder was then homogenized in a low ionic strength buffer (LIS), 40 mM Tris-HCl (pH 8), at 4 °C in a ratio of 1:4 (w/v) using a glass bead agitator MM400 (Retsch, Haan, Germany). The homogenate was centrifuged at 4 °C for 10 min at 10000g and the fat cake supernatant was removed before a second homogenization was performed. After the second centrifugation, the supernatant containing the soluble protein fraction was collected and stored at -80 °C. The protein concentration was determined by using the Bradford¹³ assay (Bio-Rad).

To perform bidimensional electrophoresis, 500 µg of proteins was incorporated in a buffer composed of 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS (w/v), 0.4% carrier ampholyte (v/v), 1% DTT (w/v), and bromophenol blue. For the first dimension, samples were loaded onto immobilized pH gradient strips (pH 5–8, 17 cm, Bio-Rad), and isoelectric focusing (IEF) was performed using a Protean IEF cell system (Bio-Rad). Strips were first passively rehydrated for 16 h, after which a rapid voltage ramping was applied until a total of 86 kVh was reached. IEF was followed by successive incubation in an equilibration buffer containing 1% DTT and another containing 2.5% iodoacetamide and bromophenol blue. These buffers were both composed of 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, and 50 mM Tris-HCl, pH 8.8.

Equilibrated strips were loaded for the second dimension for a 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using a Protean II XL system (Bio-Rad). After migration, gels were rinsed three times in permuted water and stained overnight with Coomassie Blue (Fermentas Page Blue). IEF was performed on 30 series of 12 samples and for each IEF series, SDS-PAGE was performed on 2 series of 6 samples, according to the capacities of our IEF and SDS-PAGE devices. Some damaged or unreadable gels were redone and a total of 360 gels made.

Two hundred and ninety-four stained gels were scanned using an Image Master 2D Platinum (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), and the spots quantifications were done with SameSpots software (TotalLab Ltd., Newcastle-upon-Tyne, UK). As the general aspect of a gel has an impact on the quality of the image analyses, problems concerning the aspect of the gels were recorded by annotating them in three categories: clear (no problem with the gel), blurred, and broken. Spot matching was performed across all 294 gels. Artifacts and spots detected by the software but not visible to the naked eye were removed from the analyses. The software calculated the intensity of each of the 326 remaining spots for each of the 294 samples.

Differentially expressed spots were manually excised from the gels using pipet tips and sent to the proteomics platform in Clermont-Ferrand (PFEMcp, INRA, Clermont-Ferrand Theix, France) for identification.

Spot Identification. Protein Digestion. The spots were destained with 100 µL of 25 mM NH₄HCO₃ with acetonitrile 95:5 (v/v) for 30 min and then washed twice in 100 µL of 25 mM NH₄HCO₃ with acetonitrile 50:50 (v/v) before dehydration in 100% acetonitrile. Gel spots were completely dried using a Speed Vac, and trypsin digestion was performed at 37 °C over 5 h with 12 µL of trypsin (12.5 ng/µL; V5111, Promega) in 25 mM NH₄HCO₃. Peptide extraction was optimized by adding 9.6 µL of acetonitrile 100%, followed by 10 min of sonication. Then tryptic digests were concentrated for 5 min in a SpeedVac to eliminate acetonitrile and transferred to HPLC tubes, before LC-MS/MS analysis.

Nano-LC-MS/MS Analysis. For nano-LC-MS/MS analysis, peptide mixtures were analyzed by online nanoflow liquid chromatography using an Ultimate 3000 RSLC (Dionex, Voisins le Bretonneux, France). Eight microliters of peptide mixture was first preconcentrated at a flow rate of 20 µL/min with a nano trap column of 5 cm length × 100 µm i.d., (Acclaim PepMap 100 C18, 5 µm, 100A nanoViper) equilibrated with trifluoroacetic acid 0.05% in water and then analyzed according to its hydrophobicity with a nanocapillary column of 15 cm length × 75 µm i.d., 2 µm, 100 Å (Acclaim PepMap 100 C18, Dionex) equilibrated with 0.5% formic acid in water. The solvent gradient increased linearly from 4 to 50% acetonitrile in 0.5% formic acid at a flow rate of 300 nL/min for 45 min. Identifications were attempted using an LTQ VELOS mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France). The eluate was electrosprayed in positive-ion mode at 2.7 kV through a nanoelectrospray ion source that was operated in a CID top 10 mode (i.e., 1 full scan MS and the 10 major peaks in the full scan were selected for MS/MS). Full-enhanced-scan MS spectra were acquired with 1 microscan (m/z 400–1400), and dynamic exclusion was used with 2 repeat counts, 20 s repeat duration, and 120 s exclusion duration. For MS/MS, the isolation width for ion precursor was fixed at 1 m/z and single charged species were rejected; fragmentation used 35% normalized collision energy as the default activation of 0.25.

Database Search and Protein Identification. For raw data processing, Thermo Proteome Discoverer 1.4 (v: 1.4.0.288) was used with MASCOT (v 2.3) for database search (<http://www.matrixscience.com>). UniProt tax_Aves (150722 sequences) was used as database for protein identification, and the following parameters were considered for the searches: peptide mass tolerance was set to 1.5 Da, fragment mass tolerance was set to 0.5 Da, and a maximum of 2 missed cleavages was allowed. Moreover, variable modifications were methionine oxidation (M) and carbamidomethylation (C) of cysteine. Protein identifications were considered as valid if at least two peptides with a statistically significant Mascot score >48 were assigned. Ion score is $-10 \log(P)$, where P is the probability that the observed match

is a random event. Individual ion scores >48 indicate identity or extensive homology at $p < 0.05$.

Identifications with only two unique peptides were manually validated with criteria of match fragment ions (occurrence of uninterrupted y- or b-ion series of at least three consecutive amino acids, preferred cleavages N-terminal to proline bonds, and mass accuracy).

The identification method was not able to annotate all of the analyzed spots of our set. For these spots, a manual annotation was performed on the basis of the peptide sequences given by the mass spectrometer. Alignments of the peptide sequences were done using BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) on the nonredundant protein sequences database using all of the species. For each spot, alignment was done for the three longer peptides, and the validation of the spot annotation depended on three criteria. The e value had to be $<10^{-3}$ and the homology rate, 100%. The conservation between species was also checked. A spot was considered accurately identified as a protein when the cumulated percentage of this protein was >70%.

Statistical Analyses. Spot intensities were normalized using the GLM procedure of the SAS software to take simultaneously into account the technological effects of the bidimensional electrophoresis and the zootechnical effects. The sum of spot intensities of each gel was treated as a covariate, and six fixed effects were defined: (i) crammer effect (3 crammers); (ii) hatching batch effect (2 batches); (iii) general aspect of the gels (3 classes); (iv) first electrophoresis dimension effect (30 isoelectrofocusing series of 12 samples each); (v) second electrophoresis dimension effect (2 SDS-PAGE groups per isoelectrofocusing series); and (vi) interaction of both dimensions (60 levels corresponding to the chronological running order of the samples). Normalized spot intensities are the residual values of this model and will be used for all subsequent statistical analyses.

For each of the four traits considered (LW, MR, LprotCc, and LprotDc), foie gras samples were classified into four quartile groups (Q1, Q2, Q3, and Q4) according to their phenotypic values. For each of the 4 traits and each of the 326 normalized spot intensities, ANOVAs were performed using the GLM procedure of the SAS software across the 294 samples, taking 3 effects into account: the quartile group (4 levels), the F1 family group (3 levels), and the interaction between both, denoted quartile*family (12 levels). p values obtained were corrected by the Benjamini–Hochberg method. For each trait and each fixed effect, the 326 p values were sorted in descending order: the first value had the rank (k) 0 and the last had the rank 325. The corrected p value (q) was then defined as $q = p((326/(326 - k)))$. Effects for a spot were declared significant when $q < 0.1$. For each trait, quartile means were compared pairwise, that is, six tests. The significance threshold was then corrected using the Bonferroni method: the 5% threshold was divided by 6 (the number of tests performed). Spots were considered to be at significantly different levels between two quartiles when the p value was $p < 0.05/6$.

RESULTS

Association between Protein Abundance Levels and Phenotypic Traits. Quartiles of the phenotypic traits are represented in Table 1. For liver weight (LW), values range between 204 and 911 g and quartile means are 394 g for Q1,

Table 1. Repartition in Quartiles of Phenotypic Values^a

	Q1	Q2	Q3	Q4
LW (g)	394 ± 75	531 ± 27	621 ± 25	731 ± 59
MR (%)	18.7 ± 5.1	34.8 ± 5	46.5 ± 2.5	55.2 ± 3.9
LprotCc (%)	6.2 ± 0.4	7.1 ± 0.2	7.9 ± 0.2	9.4 ± 1.0
LprotDc (%)	9.0 ± 0.7	10.7 ± 0.4	12.4 ± 0.5	16.3 ± 2.9

^aLW, liver weight; MR, melting rate expressed as a percentage of the liver quantity before cooking; LprotCc, crude liver protein content expressed as a percentage of the fresh liver weight; LprotDc, dry liver protein content expressed as a percentage of the dry liver weight.

531 g for Q2, 621 g for Q3, and 731 g for Q4. Quartiles 1 and 4 are more variable than the other two with values ranging over almost 300 g. For melting rate (MR), values range between 7.4 and 70.9% and quartile means are 18.7% for Q1, 34.8% for Q2, 46.5% for Q3, and 55.2% for Q4. The first quartile is the more variable with values ranging over 20%. For crude liver protein content (LprotCc) values go from 4.98 to 13.66%. Quartile means are 6.2, 7.1, 7.9, and 9.4% from the first to the fourth, respectively. Dry liver protein content (LprotDc) is almost twice higher than crude protein content with values going from 7.23 to 28.02%. Quartile means are 9, 10.7, 12.4, and 16.3% from the first to the fourth, respectively.

For each of the four traits (LW, MR, LprotCc, and LprotDc), the number of spots found at different levels according to the quartile, family, or quartile*family interaction effects was tested by ANOVA, and 1304 statistical tests were performed altogether (4 phenotypic traits × 326 spots each). Thirty-five spots were found significantly affected by the quartile group after correction for multiple testing, only two by the F1 family affiliation of the individuals and one by the quartile*family interaction effect. It is noteworthy that the family affiliation affects the same two spots for each of the four traits and that LprotCc is the only trait for which no spot was affected by the quartile effect. Taken trait by trait, 17, 17, 0, and 16 spots are significantly affected by the LW, MR, LprotCc, and LprotDc quartile groups, respectively. However, some spots are common to several traits (Figure 1A): three spots are affected by the



Figure 1. Venn diagram of the 35 differential proteins (A) and of the 23 identified proteins (B) affected by the phenotypic traits. Numbers correspond to the number of spots of protein affected by one, two, or three traits. LW, liver weight; MR, melting rate; LprotDc, dry liver protein rate.

three traits LW, MR, and LprotDc, one spot is affected by both LW and MR, three spots are affected by both LW and LprotDc, and four spots are affected by both MR and LprotDc. Nine spots are affected by only LW, nine by MR, and six by LprotDc.

Among the 35 spots affected by the phenotypic traits quartile groups, only 26 could be accurately identified. Three of them were attributed to keratin, which is considered as a contaminant in proteomics analyses, and the 23 remaining ones correspond to 20 unique proteins, 2 of which identified in several spots. α -Enolase was identified in three spots (spots 1403, 1414, and 1427) and annexin A5 in two spots (spots 1854 and 1914). For each protein, the spots were found at the same molecular weight but with different isoelectric points (Figure 2), suggesting different isoforms of the same protein. Among these 23 protein spots, 15 had a variation in abundance following a single trait only (LW, MR, or LprotDc), whereas the 8 remaining spots were differentially present following two or three traits simultaneously (Figure 1B). The 20 proteins showing variation in our data set represent several biological

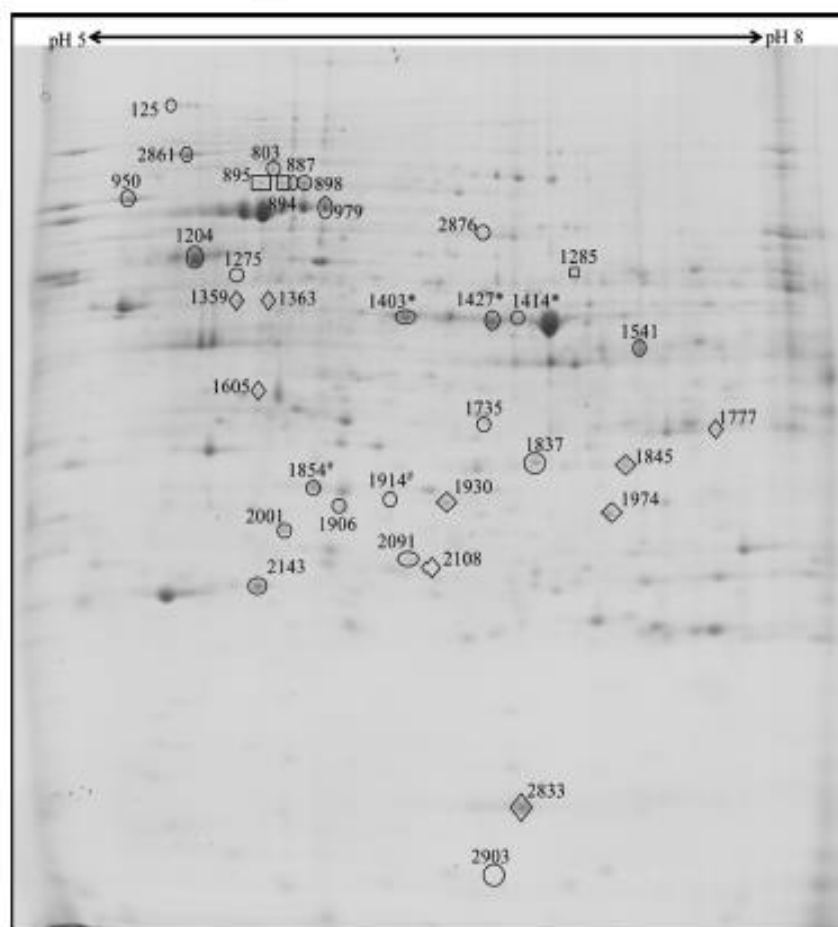


Figure 2. Two-dimensional gel electrophoresis representing a map of duck fatty liver soluble proteins. The first dimension separated the proteins according to their isoelectric point between pH 5 and 8. The second dimension separated the proteins according to their molecular weight in a 12% acrylamide gel. The 35 spots differentially expressed are represented. Spots surrounded by circles correspond to identified proteins, spots surrounded by squares correspond to keratin, and spots surrounded by diamonds correspond to nonaccurately identified spots. The star symbols or the hash symbols after spot numbers indicate that the spots correspond to the same protein.

pathways (Table 2) such as glycolysis, lipid metabolism, oxidative stress, transport, catabolism, and anabolism processes.

Variation of Protein Abundance Specific to a Single Trait. Five unique proteins were found at different levels according to LW values only (Appendix 1 in the Supporting Information). All showed significant differences between the lightest livers (Q1, LW < 486g) and the heaviest ones (Q4, LW > 661g). The hypoxia up-regulated protein 1 (HYOU1), annexin A5 (one of the two spots of ANXAS, spot 1854), and fatty acid binding protein 1 (FABP1) showed higher levels in the heaviest than in the lightest livers, whereas the glutamine synthetase (LOC100545435) and the malic enzyme (ME1) showed conversely lower levels in the heaviest than in the lightest. Of these five proteins, HYOU1 appeared to be particularly specific to LW values because the corrected *p* values for MR and LprotDc are >50%.

Six unique proteins corresponding to six identified spots were found to be at different levels according to MR values only (Appendix 2 in the Supporting Information). These proteins showed differences between low-melting livers (Q1, MR < 23%) and high-melting ones (Q3 or Q4, MR > 44%). The 70 kDa heat shock protein (HSPA5), the 60 kDa heat shock protein (HSPD1), and the *S*-formylglutathione hydrolase showed higher levels in the highest melting livers than in the lowest melting ones, whereas mitochondrial inner membrane

protein-like (IMMT), dihydrolipoamide *S*-acetyltransferase (DLAT), and annexin A5 (the second spot of ANXAS, spot 1914) showed the inverse. With their corrected *p* value >50% for LW and LprotDc, HSPD1 and IMMT seemed to be specific to MR values.

Three unique proteins corresponding to four spots were found at different levels according to LprotDc values (Appendix 3 in the Supporting Information). Remarkably, all of these proteins show significant differences between the livers with the lowest overall protein content (Q1, LprotDc < 8.5%) and the ones with high content (Q4, LprotDc >15.5%). α -Enolase was identified in two different spots (ENO1, spots 1414 and 1427), and both spots have lower levels in livers with the overall highest protein content. The two other proteins, trifunctional enzyme subunit α (HADHA) and prohibitin (PHB), showed higher levels in the protein-rich livers than in the protein-poor ones.

Variation of Protein Abundance Common to Two or Three Traits. Eight proteins corresponding to eight spots (Appendix 4 in the Supporting Information) showed different levels of abundance between the first quartile and the third or the fourth, for at least two traits. Among them, seven proteins were found expressed at different levels according to two traits simultaneously. FK506 binding protein 4 (FKBP4) was affected by LW and MR and showed a higher level in the heaviest and

Table 2. Characteristics of the 35 Spots Differentially Expressed^a

spot no.	accession no.	gene symbol	protein name	Mascot score	Σ coverage	Σ no. of peptides	no. of AA	MW ^b (kDa)	pI ^b	%	GO identifier/process
spots accurately identified as protein with an accumulated percentage >70%											
125	FINW05	HYOU1	hypoxia up-regulated protein 1	331	22.82	17	986	110.8	5.25	100	GO:0006950/response to stress
803	GUOJ4	BMT	mitochondrial inner membrane protein-like	204	9.17	6	698	77.9	5.74	63.1	GO:0051560/mitochondrial calcium ion homeostasis
	H0ZK6	BMT	mitochondrial inner membrane protein-like	82	3.83	3	757	83.5	7.17	36.9	
887	GIMM8	HADHA	trifunctional enzyme subunit α	364	18.03	10	771	82.9	9.10	100	GO:0006635/fatty acid β-oxidation
894	GIMW1	KRT	keratin	81	8.43	4	344	39.9	4.70	60.8	
	GINEY8	KRT	keratin	255	16.09	8	522	57.0	8.09	39.2	
898	EIC6N5	DLAT	diacylglycerol acetyltransferase	1917	27.37	10	632	66.5	7.84	45.3	GO:0006090/pyruvate metabolic process
	GIMZJ8	DLAT	diacylglycerol acetyltransferase	1719	32.26	11	530	55.9	6.11	54.8	
950	A0ZT13	HSPAS	heat shock protein 70 kDa	2121	34.36	20	652	71.9	5.22	100	GO:0006950/response to stress
979	I6U3L8	ALB	albumin	1995	45.37	24	615	69.6	5.86	91.2	GO:0006810/transport
1204	I3QJ5	HSPD1	heat shock protein 60 kDa	8080	73.24	35	568	60.5	5.64	98.7	GO:0006950/response to stress
1275	H0ZSE5	FKBP4	FK506 binding protein	77	21.75	7	446	50.6	6.18	100	GO:0006463/steroid hormone receptor complex assembly
1285	GINEY8	KRT	keratin	321	10.92	6	522	57.0	8.09	100	
1403	P19140	ENO1	α-enolase	4700	65.21	28	434	47.2	6.80	92.1	GO:0006096/glycolysis
	P19140	ENO1	α-enolase	2427	65.21	28	434	47.2	6.80	72.5	
1427	P19140	ENO1	α-enolase	5356	65.21	28	434	47.2	6.80	69.1	
	P51913	ENO1	α-enolase	4038	53.23	20	434	47.3	6.58	26.0	
1541	GIMW53	LOC100545435	glutamine synthetase	466	24.93	8	373	42.2	6.98	77.1	GO:0006542/glutamine biosynthetic process
1735	H0ZJH8	C11orf54	ester hydrolase C11orf54	171	22.15	4	316	34.8	6.24	100	GO:0016788/hydrolase activity
1837	GINQ47	LOC100545718	S-formylglutathione hydrolase	402	22.34	5	282	31.5	6.61	100	GO:0046294/formaldehyde catabolic process
1854	GINDY6	ANXA5	annexin A5	1498	40.57	12	318	35.8	5.80	51.2	GO:0005544/calcium-dependent phospholipid binding
	H0YUM4	ANXA5	annexin A5	1454	37.97	11	316	35.4	5.20	46.9	

Table 2. continued

spot no.	accession no.	gene symbol	protein name	Mascot score	Σ coverage	Σ no. of peptides	no. of AAs	MW ^a (kDa)	pI ^b	%	GO identifier/process
1906	B8XNP2	FASN	fatty acid synthase	467	59.78	4	92	10.1	5.73	88.3	GO:0004312/fatty acid synthase activity
1914	H0YUM4	ANXA5	annexin A5	72	37.97	11	316	3.54	5.20	100	GO:0005544/calcium-dependent phospholipid binding
2001	P84173	PI3B	prohibitin	N/A	56.62	14	272	2.99	5.76	100	GO:0006355/regulation of transcription
2091	FINBV0	PRDX6	peroxiredoxin-6	1703	43.75	8	224	2.51	6.38	75	GO:0006979/response to oxidative stress
2143	O42296	APOA1	apolipoprotein A1	1398	63.64	19	264	30.6	5.54	93.6	GO:0006869/lipid transport
2861	Q5ZMU9	VCP	transitional endoplasmic reticulum ATPase	6502	64.52	40	806	89.3	5.26	100	GO:0006511/ubiquitin-dependent protein catabolic process
2876	G1NLV4	ME1	malic enzyme	162	10.05	4	557	62.0	7.06	100	GO:0006108/malate metabolic process
2903	D7REA1	FABP1	basic fatty acid binding protein	564	64.29	9	126	14.0	8.40	89	GO:0006810/transport
spots presenting a protein mix without any protein of percentage >70%											
895	G1MVW1	KRT	keratin	101	8.43	4	344	39.9	4.70	38.1	
	G1NEY8	KRT	keratin	392	16.09	8	522	57.0	8.09	25.7	
1359	FINCZ2	GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor β	287	18.48	5	433	49.0	5.73	49.8	
	FI3F1	AHCY	adenosylhomocysteine	154	32.42	13	438	48.2	7.06	29.2	
	G1MZD6	HMGCS2	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	65	5.35	3	505	55.1	7.36	25.0	
1363	Q2ZAJ7	ACTB	β-actin	93	58.18	16	373	41.5	5.48	39.6	
	FI3F1	AHCY	adenosylhomocysteine	110	32.42	13	438	48.2	7.06	33.3	
	G1NEY8	KRT	keratin	201	10.92	6	522	57.0	8.09	27.1	
1605	P19140	ENO1	α-enolase	N/A	15.44	4	434	47.2	6.80	N/A	
	FINPD1	LOC395933	uncharacterized protein	N/A	19.55	4	312	36.1	5.87	N/A	
1777	BSG179	MDH	malate dehydrogenase	446	34.73	10	334	36.5	6.58	26.1	
	G1N071	LOC100539955	malate dehydrogenase	429	33.53	8	334	36.5	7.36	26	
	BSF3R6		pyruvate aldo-keto reductase family 7 member A2 variant 1	702	28.86	5	246	27.6	8.95	16.9	
	H9HIS2	GPD1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	169	49.19	6	185	20.1	7.88	11.7	
2108	FINBV0	PRDX6	peroxiredoxin-6	98	43.75	8	224	2.51	6.38	23.8	
	BSF3D0	PSMA	proteasome subunit α type	80	33.74	9	246	27.4	6.89	21.1	
	Q70I43	TRI	triosephosphate isomerase	93	67.30	11	211	22.6	6.64	31.4	

Table 2. continued

spot no.	accession no.	gene symbol	protein name	Mascot score	Σ coverage	Σ no. of peptides	no. of AAs	MW ^a (kDa)	pI ^b	%	GO identifier/process
	Q5ZKQ2	RCJMB04_95	uncharacterised protein	105	18.49	3	238	24.9	6.90	23.8	
2833	DOEKR3	PH	peptidyl-prolyl di- α -trans isomerase	103	10.91	2	165	17.8	8.09	51.7	
	GINNP7	LOC100544220	superoxide dismutase	672	15.67	2	134	13.6	6.60	48.3	
			spots with no protein identified								
			1845								no protein identified
			1930								no protein identified
			1974								no protein identified

^aMW, molecular weight; pI, isoelectric point; GO, gene ontology; NA, not available; %, probability of identifying this protein. ^bpI and molecular are the theoretical ones.

highest melting livers. Ester hydrolase (C11orf54), peroxiredoxin 6 (PRDX6), and α -enolase (one of the three spots of ENO1, spot 1403) were affected by LW and LprotDc. The three proteins showed higher levels in the heaviest livers. Apolipoprotein A1 (APOA1), albumin (ALB), and transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP) were both affected by MR and LprotDc, but their variation profiles of abundance were different. Indeed, VCP showed higher levels both in the high protein content and the high-melting livers, whereas APOA1 and ALB showed similarly higher levels in the high protein content livers, but lower levels in the high-melting ones.

Fatty acid synthase (FASN) was the only protein for which the level of abundance varied with the three traits: it was present at a significantly higher level in the lightest weight and lowest melting livers (first quartile) than in the other ones (second, third, and fourth quartiles) and at a significantly lower expression level in protein-poor livers than in the other ones (first quartile versus second, third, and fourth quartiles).

Biological Pathways. For the eight protein profiles for which variation in protein abundance levels concerns two or three traits, a remarkable opposition appeared between the trend of protein expression with LW and MR levels, on the one hand, and LprotDc level, on the other hand. If the protein expression level increased with LW (FKBP4, C11orf54, PRDX6, ENO1), it also increased with MR or decreased with LprotDc. Inversely, if the protein expression level decreased with MR (APOA1, ALB, and FASN), it increased for LprotDc, with the notable exception of VCP. Using this information, the data set was split into two groups: group A was composed of proteins decreasing with MR or LW and/or increasing with LprotDc, and the "mirror" group B corresponded to proteins increasing with MR or LW and/or decreasing with LprotDc (Figure 3). The submission of the entire data set of proteins identified to IPA (Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) helped in highlighting the relationships between protein through a network and in identifying the biological pathways. Proteins of group A represent pathways such as synthesis process (LOC100545435, FASN), anabolism process (DLAT, ME1), transcription regulation (PHB), and transport (APOA1, ALB). Proteins of group B represent biological pathways such as response to stress (HYOU, HSPAS, HSPD1, and PRDX6), transport (FABP1), glycolysis (ENO1), and catabolism process.

DISCUSSION

The aim of this work is to highlight possible differences in liver metabolic state, monitored by the analysis of the variation of protein levels in tissue samples, according to liver quality phenotypes. The primary focus is on four traits related to the quality of foie gras. However, contrary to what could have been expected, no significantly differential protein was identified for the trait LprotCc, whereas nine were found for LprotDc. The difference between the two traits comes from the way the predicted values of protein content are expressed. Indeed, it can be seen at the phenotypic level because values predicted by near-infrared spectroscopy (NIRS) on dry livers are almost twice higher than values predicted on crude livers. The expression of protein content related to the liver dry matter allows us to take partly into account the lipid content of the livers ($51.6 \pm 5.4\%$). As no significant result was found for LprotCc, we will therefore focus our discussion on the three other traits, namely, LW, MR, and LprotDc. The genetic correlations between LW and MR are strongly positive (+0.80), and LprotDc is negatively correlated to LW (-0.87) and to MR

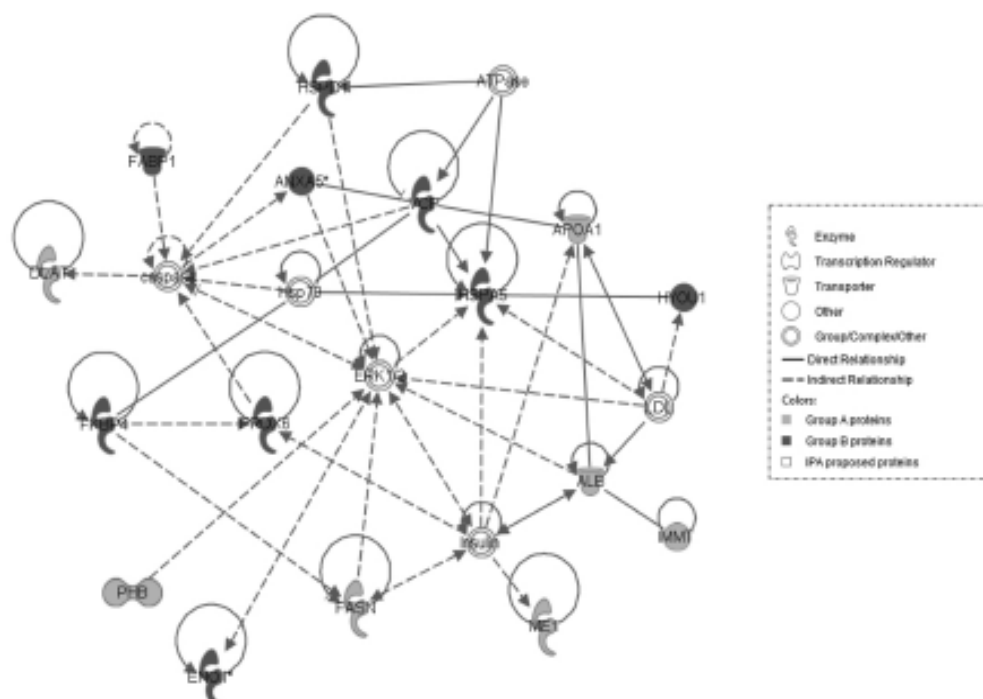


Figure 3. IPA network of hematological disease, immunological disease, and inflammatory disease associated functions representing a subset of 16 of our set of proteins (score of 46). Circled lines indicate self-regulating proteins. ALB, albumin; ANXA5, annexin A5; APOA1, apolipoprotein A1; ATPase, ATP synthase; DLAT, dihydrolipoamide *S*-acetyltransferase; ENO1, α -enolase; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; FABP1, fatty acid binding protein 1; FASN, fatty acid synthase; FKBP4, FK506-binding protein 4; HSP70, 70 kDa heat shock protein; HSPAS, 70 kDa heat shock protein 5; HSPD1, 60 kDa heat shock protein; HYOU1, hypoxia up-regulated protein 1; IMMT, mitochondrial inner membrane protein-like; LDL, low-density lipoprotein; ME1, malic enzyme; PHB, prohibitin; PRDX6, peroxiredoxin 6. The proteins included in the network are the proteins included in IPA database.

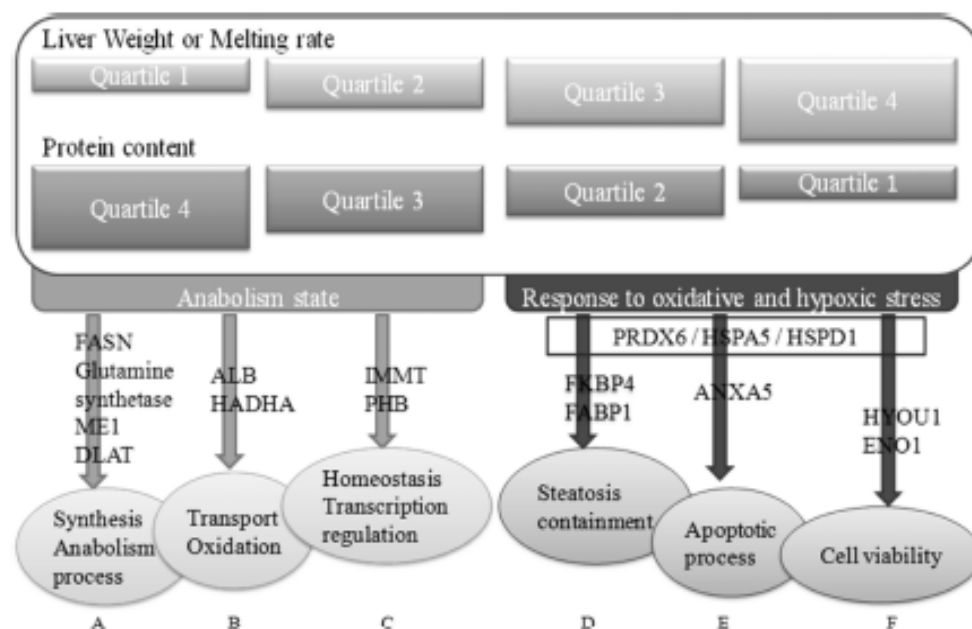


Figure 4. Summary diagram of the different liver protein profiles (from A to F) according to their phenotype. FASN, fatty acid synthase; ME1, malic enzyme; DLAT, dihydrolipoamide *S*-acetyltransferase; ALB, albumin; HADHA, trifunctional enzyme subunit α ; APOA1, apolipoprotein A1; IMMT, mitochondrial inner membrane protein-like; PHB, prohibitin; PRDX6, peroxiredoxin 6; HSPAS, 70 kDa heat shock protein 5; HSPD1, 60 kDa heat shock protein; FKBP4, FK506-binding protein 4; FABP1, fatty acid binding protein 1; ANXA5, annexin A5; HYOU1, hypoxia up-regulated protein 1; ENO1, α -enolase.

(-0.87).¹¹ The phenotypic correlation between LW and MR is $+0.67$, and the phenotypic correlations between LprotDc and

LW or MR are strongly negative (-0.78 or -0.79 , respectively) (unpublished data).

Proteins of group A belong to six gene ontology (GO) processes (Table 2): transport (ALB, APOA1), oxidation (HADHA), transcription regulation (PHB), biosynthetic and metabolic processes (DLAT, glutamine synthase, ME1, FASN), mitochondria homeostasis (IMMT), and phospholipid binding (ANXA5). The biological functions of these proteins are summarized in Figure 4. During overfeeding, duck and geese develop an important steatosis due to an intense lipogenic activity and an insufficient exportation rate of triglycerides in the peripheral tissues. This activity was observed at an enzymatic level by Chartrin et al.,¹⁴ who showed an increased activity of ME1 induced by overfeeding. At the transcriptomic level, studies showed an increased expression of FASN, ME1,^{15,16} APOA1,¹⁵ and DLAT¹⁶ due to overfeeding. FASN is the enzyme synthesizing fatty acids. Both ME1 and DLAT are proteins involved in the malate and pyruvate metabolic processes, respectively. APOA1 is a lipid transporter from the liver to the peripheral tissues. Our results are consistent with the biological functions of these enzymes as they are present at higher levels, as well as glutamine synthase (LOC100545435) (proteins of the group A, Figure 4A). FASN, ME1, and glutamine synthase (LOC100545435) were indeed overexpressed in livers of low weight compared to heavy ones. Héroult et al.¹⁵ also reported negative correlations between liver weight and APOA1, FASN, and ME1 gene expressions in duck. These results suggest that when liver weight increases, a negative regulation occurs to reduce lipogenesis. FASN, IMMT, DLAT, APOA1, and ALB were also overexpressed in livers of low melting rate (up to 26%). In a study aiming at determining the proteomic profile of low and high MR livers with the same weight and lipid content, Théron et al.⁸ showed that enolase 1, triose phosphate isomerase, malate dehydrogenase, mitochondrial carrier homologue 2, and several ribosomal proteins are present at high levels in low MR livers. In the present study, we do not point out the same proteins. However, the biological functions of the proteins at differential levels are close in both studies. Taken together, these data suggest that livers with low MR are performing anabolic processes. ALB, HADHA, PHB, and FASN were overexpressed in livers with high protein content. To our knowledge, this is the first time that such a differential expression between different liver protein contents is reported. Finally, group A proteins were at high levels in light livers, low-melting ones, and livers rich in proteins; we can hypothesize that these livers were in a higher anabolic state, leading to a more intense lipid synthesis. They also showed a significantly decreased expression when liver weights increased, when melting rate increased, or when protein content decreased. In all three traits (LW, MR, and LprotDc), the significantly decreasing expression of these proteins was followed by the overexpression of proteins of group B (Figure 4).

Proteins of group B belong to six GO processes (Table 2): response to stress (HYOU, HSPA5, HSPD1, PRDX6), glycolysis (ENO1, three isoforms), transport (FABP1), hydrolase activity (C11orf54), catabolic process (*S*-formylglutathione hydrolase), and steroid receptor (FKBP4). PRDX6 is an antioxidant enzyme induced by the increase of reactive oxygen species (ROS) levels and providing protection against oxidative injury,¹⁷ its level was found higher both in heavy livers (>581 g) and in livers of low protein content (<10%). On the contrary, PRDX6 is underexpressed in simple steatosis compared to normal livers in rat.¹⁸ Other cytoprotective proteins such as HSPA5 and HSPD1 were at higher levels in

high-melting livers (>45%), assessing the development of cytoprotection mechanisms. Similarly, Théron et al.⁸ reported a higher expression of heat shock protein 27 in high MR livers. Another kind of stress seems to occur only in heavy livers: hypoxia stress is suggested by the overexpression of HYOU1 (also named 150 kDa oxygen-regulated protein (ORP150)) in livers of weight >581 g. This protein seems to be specific to the high-weight livers, as for the two other traits it is highly nonsignificant (p value >50%). This hypoxia-induced protein was described as helping the cell to face stress induced by the lack of oxygen by its protective role to avoid apoptotic cell death.¹⁹ If protein-poor and high-melting livers seem to develop protection against oxidative stress, heavy livers seem to accumulate stresses, with both oxidative and hypoxia stresses.

The proteomics results suggest that the livers are trying to cope with the high amount of lipid synthesized by using different pathways. The first one is by containing the steatosis development (Figure 4D), as suggested by the overexpression of FKBP4 and FABP1 in heavy livers (>581 g). FKBP4 (also known as FKBP52) belongs to the family of immunophilin and plays a role in immunoregulation and basic cellular processes involving protein folding and trafficking. It is also a regulator of glucocorticoid receptor activity. When deficient mice for FKBP52 are fed a high-fat diet, there was a high expression of lipogenic genes such as FASN and an underexpression of gluconeogenic genes in the liver. Finally, the livers of these mice exhibited high lipid content and a steatosis.²⁰ In our study, FKBP52 is overexpressed when the liver's weight and melting rate increased. On the contrary, FASN and ME expressions decreased. From this, we can speculate that the overexpression of FKBP52 could reduce lipogenesis and, thus, steatosis. FABP1 is the liver isoform of the fatty acid binding protein mainly implicated in lipid transport from liver to peripheral tissues. Results from the literature concerning this protein are inconsistent. Indeed, when comparing normal livers and livers with a simple steatosis by two-dimensional electrophoresis gels, Charlton et al.²¹ found an overexpression of FABP1 in simple steatosis in humans, whereas Zhang et al.¹⁸ pointed out an underexpression of the same protein in simple steatosis in rat. Moreover, Théron et al.⁸ identified the adipocyte isoform, FABP4, as overexpressed in high melting rate livers. It was shown that FABP1 is a positive regulator of PPAR α and of FASN,²² but because our results do not show any overexpression of both FASN and FABP1 in the same group, we can only speculate that FABP1 has a cytoprotective role in exporting fatty acids.

The second pathway proposed to cope with the intense steatosis is apoptosis (Figure 4E). ANXA5 is a calcium-dependent phospholipid binding protein mainly known as a membrane apoptotic marker. In plasma or extracellular tissues, it also has anticoagulant and antithrombotic properties.²³ It is a widely expressed protein in the liver²⁴ and was overexpressed in the soluble proteome of heavy livers but also in low-melting livers. Even if apoptosis is a common phenomenon for tissues to regenerate, it can be associated with disease such as steatosis in mammals. In the livers of patients suffering from nonalcoholic steatohepatitis (NASH), there is consistently an enhanced Fas expression, activation of caspase-3 and -7, and apoptosis, which positively correlated with biochemical and histopathological markers of liver injury.²³ However, in human livers with a simple steatosis, apoptosis evaluated by a Fas score is not different from normal livers.²⁵ In the present study, ANXA5 is overexpressed in the heaviest livers and in the lowest

MR ones. The network constructed by IPA (Figure 3) also shows that four proteins (FABP1, ANXAS, VPC, and HSPD1) are linked with caspases. It could emphasize that livers in which these proteins increased with MR or LW and/or decreased with LprotDc could be more prone to develop steatosis.

The third pathway proposed is the stress response to support cell viability (Figure 4F), suggested by both HYOU1 and α -enolase (ENO1). ENO1 is a gluconeogenesis enzyme implicated in growth control and hypoxia tolerance. Its implication in hepatocellular carcinoma (HCC) was described by Hamaguchi et al.²⁶ In HCC, ENO1 activation by hypoxia-induced factor 1 α (HIF-1 α) implicated an increased HCC aggressiveness, whereas ENO1 knockdown inhibited HCC proliferation. ENO1 was overexpressed in livers of low protein content and in heavy livers like HYOU1, described as a suppressor of hypoxia-induced apoptotic cell death.¹⁹ Both proteins promote cell survival and even cell proliferation, suggesting that, despite stress, cell viability is supported.

The high level of proteins of anabolism processes in livers with melting rates up to 26% and of stress response proteins in livers with melting rates >40% confirm what was found by Theron et al.⁵ with a fixed weight and fixed lipid content, livers of low melting rate were in anabolism, whereas livers of high melting rate developed protection mechanisms. Concerning liver weight, we were able to distinguish two different metabolic states according to the liver weight value: an anabolism state in light livers (<600 g) and a cytoprotection state in heavy livers (>600 g). In a kinetic study, Bax et al.²⁷ reported that during the first half of the overfeeding period, livers were in anabolism (overexpression of FASN), whereas they developed protection mechanisms during the second period. In the present study, similarly, the lightest livers, lowest melting livers, and livers rich in protein still exhibit higher levels of proteins involved in lipogenesis, whereas the heaviest ones show higher expression of stress response proteins. We can wonder if the first group of livers has a better control of steatosis or if steatosis is just delayed. On the contrary, the second group of livers showed a development of protection mechanisms and seemed to have reached an overphysiological point.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Appendixes 1–4. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(C.M.) Phone: +33 5 34 32 39 06. Fax: +33 5 34 32 39 01. E-mail: molette@ensat.fr.

Funding

We thank the Institut National de la Recherche Agronomique and the Institut National Polytechnique Toulouse for funding the research chair of the corresponding author.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ REFERENCES

- Décret no. 93-999 du 09-08-93 du JO du 14-08-93, relatif aux préparations à base de foie gras. *J. Off. Repub. Fr.* 1993.
- Babilé, R.; Auvergne, A.; Setiawan, I.; Joly, E.; Latil, G. Conduite alimentaire au cours du gavage des canards et qualité technologique du foie gras. *1re Journ. Rech. Palmipèdes Foie Gras, Bordeaux, Fr.* 1993, 107–116.
- Latil, G.; Auvergne, A.; Babilé, R. Consommation du canard mulard en gavage. Relation avec les performances zootechniques et la qualité du foie gras. *2e Journ. Rech. Palmipèdes Foie Gras, Bordeaux, Fr.* 1996, 93–97.
- Rousselot-Pailley, D.; Guy, G.; Gourichon, D.; Sellier, N.; Blum, J. C. Influence des conditions d'abattage et de réfrigération sur la qualité des foies gras d'oie. *INRA, Prod. Anim.* 1992, 5, 167–172.
- Bouillier-Oudot, M.; Leprettre, S.; Dubois, J. P.; Babilé, R. Itinéraires post mortem et caractéristiques technologiques et organoleptiques des foies gras d'oies. *5e Journ. Rech. Palmipèdes Foie Gras, Pau, Fr.* 2002, 172–175.
- Baudonnet, C. *Facteurs de Variation de la Composition Biochimique et de la Qualité Technologique des Foies Gras de Canard*. Thèse de doctorat, INP, Toulouse, France, 1993.
- Molle, W.; Bouillier-Oudot, M.; Auvergne, A.; Babilé, R. Changes in lipid composition of hepatocyte plasma membrane induced by overfeeding in duck. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 2005, 141, 437–444.
- Théron, L.; Fernandez, X.; Marty-Gasset, N.; Fichereaux, C.; Rossignol, M.; Chambon, C.; Viala, D.; Astruc, T.; Molette, C. Identification by proteomic analysis of early post-mortem markers involved in the variability in fat loss during cooking of mule duck "foie gras". *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 12617–12628.
- Gilch-Wais, M.; Elsen, J. M.; Vignal, A.; Feves, K.; Vignoles, F.; Fernandez, X.; Manse, H.; Davail, S.; André, J. M.; Bastianelli, D.; Bonnal, L.; Filangi, O.; Baéza, E.; Guéméné, D.; Genêt, C.; Bernadet, M. D.; Dubos, F.; Marie-Etancelin, C. Detection of QTL controlling metabolism, meat quality, and liver quality traits of the overfed interspecific hybrid mule duck. *J. Anim. Sci.* 2013, 91, 588–604.
- Théron, L.; Cullere, M.; Bouillier-Oudot, M.; Manse, H.; Dalle Zotte, A.; Molette, C.; Fernandez, X.; Vitezica, Z. G. Modeling the relationships between quality and biochemical composition of fatty liver in mule ducks. *J. Anim. Sci.* 2012, 90, 3312–3317.
- Marie-Etancelin, C.; Basso, B.; Davail, S.; Gontier, K.; Fernandez, X.; Vitezica, Z. G.; Bastianelli, D.; Baéza, E.; Bernadet, M.-D.; Guy, G.; Brun, J.-M.; Legarra, A. Genetic parameters of product quality and hepatic metabolism in fattened mule ducks. *J. Anim. Sci.* 2011, 89, 669–679.
- Marie-Etancelin, C.; Fernandez, X.; Baéza, E.; Bonnal, L.; Bernadet, M. D.; Manse, H.; Chartrin, P.; Bastianelli, D. Genetic parameters of fatty liver and breast muscle composition predicted by near-infrared spectroscopy. *9th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod., Leipzig Germany* 2010, 1–4.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.
- Chartrin, P.; Bernadet, M.-D.; Guy, G.; Mourou, J.; Hocquette, J.-F.; Rideau, N.; Duclos, M. J.; Baéza, E. Does overfeeding enhance genotype effects on liver ability for lipogenesis and lipid secretion in ducks? *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.* 2006, 145, 390–396.
- Héroult, F.; Saez, G.; Robert, E.; Al Mohammad, A.; Davail, S.; Chartrin, P.; Baéza, E.; Diot, C. Liver gene expression in relation to hepatic steatosis and lipid secretion in two duck species. *Anim. Genet.* 2010, 41, 12–20.
- Zhu, L. H.; Meng, H.; Duan, X. J.; Xu, G. Q.; Zhang, J.; Gong, D. Q. Gene expression profile in the liver tissue of geese after overfeeding. *Poult. Sci.* 2011, 90, 107–117.
- Newton, B. W.; Russell, W. K.; Russell, D. H.; Ramaiah, S.; Jayaraman, A. Liver proteome analysis in a rodent model of alcoholic steatosis. *J. Proteome Res.* 2009, 8, 1663–1671.
- Zhang, X.; Yang, J.; Guo, Y.; Ye, H.; Yu, C.; Xu, C.; Xu, L.; Wu, S.; Sun, W.; Wei, H.; Gao, X.; Zhu, Y.; Qian, X.; Jiang, Y.; Li, Y.; He, F. Functional proteomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease in rat models: enoyl-coenzyme A hydratase down-regulation exacerbates hepatic steatosis. *Hepatology* 2010, 51, 1190–1199.

(19) Ozawa, K.; Kurwbara, K.; Tamatani, M.; Takatsuji, K.; Tsukamoto, Y.; Kaneda, S.; Yanagi, H.; Stern, D. M.; Eguchi, Y.; Tsujimoto, Y.; Ogawa, S.; Tohyama, M. 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 6397–6404.

(20) Warner, M.; Hinds, T. D.; Ledford, K. J.; Cash, H. A.; Patel, P. R.; Bowman, T. A.; Stechschulte, L. A.; Yong, W.; Shou, W.; Najjar, S. M.; Sanchez, E. R. Susceptibility to diet-induced hepatic steatosis and glucocorticoid resistance in FK506-binding protein 52-deficient mice. *Endocrinology* **2010**, *151*, 3225–3236.

(21) Charlton, M.; Viker, K.; Krishnan, A.; Sanderson, S.; Veldt, B.; Kaalsbeek, A. J.; Kendrick, M.; Thompson, G.; Que, F.; Swain, J.; Sarr, M. Differential expression of lumican and fatty acid binding protein-1: new insights into the histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2009**, *49*, 1375–1384.

(22) He, J.; Tian, Y.; Li, J.; Shen, J.; Tao, Z.; Fu, Y.; Niu, D.; Lu, L. Expression pattern of L-FABP gene in different tissues and its regulation of fat metabolism-related genes in duck. *Mol. Biol. Rep.* **2013**, *40*, 189–195.

(23) Guicciardi, M. E.; Gores, G. J. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* **2005**, *54*, 1024–1033.

(24) Boustead, C. M.; Brown, R.; Walker, J. H. Isolation, characterization and localization of annexin V from chicken liver. *Biochem. J.* **1993**, *291* (Part 2), 601–608.

(25) Feldstein, A. E.; Canbay, A.; Angulo, P.; Taniai, M.; Burgart, L. J.; Lindor, K. D.; Gores, G. J. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* **2003**, *125*, 437–443.

(26) Hamaguchi, T.; Iizuka, N.; Tsunedomi, R.; Hamamoto, Y.; Miyamoto, T.; Iida, M.; Tokuhisa, Y.; Sakamoto, K.; Takashima, M.; Tamesa, T.; Oka, M. Glycolysis module activated by hypoxia-inducible factor 1 α is related to the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2008**, *33*, 725–731.

(27) Bax, M. L.; Chambon, C.; Marty-Gasset, N.; Remignon, H.; Fernandez, X.; Molette, C. Proteomic profile evolution during steatosis development in ducks. *Poult. Sci.* **2012**, *91*, 112–120.

“Mule duck « Foie gras » shows different metabolic states according to its quality phenotype by using a proteomic approach”

François Y., Marie-Etancelin C., Vignal A., Viala D., Davail S., Molette C. Journal of Agricultural and Food Chemistry 62 : 7140-7150, 2014

SUPPORTING INFORMATION

Appendix 1. Proteins differentially expressed only for liver weight (LW).

Accession number	Spot number	Gene symbol	Protein name	LW p-value	Q1-Q2	Q1-Q3	Q1-Q4	Q2-Q3	Q2-Q4	Q3-Q4
F1NY05	125	HYOU1	Hypoxia up-regulated protein 1	0.0047	NS	↗*	↘*	NS	NS	NS
G1MW53	1541	LOC100545435	Glutamine synthetase	0.0029	↘**	↘*	↘*	NS	NS	NS
G1NDY6	1854	ANXA5	Annexin A5	0.0001	NS	↗***	↗***	NS	↗*	NS
G1NLV4	2876	ME1	Malic enzyme	0.0032	NS	NS	↘*	NS	↘**	NS
D7REA1	2903	FABP1	Fatty acid binding protein 1	0.0002	NS	NS	↗*	↗**	↗**	NS

NS: non-significant, *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001. Significance thresholds take into account Bonferroni correction. Increasing arrows indicates a higher expression of the protein in second quartile mentioned compared to the first one. On the contrary, decreasing arrows indicates a lower expression.

Appendix 2. Proteins differentially expressed only for melting rate (MR).

Accession number	Spot number	Gene symbol	Protein name	MR p-value	Q1-Q2	Q1-Q3	Q1-Q4	Q2-Q3	Q2-Q4	Q3-Q4
G3UQJ4	803	IMMT	Mitochondrial inner membrane protein-like	0.0007	NS	NS	↘***	NS	NS	NS
E1C6N5	898	DLAT	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase	0.003	NS	NS	↘**	NS	NS	NS
A0ZT13	950	HSPA5	70kDa Heat shock protein 5	0.005	NS	NS	NS	↗**	NS	NS
I3QII5	1204	HSPD1	60 kDa Heat shock protein	0.0037	NS	↗*	NS	NS	NS	↘*
G1NQ47	1837	LOC100545718 (ESD)	S-formylglutathione hydrolase	0.0008	↗*	NS	↗***	NS	NS	NS
H0YUM4	1914	ANXA5	Annexin A5	0.0009	↘**	↘***	↘*	NS	NS	NS

NS: non-significant, *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001. Significance thresholds take into account Bonferroni correction. Increasing arrows indicates a higher expression of the protein in second quartile mentioned compared to the first one. On the contrary, decreasing arrows indicates a lower expression.

Appendix 3. Proteins differentially expressed only for dry liver protein rate (LprotDc).

Accession number	Spot number	Gene symbol	Protein name	LprotDc p-value	Q1-Q2	Q1-Q3	Q1-Q4	Q2-Q3	Q2-Q4	Q3-Q4
G1NMS8	887	HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha	0.0034	NS	↘**	↘*	NS	NS	NS
P19140	1414	ENO1	Alpha enolase	0.001	NS	NS	↘**	NS	NS	↘**
P19140	1427	ENO1	Alpha-enolase	0.001	NS	NS	↘***	NS	NS	↘**
P84173	2001	PHB	Prohibitin	0.0024	↘**	↘*	↘**	NS	NS	NS

NS: non-significant, *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001. Significance thresholds take into account Bonferroni correction. Increasing arrows indicates a higher expression of the protein in second quartile mentioned compared to the first one. On the contrary, decreasing arrows indicates a lower expression.

Appendix 4. Proteins differentially expressed according to 2 or 3 traits.

Accession number	Spot number	Gene symbol	Protein name	p-value	Q1-Q2	Q1-Q3	Q1-Q4	Q2-Q3	Q2-Q4	Q3-Q4	
H0ZSE5	1275	FKBP4	FK506 –Binding Protein 4	LW	0.0006	NS	↘***	↘**	NS	NS	NS
				MR	0.0039	NS	↘**	NS	NS	NS	NS
H0ZRI8	1735	C11orf54	Ester hydrolase	LW	0.0003	NS	↘*	NS	↘***	NS	NS
				LprotDc	0.0019	NS	↘*	↘**	NS	NS	NS
F1NBV0	2091	PRDX6	Peroxiredoxin 6	LW	0.0006	NS	↘**	↘**	NS	NS	NS
				LprotDc	0.0002	NS	NS	↘***	NS	↘*	↘**
P19140	1403	ENO1	Alpha-enolase	LW	0.0011	NS	↘*	↘**	NS	NS	NS
				LprotDc	0.0012	NS	↘*	↘***	NS	NS	NS
I6U3L8	979	ALB	Albumin	MR	0.0005	NS	↘**	↘*	↘*	NS	NS
				LprotDc	0.0002	NS	↘*	↘**	↘*	↘**	NS
O42296	2143	APOA1	Apolipoprotein A 1	MR	0.0023	NS	NS	↘***	NS	↘***	NS
				LprotDc	0.0018	↘**	↘**	↘**	NS	NS	NS
Q5ZMU9	2861	VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	MR	0.002	NS	↘**	NS	↘*	NS	NS
				LprotDc	0.004	NS	NS	↘**	NS	↘**	NS
B8XNP2	1906	FASN	Fatty acid synthase	LW	0.0002	NS	↘***	↘**	NS	NS	NS
				MR	0.0004	↘*	↘**	↘***	NS	NS	NS
				LprotDc	0.0001	NS	NS	↘***	NS	↘***	↘**

NS: non-significant, *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001. LW: liver weight; MR: melting rate; LprotDc: dry liver protein content. Significance thresholds take into account Bonferroni correction. Increasing arrows indicates a higher expression of the protein in second quartile mentioned compared to the first one. On the contrary, decreasing arrows indicates a lower expression.

Tableau 8 : Répartition en quartiles des valeurs phénotypiques correspondant aux teneurs en lipides. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type.

	Quartile 1	Quartile 2	Quartile 3	Quartile 4
lipFoie (%)	44,4 ± 4,8	50,9 ± 1,1	54,1 ± 0,8	57,2 ± 1,3
txlipF (%)	74,7 ± 3,8	79,2 ± 0,6	81,1 ± 0,5	83,0 ± 0,9

lipFoie et txlipF : Teneurs en lipides estimées sur matière fraîche (exprimé en pourcentage du poids de foie frais) et sur matière sèche (exprimée en pourcentage du poids de foie sec).

Tableau 9 : Abondance différentielle des protéines selon lipFoie.

N° accession	N° spot	Symbole du gène	Nom de la protéine	p_value non corrigée	Q1-Q2	Q1-Q3	Q1-Q4	Q2-Q3	Q2-Q4	Q3-Q4
P19140	1427	ENO1	Alpha-enolase	0,003	↗ *	NS	↗ ***	NS	NS	↗ *
H0ZRI8	1735	C11orf54	Ester hydrolase	0,0002	↗ *	↗ *	↗ ***	NS	↗ *	↗ *
P19140	1403	ENO1	Alpha-enolase	0,0015	NS	NS	↗ ***	NS	↗ **	NS

NS: non-significatif, *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001. Les seuils de significativité donnés tiennent compte de la correction par Bonferroni. Les flèches montantes indiquent une plus forte expression de la protéine. Au contraire, une flèche descendante indique une plus faible expression.

1.2. Complément de l'article : étude des niveaux d'expressions protéiques selon les classes de teneurs en lipides.

L'étude repose strictement sur le même « matériel et méthode » que celui de l'étude précédente, mais nous avons exploré en plus l'influence des classes de teneurs en lipides sur l'abondance des protéines. De la même manière que pour les teneurs en protéines, 2 mesures de teneurs en lipides ont été utilisées ; la première estimée sur matière fraîche de foies gras (**lipFoie**) et la deuxième sur matière sèche (**txlipF**). Comme pour les précédents caractères, les 294 foies de l'étude ont été répartis en 4 classes de valeurs correspondant aux 4 quartiles (**Tableau 8**). Pour le caractère lipFoie, la gamme de valeurs s'étale de 29% à 60,6%. Les moyennes des quartiles, du 1^{er} au 4^e sont 44,4, 50,9, 54,1 et 57,2%, respectivement. Pour txlipF, la gamme de valeurs s'étale de 59,2% à 85,7% avec des moyennes de quartiles de 74,7, 79,2, 81,1 et 83%, du 1^{er} au 4^e, respectivement. Pour chaque caractère, le quartile 1 est le plus variable des 4, probablement dû à des foies dont les teneurs en lipides sont extrêmement faibles.

Dix-sept spots protéiques sont significativement différentiellement exprimés selon les classes de teneur en lipides des foies (**Tableau 12**). L'identification des spots a mis en évidence 2 spots correspondant à de la kératine, 3 spots correspondant à des mélanges de protéines et 12 spots correspondant à 11 protéines uniques.

Trois spots protéiques (**Tableau 9**) ont des abondances différentielles selon lipFoie (la teneur en lipides mesurée sur matière fraîche) : alpha-enolase (**ENO1** – spots 113 et 304, enzyme de la glycolyse) et ester hydrolase (**C11orf54**, activité hydrolytique). Ces trois spots protéiques augmentent avec la teneur en lipides et sont significativement surexprimés dans le 4^e quartile (teneur en lipides moyenne de 57,20%) par rapport au 1^{er} (teneur en lipides moyenne de 44,38%).

Six spots sont différentiellement exprimés selon txlipF (**Tableau 10**) : FK506-Binding protein 4 (FKBP4, récepteur aux stéroïdes), Annexin 5 (ANXA5, phospholipide calcium-dépendant), Proteasome Subunit Alpha (**PSMA1**, protéolyse) et Fatty Acid binding Protein 1 (FABP1, transport) sont significativement plus exprimés dans les foies à forte teneur en lipides (4^e quartile) que dans ceux à plus faible teneur (1^{er} quartile). En revanche, HADHA est significativement plus exprimé dans le 1^{er} quartile que dans le 4^e et GS est plus exprimé dans le 1^{er} quartile également.

Tableau 10 : Abondance différentielle des protéines selon txlipF.

N° accession	N° spot	Symbole du gène	Nom de la protéine	p_value non corrigée	Q1-Q2	Q1-Q3	Q1-Q4	Q2-Q3	Q2-Q4	Q3-Q4
G1NMS8	887	HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha	0,0012	NS	NS	↘ **	NS	↘ ***	↘ **
H0ZSE5	1275	FKBP4	FK506 –Binding Protein 4	0,0027	↗ **	↗ *	↗ ***	NS	NS	NS
G1MW53	1541	GS	Glutamine Synthase	0,002	↘ ***	↘ **	NS	NS	NS	NS
G1NDY6	1854	ANXA5	Annexin A5	0,0026	NS	↗ *	↗ ***	NS	↗ **	NS
B5FXD0	2104	PSMA1	Proteasome subunit alpha 1	0,0023	↗ **	NS	↗ ***	NS	NS	↗ *
D7REA1	2903	FABP1	Fatty Acid Binding Protein 1	0,0004	NS	NS	↗ ***	NS	↗ ***	↗ **

NS: non-significatif, *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001. Les seuils de significativité donnés tiennent compte de la correction par Bonferroni. Les flèches montantes indiquent une plus forte expression de la protéine. Au contraire, une flèche descendante indique une plus faible expression.

Tableau 11 : Protéines d'abondance différentielle selon lipFoie et txlipF.

N° spot	N° accession	Symbole du gène	Nom de la protéine	p_value non corrigée	Q1-Q2	Q1-Q3	Q1-Q4	Q2-Q3	Q2-Q4	Q3-Q4	
979	I6U3L8	ALB	Albumine	lipFoie	0,0031	NS	↘ **	↘ **	↘ *	NS	NS
				txlipF	0,0023	NS	↘ **	↘ **	↘ **	↘ **	NS
1906	B8XNP2	FASN	Fatty Acid Synthase	lipFoie	0,001	↘ *	↘ *	↘ ***	NS	NS	NS
				txlipF	0,0024	NS	↘ **	↘ ***	NS	↘ *	NS
2001	P84173	PHB	Prohibitin	lipFoie	0,0021	NS	NS	↘ **	NS	↘ *	↘ ***
				txlipF	0,0024	NS	NS	↘ **	NS	↘ **	↘ ***

NS: non-significatif, *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001. Les seuils de significativité donnés tiennent compte de la correction par Bonferroni. Les flèches montantes indiquent une plus forte expression de la protéine. Au contraire, une flèche descendante indique une plus faible expression.

Trois spots protéiques sont différenciellement exprimés simultanément selon les deux caractères estimant la teneur en lipides (**Tableau 11**). Il s'agit de l'albumine (**ALB**, transport), la Fatty acid synthase (**FASN**, activité de synthèse) et la Prohibitin (**PHB**, régulation de la transcription), tous trois significativement moins exprimés au sein des 4^{es} quartiles qu'au sein des 1^{ers} quartiles pour les deux caractères.

Parmi ces différentes protéines, seule PSMA1 n'a pas été identifiée lors de l'ANOVA faite sur les caractères de pfoie (LW), txfonte (MR), protFoie (LprotCc) et txprotF (LprotDc) mais était en limite de signification pour txprotF. PSMA1 fait partie du protéasome et donc est impliquée dans les activités protéolytiques. Elle avait par ailleurs été identifiée par Théron *et al.* 2011 dans des foies gras à fonte élevée. Dans notre étude, elle est significativement plus exprimée au sein des foies à forte teneur en lipides que dans les foies à faible teneur, suggérant une activité protéolytique plus importante dans ces foies. Les autres protéines différenciellement exprimées selon les classes de teneurs en lipides avaient déjà été mises en évidence. Ainsi, GS, ANXA5 (spot1854), FABP1, ENO1 (spot1427) avaient été mises en évidence avec pfoie et HADHA et PHB étaient différenciellement exprimés selon txprotF. FKBP4, C11orf54 et ENO1 (spots1403) avaient été mis en évidence avec pfoie et txprotF. ALB avec txfonte et txprotF et FASN avec les 3 caractères (pfoie, txfonte et txprotF).

De la même manière que lors de l'étude précédente, nous pouvons répartir ces protéines en 2 groupes : un premier groupe de 5 protéines (HAHDA, GS, FASN, ALB et PHB) dont les abondances sont plus élevées dans les foies à faible teneur en lipides et un second groupe de 6 protéines (ENO1, ester hydrolase, FKBP4, ANXA5, PSMA1, FABP1) dont les abondances sont plus élevées dans les foies à forte teneur en lipides. Ces 2 groupes recréent les groupes A et B évoqués dans l'article. En effet, les résultats observés pour ces protéines selon les classes de teneur en lipides sont cohérents avec les corrélations existant entre les caractères. En effet, la teneur en lipides est positivement corrélée génétiquement au poids de foie ($r=0.86$) et au taux de fonte ($r=0.87$) et négativement corrélé à la teneur en protéines ($r=-0.89$ – Marie-Etancelin *et al.* 2011). Il est alors cohérent de retrouver des protéines fortement exprimées dans des foies lourds ou à fonte élevée (FABP1, ENO1, FKBP4) également fortement exprimées dans des foies à forte teneur lipidique et inversement (FASN, GS, ALB, HADHA).

Tableau 12 : Liste des 22 spots identifiés comme protéine et mis en évidence par l'étude de l'expression protéique selon les teneurs en lipides. La protéine mise en évidence uniquement dans cette étude est surlignée. Les autres avaient été identifiés dans l'étude précédente.

N° spot	N° accession	Symbol du gène	Nom de la protéine	Score Mascot	ΣCoverage	Σ# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	%
887	G1NMS8	HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha	364	18,03	10	771	82,9	9,10	100
894	G1MVW1	KRT	Keratine	81	8,43	4	344	39,9	4,70	60,8
	G1NEY8	KRT	Keratine	255	16,09	8	522	57,0	8,09	39,2
979	I6U3L8	ALB	Albumin	1995	45,37	24	615	69,6	5,86	91,2
1275	H0ZSE5	FKBP4	FK506 Binding Protein	77	21,75	7	446	50,6	6,18	100
1403	P19140	ENO1	Alpha – enolase	4700	65,21	28	434	47,2	6,80	92,1
1427	P19140	ENO1	Alpha-enolase	5356	65,21	28	434	47,2	6,80	69,1
	P51913	ENO1	Alpha-enolase	4038	53,23	20	434	47,3	6,58	26
1541	G1MW53	LOC100545435 (GS)	Glutamine synthetase	466	24,93	8	373	42,2	6,98	77,1
1735	H0ZRI8	C11orf54	Ester hydrolase C11orf54	171	22,15	4	316	34,8	6,24	100
1854	G1NDY6	ANXA5	Annexin A5	1498	40,57	12	318	35,8	5,80	51,2
	H0YUM4	ANXA5	Annexin A5	1454	37,97	11	316	35,4	5,20	46,9
1906	B8XNP2	FASN	Fatty acid synthase	467	59,78	4	92	10,1	5,73	88,3
2001	P84173	PHB	Prohibitin	NA	56,62	14	272	29,9	5,76	100
2104	B5FXD0	PSMA1	Proteasome subunit alpha type	654	33,74	9	246	27,4	6,89	71,9
2903	D7REA1	FABP1	Basic fatty acid binding protein	564	64,29	9	126	14,0	8,40	89

L'étude de protéines différemment exprimées selon les classes de teneur en lipides n'ont donc pas réellement permis de mettre en évidence de nouvelles protéines (sauf PSMA1). Cette étude n'est cependant pas à exploiter seule, mais en complément de l'étude réalisée dans l'article. Aussi, nous pouvons compléter le schéma récapitulatif avec les nouvelles informations disponibles (Figure 18).

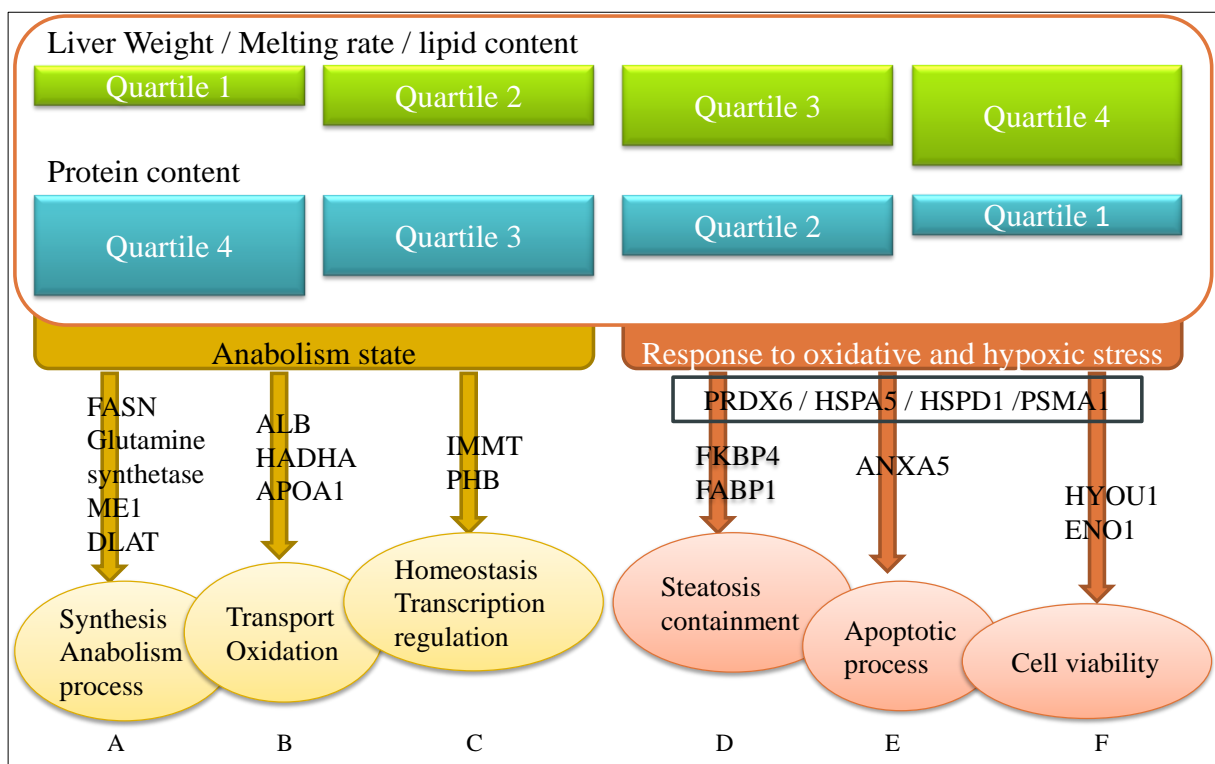


Figure 18 : Schéma récapitulatif des différents profils protéiques (de A à F) selon les classes phénotypiques des foies. FASN : Fatty Acid Synthase ; ME1 : Malic Enzyme ; DLAT : Dihydrolipoamide s-acetyltransferase ; ALB : albumin ; HADHA : trifunctional enzyme subunit α ; APOA1 : Apolipoprotein A ; IMMT : mitochondrial inner membrane protein-like ; PHB : Prohibitin ; PRDX6 : peroxiredoxin 6 ; HSPA5 : 70kDa heat shock protein 5 ; HSPD1 : 60 kDa heat shock protein ; FKBP4 : FK506-binding protein 4 ; FABP1 : Fatty Acid binding protein 1 ; PSMA1 : Proeasome subunit alpha 1 ; ANXA5 : Annexin A5 ; HYOU1 : hypoxia up-regulated protein 1 ; ENO1 : α -enolase.

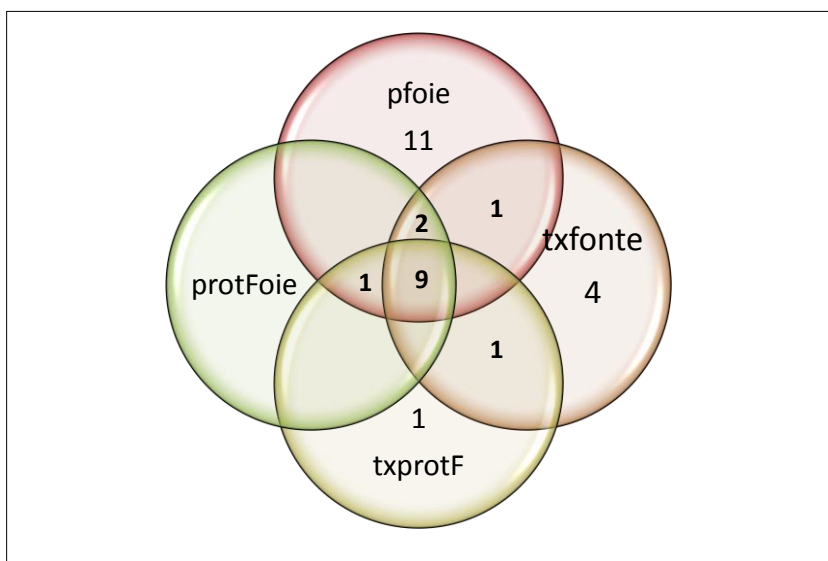


Figure 19 : Diagramme de Venn des 30 spots protéiques ayant un profil d'expression différentiel selon les caractères phénotypiques. pfoie : Poids de foie ; txfonte : Taux de fonte ; protFoie et txprotF : Teneurs en protéines estimées sur matière fraîche et sèche, respectivement. Les nombres correspondent au nombre de protéines affectées par 1, 2, 3 ou 4 caractères.

2. Etude des niveaux d'expressions protéiques selon un gradient

linéaire de poids de foie, de taux de fonte et de teneur en protéines.

L'étude précédente a montré une relation entre l'expression protéique de certains spots et les différentes classes de qualité du foie gras. Des régressions linéaires ont été entreprises entre les spots protéiques et le poids de foie, le taux de fonte, et les teneurs en protéines sur matière fraîche et sèche, indépendamment les uns des autres.

L'étude repose strictement sur le même « matériel et méthode » que celui de l'étude précédente : seul le modèle statistique d'analyse utilisé est partiellement différent. En effet, l'intensité des spots a été normalisée comme précédemment, pour chacun des 4 caractères de qualité du foie (poids de foie, taux de fonte, teneurs en protéines estimées sur matière fraîche et sèche) en fonction des effets fixes retenus. En revanche, une régression linéaire simple a été effectuée à l'aide de la procédure REG du logiciel SAS. Les probabilités obtenues ont été corrigées par la méthode de Benjamini-Hochberg, comme décrit dans l'article précédent. Pour chaque spot protéique, les effets ont été déclarés significatifs quand la probabilité corrigée était inférieure à 10%.

Quarante-cinq spots présentaient un profil d'expression différentiel selon au moins un des 4 caractères étudiés. Ainsi, ont été mis en évidence 3 spots correspondant à de la kératine, 12 spots correspondant à un mélange de protéines et 30 spots correspondant à 22 protéines différentes (certaines protéines apparaissant dans plusieurs spots, **Figure 19**). Parmi les 30 spots protéiques identifiés, 16 sont significativement affectés par un seul des 4 caractères (pfoie, txfonte, protFoie ou txprotF), 5 spots protéiques sont affectés par 2 ou 3 caractères et enfin 9 spots sont communs aux 4 caractères (**Figure 19**).

Spots significativement affectés par un seul caractère.

Onze spots protéiques spécifiques du poids de foie et correspondant à 9 protéines uniques ont été mis en évidence par la régression (**Tableau 13**). Cinq spots ont une abondance qui diminue avec l'augmentation du poids de foie : la glutamine synthase (**GS**), l'alpha-enolase (**ENO1** – spot

Tableau 13 : Spots protéiques significativement corrélés à un seul caractère

Caractère	N° accession	N° spot	Symbole du gene	Nom de la protéine	Signe de la pente de régression
pfoie	G1MW53	1541	GS	Glutamine synthase	-
	P19140	1539	ENO1	Alpha-enolase	-
	P84173	2001	PHB	Prohibitin	-
	O42296	2564	APOA1	Apolipoprotein A1	-
	G1NLV4	2876	ME1	Malic enzyme	-
	F1NY05	125	HYOU1	Hypoxia up-regulated protein 1	+
	F1NY05	152	HYOU1	Hypoxia up-regulated protein 1	+
	P19140	1427	ENO1	Alpha-enolase	+
	G1MZD9	1759	ANXA2	Annexin A2	+
	H0ZDR3	1945	PSMA1	Proteasome subunit alpha 1	+
	B5G3Z6	2314	PARK7	DJ-1	+
txfonte	G3UQJ4	803	IMMT	Mitochondrial inner membrane protein-like	-
	P19140	1449	ENO1	Alpha enolase	+
	H0ZRI8	1735	C11orf54	Ester hydrolase	+
	Q5ZL50	2906	PFN-2	Profilin 2	+
txprotF	G1NIP3	1136	TCP1	T-complex protein 1 subunit alpha	+

pfoie: poids de foie; txfonte : taux de fonte ; txprotF : teneur en protéines estimée sur matière sèche.

Tableau 14 : Spots protéiques significativement corrélés à 2 ou 3 caractères simultanément.

N° spot	N° accession	Symbole du gène	Nom de la protéine	Phénotypes considérés	Signe de la pente de régression
898	G1MZJ8	DLAT	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase	txfonte	-
				txprotF	+
1914	H0YUM4	ANX5	Annexin A5	pfoie	-
				protFoie et txprotF	+
2057	F1NBV0	PRDX6	Peroxioredoxin 6	pfoie et txfonte	+
				protFoie	-
2104	B5FXD0	PSMA1	Proteasome subunit alpha 1	pfoie et txfonte	+
				protFoie	-
2903	D7REA1	FABP1	Fatty acid binding protein 1	pfoie et txfonte	+

pfoie: poids de foie; txfonte : taux de fonte ; protFoie et txprotF : teneurs en protéines estimées sur matière fraîche et sèche, respectivement.

1539), la prohibitin (**PHB**), l'apolipoprotéine A1 (**APOA1**) et l'enzyme malique (**ME1**). Les 6 autres spots ont au contraire une expression qui augmente avec le poids de foie : la hypoxia up-regulated protein 1 (**HYOU1** – spots 125 et 152), **ENO1** (spot 1427), l'annexine A2 (**ANXA2**), le proteasome subunit alpha (**PSMA1**) et la protéine DJ-1 (**PARK7**).

Quatre spots protéiques sont linéairement liés au seul taux de fonte : 3 spots ont une abondance qui augmente avec le taux de fonte : **ENO1** (spot 1449), l'ester hydrolase (**C11orf54**) et la Profilin (**PFN**). Le spot restant (Inner Membrane mitochondrial protein, **IMMT**) a une expression qui diminue avec l'augmentation du taux de fonte.

Un seul spot est spécifiquement relié à txprotF : le T-complex protein 1 subunit alpha (**TCP1**) a une expression qui augmente avec le taux protéique du foie.

Spots significativement affectés par plusieurs caractères.

Deux spots sont linéairement liés à deux caractères simultanément (**Tableau 14**) : La fatty acid binding protein 1 (**FABP1**) est reliée linéairement à pfoie et txfonte et son expression augmente avec les valeurs des deux caractères. La dihydrolipoamide acétyl-transférase (**DLAT**) est reliée à txfonte et txprotF dont l'abondance diminue avec l'augmentation du taux de fonte mais augmente avec la teneur en protéine du foie.

Trois spots sont liés à 3 caractères simultanément (**Tableau 14**). L'annexin 5 (**ANXA5**) est à la fois liée à pfoie, protFoie et txprotF : son expression diminue avec l'augmentation du taux de fonte alors qu'elle augmente avec celles des teneurs en protéine. La peroxiredoxin (**PRDX6** – spot 2057) et la sous-unité alpha 1 du protéasome (**PSMA1**) sont reliées à la fois à pfoie, txfonte et txprotF. Leurs abondances respectives augmentent avec le poids de foie et le taux de fonte, mais diminuent avec l'augmentation de la teneur en protéines.

Neuf spots protéiques sont significativement affectés par les quatre caractères simultanément (**Tableau 15**). Les abondances de la fatty acid synthase (**FASN**) et de l'albumine (**ALB**) diminuent avec l'augmentation du poids de foie et du taux de fonte mais augmentent avec celle des teneurs en protéines. Les autres spots ont un profil d'expression inverse, leurs niveaux d'expression augmentent avec le poids de foie et le taux de fonte, et diminuent avec l'augmentation des teneurs en protéines. Les protéines identifiées dans ces spots sont l'annexine 5 (**ANXA5**), la FK506 binding protein 4 (**FKBP4**), la peroxiredoxin 6 (**PRDX6** – spot 2091),

Tableau 15 : Spots protéiques significativement corrélés simultanément à pfoie, txfonte, protFoie et txprotF.

N° spot	N° accession	Symbole du gène	Nom de la protéine	Phénotypes considérés	Signe de la pente de régression
979	I6U3L8	ALB	Albumin	pfoie et txfonte protFoie et txprotF	- +
1275	H0ZSE5	FKBP4	FK506-binding protein 4	pfoie et txfonte protFoie et txprotF	+ -
1403	P19140	ENO1	Alpha-enolase	pfoie et txfonte protFoie et txprotF	+ -
1414	P19140	ENO1	Alpha-enolase	pfoie et txfonte protFoie et txprotF	+ -
1837	G1NQ47	LOC100545718 (ESD)	S-formylglutathione hydrolase	pfoie et txfonte protFoie et txprotF	+ -
1854	G1NDY6	ANXA5	Annexin A5	pfoie et txfonte protFoie et txprotF	+ -
1906	B8XNP2	FASN	Fatty Acid Synthase	pfoie et txfonte protFoie et txprotF	- +
2091	F1NBV0	PRDX6	Peroxiredoxin 6	pfoie et txfonte protFoie et txprotF	+ -
2861	Q5ZMU9	VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	pfoie et txfonte protFoie et txprotF	+ -

pfoie: poids de foie; txfonte : taux de fonte ; protFoie et txprotF : teneurs en protéines estimées sur matière fraîche et sèche, respectivement.

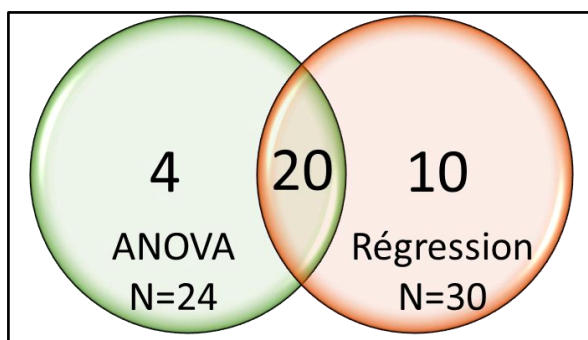


Figure 20 : Répartition des spots protéiques mis en évidence par chaque méthode d'étude. Sur les 24 et 30 spots mis en évidence par ANOVA et Régressions respectivement, 20 sont communs aux deux méthodes, 4 spécifiques de l'ANOVA et 10 autres de la régression.

l'alpha-enolase (ENO1, spots 1414 et 1403), la Transitional endoplasmic reticulum ATPase (**VCP**) et S-formylglutathione hydrolase (**ESD**).

L'étude du signe des pentes des régressions pour les spots protéiques reliés à au moins 2 caractères phénotypiques sont systématiquement conformes aux corrélations phénotypiques que l'on connaît entre les caractères : ainsi le poids de foie et le taux de fonte évoluent toujours dans le même sens, et de façon opposée aux taux de protéines du foie. On n'observe donc aucune protéine dont le comportement n'est pas similaire à la règle générale.

Vingt des 30 spots protéiques mis en évidence par régressions linéaires avaient également été mis en évidence par ANOVA (**Figure 20** - tous caractères confondus – pfoie, txfonte, protFoie et txprotF, lipFoie et txlipF). Seuls 4 spots révélés par ANOVA n'apparaissent plus. En terme de protéines, il s'agit de HADHA (mais qui était à la limite de significativité), de APOA1 et des 2 heat shock proteins HSPA5 et HSPD1. Trois de ces protéines n'ont pas de « doublon » dans l'étude par régression (**Tableau 16**). Par contre, 10 protéines (**Tableau 16**) sont nouvellement mis en évidence. Parmi ceux-ci, on notera 4 nouvelles protéines : ANXA2, PARK7, PFN2 et TCP1 (**Tableau 16**).

ANXA2 et PARK7 (DJ-1) sont 2 protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif et ont toutes deux une abondance qui augmente avec le poids de foie. Madureira *et al.* (2011) ont montré que l'augmentation de l'abondance de la protéine ANXA2 était due au peroxyde d'hydrogène et ont observé une augmentation de l'oxydation chez des souris déficientes en ANXA2. Par ailleurs, Yasuda *et al.* (2011) ont montré que des cellules KO pour DJ-1 montraient moins de viabilité en conditions de stress oxydant que des cellules témoins. Xu *et al.* (2010) ont également montré le rôle de cytoprotection de DJ-1 dans les globules rouges. Ces protéines de cytoprotection viennent s'ajouter à PRDX6 et HYOU1, venant conforter l'hypothèse d'une mise en place de mécanismes de protection et de défense des cellules contre le stress oxydatif dans les foies lourds et/ou à taux de fonte élevé.

La profilin 2 (PFN2), dont l'abondance augmente avec le taux de fonte, est une protéine de structure cellulaire ubiquitaire impliquée dans le contrôle de la polymérisation de l'actine. D'après Murk *et al.* (2009), PFN2 est une protéine ubiquitaire chez les oiseaux, au même titre que PFN1 chez les mammifères. Elle serait impliquée dans les fonctions de motilité, d'adhésion des cellules

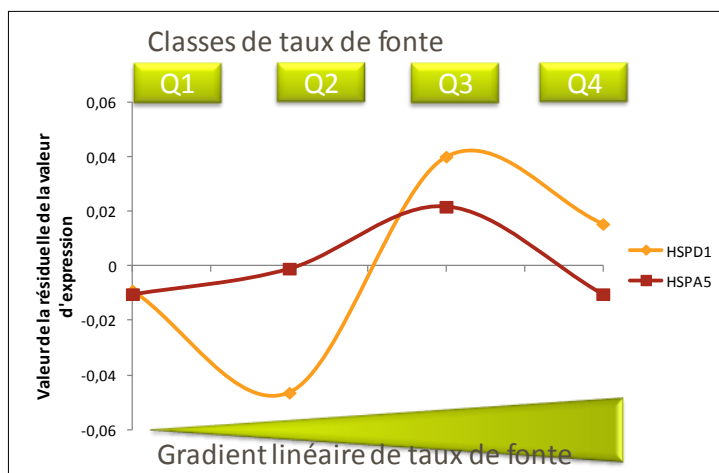


Figure 21 : Evolution des valeurs d'expression des HSP entre les différentes classes de taux de fonte

et son KO réduirait drastiquement cette motilité cellulaire. Cette protéine, liée au taux de fonte, suggère qu'il existe un lien entre la fonte et l'adhérence des cellules hépatiques entre elles.

TCP1 (T-complex protein1 subunit alpha), dont l'abondance augmente avec la teneur en protéines, est une protéine appartenant à un complexe protéique (CCT) formant une protéine chaperonne. Ces chaperonnes contenant TCP1 aident à la formation de diverses protéines cytosoliques ainsi qu'à celle de l'actine ou de la tubuline. Yokota *et al.* (2001) ont montré une surexpression du complexe CCT dans des cellules proliférant rapidement, le suggérant comme un marqueur tumoral. Dans notre cas, TCP-1 semble marquer le développement du foie et des cellules hépatiques et ainsi lier à un métabolisme anabolique.

La comparaison des 2 approches ANOVA et REG révèlent des protéines particulières : ainsi les 2 heat shock proteins (HSPD1 et HSPA5) disparaissent en REG car elles n'évoluaient pas linéairement avec le caractère d'intérêt (les HSP du dernier quartile de txfonte ayant un niveau d'expression beaucoup plus faible qu'attendu - **Figure 21**). Les HSP sont des protéines synthétisées suite à un stress (Heat Shock Factor) afin de pouvoir y répondre (Niforou *et al.* 2014). Plusieurs familles de HSP existent avec des localisations différentes au sein de la cellule (Rupik *et al.* 2011). HSPA5 est de la famille des HSP70, une protéine cytosolique pouvant se transloquer dans le noyau lors d'un « heat shock ». HSPD1 est de la famille des HSP60, protéines chaperonnes mitochondriales aidant à la conformation des protéines importées dans les mitochondries. La stimulation des HSP étant successive à un stress, leur non-linéarité par rapport au taux de fonte suggère que la stimulation est due à un effet-seuil et donc sans doute plus ponctuelle que graduelle. Par ailleurs, leur synthèse n'intervient peut-être que le temps de stimuler et d'accompagner la synthèse des autres protéines de cytoprotection surexprimées dans les derniers quartiles du poids de foie (HYOU1) ou du taux de fonte (PRDX6).

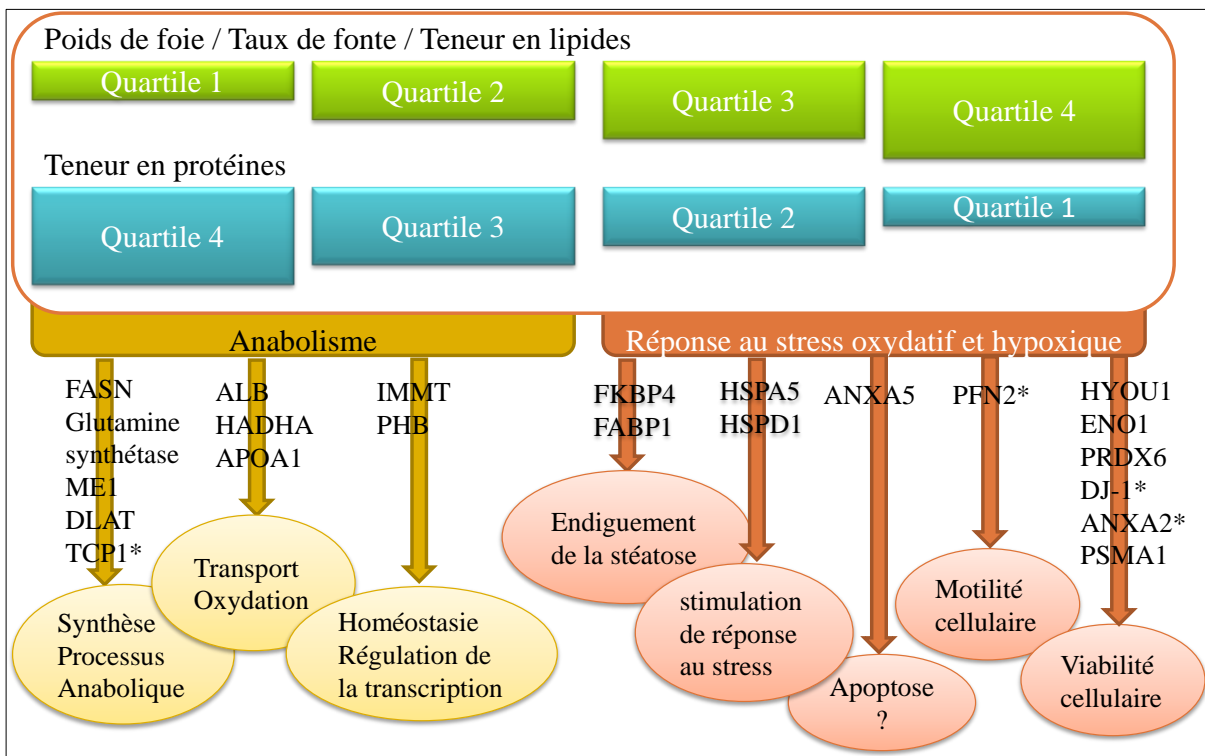


Figure 22 : Schéma récapitulatif des profils protéiques selon les classes phénotypiques des foies gras. Les protéines identifiées uniquement par la méthode de régression sont annotées avec une étoile et positionnées en dessous du quartile 4 du caractère avec lequel elles évoluent. TCP1 évolue avec la teneur en protéines, DJ1 et ANXA2 avec le poids de foie et PFN2 avec le taux de fonte.

FASN : Fatty Acid Synthase ; ME1 : Malic Enzyme ; DLAT : Dihydrolipoamide s-acetyltransferase ; ALB : albumin ; HADHA : trifunctional enzyme subunit α ; APOA1 : Apolipoprotein A ; IMMT : mitochondrial inner membrane protein-like ; PHB : Prohibitin ; PRDX6 : peroxiredoxin 6 ; HSPA5 : 70kDa heat shock protein 5 ; HSPD1 : 60 kDa heat shock protein ; FKBP4 : FK506-binding protein 4 ; FABP1 : Fatty Acid binding protein 1 ; PSMA1 : Proeasome subunit alpha 1 ; ANXA5 : Annexin A5 ; PFN2 : profilin 2 ; TCP-1 : T-complex protein1 subunit alpha ; DJ-1 : PARK7 ; ANXA2 : Annexin 2 ; HYOU1 : hypoxia up-regulated protein 1 ; ENO1 : α -enolase.

3. Conclusion

Les résultats obtenus en régression sont cohérents avec ceux obtenus en ANOVA, tous caractères confondus. Les protéines mises en évidence par les deux méthodes montrent ainsi des profils d'expression similaires d'une méthode à l'autre. L'approche par régression linéaire semble plus puissante que la comparaison de classes lorsque l'on cherche à identifier des évolutions corrélées entre elle. Dans notre contexte, l'approche par régression a en effet apporté de nouveaux éléments aux résultats obtenus par ANOVA : Elle a permis de confirmer les protéines déjà mises en évidence avec des résultats cohérents. Par ailleurs, elle a non seulement permis de mettre en évidence de nouvelles protéines également cohérentes avec les précédents résultats, mais elle a mis en lumière des protéines dont l'abondance n'était pas linéairement liée au caractère d'intérêt. Les deux méthodes, donnant des résultats cohérents entre eux, semblent ainsi complémentaires. Cela conforte l'idée que les foies ont un profil protéique différent selon leur phénotype. Ainsi les foies légers, qui fondent peu, avec une faible teneur en lipides mais une forte teneur en protéines présentent une surexpression des protéines impliquées dans les métabolismes lipidiques, glucidiques, de synthèse, suggérant que ces foies sont dans un processus anabolique. Au contraire, les foies lourds, avec un taux de fonte élevé, une forte teneur en lipides et une faible teneur en protéines présentent une surexpression de protéines impliquées dans les réponses au stress, de cytoprotection et de survie des cellules. Nous pouvons ainsi compléter le schéma récapitulatif avec les derniers résultats obtenus par régression (**Figure 22**).

Tableau 16: Liste des spots identifiés et mis en évidence uniquement par la méthode de régression (n=10) / par l'ANOVA (n=4) comme différentiellement exprimés selon les valeurs phénotypiques. Les protéines uniquement mises en évidence par l'une ou l'autre méthode sont surlignées en gris foncé, les autres spots correspondent à des protéines identifiées dans des spots mis en évidence par les deux méthodes.

N° spot	N° accession	Symbol du gène	Nom de la protéine	Score Mascot	ΣCoverage	Σ# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	%
Spots protéiques identifiés uniquement par la méthode de régression										
152	F1NY05	HYOU1	Hypoxia up-regulated protein 1	891	22,82	17	986	110,8	5,25	100
1136	G1NIP3	TCP1	T-complex protein 1 subunit alpha	2583	56,09	22	558	60,4	5,88	64,1
	H0ZMD5	TCP1	T-complex protein 1 subunit alpha	1303	41,27	11	332	36,4	6,42	36
1449	P19140	ENO1	Alpha-enolase	7605	65,21	28	434	47,2	6,80	72,9
1539	P19140	ENO1	Alpha-enolase	416	15,44	4	434	47,2	6,80	73,5
1759	G1MZD9	ANXA2	Annexin A2	487	30,97	10	339	38,6	7,33	93,8
1945 (212)	H0ZDR3	PSMA1	Proteasome subunit alpha type	238	18,08	3	260	29,2	6,54	100
2057 (226)	F1NBV0	PRDX6	Peroxiredoxin-6	645	43,75	8	224	25,1	6,38	86,9
2314 (269)	B5G3Z6	PARK7	Protein DJ-1 – PARK7	487	21,69	5	189	19,95	6,79	100
2564	O42296	APOA1	Apolipoprotein A1	79	63,64	19	264	30,6	5,54	100
2906 (313)	Q5ZL50	PFN2	Profilin 2	1005	54,29	7	140	15,0	6,99	85,6
Spots protéiques identifiés uniquement par l'ANOVA										
887	G1NMS8	HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha	364	18,03	10	771	82,9	9,10	100
950	A0ZT13	HSPA5	Heat shock protein 70 kDa	2121	34,36	20	652	71,9	5,22	100
1204	I3QII5	HSPD1	Heat shock protein 60 kDa	8080	73,24	35	568	60,5	5,64	98,7
2143	O42296	APOA1	Apolipoprotein A1	1398	63,64	19	264	30,6	5,54	93,57

AA : Acide aminé ; MW : Molecular Weight (poids moléculaire) ; pI : point isoélectrique ; % : probabilité d'identifier la protéine. pI et MW sont les valeurs théoriques

DETECTIONS DE QTL ET DE pQTL

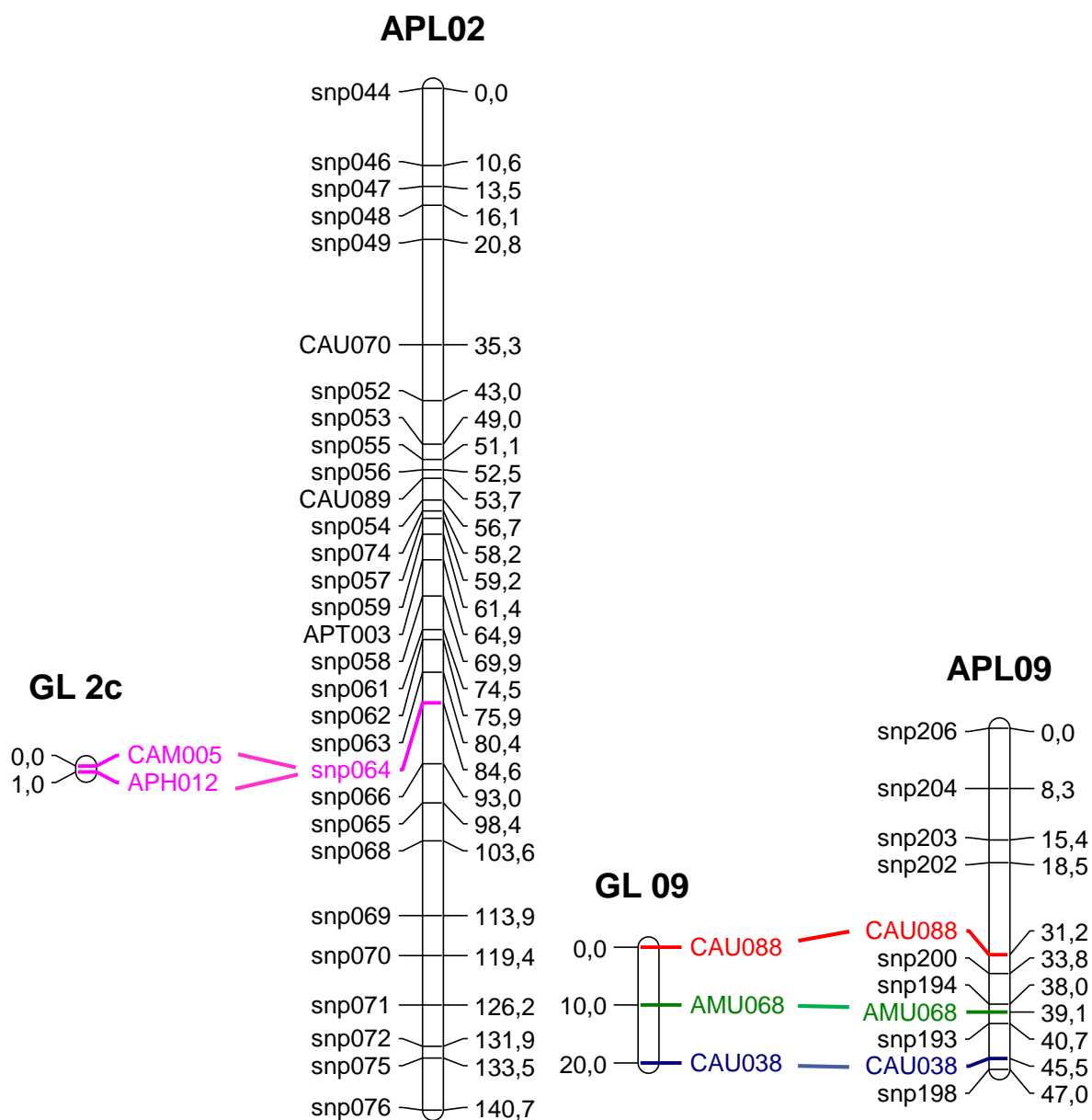


Figure 23 : Cartes des groupes de liaison GL2c et 09 de la carte microsatellite et des chromosomes APL02 et APL09 de la carte mixte. Les deux marqueurs du GL2c sont localisés au niveau du snp064 sur APL02

La seconde partie de ce travail a consisté à déterminer comment l'expression du génome influence les caractères de qualité du foie gras au travers de détections de QTL relatifs à ces caractères et de QTL de protéines relatifs aux spots protéiques obtenus par électrophorèse bidimensionnelle. Les détections de QTL ont été entreprises sur le dispositif optimisé présenté ci-avant et comprenant 3 familles de pères (43963, 57893, 57900), 98 canes BC et 294 mulards. Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur la carte composée de microsatellites et plus particulièrement sur les groupes de liaisons 2c et 9, pour lesquels plusieurs caractères phénotypiques avaient été détectés (Kileh-Wais *et al.* 2013). Dans un second temps, les détections ont été entreprises sur les chromosomes APL02 et APL09 de la carte dite « mixte » alliant SNP et microsatellites. Enfin, toutes les détections restantes relatives à l'ensemble des chromosomes de la carte mixte ont été réalisées. Toutes les détections ont été mises en œuvre a minima en uni-caractère, puis en multi-caractères en faisant des associations de caractères phénotype/phénotype, protéine/protéine ou encore phénotype/protéine.

1. Détections de QTL phénotypiques pour les groupes de liaisons

GL2c/APL02 et GL09/APL09

Les détections de QTL ont tout d'abord été entreprises sur les groupes de liaisons 2c et 09 de la carte microsatellites (**Figure 23**). GL2c est un petit groupe de liaisons comprenant 2 marqueurs (CAM005 et APH012) distants de 1 cM et représentant une très petite portion du chromosome APL02. GL09 est également un petit groupe de liaisons, composé de 3 marqueurs microsatellites (CAU088, AMU068 et CAU038) s'étalant sur 20 cM du chromosome APL09. Les détections ont ensuite été entreprises sur les chromosomes APL02 et APL09 de la carte mixte. APL02 est composé de 30 marqueurs (SNP et microsatellites) et s'étend sur une longueur de 140 cM. Les marqueurs de GL2c, bien que non insérés au sein du groupe de liaisons framework de ce chromosome, co-localisent avec le marqueur SNP064 à 84,6 cM. APL09 est un chromosome plus petit, composé de 11 marqueurs SNP et microsatellites sur une distance de 47 cM. Les 3 marqueurs de GL09 sont positionnés dans la carte d'APL09 à 31,2, 39,1 et 45,5 cM, respectivement.

Tableau 17 : QTL identifiés sur les groupes de liaisons 2c et 09 de la carte de microsatellites

	Caractère	CWS	Marqueur	Position (M)	LRT max	Famille (%)
GL2c	txfonte	5%	APH012	0	8,53	57900 (81)
	lipFoie	5%	APH012	0	9,59	57900 (66)
	txlipF	5%	APH012	0	9,88	57900 (75)
	protFoie	5%	APH012	0	7,98	43963 (48) et 57900 (52)
	txprotF	5%	APH012	0	7,39	43963 (41) et 57900 (59)
GL09	afoie	5%	CAU088	0	8,76	43963 (81)
	txfonte	5%	CAU088	0	9,3	43963 (71)
	lipFoie	5%	CAU088	0	9,93	43963 (97)
	txprotF	1%	CAU088	0	10,76	43963 (79)
	txlipF	0,50%	CAU088	0	11,56	43963 (99)
	protFoie	1%	AMU068 - CAU038	0,13	11,57	43963 (65)
	pfoie	0,50%	AMU068 - CAU038	0,15	11,17	43963 (61)

afoie : indice de rouge ; txfonte : Taux de fonte ; lipFoie et txlipF : teneurs en lipides estimées sur matière fraîche et sèche, respectivement ; protFoie et txprotF : teneurs en protéines estimées sur matière fraîche et sèche respectivement ; pfoie : poids de foie. CWS : Chromosome Wide Significance (les seuils de significativité atteints ont été estimés par rapport au groupe de liaison seul). LRT : Likelihood Ratio Test (Maximum de vraisemblance) ; Famille (%) : pourcentage de contribution des familles à la vraisemblance.

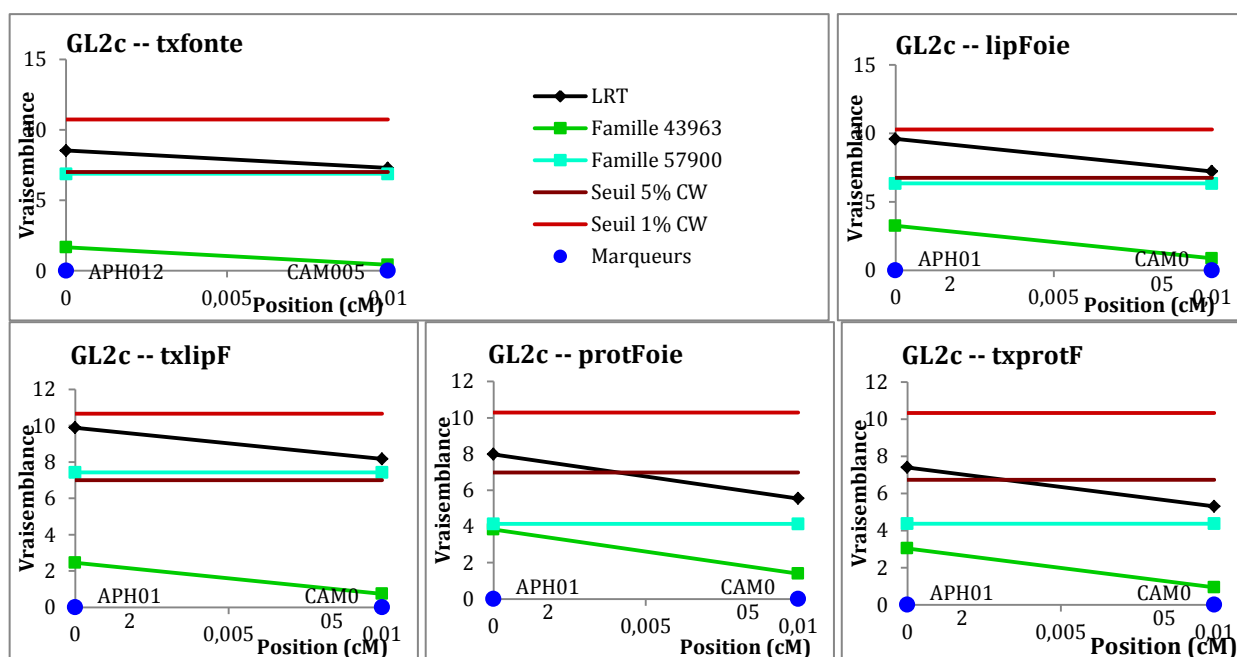


Figure 24 : Courbes de vraisemblance des QTL identifiés sur GL2c de la carte microsatellites.

1.1. Carte microsatellites des groupes de liaisons GL2c et GL09

Les détections de QTL entreprises sur les GL2c et GL09 de la carte de microsatellites pour les 10 caractères de qualité du foie gras [la luminance du foie (**Lfoie**), les indices de couleurs rouge (**afoie**) et jaune (**bfoie**), le poids du foie (**pfoie**), le taux de fonte (**txfonte**), les teneurs en lipides et protéines estimées sur matière fraîche (**lipFoie** et **protFoie**, respectivement), les teneurs en lipides et protéines estimées sur matière sèche (**txlipF** et **txprotF**) et le taux de collagène (**txcoll**)] ont permis d'identifier 12 QTL liés à 7 de ces caractères.

Parmi ceux-ci, 5 ont été mis en évidence sur GL2c à un seuil de significativité de 5% (**Tableau 17**). Ces QTL concernent les caractères txfonte, lipFoie, txlipF, protFoie et txprotF. Sur GL2c, deux (43963, 57900) des 3 familles de notre dispositif sont informatives et participent donc à la vraisemblance globale des détections : la famille 57900 contribue majoritairement (à plus de 60 %) à la vraisemblance des QTL liés au taux de fonte et aux teneurs en lipides, tandis que les QTL liés aux teneurs en protéines semblent ségréger dans les deux familles. Globalement ces 5 QTL se positionnent sur le même marqueur (APH012 – **Figure 24**). Cependant, le groupe de liaison GL2c construit avec les microsatellites étant petit – 1cM sépare les 2 marqueurs (APH012 et CAM005) du groupe de liaisons – seules des hypothèses peuvent être émises quant à la localisation des QTL. En effet, il peut s'agir soit d'un QTL à faible effet mais très proche de nos marqueurs, soit d'un QTL à fort effet ou de QTL à faibles effets, mais éloignés de ces marqueurs.

Sur GL09 (**Tableau 17**), 7 QTL ont été identifiés : 3 à un seuil de 5% liés aux caractères afoie, txfonte et lipFoie, 2 à un seuil de 1% liés aux taux de protéines (protFoie et txprotF) et enfin 2 à un seuil de 0,5% liés à pfoie et à txlipF. Sur ce groupe de liaisons, deux des 3 familles sont informatives et participent à la vraisemblance (familles 43963 et 57893). De ces deux familles, seule la famille 43963 contribue majoritairement aux vraisemblances de chaque QTL (plus de 60%). Des 7 QTL, 2 sont localisés entre les marqueurs AMU068 et CAU038, ils sont liés aux caractères pfoie et protFoie. Les 5 autres QTL sont localisés au niveau du marqueur CAU088. Cependant, lorsque l'on regarde les courbes de vraisemblances (**Figure 25**), il n'est pas possible de définir de localisation précise. En effet, pour les caractères pfoie et protFoie, si leurs maxima de vraisemblance sont estimés en position 0,15 et 0,13 M (respectivement), les courbes de vraisemblance sont quasiment constantes sur l'ensemble du GL ne permettant pas de définir de

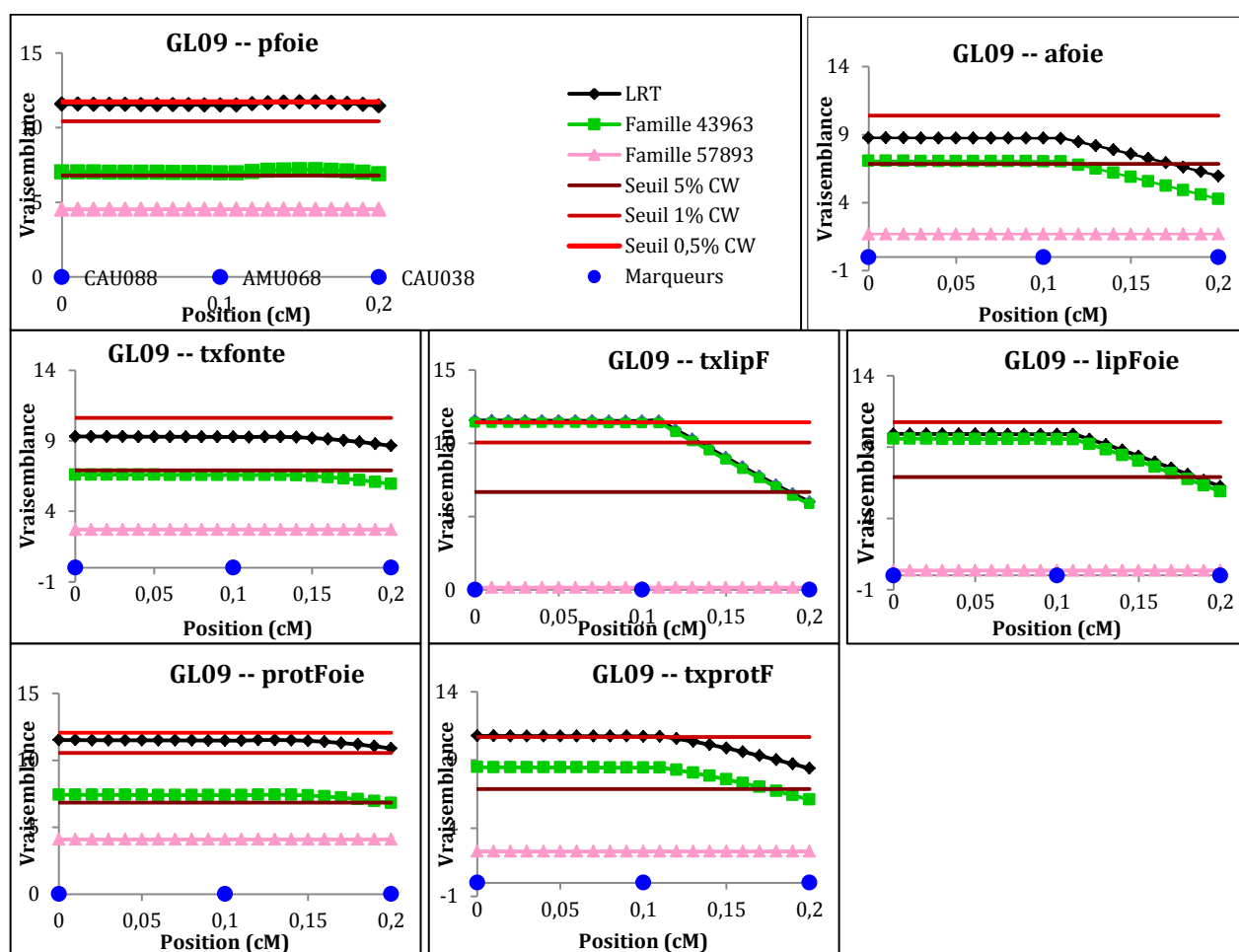


Figure 25 : Courbes de vraisemblances des QTL identifiés sur GL09 de la carte microsattellites.

Tableau 18 : QTL identifiés sur le groupe de liaisons APL02 de la carte SNP-microsattellites

Caractères	CWS	Marqueurs	Position (intervalle de confiance) (M)	LRT	Famille (%)
pfoie	5%	SNP059	0,61 (0,55-0,73)	17,31	43963 (53) et 57893 (46)
txprotF	5%	SNP057	0,59 (0,53-0,69)	15,58	43963 (76)
txfonte (a)	1%	SNP057-SNP059	0,60 (0,58-0,60)	20,23	43963 (81)
protFoie (a)	1%	SNP057	0,59 (0,58-0,60)	18,85	43963 (76)
lipFoie	5%	SNP065	0,98 (0,93-1,28)	15,19	57900 (80)
txfonte (b)	1%	SNP065	0,98 (0,92-1,30)	19,47	57900 (76)
protFoie (b)	5%	SNP068 – SNP069	1,11 (0,95-1,26)	14,84	57900 (68)

Txfonte : taux de fonte ; lipFoie et txlipF : teneurs en lipides estimées sur matière fraîche et sèche, respectivement. protFoie et txprotF : teneurs en protéines estimées sur matière fraîche et sèche respectivement. CWS : Chromosome Wide Significance (les seuils de significativité atteints ont été estimés par rapport au groupe de liaison seul). LRT : Likelihood Ratio Test (Maximum de vraisemblance) ; Famille (%) : pourcentage de contribution des familles à la vraisemblance. (a) et (b) différencie les deux QTL d'un même caractère.

marqueur flanquant précis. Le même scénario se présente pour les autres QTL mais sur une distance où la vraisemblance est constante, plus petite cependant. En effet, pour les QTL liés aux caractères afoie, txfonte, lipFoie, txlipF et txprotF, le maximum de vraisemblance se situe à 0 M, mais les vraisemblances sont constantes jusqu'à la position 0,11 M (0,14 pour txfonte) où l'on observe des inflexions de celles-ci. Plusieurs QTL, liés aux caractères de qualité du foie gras, et de significativité assez élevée, co-localisent sur ce groupe de liaison et plus particulièrement sur la première moitié du GL, suggérant que celui-ci contient un gène impliqué dans la variabilité de ces critères de qualité.

1.2. Carte mixte – groupe de liaisons APL02

QTL uni-caractères

Afin d'approfondir nos premiers résultats, des détections de QTL ont été entreprises pour les mêmes caractères de qualité du foie mais à l'aide de la carte génétique du groupe de liaisons APL02 alliant à la fois les marqueurs microsatellites et les SNP (**Tableau 18**).

Trois caractères présentent un QTL significatif sur ce groupe de liaison et 2 caractères (txfonte et protFoie) présentent 2 QTL (**Figure 26**). En effet, la vraisemblance du test H2 (2 QTL) versus H1 (1 QTL) dépasse très fortement les seuils de significativité (0,1% CW pour les deux caractères), nous permet de conclure à 2 QTL distincts pour chacun de ces 2 derniers caractères. Parmi ces 7 pics QTL, 3 atteignent le seuil de 1% chromosome wide (CW). Quatre QTL, relatifs à pfoie, à txfonte(a), à protFoie(a) et à txprotF, co-localisent au niveau des marqueurs SNP057 et SNP059. Pour chacun d'entre eux, la famille qui contribue à plus de 75% à la vraisemblance globale est la famille 43963 (à l'exception du QTL relatif à pfoie pour lequel les deux familles 43963 et 57893 contribuent de la même manière). Par ailleurs, 2 autres QTL, relatifs à txfonte(b) et à lipFoie, co-localisent au niveau du marqueur SNP065 et ségrègent dans la famille 57900. Cette famille apporte également un QTL pour le caractère protFoie(b). Localisé plus loin sur le chromosome (entre les marqueurs SNP068 et SNP069), il partage cependant le même intervalle de confiance que les QTL txfonte(b) et lipFoie (entre 0,95 et 1,26 cM).

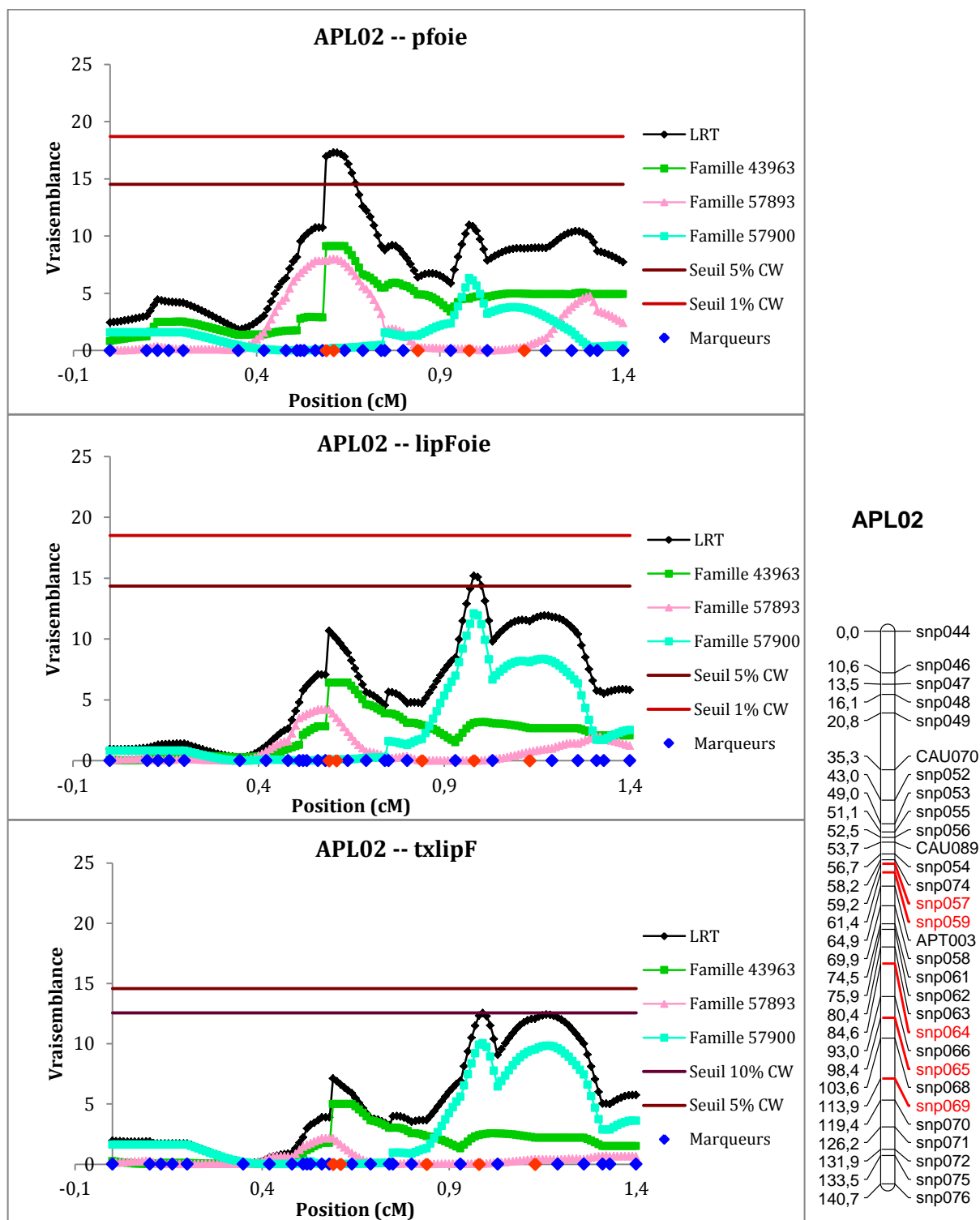


Figure 26 : Carte génétique du groupe de liaison APL02 de la carte mixte et courbes de vraisemblances des QTL obtenus. pfoie : poids de foie ; lipFoie et txlipF : teneurs en lipides estimés sur matière fraîche et matière sèche, respectivement. LRT : Vraisemblance totale ; CW : Chromosome Wide (Les seuils de significativité ont été estimés par rapport au groupe de liaisons seul).

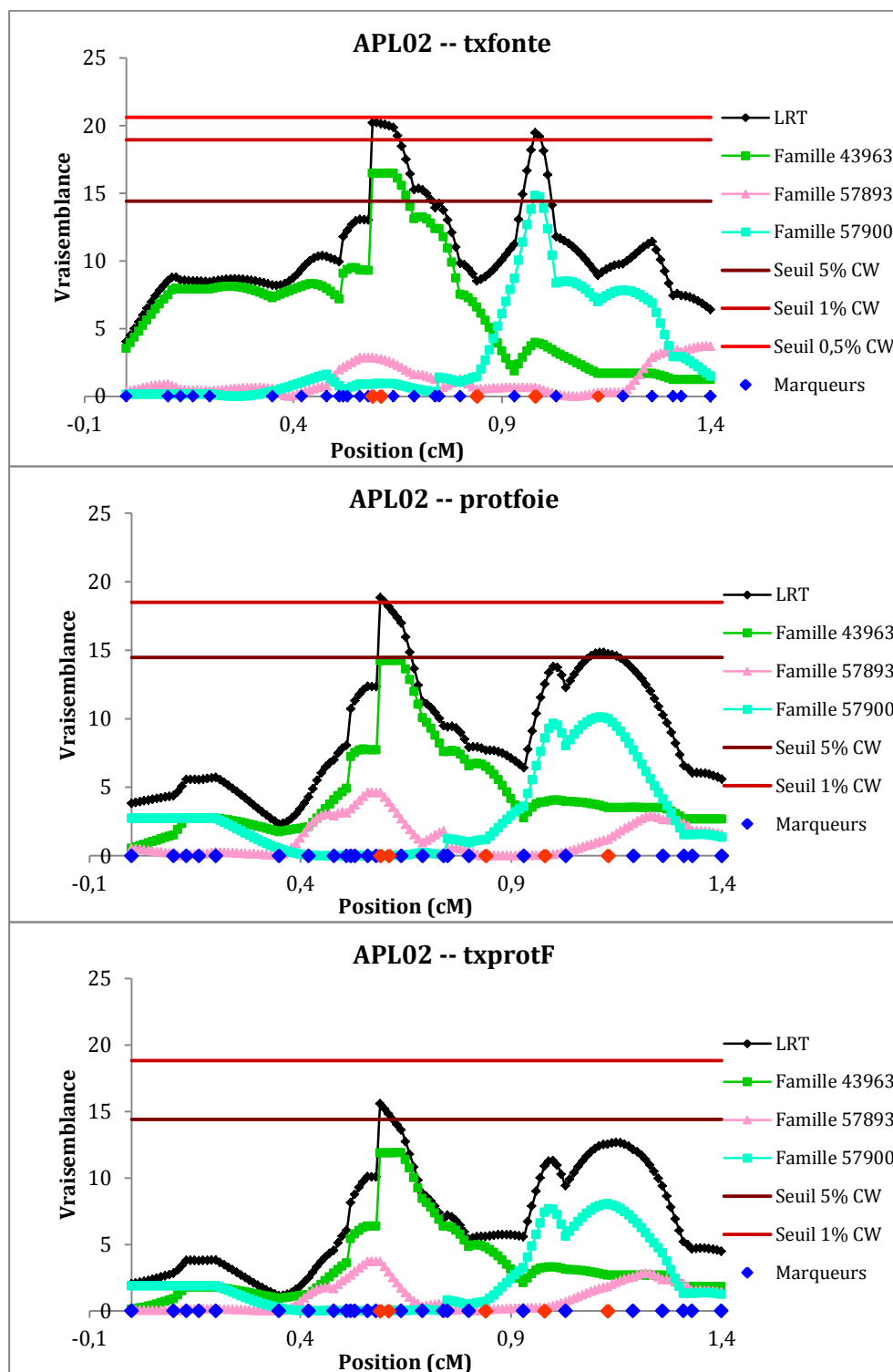


Figure 26 suite. txfonte : taux de fonte ; protFoie et txprotF : teneurs en protéines estimées sur matière fraîche et matière sèche, respectivement. LRT : Vraisemblance totale ; CW : Chromosome Wide (Les seuils de significativité ont été estimés par rapport au groupe de liaisons seul).

Quatre des 5 caractères donnant un QTL sur la carte microsatellite (txfonte, protFoie, txprotF et lipFoie) donne au moins un QTL sur la carte mixte. Le QTL relatif à txlipF n'apparaît plus avec la carte « mixte » mais un pic à la position du SNP065 atteint cependant le seuil de 10% CW. En revanche, un QTL relatif à pfoie et non présent sur la carte microsatellite, apparaît sur la carte mixte.

Les deux marqueurs composant la carte microsatellite de GL2c (APH012 et CAM005), distants de 1 cM ne sont pas physiquement inclus dans la carte mixte du chromosome APL02. Cependant, via l'option « 2 points » du logiciel CRIMAP qui nous a permis de construire la carte, nous montrons qu'ils co-localisent avec le marqueur SNP064 (0,84 M). A cette position, les vraisemblances globales ne sont jamais significatives et parmi les 3 familles étudiées c'est la famille 43963 qui y contribue majoritairement (à l'exception des QTL de txlipF et lipFoie) contrairement à la carte microsatellites où les QTL ségrégent dans la famille 57900.

Retrouver des QTL liés aux caractères de qualité du foie gras sur le groupe de liaisons APL02 renforce l'idée d'une voire 2 régions impliquées dans ces caractères. En effet, le SNP064 semble être à la croisée des deux grandes régions QTL identifiées sur la carte mixte (**Figure 26**) et les QTL identifiés sur la carte microsatellites semblent être la synthèse de ces 2 régions : la première se situe autour des marqueurs SNP057 et SNP059 (à 0,60 M) où le QTL ségrége dans la famille 43963 et la seconde autour des marqueurs SNP065 et SNP068 (à environ 1 M) où la famille 57900 contribue à 90% à la vraisemblance globale.

Si l'on regarde les caractères pour lesquels les QTL ségrégent, nous pouvons remarquer que la région des SNP057-SNP059 est partagée par le poids de foie, le taux de fonte ainsi que les teneurs en protéines. Les pics sont présents pour les teneurs en lipides, mais non significatifs (ils n'atteignent pas le seuil de 10 % CW). Cela suggère la présence de gènes impliqués dans la fonte à la cuisson mais également dans le taux protéique du foie. La région du SNP065 est partagée par txfonte et lipFoie (bien que le pic soit présent mais non significatif pour les autres caractères) laissant supposer la présence de gènes impliqués dans la qualité du foie gras (txfonte) et plus précisément dans le métabolisme lipidique (lipFoie). La région du SNP068 n'est significative que pour protFoie, le pic n'étant pas significatif pour pfoie et txprotF et n'existant pas pour pfoie et txfonte.

Tableau 19 : QTL phénotypiques multi-caractères aux positions des SNP057-SNP059 d'une part et SNP065 d'autre part

SNP057-SNP059	pfoie*	txfonte**	protFoie**	txprotF*
pfoie *		<*	<*	NS
txfonte**			<*	NS
protFoie**				NS
txprotF*				

SNP065	txfonte**
lipFoie**	<*

NS : non significatif ; * : 5% ; ** : 1% ; < : la significativité du QTL bi-caractère est inférieure (<) à celle des QTL uni-caractères. pfoie : poids de foie ; txfonte : taux de fonte ; lipFoie : teneurs en lipides estimées sur matière fraîche; protFoie et txprotF : teneurs en protéines estimées sur matière fraîche et sèche respectivement. Les étoiles à côté des noms des caractères donnent la significativité de leur QTL uni-caractères. Celles dans les cellules du tableau donnent la significativité des QTL bi-caractères.

Tableau 20 : QTL identifiés sur le chromosome APL09 de la carte mixte (SNP-microsatellites)

Caractères	CWS	Marqueurs	Position (intervalle de confiance) (M)	LRT	Famille (%)
afoie	10%	AMU068	0,39 (0.26-0.47)	10,81	43963 (77)
pfoie	10%	CAU138-SNP198	0,46 (0.31-0.47)	12,18	43963 (63) et 57893 (36)
txlipF	10%	AMU068	0,39 (0.30-0.47)	11,38	43963 (99)
protFoie	5%	SNP198	0,47 (0.31-0.47)	11,98	43963 (64) et 57893 (34)
txprotF	10%	AMU068	0,39 (0.31-0.47)	10,93	43963 (83)

pfoie : poids de foie ; txfonte : taux de fonte ; lipFoie et txlipF : teneurs en lipides estimées sur matière fraîche et sèche, respectivement. protFoie et txprotF : teneurs en protéines estimées sur matière fraîche et sèche respectivement. CWS : Chromosome Wide Significance (les seuils de significativité atteints ont été estimés par rapport au groupe de liaison seul). LRT : Likelihood Ratio Test (Maximum de vraisemblance) ; Famille (%) : pourcentage de contribution des familles à la vraisemblance

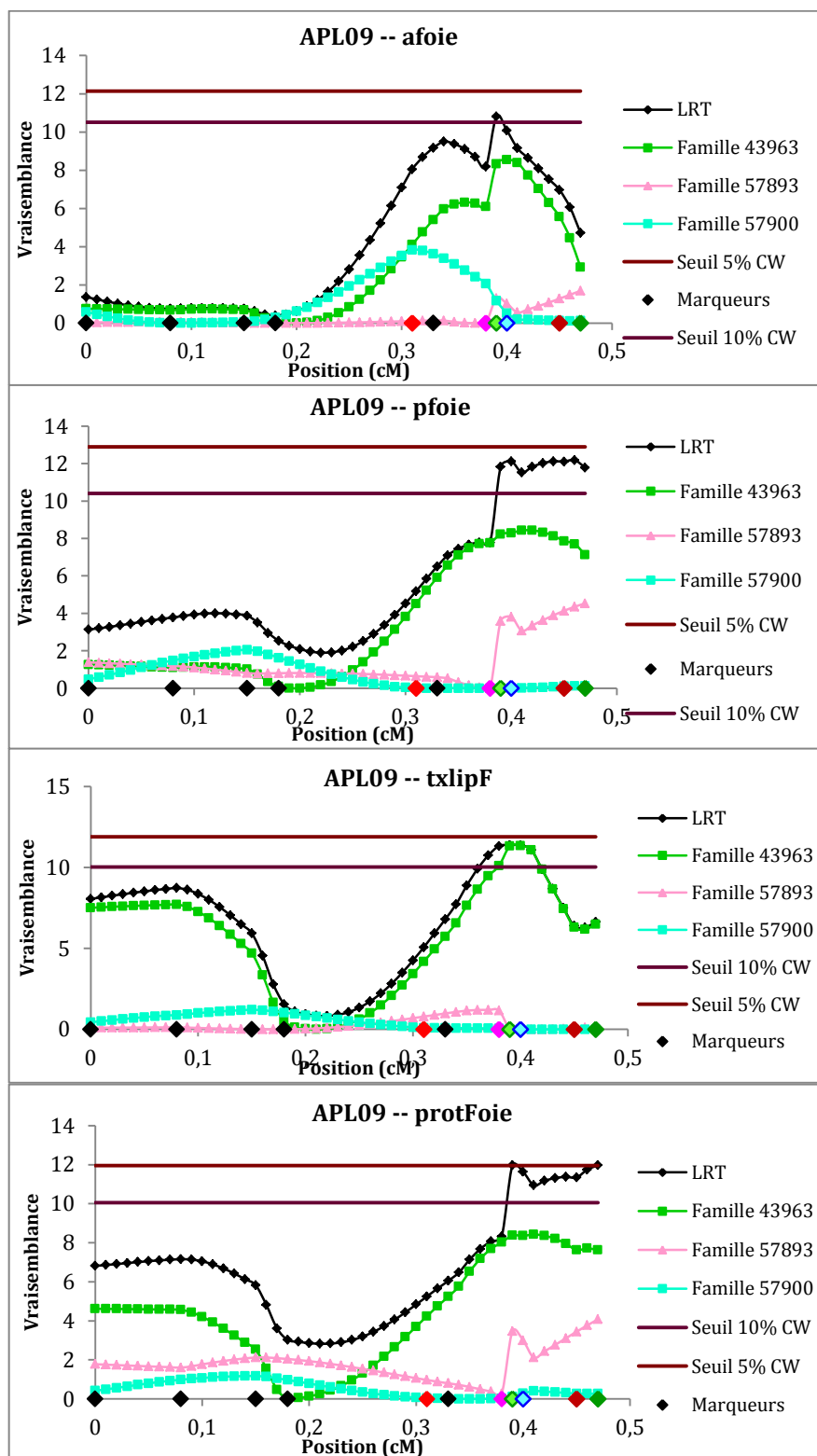
QTL phénotypiques multi-caractères

Les QTL relatifs aux caractères pfoie, txfonte(a), protFoie(a) et txprotF co-localisent au niveau des SNP057 et SNP059 (**Tableau 18**), tandis que les QTL liés à txfonte(b) et lipFoie co-localisent au niveau du SNP065. Pour chaque position, des détections multi-caractères combinant 2 à 2 les caractères concernés ont été entreprises (**Tableau 19**). Aucune des détections bi-caractères ne fait apparaître un QTL dont la significativité est supérieure au plus significatif des QTL uni-caractères. Certaines associations entraînent la disparition des QTL initialement présent en détection uni-caractère comme les combinaisons entre txprotF et pfoie d'une part ou txfonte ou protFoie d'autre part. Les autres associations permettent la détection de QTL à un seuil de 5% CW, mais aucune ne permet de renforcer la significativité des QTL initiaux uni-caractères : on ne peut donc pas conclure à l'existence de QTL pléiotropiques à ces 2 positions.

1.3. Carte mixte – groupe de liaisons APL09

La carte mixte APL09 testée est composée de 11 marqueurs répartis sur 47 cM dont les 3 microsatellites initialement présents dans GL09 (CAU088, AMU068 et CAU038) (**Figure 23**). Lors des détections effectuées sur APL09, des pics de vraisemblance avaient été mis en évidence pour 5 caractères. Un seul des 5 caractères (protFoie) présente maintenant une vraisemblance dépassant le seuil de 5% CW, les 4 autres (afoie, pfoie, txlipF et txprotF) ayant des pics de vraisemblance n'atteignant que le seuil de 10% CW (**Tableau 20**).

Nous pouvons remarquer que, comme pour la première analyse avec GL09, la famille prédominante est la famille 43963 (plus de 60% de contribution à la vraisemblance globale) avec une contribution de la famille 57893 pour les caractères pfoie et protFoie. Les pics de vraisemblance sont localisés au niveau du marqueur AMU068 (afoie et txlipF) et du marqueur SNP198 (pfoie et protFoie). Cependant pour ces derniers caractères, la vraisemblance globale reste élevée dans un intervalle allant du marqueur AMU068 au marqueur SNP198, ne permettant pas de définir de localisation plus précise. Lorsque l'on regarde l'évolution de la vraisemblance globale sur l'ensemble du groupe de liaison, nous pouvons remarquer 2 régions distinctes de part et d'autre des marqueurs SNP200 et CAU088. En effet, les vraisemblances associées aux caractères txlipF, txprotF, txfonte et lipFoie montrent 2 pics principalement dus à la famille 43963.



APL09

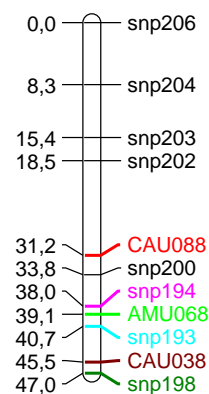


Figure 27 : Courbes de vraisemblance obtenues sur APL09 de la carte mixte et carte du groupe de liaisons.
 Afoie : indice de rouge ; pfoie : poids de foie ; lipFoie/protFoie et txlipF/txprotF : teneurs en lipides/protéines estimées sur matière fraîche et sèche, respectivement ; LRT : Vraisemblance totale ; CW : Chromosome Wide

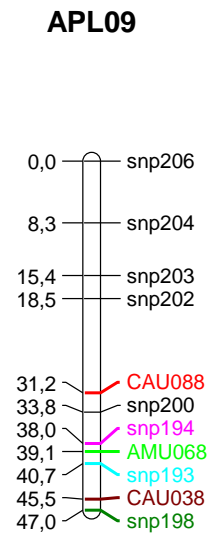
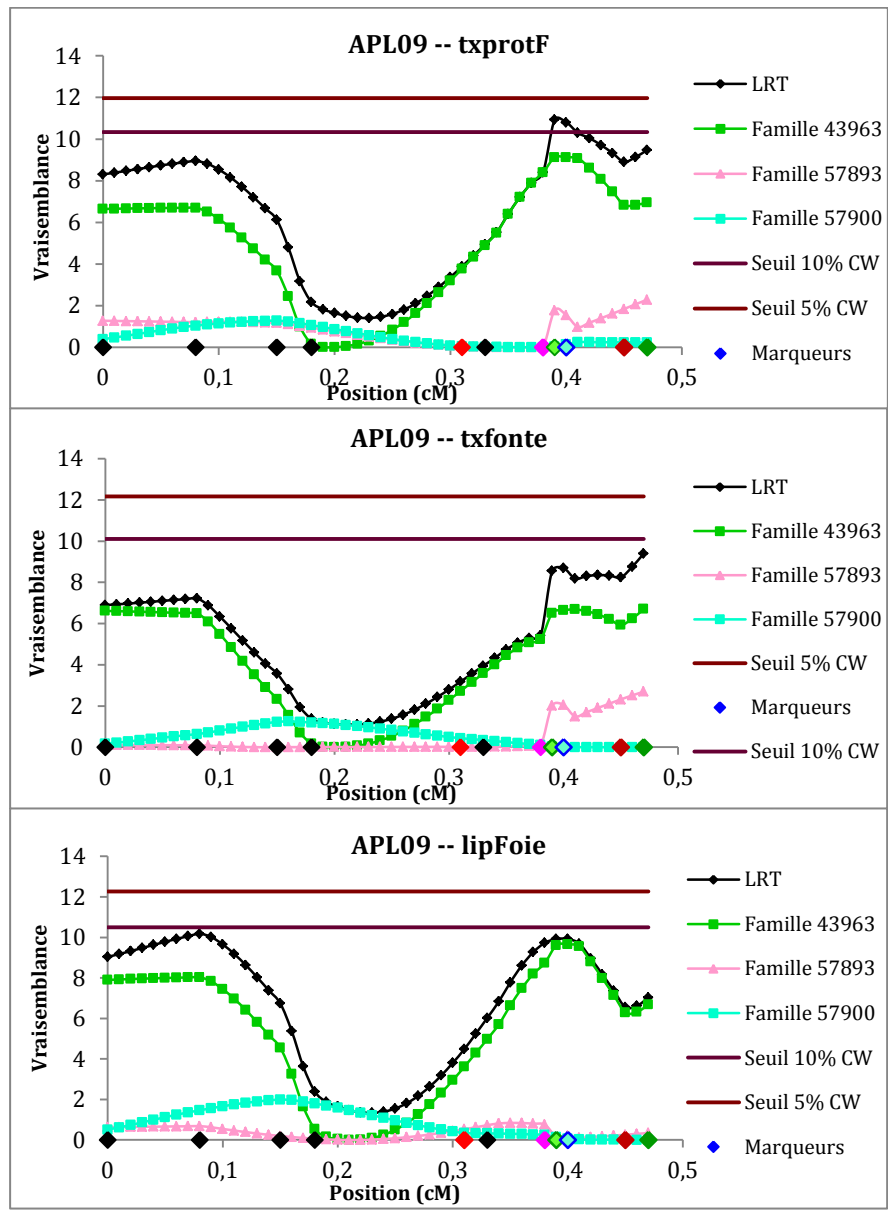


Figure 27 suite : Courbes de vraisemblance obtenues sur APL09 de la carte mixte et carte du groupe de liaisons. afoie : indice de rouge ; pfoie : poids de foie ; lipFoie/protFoie et txlipF/txprotF : teneurs en lipides/protéines estimées sur matière fraîche et sèche, respectivement ; LRT : Vraisemblance totale ; CW : Chromosome Wide

Tableau 21 : pQTL identifiés sur les groupes de liaisons GL2c et GL09 de la carte microsatellites

Groupe de liaisons	Symbole de la protéine (N° spot)	Seuil CW	Marqueurs	Position (M)	LRT max	Famille (%)
GL2c	ENO1 (1376)	5%	CAM005	0,01	7,27	43963 (60,27)
	ADK (1534)	5%	CAM005	0,01	8,119	43963 (87)
	ETF A (1883)	1%	CAM005	0,01	11,65	43963 (84,72)
	PRDX6 (2091)	5%	CAM005	0,01	8,15	43963 (90)
	PRDX4 (2112)	5%	CAM005	0,01	9,58	43963 (95,88)
	GMFB (2687)	5%	CAM005	0,01	7,48	43963 (95,87)
	ALDH7A1 (2886)	5%	CAM005	0,01	7,19	57900 (88,45)
	ENO1 (1403)	5%	CAM005	0,01	8,27	43963 (94,2)
	PRDX4 (2896)	5%	CAM005	0,01	7,26	43963 (99,9)
	DSTN (2697)	5%	APH012	0	8,13	43963 (91,76)
	TPI (2107)	0,50%	APH012	0	14,09	43963 (78,1)
GL09	ENO1 (1414)	5%	CAU038	0,20	9,71	43963 (86,06)
	ENO1 (1427)	5%	CAU038	0,20	8,58	57893 (97,17)
	NDUFS3 (2036)	5%	AMU068 – CAU038	0,11	9,01	57893 (61,26)
	PSMA1 (2104)	5%	AMU068 – CAU038	0,16	8,63	57893 (84,18)
	PRDX4 (2112)	5%	CAU038	0,20	7,62	43963 (90,67)
	SODMn (2281)	5%	CAU038	0,20	9,94	57893 (74,08)

ENO1 : alpha-enolase ; ADK : Adenylate kinase ; PRDX4 : Peroxiredoxin 4 ; GMFB : Glia maturation factor beta ; DSTN : Destrin ; ETF A : Electron transfert flavoprotein alpha ; PRDX6 : Peroxiredoxin 6 ; TPI : Triose Phosphate isomérase ; ALDH7A1 : Aldéhyde déhydrogénase 7 membre A1. NDUFS3 : NADH déhydrogénase iron-sulfur protein 3 ; PSMA1 : Proteasome subunit alpha 1 ; SODMn : Superoxyde dismutase ; CW : Chromosome wide ; LRT : Likelihood Ratio Test ; Famille (%) : pourcentage de contribution des familles à la vraisemblance

Les pics de vraisemblance mis en évidence au niveau des marqueurs AMU068 et SNP198, bien que peu voire non significatifs, sont cohérents avec les QTL mis en évidence sur la carte microsatellites : tous les caractères présentaient une vraisemblance significative à 5% CW au niveau du marqueur AMU068 (**Figure 25**). Nos résultats se confortent. En effet, les caractères pour lesquels où la vraisemblance chutait ostensiblement après le marqueur AMU068 sur la carte microsatellites, ont également une vraisemblance qui diminue après AMU068 sur la carte mixte (**Figure 27**). La région autour de ce marqueur est donc particulièrement intéressante. Ces résultats sont cependant à relativiser. Une seule famille contribue majoritairement à la vraisemblance globale et celle-ci n'atteint le seuil de significativité de 5% que pour un seul caractère (protFoie). Si l'on compare ces résultats sur APL09 avec ceux obtenus pour le groupe de liaisons APL02, ils semblent moins prometteurs. En effet, pour APL02 (carte mixte), les QTL étaient exprimés dans une famille majoritairement comme pour APL09, mais les vraisemblances étaient plus élevées et pouvaient atteindre le seuil de 1% CW.

Du fait des faibles valeurs de vraisemblance et de la non significativité à 5% des QTL identifiés sur APL09, les détections de QTL multi-caractères phénotypiques n'ont pas été entreprises sur ce chromosome.

2. Détection de pQTL – Groupes de liaisons GL2c/APL02 et

GL09/APL09

Les détections de pQTL ont été entreprises en utilisant comme caractère les intensités des spots protéiques obtenus par électrophorèse bidimensionnelle et corrigés des effets fixes. Les détections ont dans un premier temps été faites avec la carte génétique de microsatellites puis avec la carte mixte alliant SNP et microsatellites. Seuls les spots dont les protéines ont pu être identifiées sont présentés ci-après.

2.1. Cartes microsatellites – Groupes de liaisons GL2c et GL09

pQTL uni-caractère (GL2c et GL09)

Les premières détections ont mis en évidence 23 pQTL (François *et al.* 2014), 15 sur GL2c et 8 sur GL09. Onze des 15 spots de GL2c et 6 des 8 spots de GL09 ont pu être identifiés

Tableau 22 : QTL multi-caractères identifiés sur le groupe de liaison GL2c de la carte microsatellite.

Caractère / spot	ENO1 (1376) *	ENO1 (1403) *	TPI (2107) ***	ADK (1534) *	ETFA (1883) **	PRDX6 (2091) *	PRDX4 (2896) *	PRDX4 (2112) *	GMFB (2687) *	DSTN (2697) *	ALDH7 A1 (2886) *
txfonte *	>**	>****	>****	=	>***	=	=	=	=	>**	=
lipFoie *	>**	>***	>**** *	=	>***	>**	=	=	=	>***	>**
txlipF *	>**	>****	>**** *	=	>****	>***	=	=	>**	>****	>**
protFoie *	=	>***	>****	=	>**	=	=	=	=	>**	=
txprotF *	=	>***	>****	NS	>**	=	=	=	=	>**	=

Les étoiles à côté des noms des caractères donnent la significativité de leur QTL uni-caractères. Celles du milieu du tableau donnent la significativité des QTL bi-caractères. NS : non significatif ; * : 5% ; ** : 1% ; *** : 0.5% ; **** : 0.27% ; ***** : 0.1% ; = ou > : la significativité du QTL bi-caractère est égale (=) ou supérieure (>) au meilleur des 2 QTL uni-caractère initiaux. pfoie : poids de foie ; txfonte : taux de fonte ; lipFoie : teneur en lipides estimée sur matière fraîche ; txlipF : teneur en lipides estimée sur matière sèche ; protFoie : teneur en protéines estimée sur matière fraîche ; txprotF : teneur en protéines estimée sur matière sèche. ENO1 : alpha-enolase ; ADK : Adenylate kinase ; PRDX4 : Peroxiredoxin 4 ; GMFB : Glia maturation factor beta ; DSTN : Destrin ; ETFA : Electron transfert flavoprotein alpha ; PRDX6 : Peroxiredoxin 6 ; TPI : Triose Phosphate isomérase ; ALDH7A1 : Aldéhyde déhydrogenase 7 membre A1.

Tableau 23 : QTL multi-caractères identifiés sur le groupe de liaison GL09 de la carte microsatellites.

Caractères / spot	ENO1 (1414) *	ENO1 (1427) *	NDUFS3 (2036) *	PSMA1 (2104) *	PRDX4 (2112) *	SODMn (2281) *
afoie *	=	>**	=	>***	>***	>***
pfoie ***	=	=	=	< **	=	=
txfonte *	>***	>**	=	=	>**	>***
lipFoie *	>**	>***	>**	>**	>**	>***
txlipF ***	=	=	=	=	<**	=
protFoie **	>***	>***	>***	=	>***	>***
txprotF **	>***	>***	=	=	=	>***

Les étoiles à côté des noms des caractères donnent la significativité de leur QTL uni-caractères. Celles du milieu du tableau donnent la significativité des QTL bi-caractères. * : 5% ; ** : 1% ; *** : 0.5% ; **** : 0.27% ; ***** : 0.1% ; <, = ou > : la significativité du QTL bi-caractère est inférieure (<), égale (=) ou supérieure (>) au meilleur des 2 QTL uni-caractère initiaux. afoie : indice de couleur rouge ; pfoie : poids de foie ; txfonte : taux de fonte ; lipFoie : teneur en lipides estimée sur matière fraîche ; txlipF : teneur en lipides estimée sur matière sèche ; protFoie : teneur en protéines estimée sur matière fraîche ; txprotF : teneur en protéines estimée sur matière sèche. ENO1 : alpha-enolase ; NDUFS3 : NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 3 ; PSMA1 : Proteasome subunit alpha 1 ; PRDX4 : Peroxiredoxin 4 ; SODMn : Superoxide dismutase.

(**Tableau 21**). Sur GL2c, les pQTL les plus significatifs concernent ETFA (1% CW) et TPI (0,5% CW). Pour chaque pQTL, seule l'une ou l'autre des familles contribue majoritairement à la vraisemblance (> 60%). Dix des 11 QTL ségrégent dans la famille 43963 ; seul le QTL relatif à ALDH7A ségrége dans la famille 57900. Sur GL09, tous les pQTL identifiés sont significatifs à 5% CW. Deux d'entre eux, relatifs à ENO1 (spot 1414) et PRDX4 ségrégent dans la famille 43963, les 4 autres, relatifs à ENO1 (spot 1427), NDUFS3, PSMA1 et SODMn ségrégent dans la famille 57893.

Les protéines mises en évidence par les pQTL appartiennent à différentes voies métaboliques : nous pouvons identifier des protéines de la glycolyse comme l'alpha-enolase (ENO1) et la triose phosphate isomerase (TPI), de réponse au stress oxydatif comme les PRDX4 et 6 (peroxiredoxin 4 et 6), de structure comme la destrin (DSTN). Dans le but d'identifier des liens entre ces protéines, les caractères de qualité du foie et les loci, des détections de QTL bi-caractères alliant les phénotypes et les protéines ont été entreprises.

QTL multi-caractères protéines/phénotypes (GL2c et GL09)

Des détections de QTL ont été entreprises conjointement entre phénotypes et spots protéiques. Chaque spot protéique donnant un pQTL en uni-caractère a été associé à chaque phénotype avec lequel il co-localise pour une détection conjointe ou multi-caractère. Ainsi sur GL2c (carte microsatellite), 5 QTL (**Tableau 17**) ainsi que 11 pQTL (**Tableau 21**) avaient été identifiés : 55 analyses bi-caractères ont donc été effectuées (**Tableau 22**). De la même manière, sur GL09, 7 QTL ainsi que 6 pQTL avaient été identifiés : 42 analyses bi-caractères ont donc été effectuées (**Tableau 23**).

Sur GL2c, la plupart des combinaisons testées ont mis en évidence un QTL à un seuil de significativité d'au moins 5%, à l'exception de la combinaison txprotF-ADK qui est non-significative (**Tableau 22**). Sur les 11 spots protéiques donnant lieu à des pQTL, 8 donnent au moins 1 QTL pléiotrope lorsqu'ils sont associés aux caractères de qualité du foie. Un QTL est en effet considéré comme pléiotropique lorsque le seuil qu'il a atteint est supérieur à celui atteint par le meilleur des 2 QTL uni-caractères initiaux. Nous pouvons remarquer que TPI, DSTN et ENO1 (spot 1403) présentent des QTL pléiotropiques aussi bien avec le taux de fonte qu'avec les teneurs

Tableau 24 : pQTL identifiés sur les chromosomes APL02 et APL09 de la carte mixte

	Protéine (N°spot)	Seuil % CW	Position (intervalle de confiance) (M)	Marqueur	LRT	Famille (%)	Analyse bi-caractère protéine/protéine
APL02	Sulfurtransferase (1781) – GGA1	5%	0,93 (0,78-1)	SNP066	14,85	43963 (54,32) et 57900 (31,84)	Oui
	ETFA (1883) – GGA10	5%	0,92 (0,77-0,98)	SNP066	15,62	43963 (80,44)	Oui
	DSTN (2697) – GGA3	5%	0,74 (0,70-1,03)	SNP061	16,48	57900 (81,63)	Non
APL09	HAAO (1815) – GGA3	5%	0,08 (0,03-0,15)	SNP204	12,47	57893 (34,9) et 57900 (63,75)	Non
	histone H4 (2910) – GGA1	5%	0,24 (0,02-0,45)	SNP202 – CAU088	12,49	43963 (45,14) et 57900 (38,11)	Non
	FABP7 (2917) – GGA3	5%	0,17 (0-0,29)	SNP203 – SNP202	12,40	43963 (37,14) et 57893 (39,95)	Non

ETFA : Electron transfert flavoprotein alpha ; DSTN : Dextrin ; HAAO : 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase ; FABP7 : Fatty acid binding protein 7. CW : Chromosome wide ; LRT : Likelihood Ratio Test ; Famille (%) : pourcentage de contribution de la famille à la vraisemblance.

en lipides ou en protéines, la significativité la plus importante étant atteinte avec txlipF pour les 3 protéines (0,1% CW, 0,27% CW et 0,27% CW, respectivement). Aucun des 5 autres spots protéiques n'est en pléiotropie avec les teneurs en protéines du foie. En revanche, ENO1 (spot1376) et ETFA présentent des QTL pléiotropiques avec le taux de fonte et les teneurs en lipides alors que PRDX6 et ALDH7A1 n'en présentent qu'avec les teneurs en lipides et GMFB uniquement avec txlipF.

Sur GL09, toutes les combinaisons testées mettent en évidence un QTL bi-caractères significatif à au moins 5% CW (**Tableau 23**). Les deux spots correspondant à ENO1 donnent des QTL pléiotropiques quand ils sont associés avec txfonte, les teneurs en lipides ou protéines. PRDX4 et SODMn donnent également des QTL pléiotropiques quand associés à différents caractères comme afoie, txfonte, lipFoie ou protFoie. Par ailleurs, l'association de lipFoie avec chaque protéine donne systématiquement un QTL pléiotropique. Ces résultats, bien que mettant en évidence des liens entre les protéines et les caractères, ne permettent pas d'en faire ressortir un en particulier.

2.2. Carte mixte – Groupes de liaisons APL02 et APL09

pQTL uni-caractères (APL02 et APL09)

Les détections ont été ensuite entreprises avec la carte alliant SNP et microsatellites. Elles ont permis de mettre en évidence 6 pQTL, relatifs à des protéines identifiées, à 5% de significativité au niveau du chromosome (**Tableau 24**), 3 sur APL02 et 3 sur APL09. Sur APL02, deux familles se démarquent : la famille 43963 contribue majoritairement aux pQTL relatifs à la sulfurtransferase et à ETFA (Electron transfert Flavoprotein alpha) qui co-localisent au niveau du marqueur SNP066 et la famille 57900 au pQTL relatif à DSTN (Destrin) situé au niveau du marqueur SNP061. Sur APL09, les pQTL ne ségrégent pas au sein d'une famille en particulier bien que la famille 57900 soit majoritaire (>60%) pour le pQTL relatif à HAAO (3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase).

Sur ces 6 protéines, seules 2 présentaient un pQTL avec la carte microsatellite : ETFA dont le QTL ségrége toujours dans la famille 43963 et DSTN dont le QTL ségrégeait dans la famille 43963 et ségrége maintenant dans la famille 57900. Nous pouvons constater que la majorité des

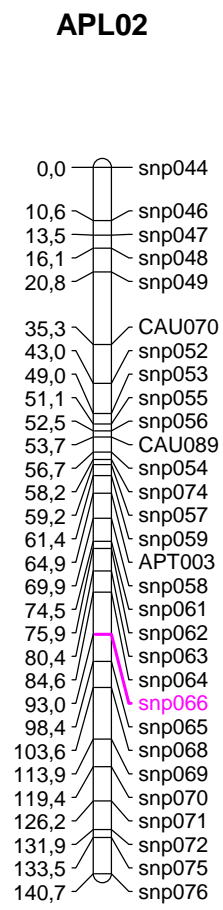
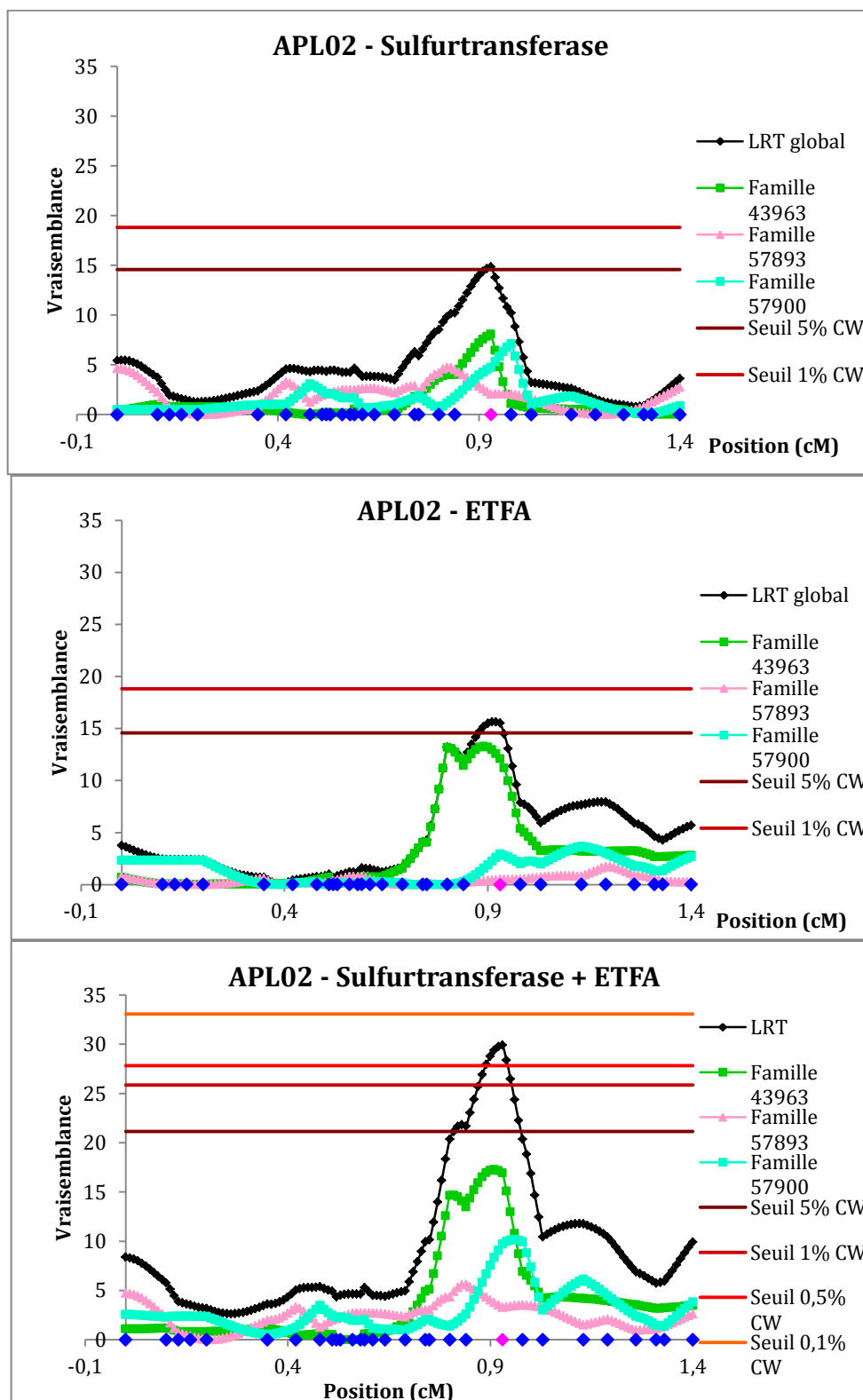


Figure 28 : Courbes de vraisemblance des pQTL co-localisant sur APL02 et du pQTL multi-caractère associé. Le point rose correspond au marqueur SNP066. ETFA = Electron transfert flavoprotein alpha ; LRT : Likelihood Ratio Test ; CW : Chromosome Wide ; LRT : Vraisemblance totale.

pQTL identifiés grâce à la carte microsatellite (15 sur 17) n'apparaissent plus lors des détections entreprises sur APL02 et APL09 de la carte mixte. Parmi ces pQTL ayant disparus, TPI atteignait pourtant le seuil de significativité de 0,5% CW. Pour APL02, dont le groupe de liaisons de la carte microsatellite était très petit (1 cM) avec seulement 2 familles informatives, nous pouvons émettre l'hypothèse que les détections entreprises avec la carte mixte plus dense ont permis d'écarter des pQTL « faux positifs ». Sur APL09, les pQTL mis en évidence avec la carte mixte ne se positionnent pas entre les marqueurs microsatellites, ce qui peut expliquer leur apparition en passant de la première carte ne contenant que des microsatellites à la carte mixte. Concernant les pQTL perdus avec la carte mixte, nous pouvons supposer comme pour APL02 que la densification de la carte ainsi que l'informativité des 3 familles (au lieu de 2 pour la carte microsatellites) du dispositif a permis d'écarter les pQTL faux positifs.

Sur APL02, sulfurtransferase et ETFA présentent des pQTL co-localisés au niveau du marqueur SNP066 et à proximité des QTL phénotypiques relatifs au taux de fonte et à txlipF. Aucun des autres pQTL ne co-localisent entre eux ou avec un QTL phénotypique existant. Sulfurtransferase et ETFA ont donc été utilisés pour des détections de pQTL en analyse bi-caractère protéine/protéine, mais également en analyse bi-caractère protéines/phénotype avec txfonte et txlipF. Sur APL09, en revanche, les pQTL et QTL identifiés ne co-localisent pas entre eux ; les détections en analyse bi-caractères n'ont pas été entreprise.

QTL multi-caractères (APL02)

QTL multi-caractères protéines/protéines

Les pQTL relatifs à la sulfurtransferase et à ETFA co-localisant au niveau du marqueur SNP066, une détection combinant les deux protéines a été entreprise (**Figure 28**). Cette détection met en évidence un QTL au niveau du marqueur SNP066, QTL que l'on qualifie de pléiotropique : un QTL multi-caractère est considéré comme pléiotropique lorsque le seuil atteint par ce QTL est supérieur à celui atteint par le meilleur des deux QTL uni-caractères initiaux, *i.e.* ici, la vraisemblance au QTL bi-caractères atteint le seuil de 0,5% CW alors que les QTL uni-caractères initiaux étaient significatifs uniquement à 5% CW. La sulfurtransferase et l'ETFa sont toutes 2 des protéines mitochondriales (Schiff *et al.* 2006). ETFa est impliquée dans le transfert d'électrons, mais également dans l'oxydation de l'Acyl-CoA mitochondriale et est un ligand du

Tableau 25 : QTL multi-caractères pléiotropiques identifiés sur APL02

Position SNP065-SNP066	Sulfurtransferase (1781)*	ETFA (1883)*
txfonte**	=	>***
lipFoie*	=	=

NS : non significatif ; * : 5% CWS ; ** : 1% CWS ; *** : 0.5% CWS. = ou > : la significativité du QTL bi-caractère est égale (=) ou supérieure (>) au meilleur des 2 QTL uni-caractère initiaux. txfonte : taux de fonte ; lipFoie : Teneur en lipides estimée sur matière fraîche. ETFA : Electron transfert flavoprotein alpha ; TPI : Triose Phosphate isomérase. L'absence de résultats signifie que le QTL bi-caractère n'est pas plus significatif que le meilleur des 2 QTL uni-caractères initiaux.

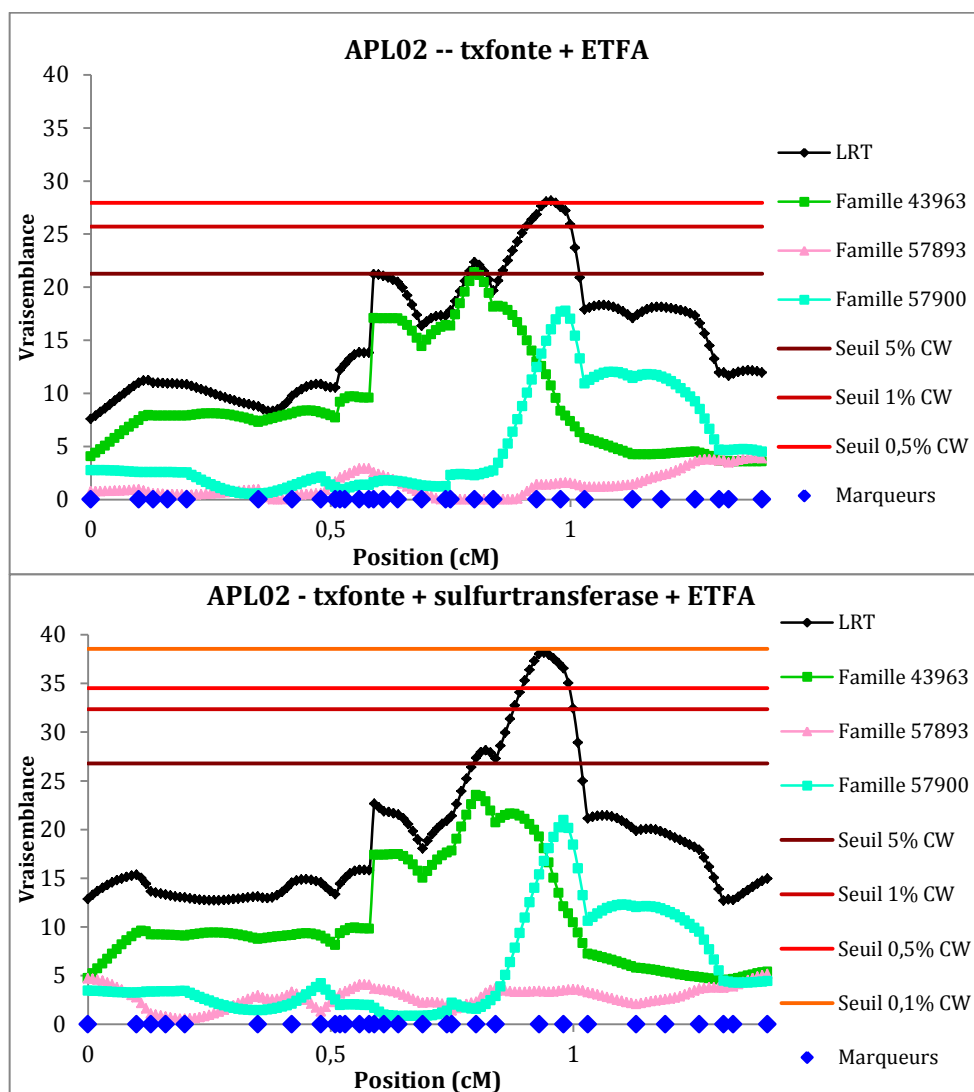


Figure 29 : Courbes de vraisemblance des QTL bi- et tri-caractères pléiotropiques identifiés sur APL02. ETFA : Electron transfert flavoprotein alpha ; txfonte : taux de fonte ; LRT = Vraisemblance totale ; CW : Chromosome Wide

métabolite FAD. Le pQTL bi-caractère identifié en relation avec ces deux protéines semble indiquer une région génomique en lien avec le métabolisme mitochondrial.

Jusqu'à présent, nous nous sommes intéressés aux QTL phénotypiques uni- et bi-caractères ainsi qu'aux pQTL uni- et bi-caractères localisés sur les groupes de liaisons APL02 et APL09 soit de la carte microsatellite, soit de la carte mixte. Nous avons ainsi pu constater des co-localisations entre QTL et pQTL. Des détections de QTL multi-caractères associant un phénotype et une protéine ont alors été entreprises afin de corroborer ou non d'éventuels liens entre les deux niveaux d'expression.

QTL multi-caractères protéines/phénotypes

La même démarche que précédemment a été entreprise avec les QTL co-localisant à proximité des mêmes marqueurs sur APL02. Des 3 spots protéiques donnant un pQTL, seuls 2 (Sulfurtransferase et ETFA) co-localisent avec 2 QTL phénotypiques (txfonte et lipFoie) : les 4 approches bi-caractères ont été testées (**Tableau 25**).

Des 4 combinaisons testées, seule l'association entre txfonte et ETFA met en évidence un QTL pléiotropique, *i.e.* le QTL associant les 2 caractères est plus significatif (0,5% CWS) que le meilleur des 2 QTL initiaux (txfonte : 1% CWS). Les 3 autres combinaisons testées permettent la détection de QTL multi-caractères dont la significativité est seulement équivalente au meilleur des deux QTL initiaux de la combinaison. Il semble donc que cette région génomique ait un rôle important à jouer à la fois dans le métabolisme mitochondrial et dans la fonte à la cuisson. Nous pouvons alors poser l'hypothèse d'un lien entre le taux de fonte et ETFA. Par ailleurs, un lien a déjà été établi entre ETFA et la sulfurtransferase, leur association donnant lieu à un QTL pléiotropique au sein de cette même région. L'association entre txfonte et sulfurtransferase ne permet pas d'améliorer la significativité du meilleur des 2 QTL uni-caractère initiaux. Une association entre txfonte, ETFA et sulfurtransferase a cependant été testée en analyse tri-caractères : le QTL tri-caractère mis en évidence est non seulement pléiotropique par rapport à chacun des QTL uni-caractères initiaux, mais également par rapport aux 3 QTL bi-caractères en dépassant le seuil de 0,27% CWS (**Figure 29**). La région génomique entourant le SNP066 semble ainsi jouer un rôle important dans l'expression des protéines ETFA et sulfurtransferase en lien avec le taux de fonte.

Tableau 26 : QTL phénotypiques à au moins 5% CW identifiés sur l'ensemble des groupes de liaisons de la carte mixte à l'exception des GL02 et 09.

	Caractère	Seuil (%)	Position (intervalle de confiance) (M)	Marqueur	LRT	Multi-caractères	
						Phénotype/p hénotype	Phénotype/ protéine
APL03	protFoie	5	1,17 (1,01-1,27)	CAM161	19,02	Oui	Non
	txprotF	5	1,17 (1,01-1,27)	CAM161	18,39	Oui	Non
APL06	Lfoie	5	0,14 (0,05-0,23)	SNP156	14,46	Non	Non
	txcoll	1	0,08 (0-0,18)	SNP158-SNP156	16,29	Non	Non
APL15	bfoie	1	0,09 (0-0,34)	SNP295 - hap141	15,56	Non	Non
	pfoie	5	0,42 (0,32-0,57)	SNP286-SNP287	11,71	Oui	Oui
	txfonte	0,50	0,41 (0,29-0,52)	SNP286-SNP288	18,80	Oui	Oui
	lipFoie	5	0,41 (0,31-0,53)	SNP286-SNP289	15,15	Oui	Oui
	txlipF	1	0,4 (0,31-0,52)	SNP286	16,40	Oui	Oui
	protFoie	5	0,4 (0,31-0,48)	SNP286	15,47	Oui	Oui
	txprotF	5	0,4 (0,30-0,50)	SNP286	14,46	Oui	Oui
APL16	pfoie	5	0 (0-0,07)	hap150	12,95	Oui	Oui
	txcoll	1	0,01 (0-0,04)	hap150 - SNP303	14,97	Oui	Oui
APL19	txprotF	5	0 (0-0,06)	SNP320	11,72	Non	Non
APL22	bfoie	1	0,08 (0-0,01)	AMU026 – SNP349	14,13	Non	Non
APL23	pfoie	5	0,01 (0-0,008)	SNP353 –SNP355	9,30	Oui	Oui
	txfonte	5	0 (0-0,008)	SNP353	11,65	Oui	Oui
	lipFoie	0,50	0 (0-0,008)	SNP353	14,26	Oui	Oui
	txlipF	0,50	0 (0-0,008)	SNP353	14,80	Oui	Oui
	protFoie	1	0 (0-0,008)	SNP353	12,10	Oui	Oui
	txprotF	0,50	0 (0-0,008)	SNP353	15,33	Oui	Oui
APL25	afoie	5	0,06 (0-0,16)	SNP365 – AMU158	15,63	Non	Non

protFoie et txprotF : teneur en protéines estimée sur matière fraîche et sèche, respectivement. Lfoie : Luminance du foie ; txcoll : Teneur en Collagène ; bfoie : indice de couleur jaune ; pfoie : poids de foie ; txfonte : taux de fonte ; lipFoie et txlipF : teneurs en lipides estimées sur matière fraîche et sèche, respectivement ; afoie : indice de couleur rouge. CW : Chromosome wide ; LRT : Likelihood Ratio Test ; Multi-caractères : les caractères ont été ou non utilisés en détections de QTL multi-caractères, soit en association avec un autre phénotype, soit avec une protéine.

Tableau 27 : QTL identifiés sur les groupes de liaison de la carte microsatellite par Kileh-Wais *et al.* (2012)

GL/APL	Caractère	Marqueurs	Position (cM)	LRT	P-value	Seuil CWS
1b/1	bfoie	APT008-CAUD058	55	21,77	0,037	5%
2b/2	afoie	CAM071-CAUD065	2	19,64	0,038	5%
3/3	bfoie	AMU060-CAM124	2	21,26	0,033	5%
13/14	Lfoie	CAUD013	0	18,18	0,026	5%
20/21	pfoie	CAUD037	2	23,25	0,0026	0.5%
20/21	txcollag	AMU111	1	16,48	0,030	5%

bfoie : Indice de jaune ; afoie : indice de rouge ; Lfoie : Luminance du foie, pfoie : poids de foie ; txcollag : teneur en collagène.

3. Détections de QTL/pQTL tous GL confondus – carte mixte

Après s'être concentré sur les groupes de liaison APL02 et APL09 sur lesquels ségrégaient 11 QTL relatifs à la qualité du foie, il nous a semblé intéressant d'étudier les autres groupes de liaisons. La carte mixte compte en tout 28 groupes de liaisons. Plus complète que la carte microsatellites, nous avons décidé d'effectuer nos analyses directement sur cette carte mixte afin de ne pas augmenter inutilement la quantité de données à étudier : des détections de QTL phénotypiques et de pQTL ont donc été effectuées sur l'ensemble des groupes de liaisons de cette carte (**Figure 14**). Les détections effectuées en uni-caractère seront présentées dans un premier temps, puis nous traiterons les détections effectuées en multi-caractères phénotypes/phénotypes, protéines/protéines et phénotypes/protéines. APL02 et APL09, déjà étudiés précédemment ne seront pas mentionnés dans cette partie.

3.1. Détection des QTL phénotypiques et pQTL en uni-caractère

De la même manière que précédemment, les détections de QTL ont été entreprises pour les 10 caractères de qualité du foie gras, à savoir : la luminance du foie (**Lfoie**), les indices de couleurs rouge (**afoie**) et jaune (**bfoie**), le poids du foie (**pfoie**), le taux de fonte (**txfonte**), les teneurs en lipides et protéines estimées sur matière fraîche (**lipFoie** et **protFoie**, respectivement), les teneurs en lipides et protéines estimées sur matière sèche (**txlipF** et **txprotF**) et le taux de collagène (**txcoll**). Les détections de pQTL ont été faites sur les 326 spots protéiques obtenus par électrophorèse bidimensionnelle et identifiés.

QTL phénotypiques

Vingt-deux QTL liés aux caractères de qualité du foie gras avec une significativité d'au moins 5% CW ont été mis en évidence sur 8 groupes de liaisons (**Tableau 26**). Treize de ces QTL liés à 7 caractères se concentrent sur 2 principaux groupes de liaisons (APL15 et APL23). Par ailleurs, sur chacun de ces GL, tous les QTL, à l'exception du QTL lié à bfoie sur APL15, co-localisent à la même position (40 cM pour APL15 et 0 cM pour APL23). Ces deux groupes de

Tableau 28 : pQTL identifiés à au moins 1% CW sur groupes de liaisons APL01 à APL16 de la carte mixte à l'exception des APL 02 et 09.

GL	Caractère – chr du gène chez la poule	Seuil (%)	Position (M)	Marqueur	LRT max	Multi-caractère	
						Protéine/Protéine	Protéine / Phénotype
APL01	PRDX3 (2246) – GGA6	0,50	2 (1,93-2,15)	SNP009 - CAU112	22,88	Non	Non
	EEF2 (1708) – GGA28	1	0,94 (0,79-1,03)	SNP027	20,03	Non	Non
APL03	TAL(1656) – GGAZ	1	0,81 (0,71-1,02)	SNP088	18,77	Non	Non
APL04	PRDX3(2219) – GGA6	0,50	0,94 (0,83-0,94)	SNP104	18,99	Oui	Non
	AKR1A1 (1614) – GGA8	0,50	0 (0-0,14)	CAM137	19,04	Non	Non
	EIF3I (1736) – GGA23	1	0,93 (0,91-0,94)	hap041-SNP104	16,77	Oui	Non
APL05	ALDH7A1 (2886) – GGAZ	1	0 (0-0,18)	CAM158	13,79	Non	Non
APL06	MDH1 (1707) – GGA3	1	0,21 (0,02-0,27)	SNP155-SNP154	17,14	Non	Non
	PGAM1 (2067) – GGA6	1	0,43 (0,31-0,54)	SNP152-SNP148	16,21	Non	Non
APL07	AKR1A1 (1614) – GGA8	1	0,42 (0,40-0,45)	CAU022	17,93	Non	Non
	APOA1 (2564) – GGA24	0,10	0,69 (0,63-0,70)	SNP175	25,11	Non	Non
APL08	PRPS2 (1816) – GGA1	1	0 (0-0,07)	SNP191	16,27	Non	Non
APL10	HIBCH (1603) – GGA7	0,10	0,11 (0,03-0,2)	SNP228-SNP231	24,11	Non	Non
	ETHE1 (2017) - ?	0,50	0,39 (0,35-0,4)	SNP226-SNP219	21,08	Non	Non
APL11	ANXA5 (1858) – GGA4	1	0,09 (0,05-0,13)	SNP207-SNP216	16,67	Non	Non
	TPI (2133) – GGA1	1	0,22 (0,11-0,24)	SNP216	16,84	Non	Non
APL13	VDAC 1 (1961) – GGA13	0,50	0,47 (0,29-0,52)	SNP257	15,94	Non	Non
APL15	FASN (1906) – GGA18	1	0,25 (0-0,35)	SNP285-SNP286	16,63	Non	Non
	ENO1 (1435) – GGA21	1	0,43 (0,26-0,53)	SNP286-SNP287	16,85	Oui	Oui
	CCT7 (2877) – GGA4	1	0,38 (0,26-0,46)	SNP285-SNP286	17,53	Oui	Oui
APL16	ATPB5 (1365) -	1	0,01 (0-0,08)	hap150	14,46	Non	Oui
	DJ-1 (2269) – GGA21	1	0,21 (0,09-0,23)	SNP300-SNP301	14,67	Non	Non

PRDX3 : peroxiredoxin 3 ; EEF2 : Elongation factor 2 ; TAL : T-cell acute lymphocytic leukemia protein ; AKR1A1 : Aldo-keto reductase family 1 member A1 ; EIF3I : Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I ; ALDH7A1 : Aldehyde dehydrogenase 7 member 1 ; MDH1 : Malate dehydrogenase 1 ; PGAM1 : Phosphoglycerate mutase 1 ; APOA1 : Apolipoprotein A1 ; PRPS2 : Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2 ; HIBCH : 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase ; ETHE1 : Persulfide dioxygenase ETHE1 ; ANXA5 : Annexin 5 ; TPI : Triose Phosphate Isomerase ; VDAC1 : Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 ; FASN : Fatty Acid Synthase ; ENO1 : Alpha-enolase ; CCT7 : Chaperonin containing TCP1 subunit 7 ; ATPB5 : ATP synthase ; DJ-1 (PARK-7) : Parkinson disease Protein 7 ; Multi-caractères : les caractères ont été ou non utilisés en détections de QTL multi-caractères, soit en association avec un autre phénotype, soit avec une protéine.

liaisons semblent être importants pour les caractères de qualité du foie gras et en particulier APL15 pour txfonte (0,5% CW) et APL23 pour les teneurs en lipides (0,5% CW). Les caractères pour lesquels les QTL co-localisent seront analysés en détections de QTL bi-caractères. De la même manière, sur APL03 et APL16, les QTL co-localisent aux positions 117 cM et 0 cM, respectivement et seront associés en analyse bi-caractères.

Les détections de QTL phénotypiques n'ayant pas été effectuées sur l'ensemble de la carte microsatellite avec notre dispositif optimisé, nous ne pouvons attester de la disparition ou de l'apparition de QTL avec la carte mixte. Les QTL identifiés par Kileh-Wais *et al.* (2013) sur l'ensemble du dispositif « GeneCan » sont rappelés dans le **Tableau 27**. Aucun des QTL qui avaient alors été mis en évidence n'a été retrouvé lors des détections sur la carte mixte.

QTL de protéines

Les détections de QTL d'expression de protéines ont été entreprises sur l'ensemble des groupes de liaisons de la carte mixte, hormis APL02 et APL09 (étudiés précédemment). En tout, 176 QTL de protéines ont été identifiés à au moins 5% CW (**Annexe, Tableau 36**). Seuls sont présentés ici les pQTL significatifs à au moins 1% CW, soit un total de 44 pQTL liés à 29 protéines différentes (**Tableau 28 et Tableau 29**) localisés sur 22 des chromosomes de la carte, hors APL02 et APL09. Les protéines ainsi mises en évidence appartiennent à différentes voies métaboliques, mais pour la plupart sont impliquées dans des mécanismes anaboliques. Nous pouvons remarquer ainsi plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme des lipides comme ENO1, TPI, MDH1, FASN, APOA1, ACADS, PGAM1 ou encore FABP7, mais également des protéines impliquées dans leur synthèse ou transport comme GS, EEF2, EIF3I, RPS12, CCT7 ou PDIA3. La protéine PRDX3, impliquée dans la réponse au stress, présente plusieurs QTL sur différents chromosomes (APL01, APL04 et APL18). Enfin, nous pouvons également remarquer le QTL relatif à ANXA5, marqueur de l'apoptose, sur APL11.

Parmi ces QTL, certains atteignent des seuils de significativité de 0,1% CW. C'est le cas de APOA1 sur APL07, de HIBCH sur APL10, de l'ENO1 sur APL18, de PDIA3 et FABP7 sur APL23 ou de VDAC1 sur APL24. Le plus fort pQTL obtenu concerne FASN avec une significativité de 0,01% CW. Ces résultats semblent mettre en évidence des régions de fort intérêt pour le métabolisme des lipides. Par ailleurs, en recherchant les gènes codant pour ces protéines

Tableau 29 : pQTL identifiés à au moins 1% CW sur groupes de liaisons APL18 à APLZ de la carte mixte.

GL	Caractère – chr du gène chez la poule	Seuil (%)	Position (M)	Marqueur	LRT max	Multi-caractère	
						Protéine/Protéine	Protéine/Phénotype
APL18	ENO1 (1427) – GGA21	0,10	0,13 (0,11-0,15)	hap161-SNP308	25,04	Oui	Non
	ENO1 (1414) – GGA21	0,50	0,85 (0,77-0,9)	SNP317-SNP318	18,73	Non	Non
	PRDX3 (2231) – GGA6	0,50	0,04 (0-0,12)	hap161-SNP308	19,41	Oui	Non
	PGAM1 (2076) – GGA6	1	0 (0-0,11)	hap161	17,24	Oui	Non
	GS (1541) – GGA5	1	0,13 (0,09-0,15)	hap161-SNP308	17,1	Oui	non
	RPS12 (2924) – GGA3	1	0,76 (0,65-0,86)	SNP315-SNP316	17,41	Non	Non
APL20	Rab GDP (2887) – GGA1	1	0,18 (0,06-0,27)	SNP330-SNP331	16,36	Non	Non
APL21	CA2 (2034) – GGA2	0,50	0,4 (0,38-0,51)	SNP345	20,33	Non	Non
APL23	PDIA3 (2883) – GGA10	0,10	0 (0-0,008)	SNP353	18,23	Oui	Oui
	FABP7 (2917) – GGA3	0,10	0 (0-0,008)	SNP353	17,35	Oui	Oui
APL24	FASN (1906) – GGA18	0,01	0,27 (0,2-0,29)	SNP359-SNP360	29,39	Oui	Non
	PGAM1 (2076) – GGA6	1	0,06 (0-0,15)	SNP358-SNP359	15,69	Non	Non
	APOA1 (1728) – GGA24	1	0,21 (0,07-0,29)	SNP359-SNP360	15,56	Oui	non
APL25	DJ-1 (2314) – GGA21	0,50	0,32 (0,25-0,39)	SNP361-SNP362	17,74	Non	Non
	ENO1 (1403) – GGA21	0,50	0,38 (0,25-0,39)	SNP363	17,46	Non	Non
	ACADS (1612) – GGA15	1	0,17 (0,08-0,31)	SNP364-SNP361	14,97	Non	Non
APL27	MDH1 (1707) – GGA3	0,50	0,42 (0,34-0,48)	SNP370-SNP372	17,95	Non	Non
	Ester hydrolase (1735) – GGA1	0,50	0,09 (0-0,21)	SNP373-SNP374	17,57	Non	Non
	TTR (2934) – GGA2	0,50	0,51 (0,45-0,51)	SNP371	19,89	Non	Non
APL29	VDAC 1 (1961) – GGA13	0,10	0,08 (0-0,12)	SNP384	19,16	Non	Non
	GS (1523) – GGA5	1	0,14(0,09-0,17)	SNP383-SNP382	14,85	Non	Non
APL Z	TPI (2107) – GGA1	1	0,22 (0,18-0,34)	hap280-SNP141	17,16	Non	Non

ENO1 : Alpha-Enolase ; PRDX3 : Peroxiredoxin 3 ; PGAM1 : Phosphoglycerate mutase 1 ; GS : Glutamine synthase ; RPS12 : Ribosomal Protein S12 ; CA2 : Carbonic Anhydrase 2 ; PDIA3 : Protein disulfide-isomerase A3 ; FABP7 : Fatty Acid Binding Protein 7 ; FASN : Fatty Acid Synthase ; APOA1 : Apolipoprotein1 ; DJ-1 (PARK-7) : Parkinson disease Protein 7 ; ACADS : Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase ; MDH1 : Malate Dehydrogenase ; TTR : Transthyretin ; VDAC1 : Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 ; TPI : Triose Phosphate Isomerase ; Multi-caractères : les caractères ont été ou non utilisés en détections de QTL multi-caractères, soit en association avec un autre phénotype, soit avec une protéine.

dans la base de donnée de ENSEMBL (http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/), nous avons pu remarquer qu'aucun des gènes codant pour les protéines mises en évidence par un QTL ne sont localisés sur les chromosomes identifiés : il n'y a pas de cis-pQTL. Par exemple, le gène de FASN est situé sur le chromosome GGA18 de la poule, correspondant au chromosome APL19 du canard, cependant, aucun pQTL n'a été mis en évidence sur ce chromosome. Les analyses bi-caractères en associant les protéines entre elles ou les protéines avec les phénotypes lorsque les pQTL/QTL co-localisent peuvent ainsi aider à confirmer l'intérêt des locus en question.

3.2. Détection de QTL multi-caractères

Les caractères et protéines pour lesquels les QTL et pQTL uni-caractères co-localisent ont été associés afin d'effectuer des détections de QTL multi-caractères, phénotype/phénotype, protéine/protéine ou phénotype/protéine. Ainsi, une analyse bi-caractères phénotype/phénotype a été réalisée sur APL03 et sur APL16 (**Figure 32**), et 15 analyses ont été effectuées pour chacun des chromosomes APL15 (**Tableau 30**) et APL23 (**Tableau 33**). Une analyse bi-caractères protéine/protéine a été réalisée sur APL04 (**Figure 30**), sur APL15 (**Figure 31**), sur APL23 et APL24 et 6 analyses ont été testées sur APL18 (**Tableau 32**). Trois chromosomes présentent des co-localisations de QTL pour des phénotypes et des protéines : APL15, APL16 et APL23. Quatre analyses bi-caractères phénotypes/protéines ont été effectuées sur APL15 (**Tableau 31**) ainsi qu'une analyse tri-caractères, une analyse a été réalisée sur APL16 (**Figure 33**) et 12 associations ont été testées sur APL23 (**Tableau 34**). Tous ces résultats sont présentés chromosome par chromosome.

Pour APL03, les QTL initiaux liés à 2 expressions du taux de protéines dans le foie (protFoie et txprotF) sont significatifs à 5% CW. La combinaison des 2 caractères permet de mettre en évidence un « pic » dont la significativité atteint les 10 % CW. L'association des deux caractères ne permet donc pas de renforcer les QTL uni-caractères déjà présents et ne confirme pas l'intérêt du locus pour les caractères de taux de protéines.

Sur APL04, l'association de 2 protéines, EIF3I (1736) et PRDX3 (2219), permet de mettre en évidence un fort QTL pléiotropique (**Figure 30**) : celui-ci atteint un seuil de significativité de

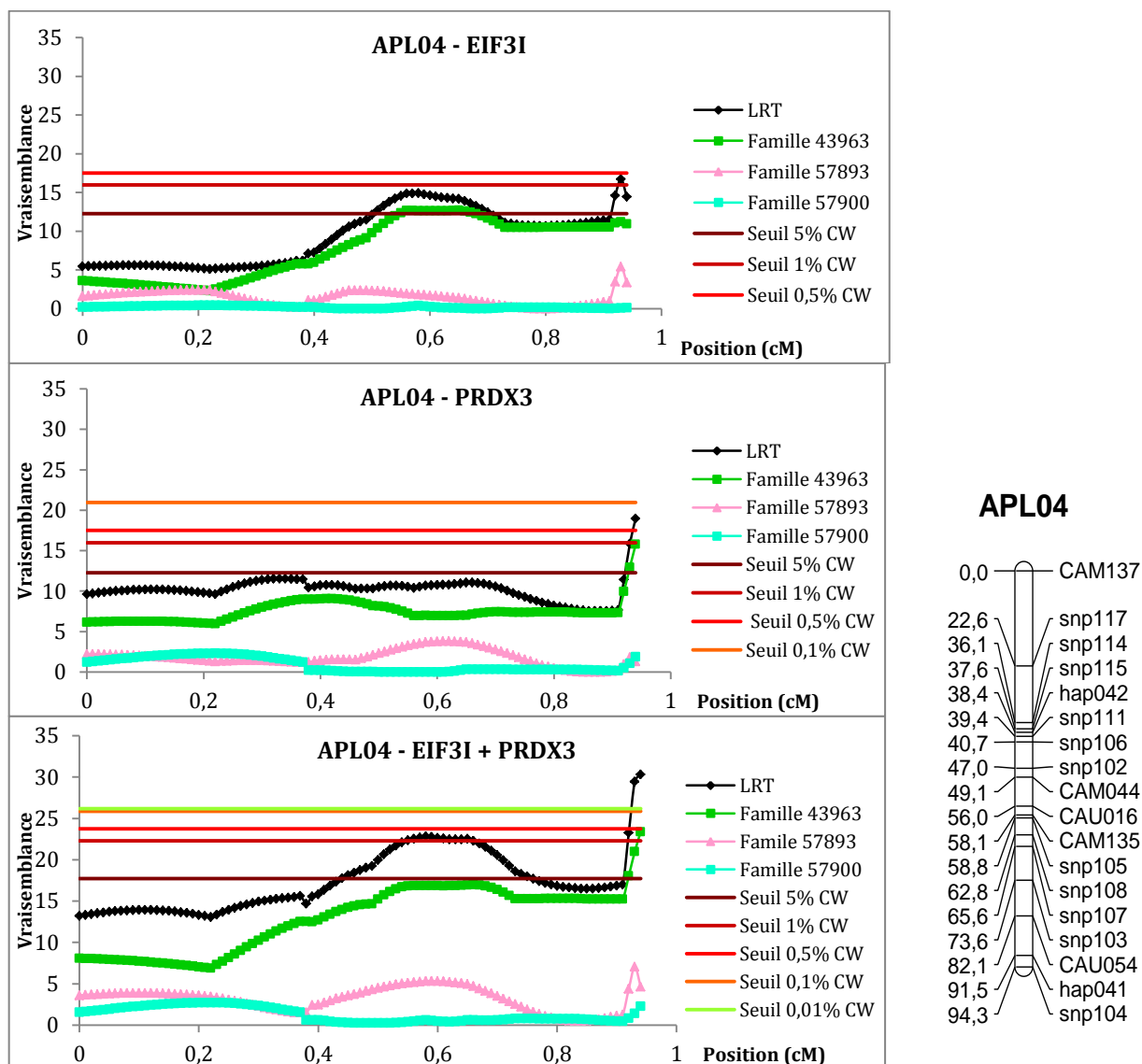


Figure 30 : Courbes de vraisemblance des pQTL uni- et bi-caractères obtenus sur APL04. EIF3I : Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I ; PRDX3 : Peroxiredoxin 3 ; LRT : Vraisemblance totale ; CW : Chromosome Wide

Tableau 30 : QTL bi-caractères mis en évidence sur APL15 (carte mixte)

	pfoie *	txfonte ***	lipFoie *	txlipF **	protFoie *	txprotF *
pfoie *		=***	NS	<*	NS	NS
txfonte ***			<*	<*	<*	<*
lipFoie *				NS	NS	NS
txlipF **					<*	NS
protFoie *						=*

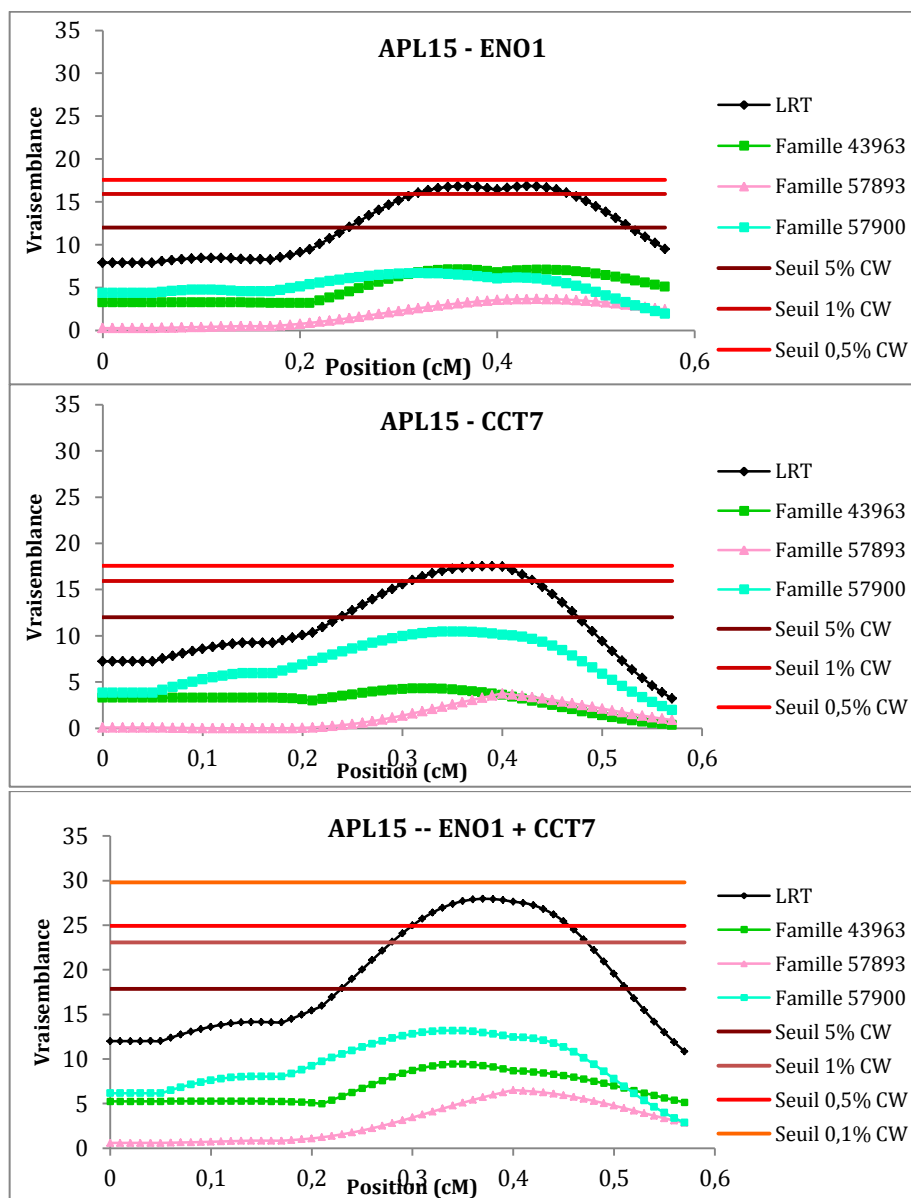
Les étoiles à côté des noms des caractères donnent la significativité de leur QTL uni-caractères. Celles du milieu du tableau donnent la significativité des QTL bi-caractères. NS : non significatif ; = ou < : La significativité du QTL bi-caractères est égale (=) ou inférieure (<) au meilleur des 2 QTL uni-caractère initiaux. pfoie : poids de foie ; txfonte : taux de fonte ; lipFoie : teneur en lipides estimée sur matière fraîche ; txlipF : teneur en lipides estimée sur matière sèche ; protFoie : teneur en protéines estimée sur matière fraîche ; txprotF : teneur en protéines estimée sur matière sèche.

0,01% CW alors que les seuils des QTL uni-caractères initiaux sont de 1% et 0,5% CW, respectivement. L'intervalle de confiance du QTL pléiotropique réduit de 1 cM l'intervalle des QTL uni-caractères (0,91-0,94 M pour EIF3I et 0,83-0,94 M pour PRDX3) et est borné entre 0,92 et 0,94 M. EIF3I est un facteur d'initiation de la traduction des ARNm en protéines. PRDX3 est une protéine impliquée dans la réponse au stress oxydatif et semblerait favoriser la survie cellulaire face au stress (Wang *et al.* 2013). Ces deux protéines avaient été identifiées comme ayant un lien avec le taux de fonte par Théron *et al.* (2011). Bien qu'il n'y ait pas de QTL de qualité de foie sur ce chromosome, nous pouvons émettre alors l'hypothèse d'une implication de ce locus dans la qualité du foie gras au travers de ces deux protéines.

Le chromosome APL15 concentre 7 QTL liés aux caractères de qualité du foie gras dont 6 co-localisent au même marqueur (SNP286 –**Tableau 26**). Les combinaisons 2 à 2 de ces 6 caractères mettent en évidence des QTL multi-caractères phénotypes/phénotypes, notamment pour les combinaisons incluant le taux de fonte, mais aucune pléiotropie (**Tableau 30**). En effet, le meilleur des QTL est lié à la combinaison pfoie/txfonte et présente une significativité à 0,5% CW équivalente à celle du QTL lié à txfonte uniquement. Au final, 5 des 8 QTL bi-caractères mis en évidence mettent en jeu le taux de fonte suggérant que la région génomique est plus « spécifique » de ce caractère.

Concernant les protéines, 3 pQTL ont été mis en évidence sur APL15. Les pQTL liés à ENO1 (1435) et CCT7 (2877) sont distant de 5 cM autour du marqueur SNP286. La combinaison de l'ENO1 et de CCT7 met en évidence un pQTL atteignant un seuil de significativité de 0,5% CW (**Figure 31**), seuil supérieur à ceux des pQTL uni-caractères initiaux dont les seuils étaient à 1% CW. Ce pQTL est donc considéré comme pléiotropique et l'intervalle de confiance de ce pQTL a été légèrement précisé (de 0,29 à 0,47 M) par rapport aux deux pQTL uni-caractère (de 0,26 à 0,53 pour ENO1 et 0,26 à 0,46 pour CCT7).

Par ailleurs, nous pouvons remarquer que 6 QTL phénotypiques co-localisent autour du même marqueur, le SNP286 ainsi que les 2 pQTL relatifs à CCT7 et ENO1. Ces deux protéines ont été associées successivement à chacun des phénotypes pour lesquels un QTL à au moins 1% CW co-localisait dans cette région, soit à txfonte (0,5% CW) et à txlipF (1% CW). Les 4 combinaisons permettent la détection de 4 QTL pléiotropiques : à 0,1% CW pour la combinaison



APL15

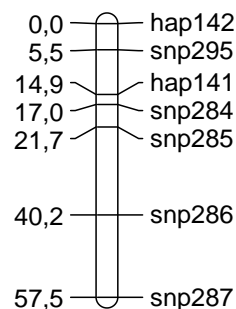


Figure 31 : Courbes de vraisemblance des QTL uni- et bi-caractères relatifs à ENO1 et CCT7 sur APL15.
 ENO1 : Alpha-Enolase ; CCT7 : Chaperonin containing TCP1 subunit 7 ; LRT : Vraisemblance totale ; CW : Chromosome Wide

Tableau 31 : QTL bi-caractères protéine/phénotypes identifiés sur APL15.

	txfonte ***	txlipF **
ENO1 (1435) **	>*****	>****
CCT7 (2877) **	>*****	>*****

Les étoiles à côté des noms des caractères donnent la significativité de leur QTL uni-caractères. Celles du milieu du tableau donnent la significativité des QTL bi-caractères. > : la significativité du QTL bi-caractères et supérieure au meilleur des 2 QTL uni-caractères initiaux. ** : 1% CWS ; *** : 0.5% CW ; **** : 0.1% CW ; ***** : 0.05% CW. ENO1 = alpha-enolase ; CCT7 = Chaperonin containing TCP1 subunit 7.

ENO1-txlipF et à 0,05% CW pour les 3 autres combinaisons (**Tableau 31**). ENO1 est une enzyme de la glycolyse et CCT7 est une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique. Ces QTL pléiotropiques suggèrent que ce locus d'APL15 est impliqué dans des caractères de qualité du foie (taux de fonte et teneur en lipides) via le processus glycolytique.

Pour APL16, plusieurs analyses bi-caractères ont été effectuées : une analyse phénotype/phénotype, deux analyses phénotype/protéine ainsi qu'une analyse tri-caractères phénotypes/protéine.

L'analyse bi-caractères phénotype/phénotype révèle un QTL pléiotropique : en effet, les QTL initiaux liés au poids de foie (pfoie) et au taux de collagène (txcollag) présentent des significativités à 5% CW et 1% CW, respectivement, alors que la combinaison de ces deux caractères permet d'atteindre un seuil de significativité de 0,01% CW (**Figure 32**). Outre l'amélioration du seuil de significativité, le QTL bi-caractères permet également de réduire l'intervalle de confiance du QTL : établi entre les positions 0 M et 0,04 M (txcollag) ou 0,07 M (pfoie) en uni-caractère, il est estimé entre 0 et 0,03 M pour le QTL bi-caractères.

Un pQTL, relatif à ATPB5 (spot 1365), co-localise avec les 2 QTL, relatifs à pfoie et txcollag au niveau du marqueur hap150. La protéine a été associée aux deux phénotypes l'un après l'autre en analyse bi-caractères, puis avec les deux ensemble en analyse tri-caractères (**Figure 33**). ATPB5 présentait un pQTL tout juste à 1% CW, pfoie et txcollag présentaient des QTL à 5% et 1%, respectivement. L'association ATPB5-pfoie met en évidence un QTL pléiotropique atteignant le seuil de 0,5% CW et celle entre ATPB5 et txcollag, un QTL pléiotropique dépassant le seuil de 0,1% CW. L'association des 3 caractères ensemble (protéine + phénotypes) donne un QTL pléiotropique avec une significativité encore plus élevée que celle des QTL bi-caractères (0,01% CW), mais ne permet pas de réduire l'intervalle de confiance des QTL : il reste borné entre 0 et 0,03 M comme le QTL bi-caractères pfoie/txcollag.

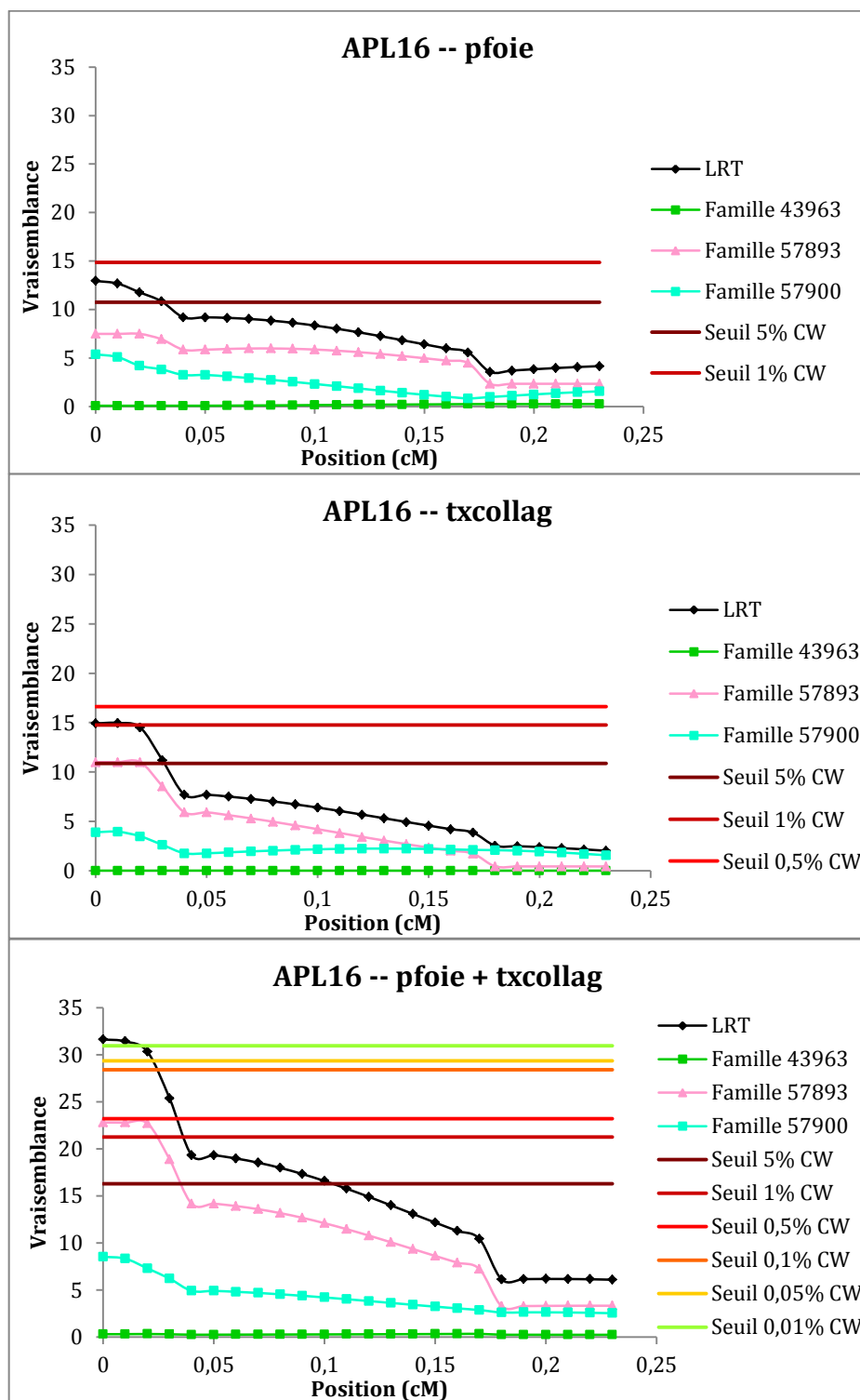


Figure 32 : Courbes de vraisemblance des QTL uni- et bi-caractères identifiés sur APL16. pfoie : poids de foie ; txcoll : teneur en collagène ; LRT : Vraisemblance totale ; CW : Chromosome Wide

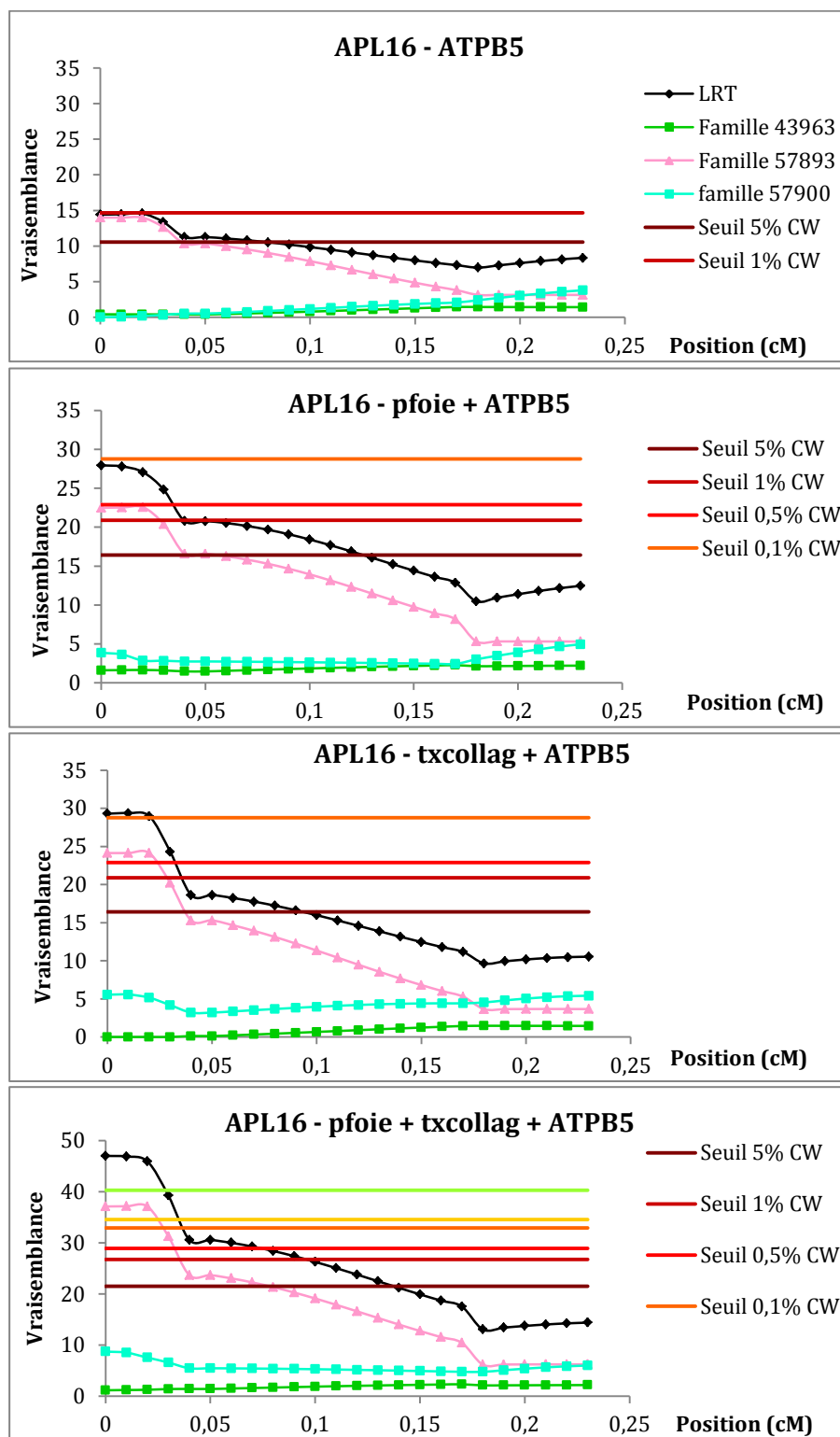


Figure 33 : Courbes de vraisemblances du pQTL uni-caractère, puis des QTL bi- et tri-caractères de APL16. LRT : Vraisemblance totale ; CW : Chromosome Wide ; ATPB5 : ATP synthase ; pfoie : poids de foie ; txcoll : teneur en collagène

Tableau 32 : pQTL bi-caractères identifiés sur APL18 pour chaque intervalle de confiance

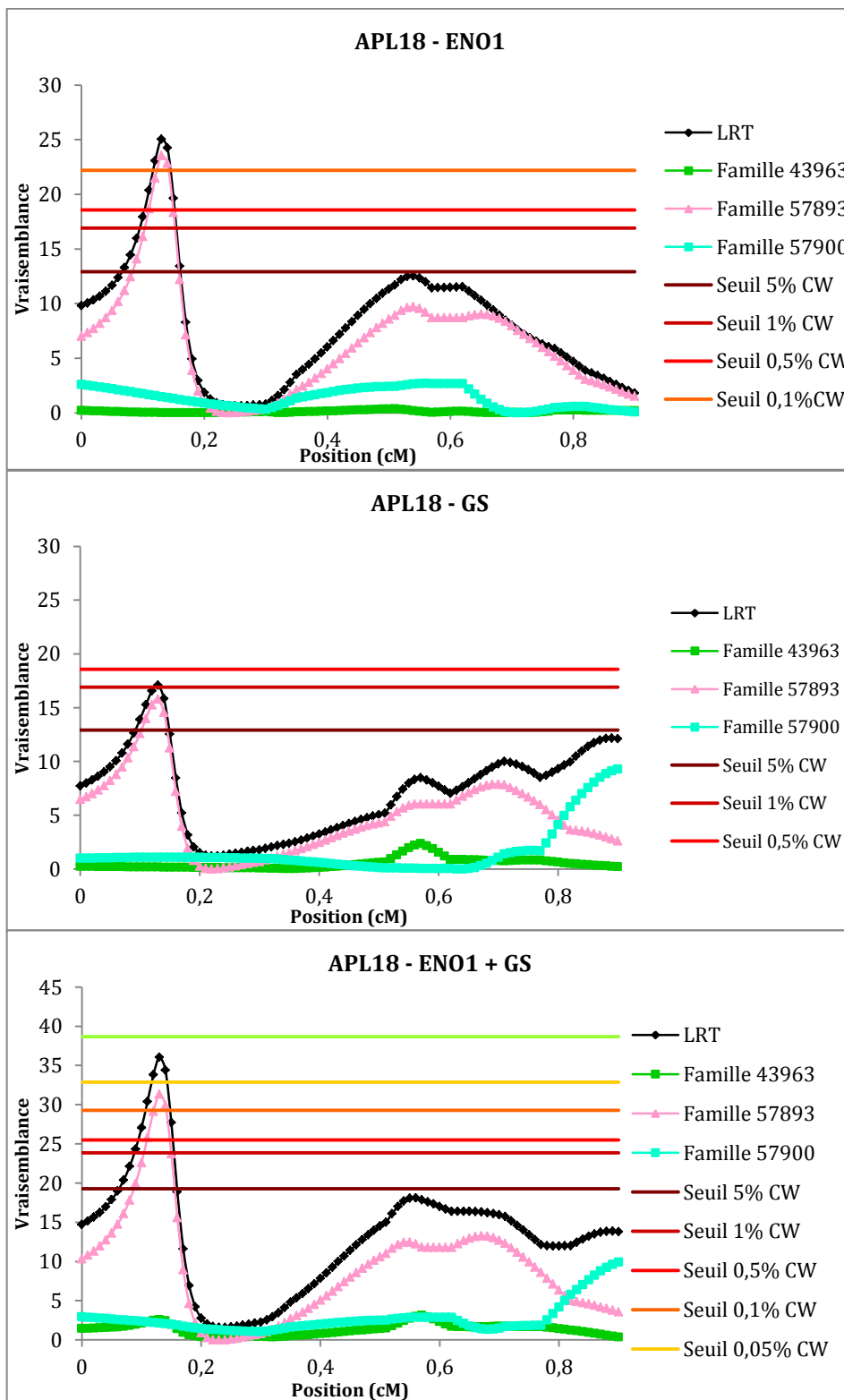
Intervalle 0,09-0,15 M	ENO1 (1427) ****
GS (1541)**	>*****

Intervalle 0-0,12 M	PRDX3 (2231) ***
PGAM1(2076) **	>*****

Les étoiles à côté des noms des caractères donnent la significativité de leur QTL uni-caractères. Celles du milieu du tableau donnent la significativité des QTL bi-caractères. * : 5% ; ** :1% ; *** : 0,5% ; **** : 0,1% ; ***** : 0,05% ; ENO1 : alpha-enolase ; GS : Glutamine Synthase ; PGAM1 : Phosphoglycérate Mutase 1 ; PRDX3 : Peroxiredoxin 3. Les nombres entre parenthèse sont les numéros de spots sur les gels 2D.

Au sein du chromosome APL18, 4 pQTL liés à 4 protéines différentes co-localisent entre les marqueurs hap161 et SNP308 (**Figure 12**). Cependant les intervalles de confiance définissent deux régions distinctes : les QTL liés à ENO1 (1427) et GS (1541) co-localisent ensemble sur le même intervalle de confiance (0,11-0,15 et 0,09-0,15, respectivement) et les QTL liés à PRDX3 (2231) et PGAM1 (2076) co-localisent également ensemble sur l'intervalle de confiance (0-0,12 et 0-0,11, respectivement). Sur chaque intervalle, les protéines dont les QTL co-localisent ont été associées pour effectuer des détections de QTL bi-caractères (**Tableau 32 et Figure 34**).

Les deux combinaisons mettent en évidence des QTL bi-caractères significatifs. Le QTL bi-caractères relatif à ENO1/GS a une significativité atteignant 0,05% CW, soit meilleure que le pQTL lié à ENO1 (0,1% CW), il est donc pléiotropique. Par ailleurs, l'intervalle de confiance n'a pas été réduit par l'approche multi-caractères : il reste défini entre 0,11 et 0,15 M. Le QTL bi-caractères relatif à PRDX3/PGAM1 est également pléiotropique puisqu'il atteint le seuil de 0,1% CW, supérieur à celui de PRDX3 seul (0,5%). Cette association permet par ailleurs de réduire sensiblement l'intervalle de confiance des QTL, celui-ci est défini entre 0 et 0,1 M. Parmi ces protéines, ENO1 et PGAM1 sont deux enzymes de la glycolyse. GS est impliquée dans des processus de synthèse des acides aminés et PRDX3 est impliquée dans la réponse au stress oxydatif. Il semblerait alors que le locus rassemblant les QTL pour ENO1 et GS soit en lien avec un processus anabolique. Comme précisé ci-dessus, PRDX3 est impliquée dans la protection cellulaire face au stress oxydatif et favoriserait la survie cellulaire. PGAM1 quant à lui semble permettre la prolifération cellulaire en favorisant la glycolyse (Heiden *et al.* 2010). Le locus rassemblant les QTL pour PGAM1 et PRDX3 semble ainsi impliqué dans des phénomènes de survie cellulaire.



APL18

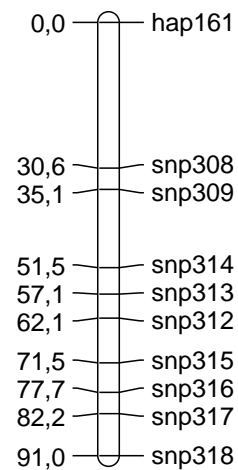


Figure 34 : Courbes de vraisemblance des pQTL uni- et bi-caractères obtenus sur APL18. ENO1 : Alpha-
 enolase ; GS : glutamine Synthase.

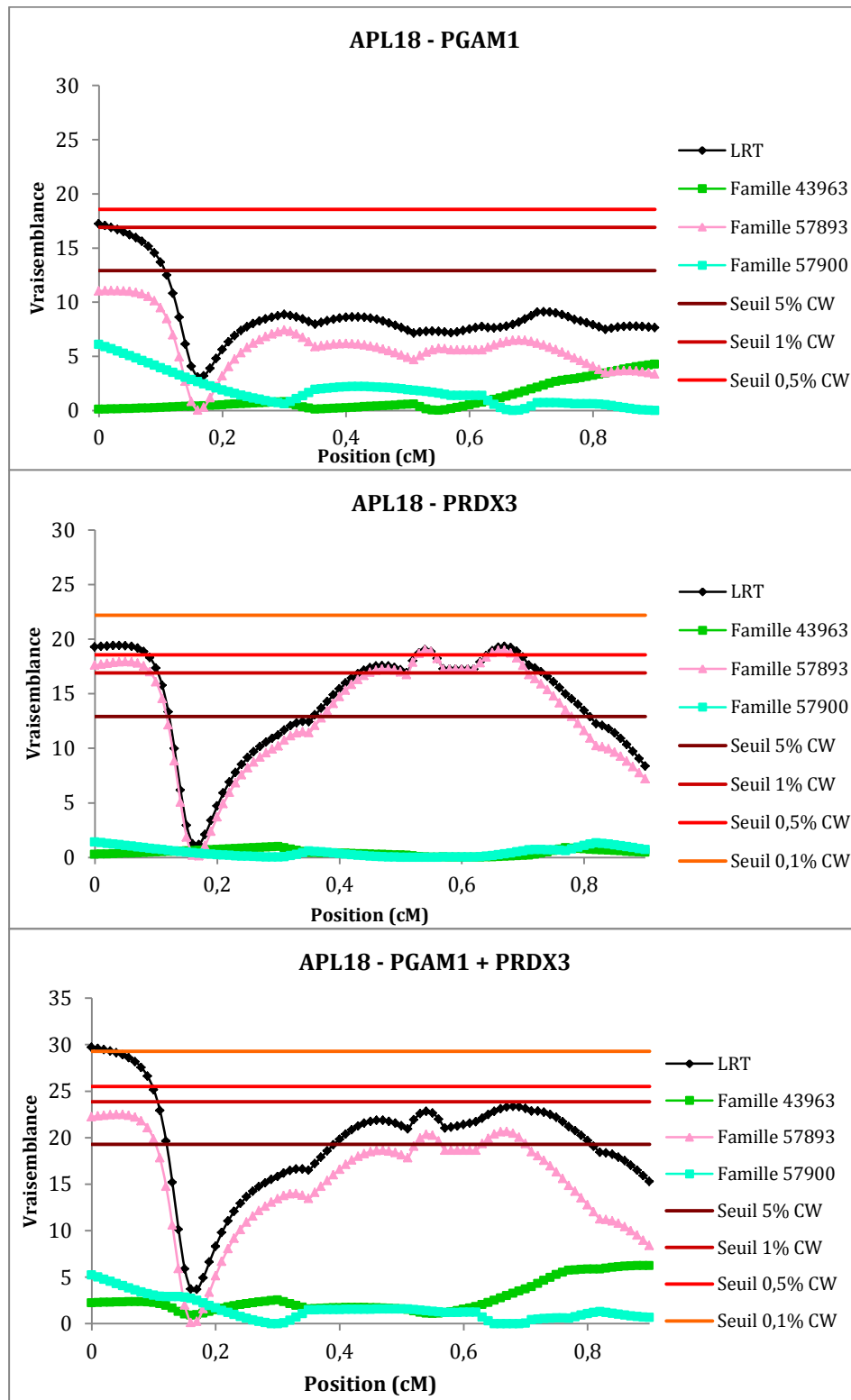


Figure 34 suite : Courbes de vraisemblance des pQTL uni- et bi-caractères obtenus sur APL18. PGAM1 : Phosphoglycerate mutase 1 ; PRDX3 : Peroxiredoxin 3.

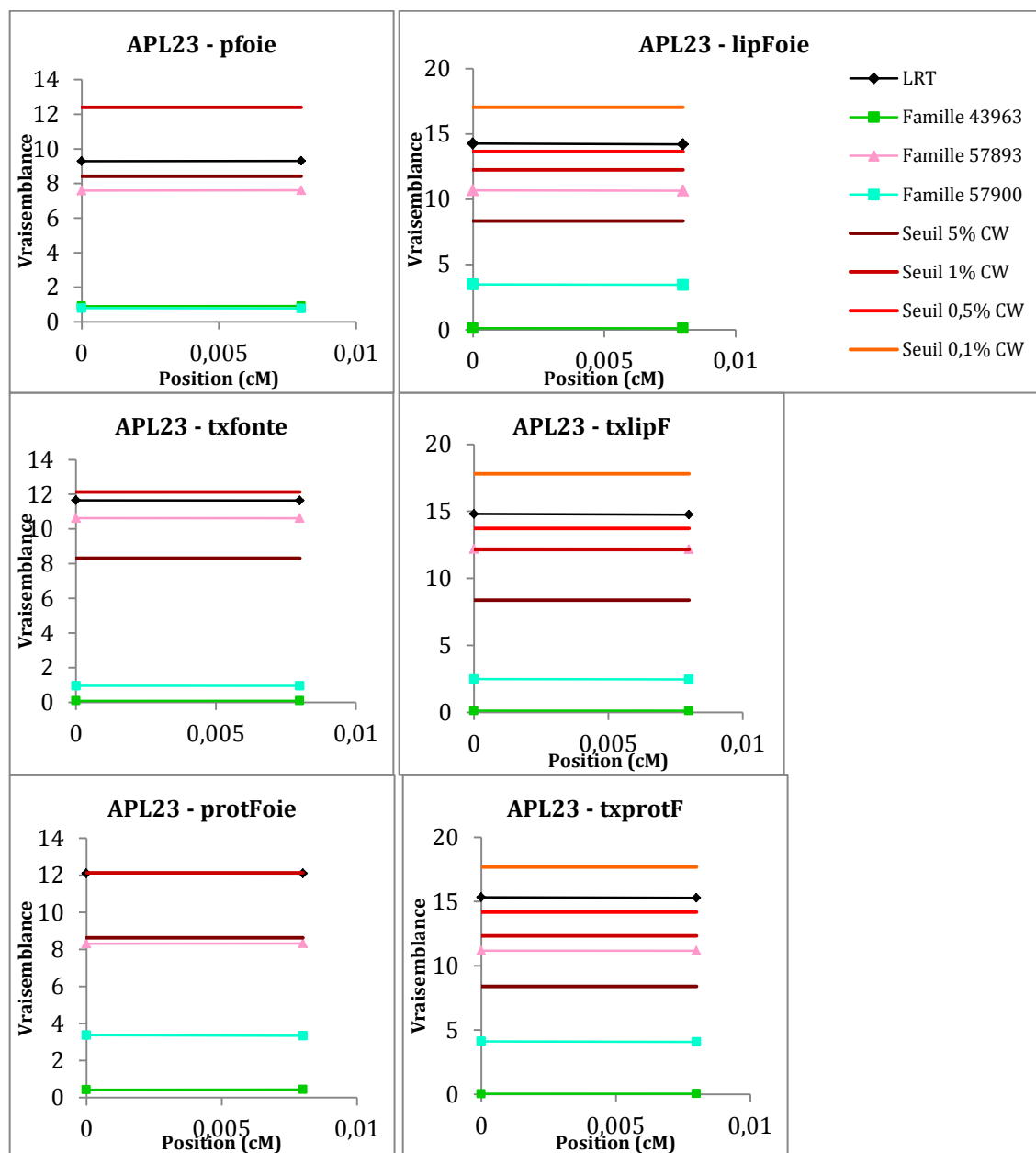


Figure 35 : Courbes de vraisemblance des QTL identifiés sur APL23.

Tableau 33 : QTL bi-caractères mis en évidence sur le APL23 (carte mixte)

	pfoie *	txfonte *	protFoie ***	txprotF ***	lipFoie **	txlipF ***
pfoie *		= *	< *	< *	< *	< *
txfonte *			< *	< *	< *	< *
protFoie ***				< **	< *	< *
txprotF ***					< *	< *
lipFoie **						< *

NS : non significatif ; = ou < : La significativité du QTL bi-caractères est égale (=) ou inférieure (<) au meilleur des 2 QTL uni-caractère initiaux. pfoie : poids de foie ; txfonte : taux de fonte ; lipFoie : teneur en lipides estimée sur matière fraîche ; txlipF : teneur en lipides estimée sur matière sèche ; protFoie : teneur en protéines estimée sur matière fraîche ; txprotF : teneur en protéines estimée sur matière sèche.

APL23, qui est un micro-chromosome, est représenté par un groupe de liaison de 0,8 cM de longueur uniquement. Néanmoins, APL23 concentre également 6 QTL relatifs à 6 caractères de qualité du foie gras, qui sont tous localisés au même endroit (**Figure 35**). Les combinaisons 2 à 2 de ces caractères ne permettent pas de mettre en évidence de QTL pléiotropique (**Tableau 33**). En effet, la significativité des QTL initiaux (lipFoie, txlipF et txprotF à 0,5% CW et protFoie à 1% CW) n'est dépassée par aucune des combinaisons de caractères. Seule l'association protFoie/txprotF donne un QTL significatif à 1% CW mais ces résultats ne permettent pas de confirmer l'intérêt du locus pour un caractère en particulier.

Les deux pQTL identifiés sur APL23 (**Figure 36**) co-localisent au niveau du marqueur SNP353 : l'association des deux protéines correspondantes (PDIA3-2883 et FABP7-2917) met en évidence un pQTL pléiotropique à ce marqueur, celui-ci dépassant les 0,01% de significativité CW pour des pQTL initiaux à un seuil de 0,1% CW. Malgré la petite taille de ce chromosome et de la région couverte par les marqueurs, ces résultats semblent confirmer un lien entre ces deux protéines et le locus en question.

Sur APL23, 2 pQTL ainsi que les 6 QTL co-localisent entre les deux seuls marqueurs du chromosome. Douze associations ont donc été testées en détections de QTL bi-caractères phénotype/protéines (**Tableau 34**). Toutes mettent en évidence des QTL bi-caractères dont 9 QTL pléiotropes. L'association de FABP7 ou de PDIA3 avec les caractères de teneurs en lipides et protéines ainsi que l'association de PDIA3 avec txfonte donne des QTL dont les significativités dépassent 0,05% CW pour des QTL initiaux de FABP7 et PDIA3 à 0,1% CW. FABP7 est une protéine de transport des acides gras et PDIA7 est une protéine du réticulum endoplasmique aidant à la conformation des protéines lors de leur synthèse. Ces QTL suggèrent ainsi un lien entre ce locus (bien que petit) et les processus de conformation (PDIA3) et de transport (FABP7) des protéines.

Enfin pour APL24, 2 pQTL, liés à FASN (1906) et à APOA1 (1728) co-localisent entre les mêmes marqueurs (SNP359-SNP360) et partagent une partie de leur intervalle de confiance (0,20-0,29 M et 0,07-0,29 M, respectivement). L'association des deux protéines met en évidence un pQTL atteignant un seuil de significativité de 0,01% CW, mais celui-ci n'est pas considéré comme pléiotropique puisque le pQTL relatif à FASN atteint le même seuil de 0,01% CW. Cependant, la

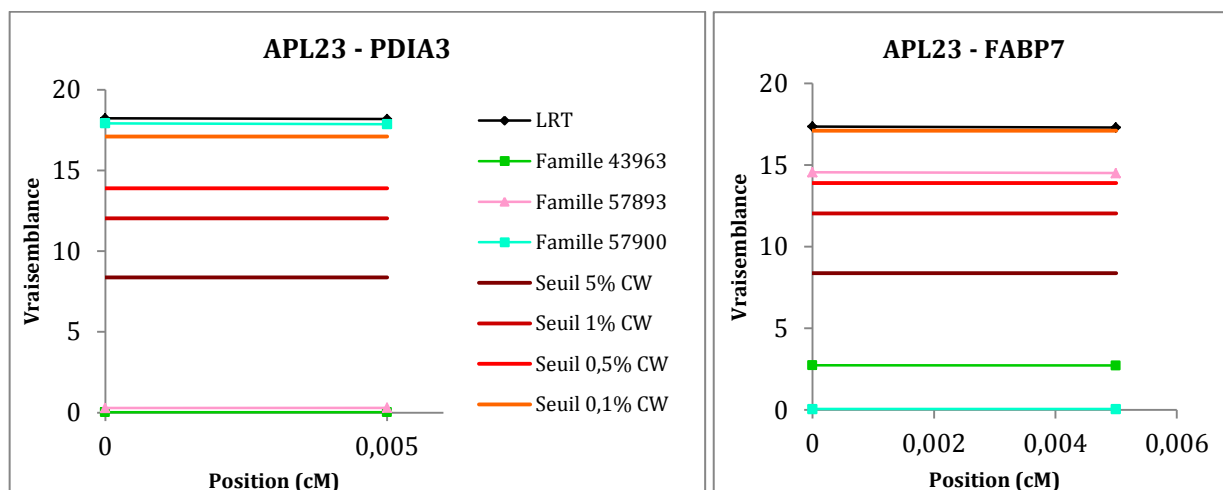


Figure 36 : Courbes de vraisemblance des pQTL identifiés sur APL23.

Tableau 34 : QTL bi-caractères protéine/phénotypes identifiés sur APL23.

	Pfoie *	Txfonte *	protFoie **	txprotF ***	lipFoie ***	txlipF****
FABP7 (2917) ****	=	=	>*****	>*****	>*****	>*****
PDIA3 (2883) ****	=	>*****	>*****	>*****	>*****	>*****

Significativités : * : 5% CW ; ** : 1% CW ; *** : 0,5% CW ; **** : 0,1% CW ; ***** : 0,05% CW ; ***** : 0,01% CW. pfoie : poids de foie ; txfonte : taux de fonte ; protFoie/lipFoie et txprotF/txlipF : teneurs en protéines/lipides sur matière fraîche et sèche, respectivement ; FABP7 : Fatty Acid Binding Protein 7 ; PDIA3 : PDIA3 : Protein disulfide-isomerase A3.

très forte significativité du pQTL relatif à FASN suggère que ce locus est fortement impliqué dans le métabolisme des lipides.

4. Bilan des détections de QTL et pQTL, uni- et multi-caractères.

Lors de cette étude, les détections de QTL ont permis de mettre en évidence 12 QTL sur la carte microsattellites (GL2c et GL09) et 30 QTL sur la carte nouvelle carte mixte. Les détections de pQTL ont mis en évidence 17 pQTL sur les GL2c et GL09 de la carte microsattellites et 50 pQTL sur la carte mixte, relatifs à 52 spots protéiques différents (**Figure 37** et **Annexe Tableau 37**).

Identifiés comme ségrégant plusieurs QTL relatifs à la qualité du foie suite aux résultats obtenus par Kileh-Wais *et al.* (2013), les groupes de liaisons GL2c et GL09 ont été étudiés en priorité, sur la carte microsattellites initiale puis sur la carte mixte (chromosomes APL02 et APL09), au travers des détections de QTL et de pQTL effectuées sur notre dispositif optimisé.

Les premiers QTL identifiés, relatifs aux caractères de qualité du foie (afoie, pfoie, txfonte, lipfoie txlipF, protFoie et txprotF) ségrégaient sur GL2c et GL09. Le groupe de liaisons GL09 semblait plus prometteur que GL2c avec 4 QTL sur 7 identifiés à 1% ou 0,5% CWS contre 0 QTL sur 5 pour APL02. Les détections entreprises sur les cartes mixtes APL02 et APL09 sur les mêmes caractères ont inversé la tendance, puisque APL02 est apparu plus informatif qu'APL09. Sur APL02, deux régions génomiques ont été mises en évidence, de part et d'autre du marqueur co-localisant avec ceux de la carte microsattellite, chacune ségrégant 4 et 3 QTL, respectivement, à 5% ou 1% CWS. Bien que ces deux régions semblent liées aux différents caractères de qualité du foie gras, l'analyse bi-caractères de QTL pour chaque région ne permet cependant pas d'établir de lien plus étroit entre une région génomique et les caractères, à l'exception de la région autour des marqueurs SNP066 et SNP065. En effet ce locus ségrége des QTL, pQTL, des QTL bi-caractères dont un pléiotropique et un QTL tri-caractères très fortement pléiotropique. Cette région génomique semble ainsi être impliquée dans le métabolisme lipidique mitochondrial au travers de la sulfurtransferase et de ETFA.

Sur APL09, bien que les détections sur la carte microsattellite aient été prometteuses, les détections effectuées sur la carte mixte ne permettent pas d'établir de lien entre ce groupe de

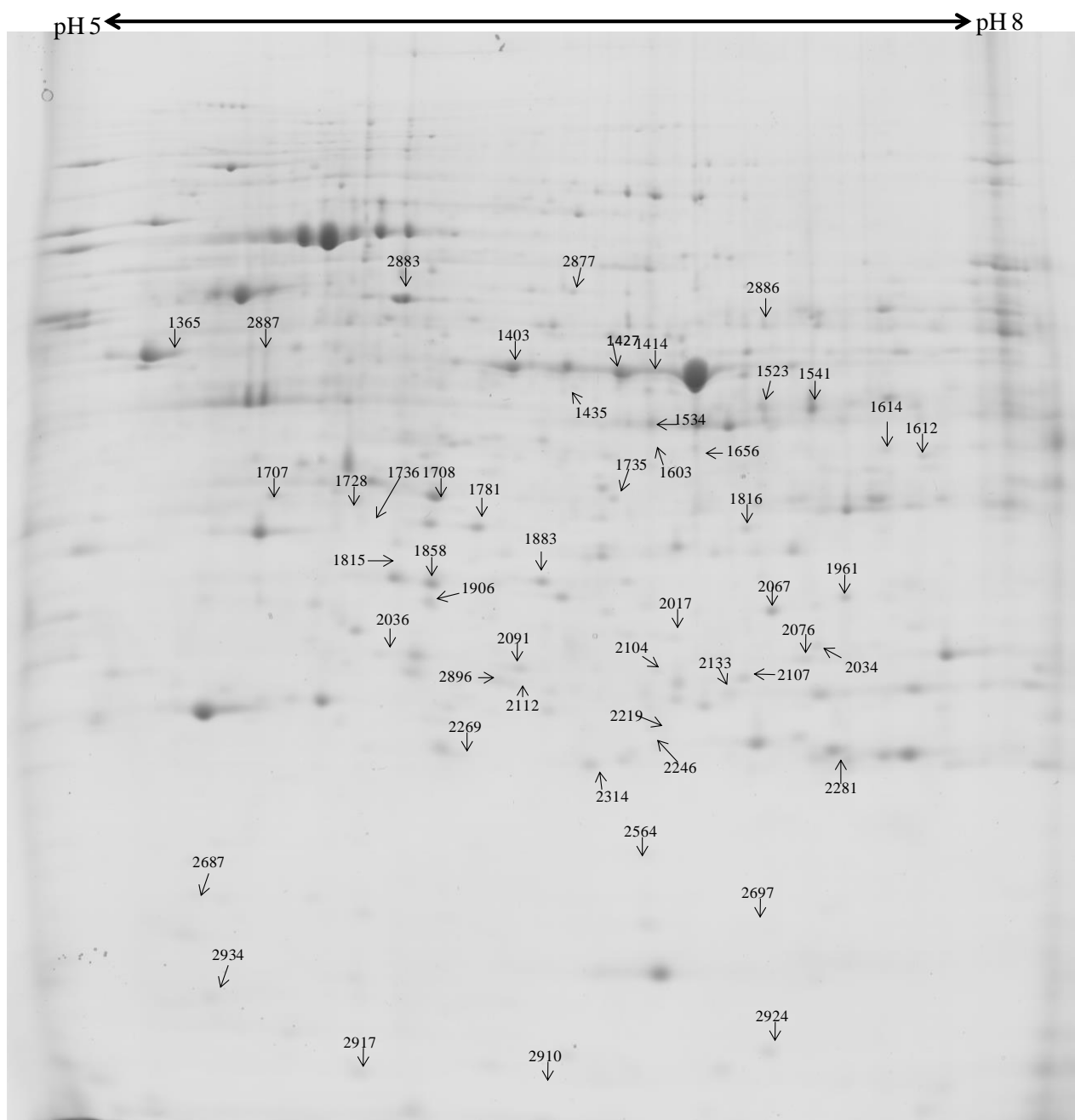


Figure 37 : Carte des spots protéiques présentant des pQTL

liaisons et les caractères de qualité du foie gras, probablement dû à un problème de carte génétique. En effet, bien que les courbes laissent apparaître des pics de vraisemblance au niveau du marqueur AMU068 (pour lequel des QTL existent sur la carte microsatellite), ceux-ci ne dépassent jamais le seuil de 5% CW (à une exception près : protFoie) et sont obtenus grâce à la contribution majoritaire d'une seule famille (43963).

Sur les 26 autres chromosomes, 22 QTL avec une significativité d'au moins 5% CW et 44 pQTL avec une significativité d'au moins 1% CW ont été mis en évidence. Certains chromosomes se démarquent des autres, soit par la présence d'un très fort pQTL, comme par exemple APL24 avec le QTL pour FASN, soit par la co-localisation de plusieurs QTL/pQTL donnant des QTL pléiotropiques très significatifs.

Ainsi, APL04 semble comporter un locus impliqué dans des processus anaboliques de synthèse et de survie cellulaire (EIF3I et PRDX3).

APL15 se démarque également avec 6 QTL qui co-localisent (pfoie, txfonte, lipFoie, txlipF, protFoie et txprotF), sans donner de pléiotropie lors de l'association des caractères 2 à 2 mais laissant présager un lien principalement avec le taux de fonte. De plus, 2 pQTL co-localisent (ENO1 et CCT7), donnant un pQTL fortement pléiotrope lorsqu'ils sont testés ensemble. Par ailleurs, ces pQTL co-localisent avec les QTL phénotypiques et donnent de fort QTL pléiotropiques avec eux. Ceci suggère une très forte association entre le locus (ou les loci), les caractères de qualité, notamment le taux de fonte, et les protéines ENO1 et CCT7.

APL16 porte un très fort QTL pléiotropique en associant à la fois, le poids de foie, la teneur en collagène et ATPB5. Le locus en question semble relatif à un processus anabolique de synthèse d'énergie.

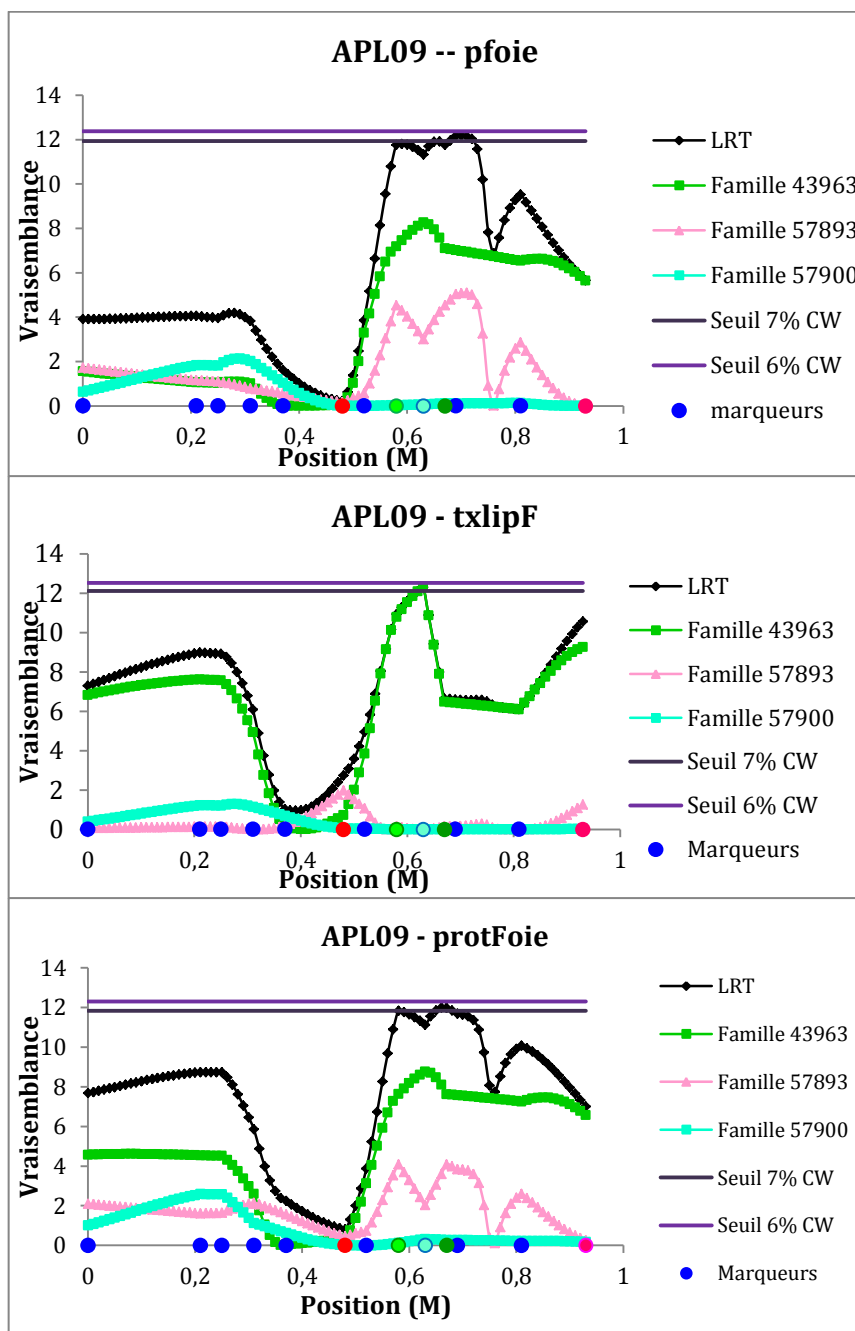
APL18 ségrége plusieurs protéines donnant des pQTL très significatifs comme pour PRDX3 et ENO1 ainsi que des pQTL bi-caractères pléiotropiques. Au vu des protéines mises en évidence, ENO1, PGAM1 (glycolyse), GS (anabolisme), PRDX3 (réponse au stress, survie cellulaire), il semblerait que le locus où ségrége les pQTL soit impliqué dans ces mécanismes de prolifération cellulaire.

APL23 se démarque également : il s'agit d'un micro-chromosome, représenté par un petit groupe de liaisons de seulement 2 marqueurs à 0,8 cM d'intervalle. Six QTL co-localisent au niveau du marqueur SNP353, relatifs aux différents caractères de qualité du foie gras. Deux pQTL identifient PDIA3 (conformation des protéines) et FABP7 (transport des protéines) au même endroit. L'association des plus forts QTL avec les protéines donne des QTL pléiotropiques très significatifs, suggérant que ce locus joue un rôle important en lien avec le taux de fonte et la teneur en lipides, ce qui est cohérent avec les deux protéines identifiées. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse d'une implication de ce locus dans les processus de transport, du réticulum. Cependant, cette hypothèse nécessite d'être confirmée à l'aide d'une couverture plus fine du chromosome. En effet, ces QTL sont peut-être précurseurs de QTL à effets forts mais plus éloignés (comme pour GL2c et APL02) ou d'un QTL à effet plus faible à proximité.

Enfin, APL24, dont le pQTL relatif à FASN atteint une significativité à 0,01% semble de grand intérêt pour le métabolisme des lipides.

5. Discussion

Lors d'une précédente étude, Kileh-Wais *et al.* (2013) avaient mis en évidence 17 QTL relatifs aux caractères de qualité du foie gras (**Tableau 4**) sur 7 groupes de liaisons (GL1b, GL2b, GL2c, GL03, GL09, GL13, GL20) de la carte constituée de microsatellites. Aucun des QTL alors mis en évidence n'a été retrouvé lors des détections entreprises sur la carte mixte, mis à part pour GL2c/APL02 et GL09/APL09. D'autres QTL ont pu être mis en évidence comme pour APL03 : le groupe de liaisons GL03 présentait 1 QTL relatif à bfoie, le chromosome APL03 présente deux QTL relatifs aux teneurs en protéines. Par ailleurs, les chromosomes APL15 et APL23 sur lesquels des QTL ont été identifiés n'existent pas dans la carte constituées de microsatellites. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence entre les détections effectuées sur les deux cartes. Notre dispositif a été optimisé en se focalisant sur les principaux critères de qualité (taux de fonte, poids de foie, teneurs en lipides et protéines) : ainsi, nous pouvons supposer que les QTL relatifs à bfoie sur GL1b et GL03, à afoie sur GL2b et celui relatif à Lfoie sur GL13 ont subi le même sort que le QTL relatif à bfoie sur GL2c : ils ont disparu car les 3 familles du dispositif optimisé ne



APL09 - 1er essai

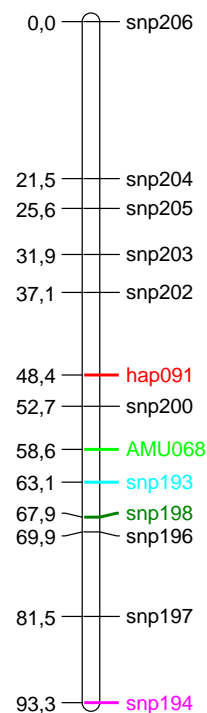


Figure 38 : Premier essai de carte et de détections de QTL sur APL09

contribuaient pas aux vraisemblances. Une autre hypothèse pour GL20 est que ce groupe de liaison était trop petit (1cM) et l'apport de SNP a simplement écarté deux QTL faux-positifs. Les groupes de liaisons GL2c et GL09 sont les seuls pour lesquels des QTL ont été retrouvés avec le dispositif optimisé sur APL02 et APL09, respectivement. Sept QTL ont été identifiés sur APL02 et un seul QTL sur APL09.

La carte génétique mixte, composée de marqueurs microsatellites et SNP, utilisée pour effectuer les détections de QTL et de pQTL de cette étude, a été mise au point à l'aide du logiciel CRIMAP, à partir des génotypages des individus du dispositif. Bien que les marqueurs SNP di-alléliques soient généralement peu informatifs, ils ont été choisis spécifiquement pour notre croisement, permettant d'optimiser la couverture du génome et l'informativité le long des groupes de liaisons. Pour tous les chromosomes étudiés, la carte correspondante était de type « framework », c'est-à-dire que l'ordre des marqueurs est 1000 fois plus vraisemblable que tout autre ordre possible. Seul APL09 a posé des problèmes, plusieurs cartes proposées par CRIMAP étant possibles.

La première carte APL09 utilisée était composée de 13 marqueurs génétiques répartis sur 93 cM dont 1 microsatellite AMU068 et 1 haplotype (hap091), constitué de l'association de 1 SNP et de 1 microsatellite (CAU088). Les premières détections de QTL n'ont mis en évidence aucun QTL, bien que le "pic" de vraisemblance atteigne le seuil de 7% CW comme sur les exemples de la **Figure 38**. Sur ces courbes de vraisemblance, nous avons pu observer une forte diminution de la vraisemblance entre les marqueurs SNP202 et hap191, un point d'inflexion (pfoie et protFoie) ou un pic de vraisemblance (txlipF) au niveau du marqueur SNP193. L'allure de la courbe de vraisemblance, notamment avec des maxima au niveau des marqueurs SNP193 et SNP194 nous a fait douter de l'ordre de ces marqueurs. En effet, le logiciel CRIMAP positionnait au même endroit les marqueurs SNP193 et SNP194 lorsque l'un ou l'autre de ces deux marqueurs était inclus dans le jeu de marqueurs utilisé pour construire la carte, alors qu'il les séparait lorsque les deux étaient inclus. Cette exclusion mutuelle a été constatée plus particulièrement pour 2 pères F1, laissant supposer un problème au niveau du génotypage de ces animaux. La carte de APL09 a donc été reconstruite sans tenir compte des 2 familles en question afin d'obtenir la carte la plus fiable possible (carte APL09, **Figure 23**). Malheureusement, ces deux familles correspondaient à 2 des 3 familles de notre dispositif optimisé (pères 57893 et 57900). Ceci peut expliquer pourquoi nos résultats de détections avec la carte retenue d'APL09 ne mettent en évidence une contribution

Tableau 35 : Gènes du génome de la poule présents sous les marqueurs des QTL majeurs

APL	Marqueur	Position GGA (pb)	gène	GO process
APL02	SNP057	GGA2 : 65030783	/	
	SNP059	GGA2 : 72597332	/	
	SNP064	GGA2 : 92134420	/	
	SNP065	GGA2 : 101064667	/	
	SNP066	GGA2 : 104075477	/	
APL04	SNP104	GGA4 : 40225080	/	
	SNP110 (hap041)	GGA4 : 62373197	FRG1 : protein FRG1 (intron)	GO:0000398 épissage ARNm
APL18	SNP308	GGA17 : 2159016	CACNA1B : calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit (intron)	GO:0006816 transport de calcium
	SNP311 (hap161)	GGA17 : 5228067	PKN3 protein kinase N3 (intron)	GO:0006468 phosphorylation de protéines
APL24	SNP359	GGA23: 3522048	yrnC : N(6)-threonylcarbamoyltransferase domain containing (intron)	GO:0008033 tRNA process
	SNP360	GGA23 : 4722130	CSMD2 CUB and Sushi multiple domains 2 (intron)	GO:0005886 composant de membrane plasmique
APL15	SNP286	GGA14 : 2159016	LMF1 : lipase maturation factor 1 (intron)	GO:0051006 régulation positive de l'activité de la lipoprotéine lipase
APL16	SNP297 (hap150)	GGA15 : 1646573	FBRSL1 : fibrosin-like 1 (intron)	GO:0044822 : ligand de ARN poly(A)
	SNP298 (hap150)	GGA15 : 2316994	/	
	SNP304	GGA15 : 9742259	SRRM4 : Serine/arginine repetitive matrix protein 4 (intron)	GO:0043484 régulation de épissage de ARN
	SNP353	GGA22 : 632038	EBF2 : early B-cell factor 2 (intron)	GO:0006355 régulation de la transcription
APL23	SNP355	GGA22 : 2941987	NCAPH : non-SMC condensin I complex, subunit H (intron)	GO:0007076 : condensation du chromosome mitotique

forte que pour une seule famille (43963), même si la famille 57893 contribue quelque peu à la vraisemblance globale. Il serait alors intéressant de résoudre ce problème de génotypage : cela permettrait de confirmer l'ordre des marqueurs sur la carte APL09, mais également de déterminer si l'absence de participation de la famille 57900 et dans une moindre mesure de la famille 57893 à la vraisemblance globale au niveau des marqueurs SNP193 et SNP194 est due à une non-ségrégation des QTL dans ces 2 familles ou juste aux erreurs supposées de génotypage. En effet, nous pouvons supposer que le problème de génotypage a un impact sur les détections de QTL entreprises, ce qui expliquerait la faible participation des familles 57893 et 57900 à la vraisemblance globale des QTL.

Sur les 27 chromosomes de la carte, 9 portent des QTL relatifs aux caractères de qualité du foie gras et 23 portent des pQTL relatifs à différentes protéines. Certains QTL et pQTL co-localisent autour des mêmes marqueurs, notamment sur APL18, APL15 ou encore APL16 nous permettant de proposer des voies métaboliques impliquées dans la variation des caractères de qualité. Sur les 50 pQTL identifiés, nous ne comptons aucun cis-pQTL. En effet, en recherchant la position des gènes codant pour ces protéines sur le génome de la poule (www.ensembl.org/gallusgallus/), il est apparu qu'aucun des gènes recherché ne se positionne sur le chromosome portant le pQTL de sa protéine. (**Tableau 24, Tableau 28 et Tableau 29**). Nous pouvons alors poser l'hypothèse que les loci d'intérêts contiennent des gènes codant pour des régulateurs des protéines mises en évidence par ces QTL.

La co-localisation de QTL et de pQTL semble intéressante dans le but d'identifier un lien entre un locus, une protéine et un phénotype. Dans cette étude, sept chromosomes sont particulièrement intéressants car ils ségrégaient pour plusieurs QTL et/ou pQTL dont les intervalles de confiance se recouvraient. Les protéines identifiées appartiennent à différentes voies métaboliques comme la glycolyse (ENO1, PGAM1), le transport (FABP7, CCT7, PDIA3), la réponse au stress oxydatif (PRDX3) ou encore le métabolisme mitochondrial (ETF A). Ces résultats donnent des hypothèses sur la fonction métabolique des gènes sous-jacents à ces QTL. Il semblerait par exemple que le locus de APL18 soit lié à la survie cellulaire ou que celui de APL15 soit particulièrement lié à la glycolyse. Afin d'approfondir la nature de ces liens, nous avons

cherché à localiser les marqueurs de nos régions QTL au sein du génome de la poule à l'aide de la base de données ENSEMBL (www.ensembl.org). Pour 6 des 7 chromosomes, les marqueurs à proximité du maximum de vraisemblance des QTL se situent dans des introns de gènes répertoriés dans le **Tableau 35**.

Sur APL04, le marqueur hap041 des QTL relatifs à EIF3I et PRDX3 est localisé dans la séquence d'un gène impliqué dans l'épissage alternatif (FRG1). Sur APL18, le marqueur SNP308 proche des QTL relatifs à ENO1 et GS est localisé chez la poule dans un gène codant pour un canal de transport de calcium (CACNA1B) et le marqueur SNP311 (hap161) proche des QTL relatifs à PRDX3 et PGAM1 est localisé dans PKN3, un gène impliqué dans la phosphorylation de protéines. Le QTL de APL24 relatif à FASN est localisé entre deux marqueurs : SNP359 se positionne dans un gène impliqué dans la synthèse des ARNt (YRDC) et SNP360 se positionne dans un gène codant pour une protéine membranaire (CSMD2). Sur APL15, le marqueur SNP286 sous-jacent aux QTL relatifs à ENO1, CCT7 et txfonte notamment se positionne chez la poule dans un gène codant pour une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique et impliquée dans la maturation de la lipoprotéine lipase (LMF1). Sur APL16, les marqueurs flanquant la région des QTL relatifs à ATPB5, pfoie et txcollag se positionnent chez la poule dans des gènes ligands des ARN (FBRSL1 - SNP297) ou impliqué dans leur épissage (SRRM4 - SNP304). Enfin sur APL23, les deux marqueurs composant ce chromosome se positionnent chez la poule dans deux gènes régulant la transcription (EBF2 - SNP353) et permettant la condensation des chromosomes (NCAPH - SNP355).

Un de ces gènes, la LMF1 (Lipase Maturation Factor 1), code pour une protéine du réticulum endoplasmique impliquée dans la maturation et le transport des lipoprotéines lipases actives et qui jouerait un rôle dans l'activation des lipases et dans la régulation du métabolisme des lipides (Péterfy, 2012). La protéine est une chaperonne comme CCT7 et son altération serait associée à des maladies comme l'hypertriglycéridémie. Par ailleurs, 2 gènes (SRRM4 et CACNA1B) sont liés entre eux, puisque SRRM4 régulerait l'épissage alternatif de l'ARNm de CACNA1B (Nakano *et al.* 2012) et donc par la même occasion le transport de calcium. Il est cependant nécessaire d'être prudent et de ne pas associer ces gènes aux caractères de qualité du foie. En effet, les positions et ordres des marqueurs et des gènes ne sont probablement pas les

mêmes entre les deux espèces poule (*Gallus Gallus*) et canard (*Anas Platyrhynchos*). Des réarrangements chromosomiques ont en effet déjà été mis en évidence sur deux chromosomes : GGA21/APL22 et GGA11/APL12 entre les espèces poule et canard par Rao *et al.* (2012). Il serait alors intéressant de pouvoir confirmer la présence de ces gènes chez le canard et notamment celle de LFM1 autour du SNP286 (APL15, GGA14).

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette étude était de comprendre comment l'expression du génome influence les caractères de qualité du foie gras et d'identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents. Après avoir optimisé le dispositif expérimental, deux approches ont été réalisées. La première avait pour objectif de comprendre les mécanismes métaboliques responsables de la variabilité des caractères de qualité du foie gras au travers d'une recherche de protéines différenciellement exprimées selon les classes de poids de foie, de taux de fonte ou encore de teneur en protéines ou lipides. La seconde approche avait pour objectif d'identifier des loci responsables des variations phénotypiques et des variations d'abondance protéique par détection de QTL et de pQTL.

Optimisation de la population

La première étape de cette étude a été d'optimiser la population expérimentale à étudier. En effet, la population du dispositif initial comptait 1552 canards mulards, fils de 372 canes backcross, elles-mêmes issues de 7 familles de pères F1. L'objectif de l'optimisation était de réduire le nombre d'échantillons à analyser lors des analyses protéomiques tout en gardant un dispositif suffisamment puissant et robuste pour mener à bien des détections de QTL. Le dispositif a donc été réduit aux 3 familles de pères F1 (43963, 57893 et 57900) qui présentaient le plus grand intérêt quant aux caractères de qualité du foie gras. En effet, ces familles participaient majoritairement aux vraisemblances des QTL relatifs au poids de foie, au taux de fonte et aux teneurs en lipides et protéines qui avaient été mis en évidence par Kileh-Wais *et al.* (2013). Au sein de ces familles, un choix de 98 BC et de 294 mulards a été entrepris selon différents critères définis ci-dessus (Figure 15). Cette optimisation s'est révélée fructueuse puisque malgré la réduction drastique du dispositif étudié, 8 des 11 QTL initiaux ont été retrouvés sur la carte microsatellites et de nombreux QTL et pQTL ont pu être mis en évidence sur la carte mixte.

Quatre familles de pères ont donc été exclues de notre étude car elles ne participaient pas aux vraisemblances des premiers QTL identifiés sur les GL2c et GL09. Cependant, ces 4 familles participent très certainement à l'expression de QTL dans des régions du génome non couvertes par la première carte microsatellites et auraient sûrement apporté des informations supplémentaires, et probablement des QTL phénotypiques supplémentaires notamment avec les nouveaux groupes de liaisons de la carte mixte. Des détections de QTL phénotypiques avec l'ensemble du dispositif sur la carte mixte, plus complète, devront être réalisées. Cependant, il n'est pas envisageable d'obtenir

des profils protéiques pour l'ensemble des canards mulards du dispositif à cause du nombre trop élevé de gels 2D qui seraient à réaliser. Si des détections de pQTL avec l'ensemble du dispositif ne sont pas envisageables, du moins à court terme, celles-ci apporteraient sûrement de nombreuses informations. Dans le but de comprendre l'influence de l'expression du génome sur les caractères de qualité du foie, effectuer alors des détections de QTL phénotypiques et de pQTL avec un dispositif plus important permettrait d'obtenir d'autres résultats sur l'influence du génome sur les caractères de qualité du foie par une puissance de détection plus importante, et ainsi de confirmer ou d'infirmer les QTL déjà existant, de préciser les intervalles de confiance des QTL, ou encore d'établir d'autres liens métaboliques phénotype/protéine/locus que ceux identifiés. Au-delà de la qualité du foie, de nombreux autres phénotypes avaient été collectés, concernant des caractères de reproduction, de performances zootechniques, de qualité du magret... La nouvelle carte mixte permettrait sûrement d'identifier des régions intéressantes sur ces caractères.

Expression différentielle de protéines

Différentes études présentent des comparaisons d'expressions de protéines ou de gènes entre des canards gavés ou non (principalement chez les canards Pékin – Zheng *et al.* ; 2012 et 2014 et Barbarie – Hérault *et al.* 2009), entre des oies gavées ou non (Zhu *et al.* 2011), ou entre des lignées grasses ou maigres chez la poule (Bourneuf *et al.* 2006) ou l'oie (Pan *et al.* 2009). En revanche, peu d'études ont porté sur l'analyse des protéines chez le canard gavé. Bax *et al.* (2012) ont étudié l'évolution des protéines exprimées au cours du développement de la stéatose, c'est-à-dire à différents stades au cours du gavage. Théron *et al.* (2011) ont montré une différence de protéines exprimées entre des foies de canards mulards présentant une fonte élevée et ceux présentant une fonte faible et ce, pour une même gamme de poids de foie et de teneur en lipides. Les mêmes auteurs ont également montré que l'évolution *post-mortem* (20 min vs. 6h) du foie gras n'est pas équivalente pour des foies qui présenteront une fonte élevée ou une fonte faible (Théron *et al.* 2013). Plus récemment, Awde *et al.* (2014) ont montré une relation entre l'activité protéolytique et la variabilité de la fonte à la cuisson. Ces auteurs suggèrent qu'une plus forte activité protéolytique dans des foies à fonte élevée produirait une fragilisation des structures cellulaires et donc en un taux de fonte plus important.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'expression différentielle des protéines après gavage, sans établir de gamme de poids ou de lipides. Deux méthodes d'analyse statistique ont été utilisées : les résultats obtenus par régressions linéaires sont cohérents avec ceux obtenus en ANOVA. Comme pour Bax *et al.* (2012) ou pour Théron *et al.* (2011), plusieurs catégories de protéines sont mises en évidence de par les processus métaboliques auxquels elles appartiennent. Nous avons ainsi des protéines du métabolisme lipidique, glucidique, des protéines de structure, mitochondriales ou encore de réponse au stress. Bien qu'une partie de nos protéines identifiées ne soient pas les mêmes que celles identifiées par Théron *et al.* 2011, les voies métaboliques représentées sont les mêmes, confirmant les résultats de ces auteurs. Il avait été montré que les foies à fonte faible présentaient une surexpression des protéines de synthèse, d'anabolisme, alors que les foies à fonte élevées présentaient une surexpression des protéines de réponse au stress. En effet, nos résultats concernant le taux de fonte présentent aussi une surexpression de protéines de synthèse (FASN, IMMT, DLAT) dans les foies à fonte faible et une surexpression des protéines de stress (HSPD1, HSPA5) dans les foies à fonte élevée. Nous pouvons par ailleurs élargir ces constatations aux autres caractères, puisque le schéma est le même pour le poids de foie et la teneur en lipides et exactement l'inverse pour la teneur en protéines (**Figure 22**).

Détection de QTL phénotypiques et de pQTL

Si de nombreux travaux existent sur les détections de QTL phénotypiques, notamment en volaille, peu étudient spécifiquement le foie. Selon la base de données de QTL (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/GG/>), 209 publications traitaient de QTL concernant 305 caractères différents chez la poule, aucun ne concernait le foie. De plus, parmi ces études, très peu de travaux de détection de QTL concernent le canard (Huang *et al.* 2007a et b ; Kileh-Wais *et al.* 2013 ; Mucha *et al.* 2014). Finalement, les détections de pQTL chez l'animal sont excessivement peu nombreuses, et commencent à se développer chez des organismes modèles comme la souris ou encore sur des lignées cellulaires. Le faible développement de ce sujet d'étude peut s'expliquer par le coût humain et matériel nécessaire : l'abondance des protéines n'est pas aisément mesurable. L'électrophorèse bidimensionnelle nécessite de la main d'œuvre et les techniques de spectrométrie de masse restent chères à utiliser. Cette étude est donc la première présentant des résultats de détections de pQTL chez les animaux de rentes.

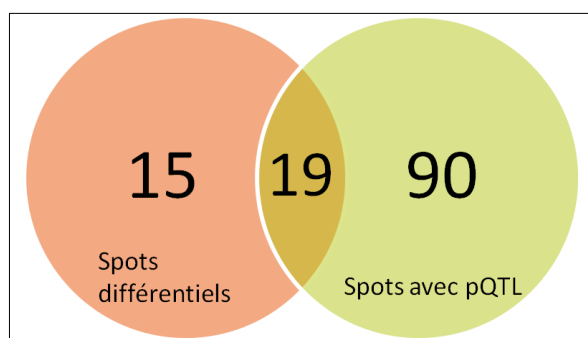


Figure 39 : Répartition des spots identifiés selon l'étude où ils ont été mis en évidence.

Dans notre étude, qui fait suite à une primo-détection de QTL relatifs à la qualité du foie gras (Kileh-Wais *et al.* 2013), nous avons pu mettre en évidence 30 QTL relatifs aux caractères de qualité du foie gras, mais également 176 pQTL relatifs à des protéines provenant de différentes voies métaboliques. En comparant les protéines différentielles et les protéines des QTL, nous avons pu constater que de nombreuses protéines sont communes aux deux démarches, présentant à la fois une variabilité inter-mulards (protéines différentielles) et une variabilité inter-backcross qui présente un déterminisme génétique (pQTL). Les détections de QTL étant possibles grâce à la variabilité des phénotypes, il serait en effet difficile d'identifier des pQTL pour des protéines non-différentielles. Cela signifie que nos deux approches sont cohérentes et complémentaires et que l'abondance de ces protéines est suffisamment variable parmi les canards mulards pour permettre d'identifier des QTL chez leurs mères backcross.

Sur les 34 spots protéiques identifiés par l'approche différentielle 19 présentent des pQTL. Ainsi, 11 spots protéiques correspondant à 10 protéines identifiées comme ayant une expression différentielle selon le taux de fonte, présentent aussi des pQTL à 5% CWS. Il s'agit de la S-formylglutathione hydrolase (1837), de PSMA1 (1945), de ANXA5 (1914), de PRDX6 (2091 et 2057), de APOA1 (2143), de VCP (2861), de ME1 (2876), de FABP1 (2903) et de ENO1 (1449 et 1539). Huit spots protéiques, correspondant à 6 protéines différentielles présentent des QTL à au moins 1% CWS. Il s'agit de FASN (1906), de APOA1 (2564), de ENO1 (1403, 1414 et 1427), de GS (1541), de DJ-1 (2314) et de l'ester hydrolase (1735). Il semble alors que les polymorphismes des différents loci influencent la variation d'abondance des protéines que l'on retrouve en classant les canards selon leurs performances phénotypiques. Cependant, d'autres phénomènes peuvent influencer ces variations d'abondance comme les modifications post-traductionnelles, les microARN... qui peuvent expliquer que certains spots différentiels ne présentent pas de pQTL. Par ailleurs, 90 spots restent spécifiquement identifiés lors des détections de pQTL, dont 42 à une significativité de 1% ou mieux. Cela semble suggérer que le polymorphisme des loci influence la variabilité d'abondance protéique d'une manière différente. Bien sûr, il ne faut pas oublier que les détections de QTL et de pQTL ont été entreprises sur les génomes des mères backcross alors que l'analyse de protéines différentielles s'est faite directement sur les performances des fils mulards.

Cela suggère que pour les protéines communes aux deux études, la variabilité au sein des fils mulards, pour ces protéines en particulier, se retrouve entre leurs mères. En revanche pour les protéines « spécifiques » des pQTL, la variabilité inter-backcross ne se retrouve pas lorsque l'on classe les mulards selon leurs phénotypes de qualité du foie : d'autres caractères semblent alors en jeu.

La co-localisation de QTL et de pQTL permet d'établir un lien entre le caractère étudié et les protéines aux loci en question. Dans une étude sur le protéome plasmatique de la souris, Holdt *et al.* (2013) ont par exemple montré un lien entre *Apoa2* et le cholestérol HDL à partir de la co-localisation des pQTL et QTL respectifs. La co-localisation, confirmée par un effet génétique comparable du QTL sur le HDL cholestérol a pu être corroborée par la littérature faisant état d'une mutation dans le gène *Apoa2*. Par ailleurs, à l'image des travaux effectués par Bourgeois *et al.* (2011) sur le pois, de nombreuses informations peuvent être extraites des pQTL et des QTL. La co-localisation de QTL et de pQTL peut ainsi être un bon indicateur de la position d'un gène-candidat : en effet, une co-localisation peut non seulement indiquer le principal métabolisme impliqué dans la variation du caractère, mais également préciser la position en réduisant l'intervalle de confiance des QTL. Dans notre cas, les intervalles de confiance n'ont pu être précisés de plus de 1 ou 2 cM. Les pléiotropies ont cependant mis en évidence certains locus qu'il peut-être intéressant d'étudier plus précisément. Des cis- ou trans-pQTL peuvent également être recherchés afin de préciser les mécanismes de régulation des gènes ou protéines. Si l'on fait le rapprochement avec les eQTL (QTL de transcrits), ceux-ci sont considérés comme cis- lorsqu'ils se positionnent à proximité du gène contrôlé et comme trans- dans le cas contraire. Le Mignon *et al.* (2010) rapportent que du fait du plus faible nombre d'évènements biologiques entre le gène contrôlé et le eQTL, les cis-eQTL ont un effet plus important sur les niveaux d'ARNm et s'identifient avec des statistiques de test plus élevées que les trans-eQTL (leur significativité est plus élevée que celle des trans-eQTL). Lorsque l'on transpose la réflexion aux pQTL, il paraît logique que la proportion des trans-pQTL/pQTL soit plus importante que celle des trans-eQTL/eQTL. En effet, le nombre d'évènements biologiques est plus élevé entre un gène et sa(s) protéine(s) qu'entre un gène et son(s) transcrit(s) : les protéines sont soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles (ubiquitinations, phosphorylations, clivages...), tandis que les transcrits sont principalement soumis aux modifications génomiques (mutations, méthylations...).

Pouvoir identifier les gènes sous-jacents à nos régions QTL serait un atout pour comprendre les métabolismes mis en jeu. Cela nécessite cependant que le génome du canard soit assemblé et que les positions de ces gènes soient vérifiées. Grâce à l'homologie entre les génomes du canard et de la poule, nous pouvons cependant émettre des hypothèses quant à la localisation de ces gènes. En regardant la position des marqueurs de nos régions QTL et pQTL sur le génome de la poule, l'identification de gènes sous-jacents à ceux-ci nous a donné des premières indications sur les loci ségrégant les principaux QTL et pQTL. Cependant, des réarrangements chromosomiques existant entre le génome de la poule et celui du canard, il sera pertinent de réitérer cette recherche directement sur le génome du canard assemblé et annoté. Par exemple sur APL15, le gène LMF1 impliqué dans la maturation des lipoprotéines lipase a été identifié proche d'un marqueur du QTL sur le chromosome GGA14 du génome de la poule. Ce gène existe chez le canard, mais l'assemblage des « scaffold » (portions séquencées du génome nécessitant d'être assemblées) n'étant pas abouti, nous ne pouvons pas savoir si sa position correspond à celle de notre QTL sur le chromosome APL15. Pour approfondir ce point et confirmer ou non la position de ce gène sous notre QTL, il pourrait être envisagé d'effectuer des comparaisons de cartes entre celle de la poule et celle du canard. Des comparaisons ont déjà été engagées : Rao *et al.* (2012) ont effectué des comparaisons entre des cartes de chromosomes de poules et des cartes d'hybrides irradiés de canard. Sur le chromosome APL12, correspondant au chromosome GGA11, une inversion chromosomique correspondant à la moitié du chromosome a ainsi été mise en évidence. Aussi, à l'image des travaux effectués par Rao (2012), l'utilisation de panels d'hybrides irradiés de canard, leur séquençage et leur comparaison avec le génome de la poule permettrait l'assemblage des scaffold du génome du canard et de connaître la position du gène recherché sur le génome du canard.

L'étude des variations d'abondance de protéines selon les phénotypes des foies nous a permis d'identifier des différences d'expressions de protéines dans les foies gras en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques. Ainsi, selon que le foie soit lourd ou léger, fondant ou pas, son profil protéique diffère, suggérant une évolution de son état métabolique : les foies légers, fondant peu semblent dans un métabolisme de synthèse alors que les foies lourds, fondant beaucoup semblent avoir développé des mécanismes de protections et de survie cellulaire. Les animaux ayant été gavés pendant une même durée, il ne s'agit pas d'un effet cinétique

d'évolution du métabolisme du foie mais bien de compositions protéiques et d'états métaboliques différents selon les phénotypes. Les détections de QTL et de pQTL ont permis de mettre en évidence des loci fortement impliqués dans les variations des caractères de qualité du foie gras, mais également dans les variations d'abondance de protéines du métabolisme lipidique, glucidique ou encore de réponse au stress. Par ailleurs, la co-localisation de QTL et de pQTL nous donne des pistes sur l'orientation métabolique des loci en question et d'identifier un lien entre les loci, les protéines des QTL et les phénotypes. Ainsi, APL15 porte un locus où ségrégent plusieurs QTL (pfoie, txfonte, protFoie, lipFoie, txprotF et txlipF) et pQTL (ENO1 et CCT7). Ce locus semble impliqué dans des processus glycolytiques ayant une incidence sur les caractères de qualité du foie. Par ailleurs, APL18 porte un locus dont les pQTL relatifs à ENO1, GS, PGAM1 et PRDX3 laissent penser qu'il est impliqué dans des processus de survie cellulaire en réponse à un stress. Enfin, APL02 présente un locus pléiotropique lié au métabolisme lipidique mitochondrial et qui impacte le taux de fonte du foie.

Quelques perspectives...

Pour aller plus loin dans ces travaux, plusieurs études pourraient être mises en oeuvre. A petite échelle, tout d'abord, il pourrait être intéressant d'étudier certaines protéines (comme APOA1 ou ENO1) et leurs modifications post-traductionnelles. En effet, la protéine ENO1 a été identifiée au sein de plusieurs spots (1403, 1414, 1427, 1435...) dans les gels 2D. Même si des biais dans la migration de protéines au sein des gels peuvent survenir, il est fortement probable que ces différents spots soient des isoformes dus aux modifications post-traductionnelles qui modifient le poids moléculaire des protéines ou encore leur point isoélectrique. Dans une étude sur les protéines cardiaques de rats diabétiques, Lu *et al.* (2010) ont montré que le stress oxydatif et nitrique provoque des modifications de l'alpha-enolase contribuant à altérer l'activité glycolytique. Aussi, nous pouvons supposer que des modifications soient apparues sur les protéines, et que ces protéines modifiées altèrent ou favorisent les mécanismes métaboliques au sein desquels elles sont impliquées. La protéine APOA1, également identifiée dans plusieurs spots, peut être sujette à des modifications oxydatives qui altéreraient ensuite la formation des HDL. Cette hypothèse provient de l'étude de Szapacs *et al.* (2008) qui ont mis en évidence un site cible des agents oxydants en étudiant les protéines plasmatiques soumises à un stress oxydatif.

Le foie est un organe constamment stimulé, alternativement pour stocker le glucose puis pour le libérer. Dans notre étude, les foies des canards sont particulièrement stimulés puisqu'ils doivent faire face à des apports en glucides très élevés et ainsi à la stéatose provoquée par le gavage. Comme nous l'avons montré précédemment, plusieurs voies métaboliques sont impliquées dans les mécanismes stéatotiques. Aussi, à plus large échelle, il serait intéressant d'élargir l'analyse protéomique pour aller au-delà de l'étude du protéome soluble proposée ici. En effet, dans cette étude, la séparation des protéines a été entreprise par la méthode d'électrophorèse bidimensionnelle, et l'extraction a été faite avec un tampon d'extraction de faible force ionique permettant l'extraction des protéines solubles, mais sans inclure les protéines membranaires. Dans cette étude, 326 spots protéiques ont été déterminés à l'aide du logiciel d'analyse de gels 2D. Parmi eux, 200 ont pu être identifiés en une protéine, correspondent à 100 protéines uniques. Les doublons de protéines augmentant le nombre de spots à 200 sont dus soit aux modifications post-traductionnelles qui modifient le poids moléculaire et le point isoélectrique des protéines, soit à des biais dans la séparation des protéines. Pour les 126 spots restants, un trop petit échantillon (environ 2/3 des 126 échantillons) ou un mélange protéique (environ 2/3) dans l'échantillon expliquent principalement l'absence d'identification.

Cent protéines est un faible effectif par rapport aux milliers de protéines synthétisées dans une cellule. Si cela nous permet néanmoins d'identifier des protéines ayant des abondances différentielles, de nombreuses informations ne nous sont pas accessibles. En effet, comme précisé dans l'étude bibliographique, les protéines membranaires ne sont pas extractibles avec le tampon utilisé, leur tampon étant incompatible avec l'IEF, et les protéines de faible abondance sont masquées par les protéines du métabolisme (lié à leur abondance) compte tenu de la méthode d'extraction utilisée. Une analyse par shotgun (beaucoup plus couteuse) aurait permis d'identifier des protéines plus nombreuses sans *a priori* concernant leur propriétés biochimiques. En effet, les contraintes analytiques sont inférieures avec cette technologie. Nous pourrions ainsi avoir accès à des quantifications de protéines membranaires, de structure... (10% des protéines identifiées par Washburn *et al.* (2001) comportaient au moins 3 domaines transmembranaires), mais également de protéines dont l'abondance est faible, ce qui ne veut pas pour autant dire qu'elle n'est pas variable. La spectrométrie de masse est aujourd'hui une méthode largement utilisée lors

d'analyses par protéomique et permet d'identifier jusqu'à 1 millier de protéines. Une telle méthode d'analyse, si elle était appliquée, permettrait alors sûrement de comprendre plus globalement le fonctionnement des hépatocytes et son impact sur les caractères de qualité du foie gras et d'élargir ainsi le champ des protéines impliquées.

Un autre niveau d'expression du génome, le transcriptome, est actuellement à l'étude. Entre le génome et le protéome, le transcriptome peut apporter d'autres informations quant à l'influence des gènes sur les phénotypes, mais également sur les protéines. En effet, le transcrit est plus directement soumis aux modifications de séquences génomiques (mutations, méthylations) ou aux régulations par des facteurs de transcriptions que la protéine, et subit peu de modifications post-transcriptionnelles (l'épissage alternatif, les microARN). Il peut alors être intéressant de comparer les transcrits responsables de eQTL avec les protéines responsables des pQTL, cela peut donner une idée du niveau d'expression où se fait la régulation de l'expression, les transcrits et protéines pouvant être régulés par différents phénomènes.

Cette étude du transcriptome ne s'est pas faite en aveugle comme pour l'étude du protéome soluble présenté ici (bien qu'elle soit ciblée sur les protéines du métabolisme), mais de façon orientée. Au total, 94 gènes identifiés dans la littérature scientifique (cf. notre étude bibliographique) comme appartenant à différentes voies métaboliques telles que les métabolismes lipidiques, glucidiques, inflammatoires, apoptotiques ou encore de structure... ont été choisis car ils jouent des rôles important dans la stéatose hépatique ou ont été identifiés comme ayant un lien avec cette stéatose. Les niveaux d'expression des transcrits, obtenus par PCR quantitative (qPCR) via la technologie Fluidigm®, seront utilisés pour effectuer des détectons de eQTL. Ces détectons, si elles sont fructueuses, mettront en évidence des loci en lien étroit avec les gènes étudiés. D'éventuelles co-localisations entre eQTL, pQTL et/ou QTL permettraient d'identifier des voies métaboliques particulières qui influenceraient les caractères de qualité du foie gras.

Cette méthode d'obtention des profils d'expression des transcrits a été choisie car il n'existe pas de puce à ADN chez le canard. Malheureusement, les coûts prohibitifs des analyses pour 300 animaux ne nous a pas permis d'en dessiner une : notre analyse du transcriptome ne sera donc pas exhaustive. Le design d'une puce à ADN pour le canard permettrait alors d'effectuer une analyse transcriptomique beaucoup plus exhaustive de par le nombre de gènes pouvant être étudiés. Aussi, le nombre de eQTL pouvant être identifiés sera sûrement plus important qu'avec

les 94 gènes de la qPCR. En effet, en comparant des eQTL de profils de transcrits obtenus par RT-qPCR et ceux obtenus par puce, Ponsuksili *et al.* (2010) montrent que si les cis-eQTL sont les mêmes d'une méthode à l'autre, les trans-eQTL sont différents. Selon ces auteurs, l'utilisation d'une puce pour des détections d'eQTL permet l'exploration des réseaux de gènes fonctionnels et régulateurs tandis que l'étude d'un plus petit nombre de gènes choisis permet d'augmenter la précision de localisation des QTL en ciblant des gènes candidats. Nous pouvons alors supposer que dans notre cas, entreprendre des détections de eQTL avec des données issues d'une puce permettrait de mettre en évidence des gènes régulateurs de plusieurs autres gènes ou « master eQTL ».

Outre les transcrits et protéines, un autre niveau d'expression est également à l'étude, il s'agit du métabolome. En effet, des métabolites ont été extraits de nos échantillons de foie gras analysés par spectroscopie à RMN et leur étude pourrait également permettre de comprendre les mécanismes métaboliques impliqués dans les différences de qualité des foies gras. Vinaixa *et al.* (2010) ont montré que la RMN était adaptée aux petite molécules en établissant des profils métaboliques différents à partir de foies de souris déficientes en LDL. Cette étude nous permettra de connaître les niveaux d'abondances de métabolites tels que les acides aminés, le glycogène ou encore le glucose, ce qui complétera et précisera les données existantes sur les protéines utilisant ces métabolites.

Les détections de QTL phénotypiques, de eQTL, pQTL ou de mQTL (métabolites) permettent d'identifier des loci génomiques ayant une responsabilité dans les variations de ces phénotypes ou dans les variations d'expression des transcrits, protéines et métabolites. Confronter ces 4 niveaux d'expression du génome nécessite de prendre en compte les interactions entre les niveaux d'expression, la complexité des réseaux biologiques, les différents tissus présents au sein d'un organe ou encore l'évolution temporelle (cycles circadiens... - Amiour *et al.* 2013). En 1986, Zuckerkandl définissait le lexotype d'une cellule comme l'ensemble des produits macromoléculaires produits par une cellule et pouvant être quantifiés (ARN, protéines, métabolites...). L'étudier s'avère un challenge, qui à notre connaissance n'a jamais été réalisé chez les animaux.

ANNEXE

Tableau 36 : Liste des pQTL identifiés au moins à 5% CW sur l'ensemble des chromosomes

Chromosome	Protéine (N° spot)	Maximum de Vraisemblance	Position (M)	Marqueurs	Seuil de significativité atteint
APL01	PRDX3 (2246)	22,879	2	snp009	0,50%
	EEF2 (1708)	20,034	0,94	snp027	1%
	Sulfurtransferase (1781)	16,283	1,53	snp016	5%
	S-formylglutathione hydrolase (1837)	17,502	0,41	snp036-snp034	5%
	HBA (2729)	16,663	0,65	snp032-hap012	5%
APL02	Sulfurtransferase (1781)	14,849	0,93	snp066	5%
	ETF A (1883)	15,623	0,92	snp064-snp066	5%
	DSTN (2697)	16,48	0,74	snp061	5%
APL03	TAL (1656)	18,769	0,81	snp088	1%
	ADK (1534)	15,078	0,72	snp087	5%
	APOA1 (2186)	14,894	0,72	snp087	5%
	APOA1 (2596)	16,388	0,39	CAM124	5%
	beta-actin (1644)	14,376	0	snp080	5%
	ENO1 (1435)	15,104	0,64	snp081	5%
	HAGH (2056)	14,725	0	snp080	5%
	MDH1 (1760)	16,657	0,55	snp083-snp082	5%
	NDUFS3 (2036)	15,578	0,04	snp077-snp199	5%
APL04	AKR1A1 (1614)	19,043	0	CAM037	0,50%
	PRDX3 (2219)	18,993	0,94	snp104	0,50%
	EIF3I (1736)	16,769	0,93	hap041-snp104	1%
	gamma actine (1937)	15,032	0,38	hap042	5%
	APOA1 (2143)	13,331	0,23	snp117-snp114	5%
	APOA1 (1728)	15,079	0,59	snp105-snp108	5%
	SODMn (2281)	13,895	0,38	hap042	5%
APL05	ALDH7A1 (2886)	13,738	0	CAM158	1%
	beta-actin (1644)	10,139	0,018	CAU059	5%
	VCP (2861)	9,919	0,012	CAM158-CAM011	5%
APL06	MDH1 (1707)	17,139	0,21	snp155-snp154	1%
	PGAM1 (2067)	16,211	0,43	snp152-snp148	1%
	HAAO (1828)	12,351	0,22	snp154	5%
	PDHB (1787)	13,54	0,54	snp151	5%
	PRDX6 (2091)	13,397	0,02	snp158-snp156	5%
APL07	APOA1 (2564)	25,107	0,69	snp175	0,10%
	AKR1A1 (1614)	17,929	0,42	CAU022	1%
	PGAM1 (2067)	13,843	0,57	snp172-snp169	5%
	GLUD1 (2921)	13,953	0,64	snp169-snp174	5%
APL08	PRPS2 (1816)	16,27	0	snp191	1%
	HBA (1529)	14,386	0,53	snp178-snp183	5%
	beta-actin (1644)	15,007	0,4	snp180-APH20	5%
	APOA1 (1647)	12,784	0,45	snp180-APH20	5%

Tableau 36 (suite)

Chromosome	Protéine (N° spot)	Maximum de Vraisemblance	Position (M)	Marqueurs	Seuil de significativité atteint
APL08	PRDX4 (2112)	12,802	0,05	snp191-snp90	5%
	HBA (2866)	13,741	0,3	snp187	5%
	PDIA3 (2883)	14,171	0,19	snp189-snp188	5%
APL09	HAAO (1815)	12,475	0,08	snp204	5%
	histone H4 (2910)	12,493	0,24	snp202 - CAU088	5%
	FABP7 (2917)	12,402	0,17	snp203 - snp202	5%
APL10	HIBCH (1603)	24,105	0,11	snp228-snp231	0,10%
	ETHE1 (2017)	21,083	0,39	snp226-snp219	0,50%
	PSMC3 (1396)	14,111	0	snp229	5%
	PRDX4 (2112)	12,173	0,28	snp220	5%
	APOA1 (2127)	12,213	0,01	snp228	5%
	ACPI (2663)	13,334	0,36	snp226-snp219	5%
	histone H4 (2910)	12,489	0,36	snp226-snp219	5%
APL11	ANXA5 (1858)	16,671	0,09	snp207-snp216	1%
	TPI (2133)	16,837	0,22	snp216	1%
APL12	TAL (1656)	13,165	1,55	snp248	5%
	ENO1 (1416)	13,258	1,55	snp248	5%
	HAAO (1815)	15,457	1,29	CAM162-CAM183	5%
	S-formylglutathione hydrolase (1837)	14,293	1,48	CAM183-snp248	5%
	NIT2 (1938)	13,876	1,51	CAM183-snp248	5%
	PRDX6 (2057)	13,454	0,69	CAM193	5%
	APOA1 (2143)	14,663	0,69	CAM193	5%
	APOA1 (2186)	16,44	1,14	CAM162-CAM183	5%
APL13	VDAC1 (1961)	15,944	0,47	snp257	0,50%
	ENO1 (1518)	12,389	0,09	snp252-hap120	5%
	TAL (1656)	10,271	0,13	hap120	5%
	PGAM1 (2067)	10,407	0,6	snp263	5%
APL14	pyruvate déshydrogenase (1505)	12,358	0,05	snp281-snp280	5%
	ADK (1534)	12,784	0,04	snp281-snp280	5%
	HIBCH (1603)	12,969	0,52	hap130	5%
APL15	ENO1 (1435)	16,853	0,43	snp286-snp287	1%
	FASN (1906)	16,631	0,25	snp285-snp286	1%
	CCT7 (2877)	17,526	0,38	snp285-snp286	1%
	ENO1 (1400)	15,586	0,55	snp286-snp287	5%
	PSMC3 (1396)	12,238	0,22	snp285-snp286	5%
	MPST (1776)	12,371	0,33	snp285-snp286	5%
	PRPS2 (1816)	14,994	0,57	snp287	5%
ANXA5 (1914)	13,026	0,35	snp285-snp286	5%	

Tableau 36 (suite)

Chromo some	Protéine (N° spot)	Maximum de Vraisemblance	Position (M)	Marqueurs	Seuil de significativité atteint
APL16	ATPB5 (1365)	14,464	0,01	hap150-snp303	1%
	DJ-1 (2269)	14,673	0,21	snp300-snp301	1%
	ENO1 (1376)	13,369	0,17	snp299	5%
	APOA1 (25696)	13,728	0	hap150	5%
APL18	ENO1 (1427)	25,041	0,13	hap161-snp308	0,10%
	PRDX3 (2231)	19,414	0,04	hap161-snp308	0,50%
	ENO1 (1414)	18,731	0,85	snp317-snp318	0,50%
	GS (1541)	17,099	0,13	hap161-snp308	1%
	PGAM1 (2076)	17,24	0	hap161	1%
	RPS12 (2924)	17,413	0,76	snp315-snp316	1%
	MDH1 (1760)	16,419	0,11	hap161-snp308	5%
	EEF2 (1842)	13,19	0,9	snp318	5%
	PSMB (1954)	13,013	0,82	snp317	5%
	SUCLG2 (1479)	15,896	0,83	snp317-snp318	5%
	TPI (2135)	13,524	0,9	snp318	5%
	ENO1 (1449)	13,521	0,9	snp318	5%
	VCP (2865)	13,33	0,17	hap161-snp308	5%
	Rab GDP (2887)	16,522	0,18	hap161-snp308	5%
	PGAM1 (2935)	15,153	0	hap161	5%
APL19	EIF3I (1736)	13,53	0,04	snp319-snp327	5%
	PRDX6 (2091)	11,796	0,24	snp322-snp321	5%
	DJ-1 (2264)	12,962	0,06	snp319-snp327	5%
	ACP1 (2663)	13,471	0,03	snp319	5%
	ME1 (2876)	12,164	0,2	snp322-snp321	5%
	Rab GDP (2887)	12,405	0,41	snp325	5%
	EEF2 (2893)	11,248	0,19	snp322-snp321	5%
	TBCA (2904)	11,876	0,41	snp325	5%
APL20	APOA1 (1728)	13,803	0,31	snp331	5%
	gamma actin (1937)	14,231	0,21	snp330-snp331	5%
	VCP (2865)	11,683	0	CAU019	5%
	Rab GDP (2887)	16,358	0,18	snp330-snp331	1%
APL21	ENO1 (1400)	11,694	0,44	snp342	5%
	HAAO (1828)	13,997	0,44	snp342	5%
	CA2 (2034)	20,33	0,4	snp345	0,50%
	PGAM1 (2067)	12,124	0,25	snp340-snp337	5%
	DJ-1 (2264)	14,825	0,02	snp347-snp341	5%
	ALB (2873)	11,939	0,55	snp342-snp343	5%
	RPS12 (2924)	13,27	0,05	snp341-hap191	5%

Tableau 36 (suite)

Chromo some	Protéine (N° spot)	Maximum de Vraisemblance	Position (M)	Marqueurs	Seuil de significativité atteint
APL22	BPNT1 (1609)	11,485	0	snp352	5%
	CA2 (2034)	10,976	0,05	snp350-AMU026	5%
	PRDX4 (2896)	14,35	0	snp352	1%
APL23	PSMC3 (1396)	8,625	0,005	snp353-snp355	5%
	NDUFS3 (2036)	8,517	0,005	snp353-snp355	5%
	APOA1 (2596)	11,246	0,005	snp353-snp355	5%
	PDIA3 (2883)	18,227	0	snp353	0,10%
	FABP7 (2917)	17,348	0	snp353	0,10%
APL24	ENO1 (1408)	11,431	0,28	snp360	5%
	APOA1 (1728)	15,560	0,2100	snp359-snp360	1%
	MYH3 (1732)	14,662	0	snp357	5%
	MDH1 (1760)	12,708	0,22	snp359-snp360	5%
	pyruvate déshydrogénase (1800)	12,196	0,26	snp359-snp360	5%
	PRPS2 (1816)	12,673	0,15	snp358-snp359	5%
	ANXA5 (1858)	10,981	0,22	snp359-snp360	5%
	FASN (1906)	29,388	0,27	snp359-snp360	0,10%
	gamma actin (1937)	12,05	0,04	snp358	5%
	PSMB (1954)	11,199	0,18	snp359-snp360	5%
	PGAM1 (2076)	15,691	0,0600	snp358-snp359	1%
	APOA1 (2259)	13,236	0,23	snp359-snp360	5%
	APL25	ENO1 (1414)	13,114	0,38	snp363
ENO1 (1435)		12,185	0,34	snp362-snp363	5%
ADK (1534)		12,679	0,12	AMU158	5%
ACADS (1612)		14,974	0,17	snp364-snp361	1%
ANXA2 (1715)		10,973	0,26	snp361	5%
PRDX4 (2112)		12,73	0,38	snp363	5%
DJ-1 (2314)		17,744	0,32	snp361-snp362	0,50%
hydrométhylglutaryl coA synthase (2888)		11,575	0,04	snp365-AMU158	5%
ENO1 (1403)		17,463	0,38	snp363	0,50%
PRDX4 (2896)		11,046	0,34	snp362-snp363	5%
APL27	MDH1 (1707)	17,951	0,42	snp370-snp372	0,50%
	Ester hydrolase (1735)	17,569	0,09	snp373-snp374	0,50%
	TPI (2135)	12,513	0,51	snp371	5%
	PSMA2 (2197)	11,99	0,43	snp370-snp372	5%
	TTR (2934)	19,887	0,51	snp371	0,50%
APL28	PSMC3 (1396)	9,142	0	snp376	5%
	ACADS (1612)	8,522	0,01	snp375	5%
	EIF3I (1736)	9,277	0,01	snp375	5%
	PRDX3 (2231)	9,089	0,01	snp375	5%

Tableau 36 (suite)

Chromo some	Protéine (N° spot)	Maximum de Vraisemblance	Position (M)	Marqueurs	Seuil de significativité atteint
APL28	Rab GDP (2887)	10,067	0,01	snp375	5%
APL29	ENO1 (1395)	9,727	0,14	snp383-snp382	5%
	ENO1 (1435)	10,326	0,07	snp384	5%
	GS (1523)	14,847	0,14	snp383-snp382	1%
	GS (1541)	10,165	0,13	snp383	5%
	HAAO (1815)	12,258	0	snp380	5%
	PSMB (1954)	10,714	0,08	snp384-snp383	5%
	VDAC1 (1961)	19,157	0,08	snp384	0,10%
	PRDX6 (2091)	10,331	0,18	snp382	5%
	TPI (2135)	11,375	0,13	snp383	5%
	DJ-1 (2269)	9,754	0,08	snp384-snp383	5%
	SODMn (2281)	12,848	0,09	snp384-snp383	5%
	ENO1 (2894)	9,721	0,14	snp383-snp382	5%
APLZ	ATP5B (1365)	13,606	0,32	snp144	5%
	ENO1 (1539)	11,897	0,22	hap280-snp141	5%
	ANXA5 (1858)	16,28	0,2	hap280	5%
	PSMA1 (1945)	14,123	0,32	snp144	5%
	TPI (2107)	17,155	0,22	hap280-snp141	1%
	DJ-1 (2264)	13,128	0,2	hap280	5%
	ALDH7A1 (2886)	11,801	0,3	CAM113-snp145	5%
	GLUD1 (2921)	15,647	0,06	snp140-snp136	5%

PRDX3/4/6 : Peroxiredoxin 3/4/6, EEF2 : Eukaryotic Elongation Factor 2, HBA : Hemoglobine alpha, ETFA : Elongation Transfert flavoprotein subunit alpha, DSTN : Destrin, TAL : Transaldolase, ADK : Adenylate Kinase, APOA1 : Apolipoprotein A1, ENO1 : Alpha-Enolase, HAGH : Hydroxyacylglutathione hydrolase, MDH1 : Malate Déshydrogénase, NDUFS3 : NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 3, AKR1A1 : Alcool déshydrogénase, EIF3I : Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I, SODMn : Mn Superoxide Dismutase, ALDH7A1 : Aldéhyde Déshydrogénase famille 7, membre A1, VCP : Transitional endoplasmic reticulum ATPase, PGAM1 : Phosphoglycérate Mutase 1, HAAO : 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase , PDHB : Pyruvate déshydrogénase beta, GLUD1 : Glutamate Déshydrogénase 1, PRPS2 : Ribose-phosphate pyrophosphokinase, PDIA3 : Protein disulfide Isomerase A3, FABP1/7 : FAtty Acid Binding Protein 1/7, HIBCH : 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, ETHE1 : protein ETHE1, PSMC3 : Protéasome subunit C3, ACP1 : Acid Phosphatase 1, ANXA5 : Annexine A5, TPI : Triose Phosphate Isomérase, NIT2 : Omega-amidase NIT2, VDAC1 : Voltage-dependent anion-selective channel protein 1, FASN : Fatty Acid Synthase, CCT7 : TCP1 Containing protein 7, MPST : 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, ATPB5 : ATP synthase subunit beta, DI-1 : Putative Parkinson disease autosomal recessive early onset 7 variant 1, GS : Glutamine Synthase, RPS12 : 40S ribosomal protein S12, PSMB : Proteasome Subunit B, SUCLG2 : Succinyl-CoA ligase subunit beta, Rab GDP : Rab-GDP dissociation Inhibitor, TBCA : Tubulin-specific Chaperone A, CA2 : Carbonic Anhydrase 2, ALB : Albumine, BPNT1 : Biphosphate Nucleotidase 1, MYH3 : Myosin 3, ACADS : Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, PSMA2 : Proteasome Subunit Alpha 2, TTR : Transthyretin.

Tableau 37 : Liste des spots identifiés et présentant des QTL à au moins 5% sur la carte microsatellite (1) et à au moins 1% CW sur la carte mixte (2). AA : Acides Aminés ; MW : Poids moléculaire ; calc PI : Point isoélectrique calculé. La dernière colonne renseigne la carte génétique portant le(s) QTL correspondant aux protéines : carte microsatellite=1 ; carte mixte=2.

N° spot	N° accession	Symbole du gène	Nom de la protéine	Score Mascot	ΣCoverage	Σ# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Carte où QTL identifié
1365	Q5ZLC5	ATPB5	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	1759	35,27	15	533	56,59	5,87	2
1376	P19140	ENO1	Alpha-enolase	283,16	17,28	5	434	47,2	6,80	1
1403	P19140	ENO1	Alpha-enolase	4700	65,21	28	434	47,2	6,80	1 et 2
1414	P19140	ENO1	Alpha-enolase	2427	65,21	28	434	47,2	6,80	1 et 2
1427	P19140	ENO1	Alpha-enolase	5356	65,21	28	434	47,3	6,58	1 et 2
1435	P19140	ENO1	Alpha-enolase	1483	39,17	11	434	47,2	6,80	2
1534	H0Z8F3	ADK	Adénosine kinase	612	30,5	9	341	38	6,37	1
1523	G1MW53	GS	Glutamine synthetase	460	22,79	7	373	42,2	6,98	2
1541	G1MW53	LOC100545435 (GS)	Glutamine synthetase	466	24,93	8	373	42,2	6,98	2
1603	G1N3F5	HIBCH	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	200	7,49	3	387	42,9	7,80	2
1612	H0ZH79	ACADS	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	763	24,58	8	415	44,3	8,66	2
1614	F1N9F8	AKR1A1	Alcohol dehydrogenase	129	12,54	5	327	37,1	7,80	2
1656	G1MXK0	TAL	Transaldolase	336	24,02	7	337	37,5	7,47	2
1707	G1N071	MDH1	Malate dehydrogenase	382	23,65	6	334	36,5	7,36	2
1708	F1NFS0	EEF2	Elongation factor 2	264	5,13	4	858	95,3	6,74	2
1728	O42296	APOA1	Apolipoprotein A1	251	20,08	5	264	30,6	5,54	2
1735	H0ZRI8	C11orf54	Ester hydrolase C11orf54	171	22,15	4	316	34,8	6,24	2

N° spot	N° accession	Symbole du gène	Nom de la protéine	Score Mascot	ΣCoverage	Σ# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Carte où QTL identifié
1736	E1C6T8	EIF3I	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	435	28,62	8	325	36,47	5,64	2
1781	H9L016	MPST	Sulfurtransferase	32815	23,60	4	267	29,8	5,40	2
1815	G1NCG5	HAAO	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	124	12,80	3	289	33,6	6,32	2
1816	E1BRQ0	PRPS2	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	483,71	40,31	9	325	35,6	6,68	2
1858	H0YUM4	ANXA5	Annexin A5	764	27,53	8	316	35,4	5,20	2
1883	H0YZD0	ETFFA	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	320	22,67	5	322	34	7,77	1 et 2
1906	B8XNP2	FASN	Fatty acid synthase	467	59,78	4	92	10,1	5,73	2
1961	G1N8Q2	VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	872	53,58	12	293	31,8	8,54	2
2017	H9L167	ETHE1	protein ETHE1, mitochondrial	97	30,84	2	107	11,68	7,34	2
2034	P07630	CA2	Carbonic Anhydrase 2	481	19,23	4	260	29	7,05	2
2036	F1ND23	NDUFS3	NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 3 mitochondrial		30,38	6	237	27,3	5,91	1
2067	Q5ZLN1	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	551	31,89	6	254	28,9	7,49	2
2076	Q5ZLN1	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1	281	18,9	4	254	28,9	7,49	2
2091	F1NBV0	PRDX6	Peroxiredoxin 6	1703	43,75	8	224	25,1	6,38	1
2104	B5FXD0	PSMA1	Proteasome subunit alpha type	654	33,74	9	246	27,4	6,89	1
2107	Q70I43	TPI	Triose Phosphate Isomerase	915	67,30	11	211	22,6	6,64	1
2112	H0ZAF6	PRDX4	Peroxiredoxin 4	205	25,52	4	192	21,8	6,20	1
2219	E1BR10	PRDX3	Peroxiredoxin 3	177	19,46	3	257	28	8,54	2
2133	Q70I43	TPI	Triose Phosphate Isomerase	1200	67,30	11	211	22,6	6,64	2

N° spot	N° accession	Symbole du gène	Nom de la protéine	Score Mascot	ΣCoverage	Σ# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Carte où QTL identifié
2231	H0ZLJ2	PRDX3	Peroxiredoxin 3	167,62	17,17	3	198	21,9	7,02	2
2246	H0ZLJ2	PRDX3	Peroxiredoxin 3	141	15,15	3	198	21,87	7,02	2
2269	B5G3Z6	DJ-1	Putative Parkinson disease autosomal recessive early onset 7 variant 1	323	21,69	5	189	19,95	6,79	2
2281	B2M0J6	SODMn	Mn superoxide dismutase	109,48	27,12	3	118	12,8	6,89	1
2314	B5G3Z6	DJ-1	Putative Parkinson disease autosomal recessive early onset 7 variant 1	323	21,69	5	189	19,95	6,79	2
2564	O42296	APOA1	Apolipoprotein A1	79	63,64	19	264	30,6	5,54	2
2687	Q5ZJ22	GMFB	Glia maturation factor, beta	290,73	32,39	4	142	16,7	5,27	1
2697	H0Z6G7	DSTN	Destrin	254	27,44	4	164	18,4	7,91	1 et 2
2877	Q5ZJK8	CCT7	T-complex protein 1 subunit eta	1160,19	29,48	13	553	60,3	6,28	2
2883	H0ZIZ6	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	802,10	31,17	16	494	55,1	5,90	2
2886	H0YSW1	ALDH7A1	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	340	8,02	4	536	58,02	7,37	1 et 2
2887	F1NCZ2	GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	712	42,26	12	433	49,0	5,73	2
2896	F1NNS8	PRDX4	Peroxiredoxin 4	502,53	35,07	8	288	32,1	8,40	1
2910	G3UR23	LOC100545463	Histone H4	161,88	44,78	3	67	7,6	10,48	2
2917	H0ZNK7	FABP7	Fatty Acid Binding Protein 7	918,66	50,00	5	132	14,9	5,91	2
2924	H0ZMV7	RPS12	40S ribosomal protein S12	311,84	36,36	4	132	14,5	7,21	2
2934	Q2LDE6	TTR	Transthyretin	219,74	45,33	4	150	16,3	5,24	2

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdallah, C., Dumas-Gaudot, E., Renaut, J., and Sergeant, K. (2012). Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance. *International Journal of Plant Genomics*, Article ID 494572.

Amiour, N., Imbaud, S., Clément, G., Agier, N., Zivy, M., Valot, B., Balliau, T., Armengaud, P., Quilleré, I., Cañas, R., et al. (2012). The use of metabolomics integrated with transcriptomic and proteomic studies for identifying key steps involved in the control of nitrogen metabolism in crops such as maize. *J. Exp. Bot.* 63, 5017–5033.

Awde, S., Marty-Gasset, N., Prahkarnkao, K., and Rémignon, H. (2014). Relationship between Proteolytic Activities and Cooking Loss Variability in Liver Issued from Force-Fed Mule Ducks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 3262–3268.

Babilé, R., and Auvergne, A. (1986). Qualité des foie gras : Comparaison de différentes méthodes d'appréciation de la fonte lipidique; Evolution en fonction du temps. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 162, 151–156.

Babilé, R., Auvergne, A., Setiawan, I., Joly, E., and Latil, G. (1993). Conduite alimentaire au cours du gavage des canards et qualité technologique du foie gras. *1^{res} Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras*, Bordeaux, France, pp. 107–116.

Babilé, R. (1989). La production de foies gras de canards de Barbarie (*Caïrina moschata*): Aspects génétiques, nutritionnels et technologiques. *Thèse de Doctorat*. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Baéza, E., Marie-Etancelin, C., Davail, S., and Diot, C. (2013). La stéatose hépatique chez les palmipèdes. *INRA Productions Animales* 26, 403–414.

Baéza, E., Rideau, N., Chartrin, P., Davail, S., Hoo-Paris, R., Mourot, J., Guy, G., Bernadet, M.D., Juin, H., Meteau, K., et al. (2005). Canards de Barbarie, Pékin et leurs hybrides: aptitude à l'engraissement. *INRA Productions Animales* 18, 131–141.

Baudonnet, C. (1993). Facteurs de variation de la composition biochimique et de la qualité technologique des foies gras de canards. *Thèse de Doctorat*. Institut National Polytechnique de Toulouse.

- Bax, M.L., Chambon, C., Marty-Gasset, N., Remignon, H., Fernandez, X., and Molette, C.** (2012). Proteomic profile evolution during steatosis development in ducks. *Poult. Sci.* 91, 112–120.
- Berth, M., Moser, F.M., Kolbe, M., and Bernhardt, J.** (2007). The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 1223–1243.
- Blum, J.C., Monachon, G., and Leclercq, B.** (1971). Liver steatosis of force-fed geese as influenced by the protein level of the diet. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae* 21, 307–311.
- Bouillier-Oudot, M., Leprettre, S., Dubois, J.P., and Babilé, R.** (2002). Itinéraire post mortem et caractéristiques technologiques et organoleptiques des foies gras d'oies. *5^e Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie gras*, Pau, France, pp. 172–175.
- Bourgeois, M., Jacquin, F., Cassecuelle, F., Savoie, V., Belghazi, M., Aubert, G., Quillien, L., Huart, M., Marget, P., and Burstin, J.** (2011). A PQL (protein quantity loci) analysis of mature pea seed proteins identifies loci determining seed protein composition. *Proteomics* 11, 1581–1594.
- Bourneuf, E., Hérault, F., Chicault, C., Carré, W., Assaf, S., Monnier, A., Mottier, S., Lagarrigue, S., Douaire, M., Mosser, J., et al.** (2006). Microarray analysis of differential gene expression in the liver of lean and fat chickens. *Gene* 372, 162–170.
- Boustead, C.M., Brown, R., and Walker, J.H.** (1993). Isolation, characterization and localization of annexin V from chicken liver. *Biochem. J.* 291 (Pt 2), 601–608.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Brun, J.-M., Sellier, N., Hu, Y.H., and Rouvier, R.** (1999). Fertility and embryonic mortality in the intergeneric cross between the common duck and the muscovy duck: candling vs. opening the eggs. *1st World Waterfowl Conference*, Taichung, Taiwan, China, pp. 193–198.

- Brun, J.-M., Richard, M.M., Marie-Etancelin, C., Rouvier, R., and Larzul, C.** (2005). Le canard mulard : déterminisme génétique d'un hybride intergénérique. *INRA Productions Animales* 18, 295–308.
- Cazeils, J.L., Bouillier-Oudot, M., Auvergne, A., and Babilé, R.** (1999). Influence de la composition biochimique de la membrane plasmique des hépatocytes sur le rendement après stérilisation des foies gras d'oies. *Revue de Médecine Vétérinaire* 150, 651–654.
- Charlton, M., Viker, K., Krishnan, A., Sanderson, S., Veldt, B., Kaalsbeek, A.J., Kendrick, M., Thompson, G., Que, F., Swain, J., et al.** (2009). Differential expression of lumican and fatty acid binding protein-1: New insights into the histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 49, 1375–1384.
- Chartrin, P., Bernadet, M.-D., Guy, G., Mourot, J., Hocquette, J.-F., Rideau, N., Duclos, M.J., and Baéza, E.** (2006). Does overfeeding enhance genotype effects on liver ability for lipogenesis and lipid secretion in ducks? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 145, 390–396.
- Chartrin, P., Bordeau, T., Meteau, K., Juin, H., Bernadet, M.D., Guy, G., Larzul, C., Mourot, J., Duclos, M.J., and Baeza, E.** (2003) Foie gras de canard : Canards de Barbarie, mulard et hinny: quelles sont les particularités sensorielles de leur foie gras? *Viandes et produits carnés* 25, 1.
- Churchill, G.A., and Doerge, R.W.** (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138, 963–971.
- Consoli, L., Lefèvre, A., Zivy, M., de Vienne, D., and Damerval, C.** (2002). QTL analysis of proteome and transcriptome variations for dissecting the genetic architecture of complex traits in maize. *Plant Mol. Biol.* 48, 575–581.
- Damerval, C., Hébert, Y., and de Vienne, D.** (1987). Is the polymorphism of protein amounts related to phenotypic variability? A comparison of two-dimensional electrophoresis data with morphological traits in maize. *Theor. Appl. Genet.* 74, 194–202.

- Damerval, C., Maurice, A., Josse, J.M., and de Vienne, D.** (1994). Quantitative trait loci underlying gene product variation: a novel perspective for analyzing regulation of genome expression. *Genetics* 137, 289–301.
- Delahunty, C.M., and Yates, J.R.** (2007). MudPIT: multidimensional protein identification technology. *BioTechniques* 43, 563, 565, 567.
- Douaire, M., Le Fur, N., el Khadir-Mounier, C., Langlois, P., Flamant, F., and Mallard, J.** (1992). Identifying genes involved in the variability of genetic fatness in the growing chicken. *Poult. Sci.* 71, 1911–1920.
- Dumont, E., Fontaine, V., Vuylsteker, C., Sellier, H., Bodèle, S., Voedts, N., Devaux, R., Frise, M., Avia, K., Hilbert, J.-L., et al.** (2009). Association of sugar content QTL and PQL with physiological traits relevant to frost damage resistance in pea under field and controlled conditions. *Theor Appl Genet* 118, 1561–1571.
- Elsen, J.-M., Mangin, B., Goffinet, B., Boichard, D., and Le Roy, P.** (1999). Alternative models for QTL detection in livestock. I. General introduction. *Genetics Selection Evolution* 31, 213.
- Feldstein, A.E., Canbay, A., Angulo, P., Taniai, M., Burgart, L.J., Lindor, K.D., and Gores, G.J.** (2003). Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 125, 437–443.
- Fernandez, X.** (1988). Etude de la variabilité génétique d'une population de canards de Barbarie mâles sur les caractères de croissance et de gavage de ses descendants. *Thèse de Doctorat*, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse.
- Fernandez, X., Lahirigoyen, E., Auvergne, A., Molette, C., and Bouillier-Oudot, M.** (2010). The effects of stunning methods on product qualities in force-fed ducks and geese. 1. Carcass downgrading and meat quality. *Animal* 4, 128–138.
- Fernandez, X., Bouillier-Oudot, M., Molette, C., Bernadet, M.D., and Manse, H.** (2011). Duration of transport and holding in lairage at constant postprandial delay to slaughter--effects on fatty liver and breast muscle quality in mule ducks. *Poult. Sci.* 90, 2360–2369.

- Fève, K., Bounet, M., Leroux, S.Y., Bardes, S., Vignal, A., and Marie-Etancelin, C.** (2008). Elaboration de la carte génétique du canard commun. Dans le cadre du programme de recherche “GENECAN.” 8^e Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras, Arcachon, France. pp. 25–28.
- François, Y., Marie-Etancelin, C., Vignal, A., Viala, D., Davail, S., and Molette, C.** (2014). Mule Duck “Foie Gras” Shows Different Metabolic States According to Its Quality Phenotype by Using a Proteomic Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 7140–7150.
- François, Y., Molette, C., Vignal, A., Davail, S. and Marie-Etancelin, C.** (2014) Detection Of Pleiotropic QTL Related To Protein Expression And Foie Gras Quality Traits. 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production, Vancouver, Canada.
- Fu, J., Keurentjes, J.J.B., Bouwmeester, H., America, T., Verstappen, F.W.A., Ward, J.L., Beale, M.H., de Vos, R.C.H., Dijkstra, M., Scheltema, R.A., et al.** (2009). System-wide molecular evidence for phenotypic buffering in Arabidopsis. *Nature Genetics* 41, 166–167.
- Gonzalez, J., Düttmann, H., and Wink, M.** (2009). Phylogenetic relationships based on two mitochondrial genes and hybridization patterns in Anatidae. *Journal of Zoology* 279, 310–318.
- Goodridge, A.G.** (1987). Dietary regulation of gene expression: enzymes involved in carbohydrate and lipid metabolism. *Annual Review of Nutrition* 7, 157–185.
- Guicciardi, M.E., and Gores, G.J.** (2005). Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 54, 1024–1033.
- Guy, G., Hermier, D., Davail, S., Bely, M., André, J.-M., and Hoo-Paris, R.** (1999). meat production and force-feeding ability of different types of ducks. 1st World Waterfowl Conference, Taichung, Taiwan, China, pp. 462–468.
- Gygi, S.P., Corthals, G.L., Zhang, Y., Rochon, Y., and Aebersold, R.** (2000). Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 9390–9395.

- Haas, M.E., Attie, A.D., and Biddinger, S.B.** (2013). The regulation of ApoB metabolism by insulin. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 24, 391–397.
- Hajri, T., and Abumrad, N.A.** (2002). Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 383–415.
- Hamaguchi, T., Iizuka, N., Tsunedomi, R., Hamamoto, Y., Miyamoto, T., Iida, M., Tokuhisa, Y., Sakamoto, K., Takashima, M., Tamesa, T., et al.** (2008). Glycolysis module activated by hypoxia-inducible factor 1alpha is related to the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* 33, 725–731.
- He, J., Tian, Y., Li, J., Shen, J., Tao, Z., Fu, Y., Niu, D., and Lu, L.** (2013). Expression pattern of L-FABP gene in different tissues and its regulation of fat metabolism-related genes in duck. *Mol. Biol. Rep.* 40, 189–195.
- Heiden, M.G.V., Locasale, J.W., Swanson, K.D., Sharfi, H., Heffron, G.J., Amador-Noguez, D., Christofk, H.R., Wagner, G., Rabinowitz, J.D., Asara, J.M., et al.** (2010). Evidence for an Alternative Glycolytic Pathway in Rapidly Proliferating Cells. *Science* 329, 1492–1499.
- Hérault, F., Saez, G., Robert, E., Al Mohammad, A., Davail, S., Chartrin, P., Baéza, E., and Diot, C.** (2010). Liver gene expression in relation to hepatic steatosis and lipid secretion in two duck species. *Anim. Genet.* 41, 12–20.
- Hermier, D., Guy, G., Guillaumin, S., Davail, S., André, J.-M., and Hoo-Paris, R.** (2003). Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 135, 663–675.
- Holdt, L.M., Delft, A. von, Nicolaou, A., Baumann, S., Kostrzewa, M., Thiery, J., and Teupser, D.** (2013). Quantitative Trait Loci Mapping of the Mouse Plasma Proteome (pQTL). *Genetics* 193, 601–608.
- Huang, Y., Haley, C.S., Hu, S., Hao, J., Wu, C., and Li, N.** (2007a). Detection of quantitative trait loci for body weights and conformation traits in Beijing ducks. *Anim. Genet.* 38, 525–526.

- Huang, Y., Haley, C.S., Wu, F., Hu, S., Hao, J., Wu, C., and Li, N.** (2007b). Genetic mapping of quantitative trait loci affecting carcass and meat quality traits in Beijing ducks (*Anas platyrhynchos*). *Anim. Genet.* 38, 114–119.
- Hussain, M.M., Rava, P., Walsh, M., Rana, M., and Iqbal, J.** (2012). Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutr Metab (Lond)* 9, 14.
- Iritani, N., Ikeda, Y., Fukuda, H., and Katsurada, A.** (1984). Comparative study of lipogenic enzymes in several vertebrates. *Lipids* 19, 828–835.
- Jansen, R.C., Tesson, B.M., Fu, J., Yang, Y., and McIntyre, L.M.** (2009). Defining gene and QTL networks. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 241–246.
- Journal Officiel de la République Française.** 1993. Décret n°93-9-99 du 09-08-93 du JO du 14-08-93, relatif aux préparations à base de foie gras.
- Kileh-Wais, M., Elsen, J.M., Vignal, A., Feves, K., Vignoles, F., Fernandez, X., Manse, H., Davail, S., André, J.M., Bastianelli, D., et al.** (2013). Detection of QTL controlling metabolism, meat quality, and liver quality traits of the overfed interspecific hybrid mule duck. *J. Anim. Sci.* 91, 588–604.
- Klose, J.** (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Hum Genet* 26, 231–243.
- Lander, E.S., and Botstein, D.** (1989). Mapping Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits Using RFLP Linkage Maps. *Genetics* 121, 185–199.
- Larzul, C., Imbert, B., Bernadet, M.-D., Guy, G., and Rémignon, H.** (2006). Meat quality in an intergeneric factorial crossbreeding between muscovy (*Cairina moschata*) and Pekin (*Anas platyrhynchos*) ducks. *Animal Research* 55, 219–229.
- Latil, G., Auvergne, A., and Babilé, R.** (1996). Consommation du canard mulard en gavage. Relations avec les performances zootechniques et la qualité technologique du foie gras. 2^e Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras, Bordeaux, France., pp. 93–97.

Leonardi, A., Damerval, C., Hébert, Y., Gallais, A., and de Vienne, D. (1991). Association of protein amount polymorphism (PAP) among maize lines with performances of their hybrids. *Theoret. Appl. Genetics* 82, 552–560.

Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M., and Yates, J.R. (1999). Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotech* 17, 676–682.

Lu, N., Zhang, Y., Li, H., and Gao, Z. (2010). Oxidative and nitrative modifications of α -enolase in cardiac proteins from diabetic rats. *Free Radical Biology and Medicine* 48, 873–881.

Madureira, P.A., Hill, R., Miller, V.A., Giacomantonio, C., Lee, P.W.K., and Waisman, D.M. (2011). Annexin A2 is a novel Cellular Redox Regulatory Protein involved in Tumorigenesis. *Oncotarget* 2, 1075–1093.

Manadas, B., English, J.A., Wynne, K.J., Cotter, D.R., and Dunn, M.J. (2009). Comparative analysis of OFFGel, strong cation exchange with pH gradient, and RP at high pH for first-dimensional separation of peptides from a membrane-enriched protein fraction. *Proteomics* 9, 5194–5198.

Marie-Etancelin, C., Chapuis, H., Brun, J. m., Larzul, C., Mialon-Richard, M. m., and Rouvier, R. (2008). Genetics and selection of mule ducks in France: a review. *World's Poultry Science Journal* 64, 187–208.

Marie-Etancelin, C., Fernandez, X., Baéza, E., Bonnal, L., Bernadet, M.D., Manse, H., Chartrin, P., and Bastianelli, D. (2010). Genetic parameters of fatty liver and breast muscle composition predicted by near-infrared spectroscopy. *9th World Congr. on Genet. Applied to Livestock Prod.*, Leipzig, Germany 4.

Marie-Etancelin, C., Basso, B., Davail, S., Gontier, K., Fernandez, X., Vitezica, Z.G., Bastianelli, D., Baéza, E., Bernadet, M.-D., Guy, G., et al. (2011). Genetic parameters of product quality and hepatic metabolism in fattened mule ducks. *J. Anim. Sci.* 89, 669–679.

Le Mignon, G., Blum, Y., Demeure, O., Diot, C., Le Bihan-Duval, E., Le Roy, P., Lagarrigue, S., et al. (2010). Apports de la génomique fonctionnelle à la cartographie fine de QTL. *INRA Productions Animales* 23, 343–358.

Miller, I., Crawford, J., and Gianazza, E. (2006). Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* 6, 5385–5408.

Molee, W., Bouillier-Oudot, M., Auvergne, A., and Babilé, R. (2005). Changes in lipid composition of hepatocyte plasma membrane induced by overfeeding in duck. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 141, 437–444.

Motoyama, A., and Yates, J.R. (2008). Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. *Anal. Chem.* 80, 7187–7193.

Mucha, S., Grajewski, B., Gornowicz, E., Lisowski, M., Radziszewska, J., and Szwaczkowski, T. (2014). Mapping quantitative trait loci affecting some carcass and meat traits in duck (*Anas platyrhynchos*). *J. Appl. Genet.*

Murk, K., Buchmeier, S., Jockusch, B.M., and Rothkegel, M. (2009). In birds, profilin-2a is ubiquitously expressed and contributes to actin-based motility. *J Cell Sci* 122, 957–964.

Nakano, Y., Jahan, I., Bonde, G., Sun, X., Hildebrand, M.S., Engelhardt, J.F., Smith, R.J.H., Cornell, R.A., Fritsch, B., and Bánfi, B. (2012). A Mutation in the *Srrm4* Gene Causes Alternative Splicing Defects and Deafness in the Bronx Waltzer Mouse. *PLoS Genet* 8, e1002966.

Newton, B.W., Russell, W.K., Russell, D.H., Ramaiah, S., and Jayaraman, A. (2009). Liver Proteome Analysis in a Rodent Model of Alcoholic Steatosis. *J Proteome Res* 8, 1663–1671.

Niforou, K., Cheimonidou, C., and Trougakos, I.P. (2014). Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Biology* 2, 323–332.

O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021.

- Odum, E.P.** (1960). Premigratory Hyperphagia in Birds. *Am J Clin Nutr* 8, 621–629.
- Ozawa, K., Kuwabara, K., Tamatani, M., Takatsuji, K., Tsukamoto, Y., Kaneda, S., Yanagi, H., Stern, D.M., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., et al.** (1999). 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* 274, 6397–6404.
- Pan, Z., Wang, J., Han, C., Zhai, N., Lv, J., Zhou, Z., Tang, H., Xiang, S., Wang, J., and Li, L.** (2010). Identification of differentially expressed genes between hepatocytes of Landes geese (*Anser anser*) and Sichuan White geese (*Anser cygnoides*). *Mol Biol Rep* 37, 4059–4066.
- Paterson, A.H., Lander, E.S., Hewitt, J.D., Peterson, S., Lincoln, S.E., and Tanksley, S.D.** (1988). Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335, 721–726.
- Peterfy, M.** (2012). Lipase Maturation Factor 1: a lipase chaperone involved in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1821, 790–794.
- Ponsuksili, S., Murani, E., Phatsara, C., Schwerin, M., Schellander, K., and Wimmers, K.** (2010). Expression quantitative trait loci analysis of genes in porcine muscle by quantitative real-time RT-PCR compared to microarray data. *Heredity* 105, 309–317.
- Poujardieu, B., Guichard, F., and Laventure, P.** (1994). Paramètres génétiques de croissance et de gavage de la cane commune. *Genetics Selection Evolution* 26, 468–472.
- Rabilloud, T., and Lelong, C.** (2011). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics* 74, 1829–1841.
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., and Lelong, C.** (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of Proteomics* 73, 2064–2077.
- Rao, M.** (2012). Construction of a duck whole genome radiation hybrid panel : an aid for NGS whole genome assembly and a contribution to avian comparative maps. *Thèse de Doctorat*, Université Toulouse III - Paul Sabatier.

Rao, M., Morisson, M., Faraut, T., Bardes, S., Fève, K., Labarthe, E., Fillon, V., Huang, Y., Li, N., and Vignal, A. (2012). A duck RH panel and its potential for assisting NGS genome assembly. *BMC Genomics* 13, 513.

Robin, N., and Castaing, J. (1990). Alimentation énergétique du canard mulard. *Rev. Alim. Anim.* 440, 22–25.

Robin, N., Peyhorgue, A., and Castaing, J. (2002). Comparaison de différents itinéraires techniques élevage/gavage pour un gavage cours des canards mulards. *5^e Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras*, Pau, France, pp. 148–151.

Rousselot-Pailley, D., Guy, G., Gourichon, D., Sellier, N., and Blum, J.C. (1992). Influence des conditions d'abattage et de réfrigération sur la qualité des foies gras d'oie. *INRA Productions Animales* 5, 167–172.

Rouvier, R., Guy, G., Rousselot-Paillet, D., and Poujardieu, B. (1994). Genetic parameters from factorial cross breeding in two duck strains (*Anas platyrhynchos*) brown Tsaiya and Pekin, for growth and fatty liver traits. *British Poultry Science* 35, 509–517.

Rupik, W., Jasik, K., Bembenek, J., and Widlak, W. (2011). The expression patterns of heat shock genes and proteins and their role during vertebrate's development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 159, 349–366.

Saez, G., Baéza, E., Davail, S., Durand, D., Bauchart, D., and Gruffat, D. (2008). Is the hepatic metabolism of glucose and linoleic acid influenced by species in overfed ducks? *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 151, 576–581.

Saez, G., Davail, S., Gentès, G., Hocquette, J.F., Jourdan, T., Degrace, P., and Baéza, E. (2009). Gene expression and protein content in relation to intramuscular fat content in Muscovy and Pekin ducks. *Poult. Sci.* 88, 2382–2391.

Saez, G., Savary-Auzeloux, I., Baeza, E., Bernadet, M.-D., Davail, S., Durand, D., Bauchart, D., and Gruffat, D. (2012). Fractional apoB-VLDL hepatic synthesis rate in Muscovy and Pekin ducks fed ad libitum. *Archiv Fur Geflugelkunde* 76, 20–25.

Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799–806.

Schiff, M., Froissart, R., Olsen, R.K.J., Acquaviva, C., and Vianey-Saban, C. (2006). Electron transfer flavoprotein deficiency: Functional and molecular aspects. *Molecular Genetics and Metabolism* 88, 153–158.

Szapacs, M.E., Kim, H.-Y.H., Porter, N.A., and Liebler, D.C. (2008). Identification of Proteins Adducted by Lipid Peroxidation Products in Plasma and Modifications of Apolipoprotein A1 with a Novel Biotinylated Phospholipid Probe. *Journal of Proteome Research* 7, 4237–4246.

Theron, L., Fernandez, X., Marty-Gasset, N., Pichereaux, C., Rossignol, M., Chambon, C., Viala, D., Astruc, T., and Molette, C. (2011). Identification by proteomic analysis of early post-mortem markers involved in the variability in fat loss during cooking of mule duck “foie gras.” *J. Agric. Food Chem.* 59, 12617–12628.

Theron, L., Cullere, M., Bouillier-Oudot, M., Manse, H., Dalle Zotte, A., Molette, C., Fernandez, X., and Vitezica, Z.G. (2012). Modeling the relationships between quality and biochemical composition of fatty liver in mule ducks. *Journal of Animal Science.* 90(9):3312-3317

Theron, L., Fernandez, X., Marty-Gasset, N., Chambon, C., Viala, D., Pichereaux, C., Rossignol, M., Astruc, T., and Molette, C. (2013). Proteomic Analysis of Duck Fatty Liver during Post-Mortem Storage Related to the Variability of Fat Loss during Cooking of “Foie Gras.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 920–930.

Théron, L. (2011). Déterminisme biologique de la variabilité de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard. *Thèse de Doctorat*, Institut National Polytechnique de Toulouse.

Vignal A., François, Y., Molette, C., Marie-Etancelin, C. (2014) New duck genetic maps : a tool for QTL and proteinQTL (pQTL) detection. *34th International Society for Animal Genetics Conference*, Xi'an, China.

Vinaixa, M., Rodríguez, M.A., Rull, A., Beltrán, R., Bladé, C., Brezmes, J., Cañellas, N., Joven, J., and Correig, X. (2010). Metabolomic assessment of the effect of dietary cholesterol in the progressive development of fatty liver disease. *J. Proteome Res.* 9, 2527–2538.

Wang, X., Gilbert, H., Moreno, C., Filangi, O., Elsen, J.-M., and Le Roy, P. (2012). Statistical properties of interval mapping methods on quantitative trait loci location: impact on QTL/eQTL analyses. *BMC Genet* 13, 29.

Warrier, M., Hinds, T.D., Ledford, K.J., Cash, H.A., Patel, P.R., Bowman, T.A., Stechschulte, L.A., Yong, W., Shou, W., Najjar, S.M., et al. (2010). Susceptibility to Diet-Induced Hepatic Steatosis and Glucocorticoid Resistance in FK506-Binding Protein 52-Deficient Mice. *Endocrinology* 151, 3225–3236.

Washburn, M.P., Wolters, D., and Yates, J.R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology* 19, 242–247.

Waters, K.M., and Ntambi, J.M. (1994). Insulin and dietary fructose induce stearyl-CoA desaturase 1 gene expression of diabetic mice. *J. Biol. Chem.* 269, 27773–27777.

Westbrook, J.A., Yan, J.X., Wait, R., Welson, S.Y., and Dunn, M.J. (2001). Zooming-in on the proteome: Very narrow-range immobilised pH gradients reveal more protein species and isoforms. *Electrophoresis* 22, 2865–2871.

WOESSNER, J.F., Jr (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 93, 440–447.

Xu, X., Martin, F., and Friedman, J.S. (2010). The familial Parkinson's disease gene DJ-1 (PARK7) is expressed in red cells and plays a role in protection against oxidative damage. *Blood Cells Mol Dis* 45, 227–232.

Yasuda, T., Kaji, Y., Agatsuma, T., Niki, T., Arisawa, M., Shuto, S., Ariga, H., and Iguchi-Ariga, S.M.M. (2013). DJ-1 cooperates with PYCR1 in cell protection against oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 436, 289–294.

Yokota, S., Yamamoto, Y., Shimizu, K., Momoi, H., Kamikawa, T., Yamaoka, Y., Yanagi, H., Yura, T., and Kubota, H. (2001). Increased expression of cytosolic chaperonin CCT in human hepatocellular and colonic carcinoma. *Cell Stress & Chaperones* 6, 345.

Zhang, X., Yang, J., Guo, Y., Ye, H., Yu, C., Xu, C., Xu, L., Wu, S., Sun, W., Wei, H., et al. (2010). Functional proteomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease in rat models: Enoyl-coenzyme a hydratase down-regulation exacerbates hepatic steatosis. *Hepatology* 51, 1190–1199.

Zheng, A., Liu, G., Zhang, Y., Hou, S., Chang, W., Zhang, S., Cai, H., and Chen, G. (2012). Proteomic analysis of liver development of lean Pekin duck (*Anas platyrhynchos domestica*). *J Proteomics* 75, 5396–5413.

Zheng, A., Chang, W., Hou, S., Zhang, S., Cai, H., Chen, G., Lou, R., and Liu, G. (2014). Unraveling molecular mechanistic differences in liver metabolism between lean and fat lines of Pekin duck (*Anas platyrhynchos domestica*): a proteomic study. *J Proteomics* 98, 271–288.

Zhu, L.H., Meng, H., Duan, X.J., Xu, G.Q., Zhang, J., and Gong, D.Q. (2011). Gene Expression Profile in the Liver Tissue of Geese After Overfeeding. *Poult Sci* 90, 107–117.

Zuckerandl, E. (1986). Quantitative protein profiling: determining lexotypes. *J. Theor. Biol.* 121, 185–198.

