

**CONTRIBUTION DES TRANSCRIPTOMES DU FOIE, TISSU ADIPEUX
ET MUSCLE AUX MECANISMES D'ADAPTATION DES POULETS DE CHAIR
FACE A UNE VARIATION DE LA SOURCE D'ENERGIE DANS L'ALIMENT**

**Desert C.^{1,2}, Baéza E.³, Aite M.^{1,2}, Boutin M.^{1,2}, Le Cam A.⁴, Houee-Bigot M.^{1,2}, Blum Y.^{1,2},
Roux P.F.^{1,2}, Gondret F.^{1,2}, Hennequet-Antier C.³, Berri C.³, Lessire M.³,
Metayer-Coustard S.³, Collin A.³, Le Bihan-Duval E.³, Duclos M.J.³, Lagarrigue S.^{1,2}**

¹ *AGROCAMPUS OUEST, UMR1348 PEGASE, F-35000 Rennes, France*

² *INRA, UMR1348 PEGASE, F-35590 St Gilles, France*

³ *INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France*

⁴ *INRA, LPGP, F-35000 Rennes, France*

sandrine.lagarrigue@agrocampus-ouest.fr

RÉSUMÉ

Les tensions actuelles sur le marché des céréales conduisent à intégrer des matières premières moins conventionnelles dans les aliments des poulets de chair. Substituer l'amidon des céréales par des fibres complétées par des lipides pour avoir un régime isoénergétique est une alternative économiquement intéressante mais qui doit être évaluée. Afin de mesurer la capacité d'adaptation du poulet de chair à ces variations de sources énergétiques, 48 poulets mâles de lignées maigre ou grasse ont été nourris pendant 6 semaines avant abattage avec deux régimes isoénergétiques et isoprotéiques, mais différant par leur teneur en lipides (8% versus 2%) et en amidon (38% versus 51%) et notés respectivement HL et LL. Parce qu'il a été montré que la source en énergie du régime n'a eu aucun effet sur les performances de croissance et la composition corporelle à 63 jours d'âge, cette étude a pour objectif d'identifier les mécanismes génétiques impliqués dans cette adaptation. Pour cela, nous avons analysé sur ces mêmes poulets, les transcriptomes de trois tissus clés impliqués dans le métabolisme énergétique (foie, gras abdominal et muscle) en utilisant une puce personnalisée permettant de mesurer l'expression de l'ensemble des gènes référencés chez la poule. Comme attendu, environ 70% des gènes référencés sont exprimés dans chacun des trois tissus. En revanche, seul le foie présente des gènes différenciellement exprimés entre régimes. Au total, 388 et 199 gènes sont sous- et sur-exprimés respectivement avec le régime HL comparé au régime LL correspondant à un régime standard. Une analyse fonctionnelle de ces gènes montre dans le régime HL une inhibition de l'expression de nombreux gènes associés à la synthèse et au transport des acides gras (AG) et à la synthèse du glycogène. On retrouve également réprimés les expressions des régulateurs classiques de ces métabolismes que sont SREBP1 et PPARgamma. A l'inverse, sont surexprimés avec le régime HL des gènes impliqués dans le système de conversion des AG en acyl-carnitine, indispensable à leur entrée dans la mitochondrie pour y être β -oxydé. Sont également surexprimés dans le régime HL des gènes impliqués dans la réponse immunitaire, régulation qui pourrait être en partie due à la faible expression des PPARs avec ce régime. De façon plus surprenante, nous observons des variations d'expression pour des gènes impliqués dans le métabolisme du fer et de l'oxygène. Ces résultats montrent le rôle central du foie dans l'adaptation des poulets face aux variations de sources énergétiques alimentaires.

ABSTRACT

Contribution of the liver, adipose and muscle transcriptomes to the adaptative mechanisms of broilers in response to a variation of dietary energy source

The increasing use of unconventional feedstuffs in broiler's diets results in the substitution of starch by lipids as the main energy source. To evaluate the responses of genetically fat or lean broilers to such diets, male chickens were fed during 6 weeks isoenergetic and isoproteic diets with high lipid (8 %), high fiber content (HL) or low lipid (2 %), low fiber content (LL). Irrespective of line, diet had no effect on growth performances and body composition at 63 d of age. This study aimed at identifying the genetic mechanisms involved in this adaptation. For this purpose, we analyzed the transcriptomes of three key tissues involved in energy metabolism (liver, abdominal fat and muscle) using a custom DNChip to measure the expression of all genes referenced in this species. As expected, 70% of genes referenced in chicken are expressed in each tissue. However, only the liver presents differentially expressed genes between the two diets. In total, 388 and 199 genes were under- and over-expressed respectively with the HL compared to the LL diet considered as standard diet. In the HL diet, we observed an inhibition of the expression of genes involved in fatty acid and glycogen synthesis. We observed that the key regulators of these metabolisms, SREBP1 and PPARgamma are also under-expressed. Conversely in the HL diet, we observed an overexpression of genes involved in the conversion of the fatty acids into acyl-carnitine, step required for going into the mitochondria to be β -oxidized. Genes involved in the immune response were also over-expressed, which could be partially due to the inhibition of PPARgamma and PPARdelta expressions. More surprisingly we observed variations in the expression of genes involved in the iron and oxygen metabolisms. These results show the central role of the liver in the adaptation (in terms of performances) of birds to face variations in dietary energy sources.

INTRODUCTION

Le coût de production dû à l'alimentation d'un poulet de chair ou d'un porc est de 60%. Aussi, dans un contexte de hausse des prix des matières premières de l'alimentation animale (en partie dû à la compétition entre alimentation humaine et alimentation animale), il est nécessaire d'intégrer des matières premières moins conventionnelles dans les aliments des monogastriques. Les coproduits à bas coût de l'industrie agro-alimentaire généralement riches en fibres sont une alternative. Cependant, les fibres sont mal dégradées le long du tractus digestif. Un régime riche en fibres requiert donc l'addition d'une source énergétique comme les graisses afin d'améliorer la valeur énergétique de l'aliment et ainsi l'efficacité alimentaire de l'animal. Plusieurs travaux conduits sur des espèces monogastriques ont étudié l'impact sur les performances de croissance et la composition corporelle des animaux, des variations de composition de différents régimes, en particulier de régimes riches en fibres et en lipides versus des régimes standards riches en amidon (Plavnik et al., 1997, Malheiros et al., 2004, Montagne et al., 2014). Les effets décrits sont variables d'une étude à l'autre, dépendant de différents facteurs comme la source d'énergie utilisée ou le génotype et restent donc difficiles à prédire.

Cette étude a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes biologiques impactés par une variation de composition de régimes plus ou moins riches en graisses et en fibres *via* l'analyse des transcriptomes de différents tissus métaboliques. Pour cela, des poulets de chair issus de lignées divergentes grasse et maigre (Leclercq, 1988) ont été nourris avec des régimes isoénergétiques et isoprotéiques présentant des teneurs contrastées en lipides et amidon. Les travaux de Baéza et al. (2015) montrent que la variation de composition de régimes n'a pas d'effet significatif sur les performances de croissance et sur la composition corporelle à 63 jours, et ce quelle que soit la lignée. Considérant l'hypothèse que des événements de régulation génique au niveau des ARNm pourraient être en partie responsables de cette adaptation, nous proposons dans cette étude d'analyser la contribution des transcriptomes de trois tissus métaboliques dans l'adaptation observée des poulets de chair face aux variations de régimes alimentaires imposés. Les trois tissus ont été choisis pour leur rôle complémentaire dans l'homéostasie énergétique. Il s'agit du foie, organe clef de la régulation et distribution pour l'organisme des substrats énergétiques, le tissu adipeux abdominal, lieu de stockage privilégié des lipides corporels et le muscle, tissu utilisateur de l'énergie.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et régimes alimentaires

Des poulets mâles des lignées divergentes maigre (notée M, n = 60) et grasse (notée G, n = 60) ont été soumis à un même régime de démarrage (2900 kcal EM/kg et 210 g PB/kg) de l'éclosion jusqu'à l'âge de 21 jours (Pôle Expérimental Avicole de Tours, INRA, Nouzilly, France). A cet âge, 24 poulets de chaque lignée choisis avec un poids vif équivalent ont été placés en cages individuelles et nourris pendant 6 semaines avec un des deux régimes alimentaires qui suit : ces deux régimes isoénergétiques (3000 kcal EM/kg) et isoprotéiques (190 g PB/kg) sont caractérisés par des teneurs en lipides soit élevées (8%, noté HL), soit faibles (2%, noté LL) avec une composition en acides gras équivalente. Plus précisément, le régime HL contenait plus d'huile végétale mais aussi plus de cellulose (6,4% vs 2,1%), tandis que le régime LL contenait plus d'amidon de blé (51,4% vs 37,9%). A 63 jours, 12 poulets par lignée et par régime ont été mis à jeun pendant 12 h puis réalimentés pendant 3 h avant leur mise à mort de manière à s'assurer d'un état physiologique postprandial. Le foie, le tissu adipeux abdominal et le muscle *Sartorius* de la cuisse ont été prélevés, immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

1.2. Obtention des transcriptomes tissulaires

Les ARN totaux ont été extraits des trois tissus par un protocole classique à base de TRIzol® (Invitrogen). Les ARNs ont été quantifiés par spectrophotométrie (NanoDrop®) et leur qualité a été vérifiée à l'aide du Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technology ; kit RNA 6000 Nano Assay). Le transcriptome de chaque tissu a été obtenu après marquage des ARN par le fluorochrome Cy3 (Low Input Quick Amp Labeling kit, Agilent), puis hybridation des ARN marqués à une puce d'oligonucléotides (dessinée « à façon » à l'aide de eArray, Agilent). Les puces hybridées ont été alors numérisées par le scanner Agilent G2505B. Les données brutes ont ensuite été prétraitées afin de les rendre comparables (passage en log₂, normalisation). La puce contient 61350 sondes représentant les 16736 gènes de poule référencés dans Ensembl à la date de création de la puce (version V70 de Janvier 2013). Le nombre moyen de sondes par gène est de 4 avec un minimum de 1 (4464 gènes concernés), une médiane de 4 et un maximum de 30. Les expressions différentielles entre régimes d'une centaine de gènes ont été vérifiées avec une autre technologie, la PCR quantitative moyen débit (Fluidigm - Plateforme Get-plage de Toulouse).

1.3. Analyses statistiques

Les effets de la lignée, du régime alimentaire et de l'interaction entre lignée et génotype ont été testés pour chaque gène par une analyse de variance (ANOVA). La probabilité *p* associée à chaque test a ensuite été corrigée par la méthode de Benjamini-Hochberg pour tenir compte des tests multiples (plus de 40000 variables correspondant aux sondes exprimées dans chaque tissu). Une sonde ou un gène est alors considéré/e comme significativement différentiellement exprimé/e (DE) pour un facteur si la probabilité critique *P* corrigée est inférieure à 5% et la différence d'expression supérieure à 20%.

1.4. Interprétation biologique des gènes DE

Plusieurs méthodes complémentaires ont été utilisées : 1) L'analyse en composantes principales (ACP) pour hiérarchiser les variables/gènes DE contribuant le plus fortement aux différences transcriptomiques entre régimes, 2) l'analyse de termes fonctionnels standardisés (ontologie *Gene Ontology*) afin d'identifier si certaines voies biologiques sont enrichies dans la liste des gènes DE comparé à l'ensemble des gènes exprimés, 3) la recherche systématique de gènes régulateurs *via* l'analyse de l'ontologie génique ou encore *via* un outil que nous avons développé et qui est fondé sur l'analyse d'un graphe de causalités construit à partir de la base de connaissance Transpath (Blavy et al., 2014) et enfin 4) la recherche de réseaux géniques associés à ces régulateurs *via* l'outil *Ingenuity Pathway Analysis*.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Nombre de gènes exprimés par tissu

Sont exprimés dans au moins un des trois tissus étudiés 13907 gènes, soit 83% des 16736 gènes référencés chez la poule, et 10870 sont exprimés dans les 3 tissus, soit 65% des gènes référencés. Plus précisément 12254, 12484 et 12442 gènes sont respectivement exprimés dans le foie, le tissu adipeux et le muscle, parmi lesquels très peu sont tissu-spécifiques : 402, 256 et 356 sont respectivement spécifiques du foie, du tissu adipeux et du muscle.

Seul le foie présente des gènes différentiellement exprimés (DE) entre régimes.

Un effet significatif du génotype est observé dans les différents tissus avec respectivement 3456, 6534, et 3223 gènes DE dans le foie, le tissu adipeux et le muscle. Ces gènes DE entre lignées ne seront pas commentés dans cette étude. De façon intéressante, seul le foie présente des gènes DE entre régimes, et ce quelle que soit la lignée, avec 466 gènes DE (1020 sondes) sur 12254 gènes exprimés dont 298 réprimés

et 168 activés dans le régime HL comparé au régime standard.

Les deux lots d'animaux soumis aux deux régimes HL et LL sont parfaitement séparés par les deux premières dimensions de l'ACP effectuée avec les 466 gènes DE pour le régime (**Figure 1**). L'observation des 30 gènes les plus corrélés à ces deux axes indique les métabolismes qui semblent être les plus impactés par la variation de régimes ; ils sont indiqués en **Figure 1** et commentés plus loin. L'analyse ontologique des 466 gènes DE montre également que ces mêmes métabolismes sont significativement enrichis dans cette liste DE par rapport à la liste des gènes exprimés, confortant leur importance.

Les métabolismes liés à la synthèse des acides gras (AG) et du glycogène seraient fortement inhibés par le régime HL.

L'expression des gènes impliqués dans la synthèse *de novo* des acides gras (ACACA, FASN, SCD, ...), dans l'activation de ces derniers (ACSL3, ACSL5, ACSL6,...), dans leur élongation (ELOVL3, ELOVL5) et dans leur transport sous forme de triglycérides (AGPAT2, DGAT2, LPIN1, MTTP,...) est inhibée par le régime HL, très riche en lipides comparé au régime standard. Ayant observé des dépôts de graisses similaires dans les tissus des animaux soumis aux deux régimes (Baéza et al, 2015) et sachant que le foie est l'organe majeur de la synthèse des acides gras chez le poulet, ces variations d'expression suggèrent fortement que les poulets soumis au régime HL répriment la synthèse hépatique *de novo* des AG et la sécrétion de ces AG vers les tissus utilisateurs. Ceci est en accord avec la composition hépatique en AG observée par Baéza et al (2015) chez ces mêmes poulets "HL" qui contiennent plus d'AG poly-insaturés, en particulier les AG essentiels C18:2 et C18:3 qui sont d'origines alimentaires, et moins d'AG C16:0, C16:1 et C18:1 qui sont issus de la synthèse *de novo*.

L'expression de gènes impliqués dans la synthèse du glycogène (PGM1, PGM2, UGP2,...) est également réprimée par le régime HL. Ce résultat est cohérent avec ceux de Baéza et al (2015) qui montrent chez les animaux soumis au régime HL un taux moins élevé de glycogène hépatique.

Le système de conversion des AG en acyl-carnitine serait activé par le régime HL.

Nous observons une activation dans le régime HL de l'expression de gènes impliqués dans le système de conversion des AG en acyl-carnitine, conversion indispensable à l'entrée des AG dans la mitochondrie pour y être bêta-oxydés : ces gènes codent les enzymes CPT1, CRAT et la famille des transporteurs SLC22 (SLC22A16, SLC22A4 SLC22A5). A noter que l'expression des gènes codant les enzymes clés de

la bêta-oxydation mitochondriale, tels que EHHADH et HADH, n'est pas affectée, de même que celle du régulateur de la bêta-oxydation, PPARalpha. Comme déjà énoncé par d'autres auteurs (Foster et al., 2004), ceci suggère fortement qu'au niveau transcriptionnel, l'étape de régulation limitante de la bêta-oxydation mitochondriale des AG serait l'étape d'entrée des AG dans la mitochondrie plutôt que les réactions de bêta-oxydation en elles-mêmes. Néanmoins, des régulations post-transcriptionnelles peuvent avoir lieu.

Des gènes de l'inflammation sont activés dans le régime HL.

L'expression des gènes codant plusieurs récepteurs aux interleukines (IL13RA1, IL1R1, IL20RA, IL7R) est activée par le régime HL, suggérant une inflammation du foie suite au régime HL, dont l'importance reste à évaluer. Ces résultats sont confortés par des travaux de plus en plus nombreux montrant des liens entre métabolisme des lipides et inflammation (Yessoufou et Wahli, 2010 ; Khan et al., 2014).

Que peut-on dire des régulateurs de ces métabolismes impactés par le régime ?

Parmi les 466 gènes DE, plus d'une vingtaine sont des facteurs de transcription, représentant des régulateurs potentiels de ces métabolismes. Une analyse des réseaux géniques caractérisant la liste de 466 gènes DE a été alors réalisée à l'aide du logiciel *IPA* qui exploite la littérature. Les deux premiers réseaux géniques significatifs identifiés sont indiqués en **Figure 2**.

Le premier réseau génique concerne les régulateurs SREBP1 et PPARgamma et leurs gènes cibles, tous réprimés dans le régime HL montrant la cohérence des résultats observés (**Figure 2A**). Ainsi, SREBP1 est un des régulateurs clés de la synthèse hépatique *de novo* des acides gras et des triglycérides *via* ses nombreux gènes cibles codant des enzymes de ces métabolismes. Par ailleurs, les acides gras, en particulier les acides gras poly-insaturés inhiberaient l'activité de SREBP1 en bloquant le clivage de son précurseur inactif (Georgiadi et Kersten, 2012), représentant un autre mécanisme d'inhibition de la synthèse des AG par un régime riche en lipides impliquant SREBP1. De même le facteur de transcription PPARgamma est un régulateur majeur de la différenciation adipocytaire, de la lipogénèse et du stockage des acides gras (Yessoufou et Wahli, 2010).

De plus en plus d'études décrivent également les récepteurs nucléaires PPARs, dont PPARgamma et PPARbeta/delta comme ayant un rôle anti-inflammatoire en plus de leur rôle majeur dans le métabolisme des acides gras (Yessoufou et Wahli,

2010). Ces deux récepteurs réprimés dans le régime HL pourraient donc être en partie à l'origine de l'inflammation suggérée par les variations d'expression des récepteurs à certaines interleukines pro-inflammatoires observés dans ce régime HL.

Le second réseau génique significatif proposé par le logiciel *IPA* fait intervenir plusieurs régulateurs HIF1A, CEBPA et BTG2 réprimés dans le régime HL et NFE2L1 activé dans ce régime (**Figure 2B**). Ce réseau complexe met en relation des régulateurs impliqués dans des métabolismes variés et nécessite une étude bibliographique plus approfondie pour en extraire la cohérence. Entre autres, il met en lien des gènes régulant le cycle cellulaire (BTG2), le stress oxydatif, la détoxification mais aussi le métabolisme des lipides (NFE2L1) et enfin le métabolisme du fer et de l'O₂ qui sont étroitement liés (HIF1A en connexion avec les enzymes liées au Fer, HMOX1 et SLC40A1).

Parmi la dizaine de régulateurs ainsi mis en évidence, certains d'entre eux (SREBP1, PPARgamma, PPARbeta/delta et HIF1A) sont également pointés par notre outil fondé sur le parcours de graphe de causalités renforçant leur importance dans la régulation de certains gènes DE en fonction du régime.

CONCLUSION

L'analyse des données transcriptomiques de trois tissus, foie, tissu adipeux abdominal et muscle, de poulets soumis à deux régimes plus ou moins riches en graisses et fibres montre le rôle central du foie dans l'adaptation des poulets face aux variations de sources énergétiques alimentaires. Lorsque le régime alimentaire est riche en lipides, la synthèse hépatique *de novo* des acides gras semble être inhibée alors que la dégradation de ces derniers serait accrue *via* l'activation du transport des acides gras vers la mitochondrie. Les animaux, pour lesquels aucune différence de performances ou de composition corporelle n'a été observée en réponse aux variations de régime, se sont donc adaptés au remplacement de l'amidon par des lipides dans leur alimentation. En revanche, cet afflux de lipides semble entraîner des réactions inflammatoires dans le foie et modifier bien d'autres métabolismes. Ces observations mériteraient des investigations plus poussées afin de mieux les caractériser et de mieux comprendre leur lien avec le métabolisme des lipides.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le personnel de l'INRA, UE1295 PEAT (Nouzilly, France) pour l'élevage des poulets. Ces travaux ont été financés par l'Agence Nationale de la Recherche (Projet FatInteger 2012-2015).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Baéza E., Gondret F., Chartrin P., Le Bihan-Duval E., Berri C., Gabriel I., Narcy A., Lessire M., Métayer-Coustard S., Collin A., Jégou M., Lagarrigue S., Duclos M. J. 2015. La capacité de synthèse et de stockage des lipides par des poulets maigres ou gras n'est pas influencée par la source d'énergie dans l'aliment, *Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours*,
- Blavy P, Gondret F, Lagarrigue S, van Milgen J, Siegel A. 2014. Using a large-scale knowledge database on reactions and regulations to propose key upstream regulators of various sets of molecules participating in cell metabolism. *BMC Syst Biol* 17;8:32
- Foster DW. The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Nov;1033:1-16.
- Georgiadi A, Kersten S. Mechanisms of gene regulation by fatty acids. *Adv Nutr.* 2012 Mar 1;3(2):127-34.
- Khan SA, Ali A, Khan SA, Zahran SA, Damanhoury G, Azhar E, Qadri I. Unraveling the complex relationship triad between lipids, obesity, and inflammation. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:502749.
- Leclercq B., 1988. In: Leclercq, B., and Whitehead, C.C. (Eds) London, Butterworths & Co, Ltd-INRA, pp. 25-40
- Malheiros R.D., V.M. Barbosa Moraes, A. Collin, G.P.J. Janssens, E. Decuypere, J. Buyse. 2004. Dietary macronutrients and performance and plasma hormone and metabolite levels of broiler chickens – fat by carbohydrate substitution. *Arch. Geflügelk.* 68 (2):87-93.
- Montagne, L., F. Loisel, T. Le Naou, F. Gondret, H. Gilbert, and M. Le Gall. 2014. Difference in short-term responses to a high fiber diet in pigs divergently selected on residual feed intake. *J. Anim. Sci.* 92:1512-1523.
- Plavnik, I., E. Wax, D. Sklan, I. Bartov and S.Hurwitz. 1997. The response of broiler chickens and turkey poults to dietary energy supplied either by fat or carbohydrates. *Poult. Sci.* 816 76 :1000-1005.
- Yessoufou A, Wahli W. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Med Wkly.* 2010 Sep 15;140:w13071.

Figure 1. ACP séparant les 48 poulets selon le régime HL et LL.

A gauche et à droite les métabolismes soit enrichis dans la liste des 466 gènes DE (*) soit ayant des gènes associés situés dans le Top30 des gènes les plus corrélés aux deux dimensions (\$). A gauche, les métabolismes associés aux gènes surexprimés chez les HL, à droite ceux associés aux gènes surexprimés chez les LL. FT : facteur de transcription.

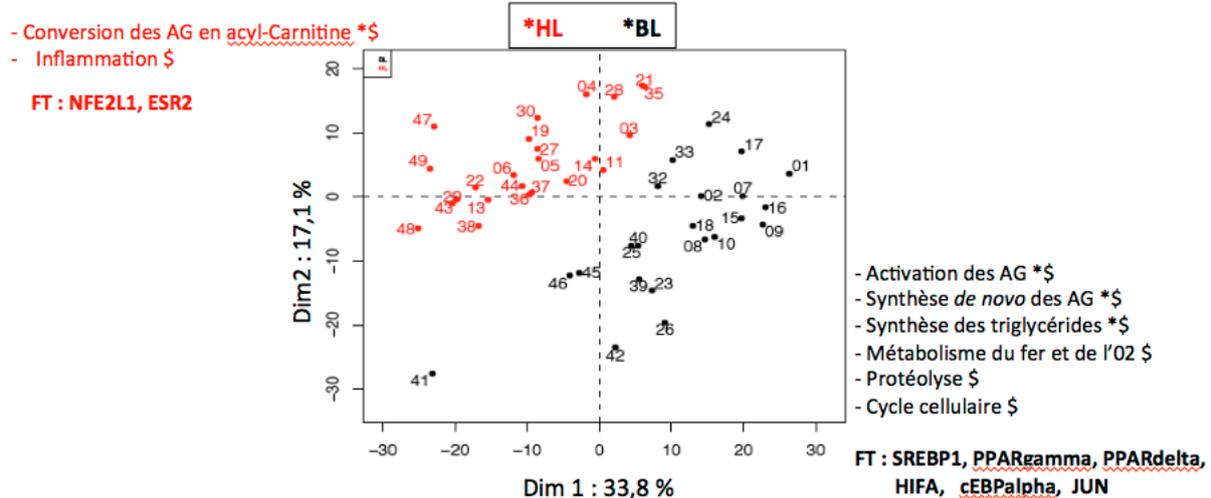


Figure 2. Les deux premiers réseaux de gènes les plus significatifs indiqués par *Ingenuity Pathway Analysis (IPA)*. **A.** Réseau centré sur les régulateurs clefs, SREBP1 et PPARgamma, du métabolisme des lipides. **B.** Réseau faisant intervenir différents facteurs de transcription impliqués dans des métabolismes variés.

