

EXPRESSION DE GENES DANS LE FOIE DE CANARDS NOURRIS AD LIBITUM OU GAVES

Hérault Frédéric¹, Houée-Bigot Magalie², Baéza Elisabeth³, Bouchez Olivier^{4,5}, Esquerré Diane^{4,5}, Klopp Christophe^{6,7}, Diot Christian¹

¹UMR PEGASE - INRA-Agrocampus Ouest -3590 SAINT-GILLES,

²MATHEMATIQUES APPLIQUEES - Agrocampus Ouest - 35042 RENNES

³URA - INRA - 37380 NOUZILLY

⁴UMR GENPhySE - INRA - 31326 CASTANET TOLOSAN

⁵GeT PlaGE - GenoToul - 31326 CASTANET TOLOSAN

⁶Bioinfo - GenoToul - 31326 CASTANET TOLOSAN

⁷SIGENAE - INRA - 31326 CASTANET TOLOSAN

Christian.diot@inra.fr

RÉSUMÉ

L'analyse des transcriptomes de foies de canards de différents types génétiques, nourris *ad libitum* ou gavés et présentant des aptitudes différentes à la production de foie gras, a été conduite afin de mettre en évidence les gènes présentant des différences d'expression et ainsi mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de la stéatose hépatique.

Des ARN ont donc été extraits de foies provenant de canards communs, de Barbarie et de leurs hybrides réciproques mulards et hinnies, gavés ou non. Ces ARN ont été séquencés à haut débit et l'analyse des données d'expression a été réalisée. Des analyses par classification hiérarchique ou en composantes principales montrent que le premier regroupement des individus se fait en fonction du régime alimentaire, les différences entre types génétiques n'intervenant qu'ensuite. Les canards de Barbarie nourris *ad libitum* sont cependant plus proches des canards de Barbarie gavés que des autres canards nourris *ad libitum*. Parmi tous les groupes constitués, celui des canards Pékin gavés est le plus hétérogène. Par contre, et pour chacun des deux régimes, les canards mulards et hinnies ne peuvent pas être distingués. De nombreux gènes présentent des différences d'expression selon le régime alimentaire, gènes impliqués dans diverses voies métaboliques plus ou moins attendues comme le catabolisme des sucres, la lipogenèse ou le cycle cellulaire, l'immunité et la réponse inflammatoire. Enfin, ces processus d'annotation fonctionnelle permettent aussi de distinguer des fonctions discriminant les réponses au gavage des différents types génétiques.

Au final, ce projet permet d'améliorer la connaissance des fonctions mises en œuvre lors du gavage et impliquées dans le développement de la stéatose hépatique dans quatre types génétiques de canards.

ABSTRACT

Gene expression in the liver of ducks *ad libitum* fed or overfed

Transcriptome analyses have been conducted on RNAs extracted from the livers of ducks, *ad libitum* fed or overfed and presenting different susceptibility to fatty liver production, in order to identify genes with differences in expression and thus to better describe mechanisms involved in hepatic steatosis.

RNAs have been extracted from the liver of "pure species", Pekin and Muscovy ducks, and of their reciprocal hybrids, mule and hinny. RNAs have been sequenced and sequencing data have been analyzed. Hierarchic clustering and principal component analyses indicate that differences between individuals lie primarily in feeding effect, differences between genotypes being less important. However, Muscovy ducks *ad libitum* fed and overfed are clustered together. Interestingly, hinny and mule ducks are clustered together according to feeding. Many genes with differences in expression between overfed and *ad libitum* fed have been identified. Analyses of functional annotations associated to these differential genes highlight some expected functions (carbohydrate and lipid metabolisms) but also some unexpected ones (cell proliferation and immunity). These analyses also allow to evidence differences in response to overfeeding between the different genotypes.

Finally, these RNA sequence analyses help to better characterize functions involved in hepatic steatosis in ducks.

INTRODUCTION

Les canards sont des espèces de rente importantes en France, notamment au regard de la production du foie gras qui représente plus de 75 % du total mondial. En fait, 95% du foie gras produit provient de mâles mulards gavés, hybrides résultant du croisement inter-générique entre des femelles communes (*Anas platyrhynchos*), par exemple de type Pékin, et des mâles Barbarie (*Cairina moschata*). Il convient de préciser qu'à l'inverse, le hinny n'est pas utilisé pour la production de foie gras. Cela est essentiellement dû à une efficacité de procréation de canetons hinny bien moindre. Aussi, très peu de travaux se sont intéressés à la production de foie gras chez le hinny.

La sélection directe de caractères d'intérêt chez le canard mulard est coûteuse puisque nécessitant la procréation des canetons, leur gavage et abattage. Certaines mesures de qualité des foies (notamment, l'évaluation du rendement technologique à la cuisson) sont destructrices. De plus, les mulards sont stériles : la sélection doit donc se faire sur les deux parents, de genres différents. Par conséquent, la filière est très demandeuse de prédicteurs précoces, marqueurs ou gènes, chez les espèces parentales expliquant une part de la variabilité des caractères exprimés chez le canard mulard. La connaissance et la maîtrise génétique des mécanismes mis en œuvre lors de la stéatose hépatique est donc nécessaire. Quelques travaux ont ainsi été entrepris pour améliorer ces connaissances chez le canard : estimation des paramètres génétiques relatifs à l'aptitude au gavage et à la qualité et composition des foies gras (Marie-Etancelin et al., 2011), recherche de QTL (Kileh-Wais et al., 2013), séquençage d'ARN à moyen débit (Pitel et al., 2010) et expression de quelques gènes ou protéines candidats (Hérault et al., 2010 ; Molette et al., 2012 ; Tavernier et al., 2016).

Le présent projet vise à compléter les résultats obtenus, par séquençage à haut débit des ARNs (RNA-Seq) de foies de canards Pékin et de Barbarie et de leurs hybrides réciproques, mulard et hinny, tous nourris *ad libitum* ou gavés. Son objectif majeur est d'analyser l'ensemble du transcriptome hépatique de ces canards afin de mettre en évidence des différences d'expression entre types génétiques et/ou statuts nutritionnels et ainsi mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de la stéatose hépatique.

Au final, ce projet devrait améliorer la connaissance des fonctions et métabolismes impliqués dans le développement de la stéatose hépatique chez les canards.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Dispositif expérimental et séquençages

Quatre-vingt échantillons de foies de canards de 4 types génétiques différents (Pékin, Barbarie, mulard et hinny), gavés ou non (Chartrin et al., 2006), soit 10 échantillons par condition, ont été utilisés dans cette étude. Les ARNs totaux ont été extraits de ces échantillons selon le protocole déjà décrit (Hérault et al., 2008) à l'aide de kits NucleoSpin® RNA L (Macherey–Nagel EURL).

La préparation des banques à partir des ARNs totaux et les séquençages « paired-ends » en multiplex de 6 ont été réalisés à la plateforme Génome et Transcriptome - PlaGe de la Génopole Toulousaine (<http://get.genotoul.fr>) avec la technologie HiSeq 2000 et à l'aide du kit TruSeq v3 (Illumina), nécessitant 14 lignes de séquençage.

1.2. Analyses des données

Le prétraitement des données de séquençage a été réalisé par l'équipe Sigene (INRA Toulouse). Celui-ci a consisté en un nettoyage des séquences, leur alignement sur le génome de référence *Anas platyrhynchos*, la détermination des transcrits et des gènes correspondants et au comptage des séquences correspondant à chacun de ces gènes.

Ces données de comptage, directement proportionnelles aux niveaux d'expression des gènes, ont alors été analysées dans l'environnement R. Elles ont tout d'abord été normalisées pour s'affranchir au mieux des différences artefactuelles.

Des analyses en composantes principales (ACP) et en classification ascendante hiérarchique (CAH) ont ensuite été réalisées pour comparer les échantillons sur la base de l'expression des gènes.

Des analyses ont également été conduites à l'aide du module (package) edgeR (Empirical Analysis of Digital Gene Expression Data in R, Robinson et al., 2010) afin d'identifier les gènes présentant des différences d'expression entre les différentes conditions expérimentales (types génétiques et modalités d'alimentation).

Enfin, les fonctions associées à ces gènes différenciellement exprimés ont été déterminées à l'aide de DAVID (Huang et al., 2009), outil permettant de mesurer l'enrichissement des fonctions associées à des listes de gènes différentiels par rapport aux fonctions représentées par l'ensemble des gènes présents dans le génome.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Environ 60 millions de séquences ont été obtenues par échantillon, soit un total de 4,8 milliards, attestant de la véracité de l'assertion « haut-débit » associée à ces nouvelles méthodes de séquençage.

Ces nombreuses séquences ont été assemblées sur le génome en 23059 gènes et 40551 transcrits différents. Pour chacun de ces gènes, le nombre de séquences alignées a été déterminé par échantillon et traité comme valeur d'expression des différents gènes.

Ces données d'expression ont été traitées par ACP et CAH pour comparer les différents individus. La première dimension de l'ACP discrimine les individus en fonction du régime alimentaire, les différences entre types génétiques n'intervenant qu'ensuite (figure 1A). Des résultats tout à fait similaires sont obtenus après CAH (figure 1B). Les canards de Barbarie nourris *ad libitum* sont cependant plus proches des canards de Barbarie gavés que des autres canards nourris *ad libitum*. Parmi tous les groupes constitués, celui des canards Pékin gavés est le plus hétérogène. Par contre, et pour chacune des deux modalités d'alimentation, les canards mulards et hinnies ne peuvent pas être distingués.

Pour chaque type génétique, les gènes présentant des différences d'expression significatives et supérieures ou égales à 2 entre animaux gavés et nourris *ad libitum* ont été identifiés (2233, 2144, 2545, 2238, respectivement chez les Pékin, Barbarie, mulards et hinnies). Après ACP et CAH sur la base des gènes présentant des différences d'expression *ad libitum*/gavés, les mêmes groupes sont constitués, les canards de Barbarie constituant néanmoins deux groupes bien distincts.

L'analyse de ces gènes différenciellement exprimés avec DAVID (<https://david-d.ncifcrf.gov/>) montrent que, comme attendu, les processus biologiques associés aux métabolismes des lipides et des sucres

sont significativement (après correction par la procédure Benjamini-Hochberg) enrichis (figure 2). De manière plus surprenante, les processus associés au cycle cellulaire, à l'organisation de la matrice extracellulaire, la coagulation et la réponse immunitaire sont également enrichis.

Enfin, lorsque les niveaux d'expression de ces gènes sont comparés entre types génétiques, il apparaît quelques fonctions plus ou moins enrichies, indiquant quelques différences qualitatives (différents gènes) et quantitatives (différence d'amplitude) de réponse au gavage entre types génétiques.

CONCLUSION

Ces travaux permettent de mieux caractériser les réponses au gavage de différents types génétiques et d'identifier des fonctions et métabolismes susceptibles de jouer un rôle important dans ces réponses.

Au-delà de leur portée cognitive, tout à fait intéressante, ces résultats pourraient aussi constituer les premiers jalons d'une sélection précoce, chez les parents du mulard, de canards gras présentant des caractères intéressants la profession en identifiant des gènes présentant des niveaux d'expression différents entre types génétiques et corrélés à leur production de foie gras.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chartrin P., Bernadet M., Guy G., Mourot J., Hocquette J., Rideau N., Duclos M.J., Baéza E, 2006. Comp. Biochem. Physiol. A, (145), 390-396.
- Héroult F., Robert E., Diot C., 2008. Anim. Genet., (39), 325-327.
- Héroult F., Saez G., Robert E., Al Mohammad A., Davail S., Chartrin P., Baéza E., Diot C., 2010. Anim. Genet., (41), 12-20.
- Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A., 2009. Nucleic Acids Res (37), 1-13.
- Kileh-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., 2013. J. Anim. Sci. (91), 588-604.
- 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., 2011. J. Anim. Sci., (89), 669-679.
- Molette C., Théron L., Marty-Gasset N., Fernandez X., Rémignon H., 2012. J. Proteomics (75), 4290-4295.
- Pitel F., Leroux S., Fève K., Vignoles F., Duby C., Bernadet M.D., Marie-Etancelin C., Basso B., Klopp C., Vignal A., Diot C., 2010. 9èmes Journées de la Recherche Filière Palmipèdes à Foie Gras, Bordeaux, France, 07-08 octobre 2010.
- Robinson M.D., McCarthy D.J. and Smyth G.K. 2010. Bioinformatics (26), 1.
- Tavernier A., Davail S., Ricaud K., Bernadet M.D., Gontier K., 2016. Mol. Cell. Biochem., Epub ahead of print

Figure 1. Regroupement des individus par ACP (A) et CHA (B).
 Bleu : Pékin ; vert : Barbarie ; rouge : mulard ; gris : hinny ;
 Couleurs claires : ad libitum ; foncées : gavé.

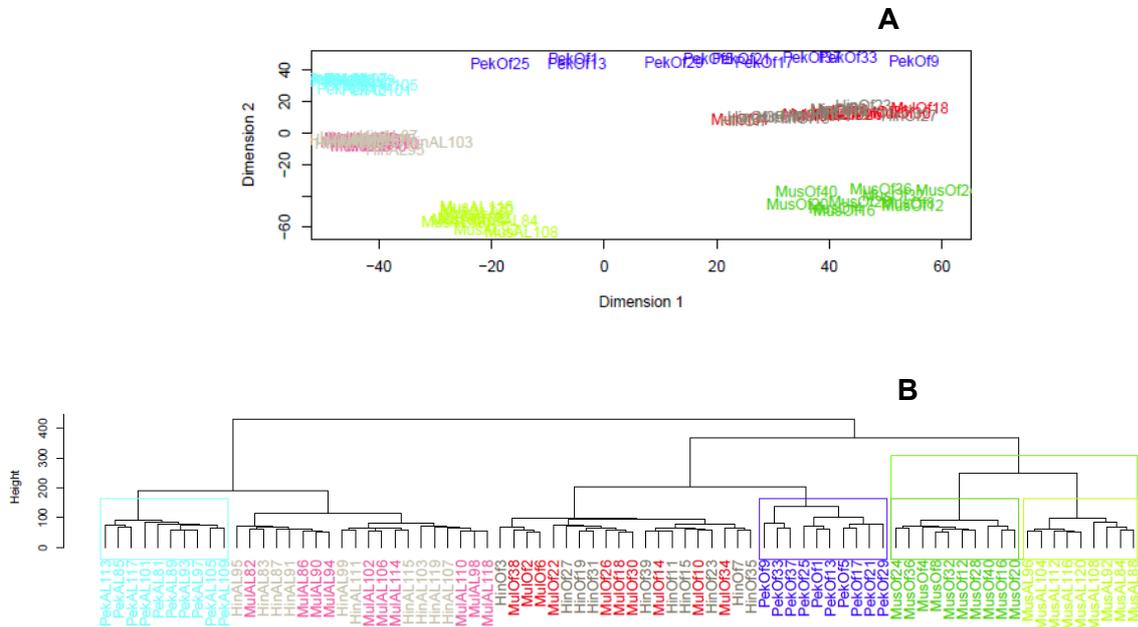


Figure 2. Enrichissement en processus biologiques en réponse au gavage.
 Les valeurs en ordonnée correspondent aux taux d'enrichissement des clusters et processus biologiques (GO)
 calculés par DAVID.
 Ap : Pékin ; Cm : Barbarie ; hi : hinny ; mu : mulard.

