

EXPRESSION ET ONTOGENESE DES TRANSPORTEURS DE GLUCOSE *SLC2A-1*, -8 ET -12 DANS DIFFERENTS MUSCLES DE POULET

Coudert Edouard¹, Crochet Sabine¹, Cailleau-Audouin Estelle¹, Bordeau Thierry¹,
Collin Anne¹, Berri Cécile¹, Tesseraud Sophie¹, Métayer-Coustard Sonia¹

¹INRA, UR83 Unité de Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly

Sonia.Metayer@tours.inra.fr

RÉSUMÉ

Le poulet présente de nombreuses particularités au niveau de son métabolisme glucidique, notamment une forte glycémie et une relative insensibilité à l'insuline exogène. L'homéostasie du métabolisme glucidique est dépendante du transport de glucose à l'intérieur des cellules, étape limitante régulée par des transporteurs de glucose GLUTs (codés par les gènes de la famille *SLC2A**) chez les mammifères. A ce jour, les transporteurs GLUT-1, -8 et -12 ont été décrits au niveau musculaire chez le poulet mais pas complètement caractérisés. Le but de cette étude est d'étudier l'ontogénèse et les profils d'expression par PCR en temps réel de ces trois transporteurs de glucose au sein de différents muscles de poulet. Des prélèvements sur les muscles *Pectoralis major* et *Sartorius* à 12 et 19 jours pendant l'embryogénèse, à l'éclosion et 5 jours après ont été réalisés pour caractériser l'embryogénèse des transporteurs GLUTs. Pour caractériser l'expression des GLUTs en fonction des types de muscles, d'autres muscles de types métaboliques et contractiles contrastés ont aussi été prélevés sur des poulets âgés de 9 semaines. Les 3 transporteurs de glucose présentent des profils d'expression différents en fonction de l'âge et du muscle. Dans le muscle *Pectoralis major*, *SLC2A-1* est fortement exprimé au début de l'embryogénèse puis 5 jours après l'éclosion, *SLC2A-8* est fortement exprimé à l'éclosion, tandis que l'expression de *SLC2A-12* augmente pendant l'embryogénèse jusqu'à 5 jours après l'éclosion. Dans le muscle *Sartorius*, les niveaux d'expression de *SLC2A-1* et *SLC2A-8* restent inchangés pendant cette période. L'expression de ces trois transporteurs à 9 semaines est également fortement dépendante du type de muscle. Ainsi, *SLC2A-1* et *SLC2A-8* sont majoritairement exprimés dans les muscles lents oxydatifs ou mixtes, alors que *SLC2A-12* est plus exprimé dans le muscle rapide glycolytique *Pectoralis major*. Cette étude montre des différences d'expressions spatio-temporelles pour 3 transporteurs de glucose chez le poulet et met en avant la complexité des régulations du métabolisme glucidique chez cette espèce.

ABSTRACT

Expression and ontogenesis of glucose transporters *SLC2A-1*, -8 and -12 in different chicken muscles

Some peculiarities have been found about chicken's glucose metabolism, notably a high glycaemia and a relative insensitivity to exogenous insulin. In mammals, glucose transport, which is known to be the limiting step of cell glucose metabolism, is regulated by the glucose transporters GLUTs (coded by the *SLC2A** genes). Only GLUT-1, -8 and -12 have been described in chicken muscles but they are not fully characterized yet. The aim of this study is to determine the ontogenesis and differences in expression patterns of these transporters by qRT-PCR in different chicken muscles.

Ontogenesis study has been conducted on *Pectoralis major* and *Sartorius* muscles removed at 12 and 19 days of embryogenesis, at hatch and 5 days post-hatch. To add information about the relationships between muscle types and glucose transporter expression levels, other muscles have been also removed from 9-weeks old chickens. The 3 glucose transporters showed different age-related expression patterns. In *Pectoralis major*, *SLC2A-1* was more expressed during early stage of embryogenesis and 5 days post-hatch, *SLC2A-8* expression level was particularly high at hatching day, and *SLC2A-12* expression was increased during embryogenesis to 5 days post-hatch. In *Sartorius*, expression levels of *SLC2A-1* and *SLC2A-8* did not change during this period. Expression levels of glucose transporters also differed according to muscle type at 9 weeks of age. *SLC2A-1* and *SLC2A-8* were highly expressed in slow oxidative muscles and mixed type muscles, whereas *SLC2A-12* was strongly expressed in the pure fast glycolytic muscle *Pectoralis major*. This study shows different spatio-temporal expression patterns of glucose transporters in chicken and further illustrates the complexity of energy regulation in an avian species.

INTRODUCTION

La croissance musculaire, la différenciation des tissus ou les mécanismes de défense contre les pathogènes sont autant de processus biologiques directement dépendants de l'apport en énergie intracellulaire. Le glucose est une des principales sources énergétiques disponibles pour l'animal mais les mécanismes conduisant à son utilisation par les tissus périphériques restent encore largement méconnus chez les oiseaux. Le poulet présente de nombreuses particularités par rapport aux mammifères quant à son métabolisme glucidique, notamment une forte glycémie et une relative insensibilité à l'insuline exogène (Simon 1989, Akiba *et al.* 1999, Braun and Sweazea 2008). L'homéostasie du métabolisme glucidique est dépendante du transport de glucose à l'intérieur des cellules. Chez les mammifères, cette étape limitante est régulée par des transporteurs de glucose GLUTs (codés par les gènes de la famille *SLC2A**). Ils peuvent être constitutifs, comme GLUT-1, ou doivent être recrutés des compartiments endosomiques vers la membrane suite à une stimulation par l'insuline (GLUT-4, -8 et -12). Chez les mammifères, le génome code 12 protéines GLUT-1 à GLUT-12 présentant une forte homologie de séquences. GLUT-4 est le principal transporteur de glucose dans les muscles, tissus sensibles à l'insuline. A ce jour, 10 séquences codant différents transporteurs de glucose ont été trouvées dans le génome de poulet mais aucune ne code un transporteur GLUT-4. Seuls les transporteurs de glucose GLUT-1, -2, -3, -8, -9 et -12 ont été partiellement décrits chez le poulet (Seki *et al.* 2003, Kono *et al.* 2005, Zhao *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2013, Coudert *et al.* 2013). GLUT-1, -8 et -12 sont les principaux transporteurs décrits au niveau du muscle. Le but de cette étude est de caractériser l'expression de ces trois transporteurs de glucose majeurs au niveau musculaire chez le poulet au cours du développement embryonnaire, période critique pour le développement des oiseaux et leur bon démarrage en élevage. Nous avons également caractérisé l'expression de ces transporteurs de glucose dans des muscles présentant des types métaboliques différents.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Dispositif expérimental et prélèvements

1.1.1. Ontogenèse

Les muscles *Pectoralis major* et *Sartorius* ont été prélevés sur des embryons à 12 et 19 jours d'incubation (E12 et E19) dans des conditions contrôlées (37.8 °C, 56% HR), puis sur des poussins (Cobb500) à l'éclosion (J0) et à 5 jours post-éclosion (J5). Les différents muscles prélevés ont été congelés rapidement dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C.

1.1.2. Différents types de muscles

Différents types de muscles ont été prélevés [*Pectoralis major*, *Posterior Latissimus Dorsi* (PLD), *Ilio tibialis*, *Sartorius*, *Adductor profundus* (ADP), *Anterior Latissimus Dorsi* (ALD)] sur des poulets de chair expérimentaux âgés de 9 semaines. Les tissus ainsi collectés ont été rapidement congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

1.2. Extraction des ARN et qRT-PCR

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 100 mg de tissus avec le réactif RNA Now (Biogentec, Seabrook, TX, USA) selon les recommandations du fournisseur. Un traitement à la DNase (Ambion, Clinisciences, Montrouge, France) a ensuite été réalisé puis les ARN totaux ont été transcrits en utilisant la SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et des amorces au hasard (Random Primers ; Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Des amorces spécifiques codant pour les gènes *SLC2A1*, *SLC2A8*, *SLC2A12*, le cytochrome b (Cyt b), la TBP (TATA Box Binding Protein) et le facteur EIF3F ont été désignées à partir du génome de poulet et validées par séquençage des fragments obtenus.

Les expressions des différents gènes ont été mesurées par qPCR avec un LightCycler 480 II (Roche, Meylan, France) sur les différents échantillons collectés. Le cytochrome b (Cyt b), la TBP (TATA Box Binding Protein) et le facteur EIF3F ont été choisis comme gènes de référence pour les différentes analyses, dans la mesure où leurs niveaux d'expression est stable au cours du développement et entre les différents muscles.

1.3. Analyse statistique

Les valeurs sont présentées sous la forme moyenne \pm SEM. Les données ont été analysées avec Statview (version 5, SAS Institute, Cary, NC, USA). Pour l'étude d'ontogenèse, une analyse de variance avec pour effet principal le stade de développement associée à un test de Fisher, a été réalisée pour détecter les différences significatives entre les groupes. Pour l'étude typologique, l'analyse de variance a été réalisée avec le type de muscle comme effet principal. Le seuil de significativité a été fixé à $P < 0.05$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les trois transporteurs de glucose *SLC2A-1*, *-8* et *-12* sont exprimés au cours du développement embryonnaire dans le muscle chez l'oiseau. Chacun présente un profil d'expression qui lui est propre au cours du temps. Ce profil d'expression peut être identique entre deux muscles présentant des caractéristiques métaboliques différentes (ex : *SLC2A-12*) ou être différent d'un muscle à l'autre (ex : *SLC2A-1* et *SLC2A-8*).

Ainsi, l'expression du gène *SLC2A-12* augmente significativement dans le muscle de poulet au cours du développement embryonnaire et ceci dans les deux types de muscles : le *Pectoralis major* ($P < 0.0001$) et le *Sartorius* ($P = 0.003$). Cette augmentation n'est pas linéaire dans le temps, un premier pallier est observé entre E12 et entre E19 puis après l'éclosion entre J0 et J5. L'expression à J5 est alors environ 4 fois plus importante qu'à E12.

Le transporteur de glucose *SLC2A-1* est également exprimé dans les deux types de muscles étudiés, mais présente des profils d'évolution différents entre muscles. Dans le *Pectoralis major*, l'expression de *SLC2A-1* est forte à E12, diminue de moitié au cours du développement embryonnaire entre E12 et E19, reste au même niveau jusqu'à J0 puis ré-augmente d'un facteur 2 à J5 ($P < 0.0001$). Dans le *Sartorius*, aucune évolution significative des niveaux d'expression de *SLC2A-1* n'a été observée.

Le transporteur de glucose *SLC2A-8* présente également des profils d'expression différents au cours du développement et de la croissance entre muscles. Dans le *Pectoralis major*, *SLC2A-8* présente un pic d'expression le jour de l'éclosion (J0) ($P < 0.0001$). Les niveaux d'expression de *SLC2A-8* ne varient pas dans le *Sartorius*.

Les résultats observés chez le poulet sont comparables à ceux rapportés chez les mammifères avec une forte expression du transporteur constitutif *SLC2A-1* au cours de l'embryogénèse, et une augmentation progressive de l'expression des transporteurs insulino-sensibles comme *SLC2A-12* chez l'oiseau et *SLC2A-4* chez les mammifères (Santalucia *et al.*, 1992 ; Macheda *et al.*, 2002). Chez l'oiseau, ces profils d'expression sont certainement en relation avec la nature du substrat énergétique utilisé dans l'œuf (acides gras) ou après l'éclosion (glucose), mais aussi avec les besoins du jeune oiseau qui doit reconstituer son stock de glycogène musculaire fortement sollicité lors de l'éclosion. D'ailleurs, à J5, nous avons montré une expression plus forte du transporteur insulino-sensible *SLC2A-12* dans le *Pectoralis major*, principal muscle impliqué dans le stockage du glucose sous forme de glycogène, par rapport au *Sartorius*. Le jour de l'éclosion, la forte expression de *SLC2A-8*, décrit comme insulino-sensible dans certains modèles de mammifères (blastocystes), pourrait également suppléer le *SLC2A12* devant la forte demande d'énergie.

Nous avons également caractérisé l'expression de ces trois mêmes transporteurs de glucose sur un panel

plus large de différents muscles provenant d'animaux âgés de 9 semaines. Les muscles choisis recouvrent 4 grands types de caractéristiques contractiles et métaboliques : les muscles rapides glycolytiques (*Pectoralis major* et *PLD*), un muscle rapide oxydo-glycolytique (*Ilio tibialis*), des muscles mixtes oxydo-glycolytiques (*Sartorius* et *ADP*) et des muscles lents oxydatifs (*Anterior Latissimus Dorsi*, *ALD*). Ces muscles proviennent de localisations différentes (ailes, pattes, pectoral) et peuvent présenter des fonctions physiologiques différentes (ex: mouvement ou posture ...).

SLC2A-1 est plus exprimé dans le muscle *ALD* (lent oxydatif), puis dans les muscles *Sartorius* et *ADP* (mixtes oxydo-glycolytiques), et enfin dans *Ilio tibialis*, le *PLD* et le *Pectoralis major* ($P < 0.0001$). L'expression de *SLC2A-1* est ainsi 3 fois plus forte dans le muscle *ALD* en comparaison avec les muscles purement glycolytiques *Pectoralis major* et *PLD*. L'expression de *SLC2A-8* suit un profil d'expression similaire à celui de *SLC2A-1* : plus exprimé dans les muscles de type oxydatif que dans des muscles de type glycolytique. Au contraire, l'expression de *SLC2A-12* est significativement plus faible dans le muscle *ALD* par rapport au *Pectoralis major*, *Ilio tibialis* ou encore le *Sartorius* ($P < 0.0001$). L'observation d'une plus forte expression de *SLC2A-12* dans le *Pectoralis major* serait à relier à son caractère insulino-sensible ; ce muscle a en effet pour rôle principal de stocker le glucose sous forme de glycogène suite à un repas ou à une stimulation insulinique. *SLC2A-12* présente également la particularité d'être différentiellement exprimé entre deux muscles de type métabolique identique mais qui présentent des fonctions physiologiques complètement différentes (stockage de glucose sous forme de glycogène pour le *Pectoralis major* ou fonction de mouvement pour le *PLD*).

CONCLUSION

Les transporteurs de glucose *SLC2A-1*, -8 et -12 sont exprimés différemment chez le poulet, que ce soit au cours de son embryogénèse ou entre différents muscles squelettiques. Cette étude montre des expressions spatio-temporelles différentes des trois transporteurs de glucose chez le poulet et met en avant la complexité des régulations du métabolisme glucidique chez cet oiseau.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Akiba Y., Chida Y., Takahashi T., Ohtomo Y., Sato K., Takahashi K., 1999, Br. Poult. Sci., (40), 701-705
2. Braun EJ., Sweazea KJ., 2008, Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol., (151), 1-9
3. Coudert E., Dupont J., Simon J., Cailleau-Audouin E., Crochet S., Duclos MJ., Tesseraud S., Métayer-Coustard
4. S., 2013, in : Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production, p391
5. Kono T., Nishida M., Nishiki Y., Seki Y., Sato K., Akiba Y., 2003, Br. Poult. Sci., (46), 510-515
6. Macheda ML., Kelly DJ., Best JD., Rogers S., 2002, Anat. Embryol., (205), 441-452
7. Rideau N., Simon J., 1989, Gen. Comp. Endocrinol., (73), 129-135
8. Santalucia T., Camps M., Castello A., Munoz P., Nuel A., Testar X., Palacin M., Zorzano A., 1992, Endocrinol.,
9. (130), 837-846
10. Seki Y., Sato K., Kono T., Abe H., Akiba Y., 2003, Gen. Comp. Endocrinol., (133), 80-87
11. Zhang W., Sumners LH., Siegel PB., Cline MA., Gilbert ER., 2013, Physiol. Genomics, (22), 1084-1094
12. Zhao JP., Bao J., Wang XJ., Jiao HC., Song ZG., LinH., 2012, J. Anim. Sci., (12), 4337-4345