

LE PROGRAMME METEPIC : ETUDE D'UNE PROGRAMMATION NUTRITIONNELLE CHEZ LE CANARD MULARD

**Alexis Cornuez², Marie-Dominique Bernadet², Emilie Cobo¹, Frédéric Mercierand⁴,
Céleste Le Bourhis⁴, Michel Lessire³, Xavier Martin², Frédérique Pitel¹, Cécile MD
Bonnetfont¹, Jean-Michel Brun¹ et Mireille Morisson¹**

¹UMR1388 INRA-ENSAT-ENVT, GenPhySE, 31326 CASTANET-TOLOSAN,

²UE89 INRA, Unité Expérimentale des Palmipèdes à Foie Gras, 40280 BENQUET,

³UR83 INRA, Unité de Recherche Avicole, 37380 NOUZILLY,

⁴UE1295 INRA, Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, 37380 NOUZILLY.

Mireille.morisson@toulouse.inra.fr

RÉSUMÉ

Lors du développement embryonnaire, des marques épigénétiques sont apposées sur le génome de façon différenciée en fonction du devenir cellulaire, conduisant à l'expression différentielle des gènes d'un même génome. Une fois posées, elles constituent les bases d'une « mémoire cellulaire » et sont transmises à travers les mitoses aux cellules filles. Des modifications de l'environnement de l'embryon et notamment de la disponibilité de certains nutriments, comme la méthionine, peuvent affecter ces marques épigénétiques et impacter durablement le métabolisme des tissus.

Chez le canard mulard, hybride intergénérique de la cane commune (*Anas platyrhynchos*) et du canard de Barbarie (*Cairina moschata*), nous nous intéressons à cette programmation précoce en modifiant expérimentalement les paramètres nutritionnels des réserves de l'œuf via l'alimentation de la mère.

Le dispositif expérimental, en cours de réalisation, a pour objectif de vérifier l'impact d'un régime alimentaire maternel pauvre en méthionine sur les caractères zootechniques des descendants mulards, observé lors d'une étude préliminaire. Il est aussi conçu pour collecter de nombreux tissus chez les canes témoins et carencées, puis chez leurs descendants mulards, à différents stades de développement. Cette tissuthèque permettra l'étude des mécanismes moléculaires de cette programmation nutritionnelle lors d'un prochain programme.

ABSTRACT

The METEPIC project: a study of nutritional programming in mule ducks

During developmental cell-type specification, epigenetic marks are patterned across the genome leading to differential expression of the genes from the same genome. Once engraved, they constitute the bases of "cell memory" and are transmitted through mitosis to the daughter-cells. The modification of the embryo's environment, particularly the availability of some nutrients such as methionine, can alter these epigenetic marks and impact the tissue metabolisms on the long term.

Our study aims at exploring this early nutritional programming in the mule duck, an intergeneric hybrid of common duck females (*Anas platyrhynchos*) and Muscovy drakes (*Cairina moschata*), by experimentally altering some nutritional parameters of the egg reserves via maternal nutrition.

This experiment which is in progress aims at checking the effects of a maternal methionine-deficient diet on the mule progeny, observed in a preliminary experiment. It is designed so as to collect different tissues, at various stages of the development, in control and methionine deficient female ducks and their progeny. This collection of tissues will allow studying the molecular mechanisms of this nutritional programming in a subsequent program.

INTRODUCTION

Lors du développement embryonnaire, des marques épigénétiques⁽¹⁾ sont apposées de façon différenciée en fonction du devenir cellulaire, conduisant à l'expression différentielle des gènes d'un même génome (Inbar-Feigenberg et al., 2013). Une fois posées, elles constituent les bases d'une « mémoire cellulaire » et sont transmises à travers les mitoses aux cellules filles (Feil et Fraga, 2012). La modification de l'environnement de l'embryon, telle que la disponibilité de certains nutriments, peut affecter durablement le métabolisme des tissus par une « programmation nutritionnelle » modifiée mais adaptée aux substrats disponibles dans l'environnement. La nutrition précoce peut ainsi influencer à long terme, voire sur plusieurs générations, un certain nombre de métabolismes (Waterland et Michels, 2007 ; Parnet et al., 2007) dont le métabolisme hépatique. Chez le rat, une modification du métabolisme hépatique a été observée en générations F1 et F2 à la suite d'une restriction protéique appliquée pendant la gestation à des femelles F0 (Drake et al., 2005 ; Lillycrop et al., 2005 ; Burge et al., 2007). Mais une modulation plus fine qu'une restriction protéique globale, ciblée sur les donneurs de méthyle (CH₃) impliqués dans le métabolisme du mon carbone (vitamine B12, folate, choline, méthionine,...), impacte également le métabolisme hépatique. Ainsi, chez le mouton, une carence en donneurs de méthyle chez la mère impacte le niveau de méthylation de gènes dans le foie des descendants F1 (Sinclair et al., 2007). Chez le rat, une carence maternelle en donneurs de méthyle induit une stéatose hépatique (Pooya et al., 2012) et une modification du protéome hépatique (Maloney et al., 2013). Des modifications épigénétiques sont invoquées et parfois démontrées pour expliquer ces effets (Sinclair et al., 2007 ; Pooya et al., 2012 ; Guéant et al., 2013a ; Guéant et al., 2013b).

Le foie est le site principal de la lipogénèse dans plusieurs espèces, dont les espèces aviaires. L'aptitude à la stéatose hépatique sous l'effet du gavage est exploitée chez les palmipèdes, et notamment chez le canard mulard mâle, qui représente plus de 95% de la production française de foie gras.

Dans ce contexte, nous nous sommes interrogés sur l'impact d'une modulation nutritionnelle précoce sur la production de foie gras chez le canard mulard. Nous avons choisi de moduler dans l'aliment maternel le taux de méthionine, considéré à la fois comme un nutriment et comme un donneur de méthyle, connu pour intervenir dans des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN. Au cours du programme ANR EpiBird, coordonné par Frédérique Pitel (GenPhySE, centre INRA de Toulouse), nous avons montré qu'un régime à faible teneur en méthionine induit une diminution significative du poids des œufs (tableau 1). Ce régime a induit chez

les descendants mulards mâles une augmentation du poids de foie gras de 60g et, à l'opposé, une réduction du poids de foie gras de 100g chez les femelles (Tableau 1 ; Brun et al., en préparation).

Nous avons construit le programme METEPIC (Programmation nutritionnelle, métabolisme et épigénétique chez le canard mulard) pour vérifier ces premiers résultats sur un effectif plus large. Le phénotype d'intérêt est le foie gras du canard mulard gavé mais d'autres phénotypes seront mesurés, y compris les éventuels effets zootechniques défavorables, afin d'étudier aussi largement que possible les effets du régime alimentaire de la mère.

Nous envisageons également d'inclure des analyses portant sur différents métabolismes (monocarbone, glucidique, lipidique) et nous constituerons une tissuthèque pour des études moléculaires ultérieures. Celle-ci sera constituée de tissus prélevés à différents stades de développement (ovocytes, embryons, nouveau-nés, 12 semaines d'âge et après gavage) et ciblera les tissus d'intérêt (sang, foie, muscle, gras abdominal,...) de façon à pouvoir à terme, décrire au mieux les effets d'une programmation nutritionnelle chez ce modèle aviaire.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Le dispositif expérimental (figure 1)

Le programme est actuellement en cours à l'UEPFG (Benquet, centre INRA de Bordeaux). Nous utilisons 60 canes communes de la souche INRA444 installées en cages individuelles dès l'âge de 9 semaines. Elles sont nourries *ad libitum* et la moitié de ces canes reçoit un aliment dont la teneur en méthionine est réduite par rapport aux recommandations. L'autre moitié reçoit un aliment témoin. A titre d'exemple, la teneur en méthionine de l'aliment reproduction s'élève à 2,6 g/kg et à 4,2 g/kg pour l'aliment à teneur réduite et le témoin respectivement. Ces aliments sont fabriqués au moulin de l'Unité Expérimentale PEAT (Tours, Centre INRA Val de Loire). Ils sont distribués aux canes entre l'âge de 10 semaines et leur réforme, à 50 semaines. Nous récoltons 50 œufs non fécondés puis 50 œufs fécondés pour chacun des deux groupes de femelles. Ensuite, un total de 300 mulards des 2 sexes est produit à partir de ces canes. Parmi eux, 60 seront sacrifiés à la naissance, 60 seront abattus avant la mise en gavage (à 12 semaines d'âge) et 180 seront gavés pendant 12 jours avec deux repas par jour, puis abattus.

1.2. Les mesures zootechniques

Des mesures seront réalisées sur les canes communes des deux groupes ainsi que sur leurs descendants canards mulards.

Chez les canes communes :

Nous noterons la consommation alimentaire individuelle, les caractères de croissance (poids à l'âge de 4, 8, 12 et 50 semaines) et de reproduction (poids des œufs, ponte, fertilité, éclosabilité). Nous mesurerons les poids des œufs, du blanc et du jaune sur 50 œufs pondus par les canes de chaque groupe.

Chez les descendants mulards :

A l'éclosion, nous mesurerons le poids des canetons, mâles et femelles, issus des deux conditions expérimentales ainsi que la couleur du duvet.

Sur tous les animaux en croissance, nous noterons la consommation alimentaire par lot de 60 animaux, le poids aux âges de 4, 8 et 12 semaines. L'engraissement corporel sera estimé à 8 semaines par TOBEC (Total Body Electrical Conductivity) chez les mâles uniquement.

Chez les animaux gavés, nous contrôlerons l'ingéré et à l'abattage nous mesurerons le poids vif, le poids de la carcasse, le poids du foie, le rapport poids du muscle sur poids de l'ensemble muscle et peau du magret, le poids du gras abdominal et quelques paramètres de la qualité des foies (présentation visuelle, couleur, rendement technologique). Nous ferons une prédiction de la composition chimique des foies par spectroscopie dans le proche infra-rouge (SPIR ou NIRS en anglais). Nous évaluerons également les qualités technologiques du magret.

1.3. Les prélèvements de sang

Des prélèvements sanguins au cours de la vie des canes et des descendants mulards, y compris chez les nouveau-nés, seront réalisés afin d'étudier plus tard les paramètres sanguins des métabolismes lipidiques et glucidiques (glucose, triglycérides, cholestérol). Ils serviront aussi à analyser les perturbations induites par une carence en méthionine sur le métabolisme du monocarbonate (SAM, SAH, ...).

1.4. Les prélèvements de tissus

Chez les canes communes, nous prélèverons des échantillons de foie, de muscle, de gras abdominal ainsi que des ovocytes. Nous conserverons également des aliquotes de blanc et de jaune d'œufs.

Des embryons de canards mulards seront récoltés à 24 heures d'incubation afin de pouvoir ultérieurement comparer les marques épigénétiques apposées dès ce stade selon les modalités d'alimentation maternelle.

Chez les nouveau-nés, nous collecterons des échantillons de foie, de muscle et d'intestin. Enfin, chez tous les descendants abattus à 12 semaines ou après gavage, nous conserverons du foie, du magret, du gras abdominal, de l'intestin, du microbiote intestinal et la bourse de Fabricius. L'ensemble de ces tissus pourra être étudié ultérieurement pour préciser

l'impact de la carence maternelle en méthionine sur leur métabolisme.

CONCLUSION

Ce projet devrait nous permettre de valider les premières observations zootechniques déjà réalisées et d'évaluer les éventuels effets défavorables d'un régime maternel appauvri en méthionine sur les caractères de production des canards mulards. Les mesures effectuées sur les canetons nouveau-nés et les animaux à 12 semaines d'âge, compléterons ces connaissances.

Les analyses menées sur la composition des œufs nous éclaireront sur les modifications induites par le régime alimentaire sur l'environnement de l'embryon et leur éventuelle implication lors de la programmation nutritionnelle précoce.

Les nombreux prélèvements de tissus effectués à différents stades de développement devraient conduire à terme à l'identification des métabolismes touchés, des gènes impactés et des mécanismes moléculaires impliqués dans cette programmation nutritionnelle. Cela nous permettra de décrire un mécanisme épigénétique encore très peu étudié chez les oiseaux. Pour la filière, l'intérêt est évident s'il s'avère qu'un faible taux de méthionine dans l'aliment des canes améliore les performances de gavage des canards mulards mâles sans dégrader la qualité du foie et du magret.

REMERCIEMENTS

Le programme METEPIC est soutenu financièrement par le Département de Génétique Animale de l'INRA. Les auteurs remercient l'ensemble des agents de l'Unité Expérimentale des Palmipèdes à Foie Gras.

(1) Les principales marques épigénétiques décrites sont la méthylation de l'ADN, les modifications des histones (par ajout ou élimination de groupes acétyl, méthyle, phosphoryl ou ubiquitiny), des microARN, et des grands ARN non-codants. Elles régulent le statut actif ou inactif des gènes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

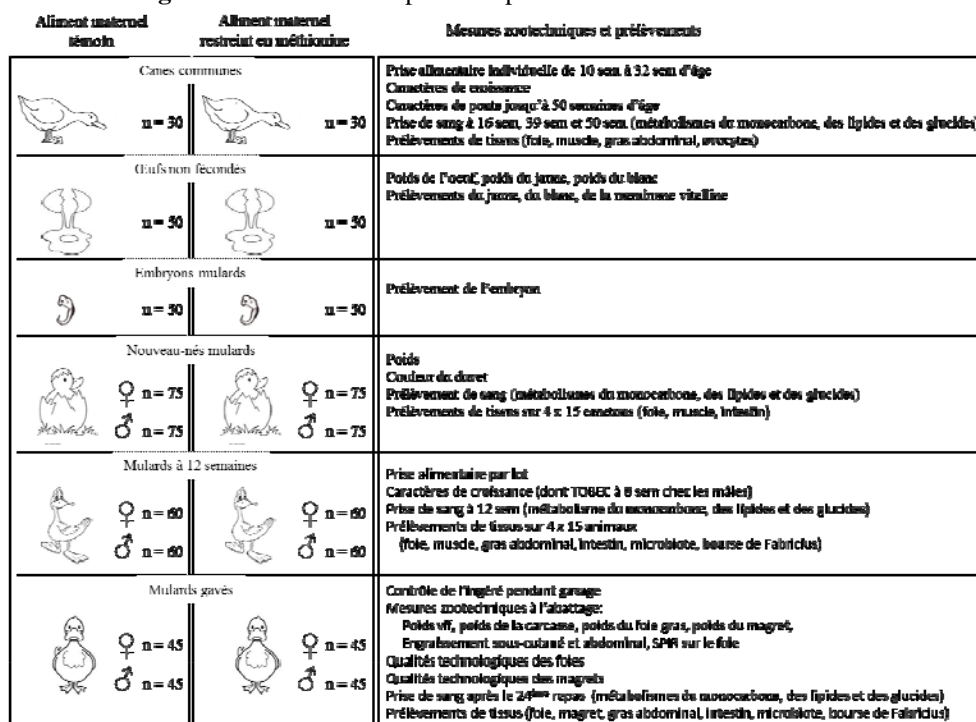
1. Burdge GC, 2007. Br J Nutr. (97), 435-439
2. Drake A.J., 2005. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol (288), R34-38
3. Feil R et Fraga MF(2012), Nat Rev Genet. (13), 97-109
4. Guéant JL, 2013a. Trends Endocrinol Metab. (24), 279-289
5. Guéant JL, 2013b. Biochimie (95), 1033-1040
6. Inbar-Feigenberg M., 2013. Fertil Steril. (99), 607-15
7. Lillycrop KA, 2005. J Nutr. (135), 1382-1386
8. Maloney CA, 2013. Genes Nutr. (8), 181-190
9. Parnet P., 2007. Obes. (2), 158-165
10. Pooya S, 2012. J Hepatol. (57), 344-351
11. Sinclair KD, 2007. Proc Natl Acad Sci U S A. (104), 19351-19356
12. Waterland R.A., Michels K.B. 2007. Annu. Rev. Nutr. (27), 363-88

Tableau 1. Effets d'une restriction alimentaire en méthionine sur le poids des œufs des canes communes et sur le poids des foies gras de leurs descendants mulards

	Restriction en Méthionine		Aliment Témoin		significativité
Concentration en méthionine de l'aliment croissance (g/kg)		2,56		4,07	
Concentration en méthionine de l'aliment reproduction (g/kg)		2,60		4,20	
Poids des oeufs (g)	(n=131)	61,5±0,4	(n=193)	66,7±0,3	p < 0,001
Poids des foies femelles (g)	(n=30)	449±22	(n=30)	546±24	p < 0,05
Poids des foies mâles (g)	(n=30)	581±24	(n=30)	512±25	p < 0,05

Ces résultats ont été obtenus lors d'une étude préliminaire (Brun *et al.* En cours de préparation).

Figure 1. Schéma du dispositif expérimental en cours de réalisation



Alexis Cornuez², Marie-Dominique Bernadet², Emilie Cobo¹, Frédéric Mercierand⁴,
Céleste Le Bourhis⁴, Michel Lessire³, Xavier Martin², Frédérique Pitel¹, Cécile MD Bonnefont¹,
Jean-Michel Brun¹ et Mireille Morisson¹

Qu'est-ce que la programmation nutritionnelle ?

Lors du développement embryonnaire, des marques épigénétiques sont apposées de façon différenciée en fonction du devenir cellulaire, conduisant à l'expression différentielle des gènes d'un même génome (Inbar-Feigenberg et al., 2013, Fertil Steril. (99), 607-15). Elles constituent les bases d'une « mémoire cellulaire » et sont transmises à travers les mitoses aux cellules filles (Feil et Fraga, 2012, Nat Rev Genet. (13), 97-109). La modification de l'environnement de l'embryon, telle que la disponibilité de certains nutriments, peut modifier ces marques épigénétiques et cette « mémoire cellulaire », affectant durablement le métabolisme des tissus (Langley-Evans, 2015, J Hum Nutr Diet. 28, 1-14).



Chez l'humain, un **déficit nutritionnel** pendant la grossesse peut affecter durablement la santé de l'enfant. Aux Pays-Bas, les enfants des femmes ayant subi la famine de 1944-1945, ont présenté un taux plus élevé de diabète de type 2, d'obésité, d'hypertension artérielle et de maladies cardiovasculaires (Barker, 1997 Br Med Bull 53:96-108).



Chez le rat, une **restriction** en donneurs de méthyle au cours de la gestation, induit une stéatose hépatique (Pooya et al., 2012, J Hepatol. (57), 344-351) et une modification du protéome hépatique (Maloney et al., 2013, Genes Nutr. (8), 181-190) chez les descendants.

Peut-on utiliser la programmation nutritionnelle pour améliorer les performances de gavage des canards mulards mâles ?




Chez le canard mulard, des résultats préliminaires montrent qu'une **restriction** en méthionine appliquée à la mère, induit **une augmentation du poids de foie gras de 60g chez les descendants mulards mâles** et, à l'opposé, une réduction du poids de foie gras de 100g chez les femelles (Brun et al., en préparation).

	Restriction en Méthionine	Aliment Témoin	significativité
Concentration en méthionine de l'aliment (g/kg)	2,6	4,2	
Poids des foies femelles (g)	449±22 (n=30)	546±24 (n=30)	p < 0,05
Poids des foies mâles (g)	581±24 (n=30)	512±25 (n=30)	p < 0,05


Mesures zootechniques et prélèvements

Canes communes




- Prise alimentaire individuelle
- Caractères de croissance et de ponte
- Prises de sang à 16 sem, 39 sem et 50 sem
- Prélèvement de tissus (foie, muscle, gras abdominal, ovocytes)

Ceufs non fécondés




- Poids de l'œuf, du jaune, du blanc
- Prélèvement du jaune, du blanc, de la membrane vitelline

Nouveau-nés mulards




- Poids
- Couleur du duvet
- Prélèvement de sang et du foie

Mulards à 12 semaines



- Prise alimentaire par lot
- Caractère de croissance
- Prise de sang à 8 et 12 sem
- Prélèvement de tissu (foie, muscle, gras abdominal, intestin, microbiote)

Mulards gavés



- Contrôle de l'ingéré pendant gavage
- Mesures zootechniques à l'abattage
- Qualités technologiques des foies et des magrets
- Prise de sang
- Prélèvement de tissu (foie, muscle, gras abdominal, intestin, microbiote)

Pour la filière, l'intérêt est évident s'il s'avère qu'un faible taux de méthionine dans l'aliment des canes améliore les performances de gavage des canards mulards mâles sans dégrader la qualité du foie et du magret.

Le dispositif expérimental MetEpiC a pour objectif de vérifier l'impact d'un régime alimentaire maternel pauvre en méthionine sur le poids du foie gras des descendants mulards et d'évaluer les éventuels effets défavorables.

Il est aussi conçu pour collecter de nombreux tissus chez les canes témoins et carencées, puis chez leurs descendants mulards, à différents stades de développement. Cette tissuthèque permettra l'étude des mécanismes moléculaires de cette programmation nutritionnelle lors d'un prochain programme.