



HAL
open science

La stéatose hépatique chez les palmipèdes : gènes clés, différences entre types génétiques et cinétique postprandiale

Annabelle Tavernier

► To cite this version:

Annabelle Tavernier. La stéatose hépatique chez les palmipèdes : gènes clés, différences entre types génétiques et cinétique postprandiale. Médecine vétérinaire et santé animale. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2016. Français. NNT: . tel-02968435

HAL Id: tel-02968435

<https://hal.science/tel-02968435>

Submitted on 15 Oct 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.

THESE

Université de Pau et des Pays de l'Adour

Ecole Doctorale Sciences Exactes et leurs Applications - ED211

Manuscrit de thèse par

Annabelle Tavernier

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Spécialité Physiologie et biologie des organismes, populations, interactions

La stéatose hépatique chez les palmipèdes : gènes clés, différences
entre types génétiques et cinétique postprandiale

Thèse soutenue le 12 Décembre 2016 devant le jury composé de :

Mme. Caroline Molette, Ingénieur de recherche, Euralis, HDR	Rapporteur
M. Xavier Fernandez, Directeur de Recherche, INRA INPT GenPhySE, HDR	Rapporteur
M. André Bado, Directeur de Recherche, UMR INSERM 1149, HDR	Président
M. Hervé Guillou, Directeur de Recherche, E1 TIM, HDR	Examineur
M. Stéphane Davail, Professeur, UMR INRA 1419, HDR	Directeur de thèse
Mme. Karine Gontier, Maître de Conférences, UMR INRA 1419	Directeur de thèse

Résumé

La stéatose hépatique chez les palmipèdes est un processus complexe impliquant de nombreux facteurs notamment le fond génétique. En effet, des différences inter-génotypes ont d'ores et déjà été démontrées entre les canards de Barbarie, Pékin ainsi que leur hybride, le canard mulard (utilisé dans la production de foie gras). Les travaux de cette thèse se sont donc inscrits dans une compréhension globale des mécanismes physiologiques à l'origine du développement de la stéatose hépatique autrement appelée « foie gras ». La première étude « DuckPhy » s'intéresse particulièrement aux différences intergénotypiques rencontrées au cours du gavage chez les trois types génétiques, notamment du point de vue transcriptionnel. Cette expérimentation a permis de mettre en évidence l'apport important du recaptage des lipides au niveau hépatique et sa possible implication dans le développement exacerbé de la stéatose hépatique chez le canard mulard. En effet, le transporteur d'acides gras Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) ainsi que le récepteur aux Very Low Density Lipoprotein (VLDLR) présentent une induction très importante de leur expression à la fin du gavage dans le foie du canard mulard en comparaison des deux autres types génétiques. Le canard Pékin, quant à lui, surexprime les gènes en rapport avec l'exportation des lipides et la β -oxydation à savoir, d'une part l'Apolipoprotéine B (ApoB) ainsi que la Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTTP), et d'autre part la Carnitine Palmitoyl Transferase 1 (CPT1), conduisant à une faible accumulation de lipides dans le foie. Concernant le métabolisme glucidique, le canard Pékin semble mieux exprimer les transporteurs de glucose (GLUT), notamment dans le foie et les tissus périphériques en fin de gavage associé à une glycémie plus faible. La seconde étude « DuckKinetic » a permis d'établir un profil d'expression des différents gènes d'intérêt en vue de localiser leurs pics d'expression permettant ainsi de sélectionner le meilleur point de prélèvement postprandial chez le canard mulard gavé. Cette étude fournit un historique d'expression des gènes des enzymes impliquées aussi bien dans le métabolisme lipidique que glucidique avec une expression précoce des transporteurs de glucose dans le jejunum et une forte régulation postprandiale de la DGAT2 la positionnant comme enzyme clé de la lipogenèse. L'ensemble de ces données a permis de mettre en avant des mécanismes jusqu'alors inconnus notamment sur le recaptage hépatique des lipides circulants, mais aussi de construire un historique d'expression pour chaque gène impliqué dans la mise en place de la stéatose.

Mots clés : stéatose hépatique, palmipèdes, gavage, expression de gènes, métabolismes

Abstract

In waterfowls, hepatic steatosis is a complex mechanism which involved many factors including genetic background. Indeed, some inter-genotype differences have already been demonstrated between Muscovy, Pekin ducks and their crossbreed the mule ducks (which is used in fatty liver or “foie gras” production). The work of this thesis is enrolled in a comprehensive understanding of the physiological mechanisms underlying the development of hepatic steatosis. The first study “DuckPhy” is interested in intergenotypic differences during overfeeding in the three genotypes particularly at transcriptional level. This experiment leads us to highlight the importance of the hepatic re-uptake of lipid and its possible involvement in the exacerbated development of fatty liver disease in the mule ducks. In fact, the fatty acid transporter Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) and the receptor of Very Low Density Lipoprotein (VLDLR) present a very large overexpression at the end of the overfeeding period in liver of mule ducks in comparison with the two other genetic types. However, Pekin ducks overexpressed genes related to lipid export and β -oxidation such as Apolipoprotein B (ApoB), Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTTP), but also Carnitine Palmitoyl Transferase 1 (CPT1) leading to a weak hepatic lipid accumulation. Regarding glucose metabolism, Pekin ducks seem to better express GLUcose Transporters (GLUT) in liver and peripheral tissues at the end of the overfeeding period associated with a lower glycemia. The second study “DuckKinetic” allow us to build an expression profile in order to localize their peak of expression and to select the best sampling point after the meal in overfed mule ducks. This study provides a kinetic of expression of genes involves in both lipid and glucid metabolisms. We have observed a precocious expression of glucose transporters in jejunum and a high postprandial regulation of DGAT2 positioning this gene as a key enzyme in lipogenesis. All these data allow to highlight previously unknown mechanisms including hepatic re-uptake of circulating lipids, but also to build a profile of expression for each gene involved in the development of hepatic steatosis.

Mots clés: Hepatic steatosis, palmipeds, genes expression, glucid and lipid metabolisms

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et d'assister à ma soutenance, tout particulièrement mes rapporteurs Monsieur Xavier Fernandez et Madame Caroline Molette.

Je remercie également Monsieur Olivier Donard pour m'avoir accueillie au sein de l'IPREM-EEM durant les deux premières années de cette thèse, ainsi que Madame Sandrine Skiba pour son accueil au sein de NuMÉA lors de cette dernière année.

Je tiens également à remercier Madame Caroline Molette pour m'avoir transmis la liste de ses amorces PCR.

Je remercie également Monsieur André Bado sans le soutien de qui je n'aurais pas réussi à décrocher cette thèse.

Je souhaite également remercier les membres de mon comité de thèse, Madame Elisabeth Baéza et Madame Geneviève Corraze, qui ont contribué au pilotage de ce travail.

Merci à Monsieur Stéphane Davail pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse et pour m'avoir accueilli dans l'équipe montoise.

Un énorme merci à Madame Karine Gontier, ma co-directrice de thèse qui m'a guidée et supportée tout au long de ses années (car oui, je ne suis pas facile...). Merci pour ton soutien, ta présence et tes corrections.

Je remercie particulièrement le Comité Interprofessionnel des palmipèdes à Foie Gras, ainsi que le Conseil Général des Landes et la Communauté d'Agglomération du Marsan pour avoir financé cette thèse ainsi que la réalisation des différentes expérimentations.

Merci à Madame Marie Dominique Bernadet ainsi qu'à l'ensemble des personnels de la station expérimentale des palmipèdes à foie gras d'Artiguères pour leur aide technique dans l'élevage des animaux.

Je remercie le personnel du Laboratoire Pyrénées Landes et tout particulièrement Monsieur Patrick Daniel et Mesdames Karine Bellet et Martine Chague pour leur accueil lors de mes manipulations ainsi que l'utilisation de leur matériel.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres de l'unité GenPhySE, particulièrement à Xavier Fernandez, pour leur accueil lors de mon passage Toulousain pour la réalisation des analyses Folch. Un merci particulier à Madame Hélène Manse et Monsieur Stéphane Seidlinger pour leur formation sur les extractions.

J'adresse également mes remerciements à Frédéric Martins et Jean-José Maoret pour leur accueil et la réalisation des expérimentations en Fluidigm.

Merci à l'ensemble de l'équipe enseignante de l'IUT de Mont de Marsan pour leur accueil et leur bienveillance. Un merci également pour le personnel administratif du site sans qui je n'aurais pu partir en mission...un merci tout particulier à Béatrice et aux secrétaires Peggy, Christine et Marion pour leur sympathie.

Je remercie également Sandra pour sa bonne humeur et nos échanges. Un merci va également à José et Véro, pour leurs petits coups de main quotidiens qui m'ont souvent facilité la vie.

Je remercie également tous mes compagnons de bureau qui ont été nombreux au fil du temps... plus particulièrement Jamal pour ses câlins et sa façon de prendre soin des gens (parfois un peu trop ;)). Merci à Elio, j'ai beaucoup apprécié ton esprit et nos échanges.

Karine (Ma petite Ricaud) et Juliette, je ne trouve pas de mots pour vous remercier... sans vous cette thèse aurait sûrement été plus difficile à vivre. Vous m'avez accompagnée et soutenue dans les hauts et les bas et pour cela MERCI !

Karine, tes ronchonchonges vont me manquer, quand je ne serai plus là, garde la pêche et ne te démotive pas ! Juliette, tu as été mon compagnon de galère, toujours à l'écoute, nos bavassages et échanges culinaires vont me manquer.

Mickaël (Doudou), ces deux premières années avec toi ont été géniales, nos parties de franches rigolades, nos sorties (surtout une, TMTC) et ta joie de vivre resteront toujours gravées dans mes souvenirs ! Merci de m'avoir soutenue.

Ma Karine, au-delà de ma co-directrice tu as été bien plus. Je garderai un très bon souvenir de ces années, ta patience et ta zenitude me surprendront toujours.

Marianne, la « petite » dernière, tu as fait partie de la fin de mon aventure (la meilleure partie !) ; je te remercie pour ton esprit critique lors de nos petites réunions, ta bonne humeur au quotidien et le petit coin de bureau que tu me laissais...

Je tiens également à remercier ma famille, en particulier mes parents qui m'ont toujours soutenue dans ce long projet. Une pensée également à mon filleul qui m'a beaucoup manqué lors de ces trois années. <3

Enfin, le meilleur pour la fin, merci à ma moitié pour ton aide, ces jours passés à étiqueter les tubes de prélèvements... mais aussi et surtout pour m'avoir supportée dans les moments de fatigue, pour m'avoir toujours soutenue et encouragée, pour prendre soin de moi.

Sommaire

Travaux issus de la thèse	1
Liste des abbréviations	2
Liste des tableaux	4
Liste des figures	5
Introduction générale.....	6
Etude bibliographique	10
I. Modèles d'étude.....	11
I. 1. <i>Cairina moschata</i>	11
I. 2. <i>Anas platyrhynchos</i>	11
I. 3. Le canard mulard	13
II. Le gavage.....	13
III. Le métabolisme des oiseaux.....	14
III. 1. Le métabolisme glucidique	15
III. 1. 1. Digestion et absorption du glucose	15
III. 1. 2. Les transporteurs de glucose chez l'oiseau	16
III. 1. 2. L'utilisation du glucose	18
III. 2. Le métabolisme des lipides	20
III. 2. 1. La lipogenèse <i>de novo</i>	22
III. 2. 2. La beta oxydation	22
III. 2. 3. Le transport et l'exportation des lipides.....	24
III. 2. 4. Le captage des lipides en périphérie	25
III. 3. Régulation des métabolismes glucidique et lipidique	26
IV. La stéatose hépatique	30
IV. 1. La stéatose chez l'homme	30
IV. 2. La stéatose hépatique chez l'oiseau	32
IV. 1. Les différences de réponse au gavage.....	33

IV. 1. 1. Zootechnie.....	33
IV. 1. 2. Paramètres plasmatiques	36
IV. 1. 3. Paramètres moléculaires.....	37
V. Techniques de biologie moléculaire.....	37
V. 1. La Polymerase Chain Reaction (PCR)	38
V. 2. La PCR quantitative (qPCR)	38
V. 3. La qPCR utilisant le BioMark	38
Matériels et méthodes.....	39
I. Conditions d'élevage, de gavage et d'abattage des canards pour les deux expérimentations	40
I.1. DuckPhy.....	43
I. 2. DuckKinetic	45
II. Analyses biochimiques	45
II.1. Dosages plasmatiques.....	45
II.2. Détermination du pourcentage en eau et de lipides totaux	46
III. Biologie moléculaire	46
III. 1. Extraction des ARN totaux	46
III. 2. Transcription inverse.....	47
III. 2. 1. Dénaturation des ARN	47
III. 2. 2. Transcription inverse des ARN	48
IV. Validation des amorces	48
IV. 1. Conception des amorces.....	48
IV. 2. Test des amorces en qPCR.....	49
V. qPCR	52
VI. Analyse et traitements statistiques des résultats	54
Chapitre 1 : DuckPhy	55
Objectif du travail.....	56

Article 1: Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks.....	58
Résultats non publiés.....	86
Article 2: Inter genotype differences in expression of genes involved in glucose metabolism in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks.	88
Chapitre 2 : DuckKinetic.....	110
Objectif du travail.....	111
Article 3: Kinetic of expression of genes involved in glucose metabolism in overfed mule ducks.....	113
Article 4: Kinetic of expression of genes involved in lipid metabolism in overfed mule ducks.....	127
Discussion générale.....	145
Influence du régime et du génotype sur le développement de la stéatose hépatique (Articles 1 et 2).....	146
Cinétique postprandiale d'expression des gènes des métabolismes glucidique et lipidique chez le canard mulard (Articles 3 et 4)	152
Conclusions et perspectives	156
Références bibliographiques	161
Annexes.....	182
Liste des Annexes.....	183

Travaux issus de la thèse

Publications dans des journaux à comité de lecture :

Article 1: **Annabelle Tavernier**, Stéphane Davail, Karine Ricaud, Marie Dominique Bernadet, Karine Gontier. *Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks*. Molecular and Cellular Biochemistry (accepté).

Article 2: **Annabelle Tavernier**, Karine Gontier, Karine Ricaud, Marie Dominique Bernadet, Stéphane Davail. *Inter genotype differences in expression of genes involved in glucose metabolism in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks*. Comparative biochemistry and physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology. (en préparation)

Article 3: **Annabelle Tavernier**, Stéphane Davail, Karine Ricaud, Marie Dominique Bernadet, Karine Gontier. *Kinetic of expression of genes involved in glucose metabolism in overfed mule ducks*. Molecular and Cellular Biochemistry (soumis).

Article 4: **Annabelle Tavernier**, Karine Gontier, Karine Ricaud, Marie Dominique Bernadet, Stéphane Davail. *Kinetic of expression of genes involved in lipid metabolism in overfed mule ducks*. Molecular and Cellular Biochemistry (en préparation).

Communications lors de congrès :

Tavernier Annabelle, Gontier Karine, Jaglin Mathilde, Rey Mickael, Ricaud Karine, Bernadet Marie-Dominique, Davail Stéphane. *Etude des mécanismes de régulation des mécanismes lipidiques et glucidiques périphériques et hépatiques chez les palmipèdes à foie gras*. Onzièmes journées de la recherche avicole (2014), Tours, France. (Poster).

Poster réalisé lors des journées de l'école doctorale 211 :

Annabelle Tavernier, Stéphane Davail, Karine Gontier. *Regulatory mechanisms involved in lipid and glucose absorption at peripheral and hepatic level in overfed waterfowl*. Journées de l'ED211 (2015), Pau, France.

Liste des abréviations

- ACAD** : Acyl-CoA Dehydrogenase
- ACC** : Acetyl CoA Carboxylase
- ACLY** : ATP Citrate lyase
- ACSL** : Acyl CoA Synthetase Long chain
- ADP** : Adénosine Di-Phosphate
- AG** : Acide gras
- AGS** : Acides Gras Insaturés
- AGM/PI** : Acides Gras Mono/Poly-insaturés
- Akt** : Akt / protein kinase B
- ApoAI** : Apolipoprotein AI
- ApoB** : Apolipoprotein B
- ATP** : Adénosine tri-Phosphate
- CEPT1** : Cholesteryl Ester Transfer Protein 1
- ChREBP** : Carbohydrate Responsive Element Binding Protein
- CPT1** : Carnitine Palmitoyl Transferase 1
- DGAT2** : DiacylGlycerol AcylTransferase 2
- Elovl6** : Elongation of very long chain fatty acids protein 6
- ENO1** : Enolase 1
- FA** : Fatty Acid
- FABP** : Fatty Acid Binding Protein
- FAD** : Flavine Adénine Dinucléotide
- FAS** : Fatty Acid Synthase
- FAT/CD36** : Fatty Acid Transporter/Cluster of differenciation 36
- FFA** : Free Fatty Acid
- GAPDH** : Glyceraldehyde 3 Phosphate DeHydrogenase
- GK** : GlucoKinase
- GLUT** : Glucose Transporter

GPAT : Glycerol-3-Phosphate AcylTransferase
G6P : Glucose 6 Phosphate
GTP : Guanosine Tri-Phosphate
HDL : High Density Lipoprotein
HK1 : HexoKinase 1
IGF1 : Insulin like Growth Factor
InsR : Insulin Receptor
LDLR : Low Density Lipoprotein Receptor
LMF1 : Lipase Maturation Factor 1
L-PK : Liver Pyruvate Kinase
LPL : Lipoprotein Lipase
LXRA : Liver X Receptor Alpha
MTTP : Microsomal Triglyceride Transfer Protein
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NAFLD : Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NASH : Non Alcoholic Steato-Hepatitis
NEFA : Non Esterified Fatty Acid
PDH : Pyruvate DeHydrogenase
PEP : PhosphoEnol Pyruvate
PEPCK : PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase
PPARA/G : Peroxysome Proliferator-Activated Receptor Alpha/Gamma
PP2A : Protein Phosphatase 2A
ROS : Reactive Oxygen Species
SCD1 : Stearoyl CoA Desaturase
SGLT1 : Sodium Glucose Linked Transporter 1
SREBP-1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c
TG : Triglyceride
VLDLR : Very Low Density Lipoprotein Receptor
X5P : Xylulose 5 Phosphate

Liste des tableaux

Tableau 1. Distribution des différentes isoformes de GLUT chez le mammifère.	16
Tableau 2. Composition corporelle de 4 types génétiques de canard.	34
Tableau 3. Evolution des quantités d'AG du foie (%) au cours du gavage chez le canard de Barbarie (D'après Baudonnet Lenfant, 1993).....	35
Tableau 4. Composition des différents aliments utilisés en élevage pour les deux expérimentations	42
Tableau 5. Effectifs et modalités. Expérimentation DuckPhy (B : Barbarie ; m : mulard ; P : Pékin)	43
Tableau 6. Effectifs et temps de prélèvement. Expérimentation DuckKinetic.	45
Tableau 7. Composition du mix 1 en vue de la dénaturation d'ARN	47
Tableau 8. Composition des mix en vue de la rétro-transcription	48
Tableau 9. Séquences des primers validés	50
Tableau 10. Mix réactionnel de l'étape de pré-amplification	52
Tableau 11. Mix réactionnel de l'étape d'exonucléase	52
Tableau 12. Mix réactionnel de l'étape de qPCR, plaque « samples ».....	53
Tableau 13. Programme d'amplification BioMark	53
Tableau 14. Effet du gavage et du génotype sur la composition hépatique en AG (% lipides totaux).....	151

Liste des figures

Figure 1. Types génétiques utilisés pendant la thèse	12
Figure 2. Réactions enzymatiques de la voie de la glycolyse.	19
Figure 3. Réactions enzymatiques du cycle de Krebs.	21
Figure 4. Métabolisme des glucides et des lipides.	23
Figure 5. Régulation transcriptionnelle de la glycolyse et de la synthèse des lipides hépatiques.	27
Figure 6. Principaux mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la NASH.	31
Figure 7. Comparaison entre les modèles animaux nutritionnels et génétiques en regard de la survenue de la stéatose hépatique ou de la NASH.	32
Figure 8. Evolution de la composition chimique du foie au cours du gavage chez le canard de Barbarie	35
Figure 9. Courbe de gavage des trois types génétiques utilisés pour DuckPhy	41
Figure 10. Courbes de croissance des trois types génétiques utilisés pour DuckPhy.	44
Figure 11. Illustration de la plaque utilisée pour le BioMark, Fluidigm.....	53
Figure 12. Effet du génotype sur les principaux gènes du métabolisme lipidique étudiés lors du gavage (P : Pékin, B : Barbarie, m : mulard)	151

Introduction générale

Le foie gras, spécificité culinaire française, est un produit fortement valorisé de par ses qualités organoleptiques. Il est, depuis 2006, inscrit au patrimoine culturel et gastronomique français (Loi n° 2006-11 du 5 janvier 2006 d'orientation agricole ajoutée à l'article L654-27-1 au code rural français). La France est le premier producteur mondial de foie gras avec 19 608 tonnes de foie gras produit en 2014 (ITAVI, 2015) soit presque 74% de la production ; viennent ensuite la Bulgarie (2 600 t) et la Hongrie (2 590 t). Les régions de production sont peu nombreuses et rassemblent l'Aquitaine, Midi-Pyrénées, Pays de la Loire, Poitou-Charentes et Bretagne pour près de 97% de la production française (Ministère de l'agriculture, 2015), l'Aquitaine rassemblant à elle seule près de 40% de la production. Le foie gras constitue une filière importante, impliquant plus de 100 000 emplois directs et indirects. Les exportations de foie gras cru et transformé se maintiennent à 4 940 t en 2014, proche du record de 2010 (5 190 t) et les principaux importateurs sont l'Espagne (1 500 t), la Belgique (900 t) et le Japon (600 t). La consommation française de foie gras a atteint les 18 220 t en 2014 avec une consommation moyenne de 276 g par habitant. La définition commerciale d'un foie gras cru, telle que l'indication géographique protégée (IGP) le détermine, est claire : un foie gras doit provenir d'un canard mâle, gavé avec 20 repas pendant 10 jours minimum avec un aliment à 95% de maïs issu de l'agriculture locale. Le foie gras obtenu doit peser au minimum 350g (RÈGLEMENT (CE) n° 510/2006 DU CONSEIL relatif à la protection des indications géographiques et des appellations d'origine « Canard à foie gras du Sud-Ouest (Chalosse, Gascogne, Gers, Landes, Périgord, Quercy) »).

La bien être des animaux est primordial et une mise aux normes des conditions d'élevage lors du gavage avec des cages non plus individuelles mais collectives vient d'être effectivement appliquée au 1^{er} Janvier 2016. C'est dans l'optique d'améliorer les conditions d'élevage et les performances au gavage que s'inscrit cette thèse.

En effet, les cours des matières premières qui ne cessent de fluctuer (ITAVI, 2015) et le contexte de crise économique, poussent la filière à rechercher de nouvelles stratégies de production. Les principales problématiques sont : améliorer le bien-être animal, la sélection des animaux ainsi que réduire la quantité de maïs et la durée du gavage.

Afin de répondre aux objectifs de la filière, de nombreuses études se sont inscrites dans la compréhension des mécanismes de mise en place du foie gras scientifiquement appelé stéatose hépatique.

La stéatose hépatique est une accumulation de triglycérides (TG) dans le foie résultant d'une forte activité de la lipogenèse (Hermier et al., 1999; Saadoun and Leclercq, 1986). En effet, chez les oiseaux, la lipogenèse *de novo* est essentiellement hépatique (Belo et al., 1976) et leur permet ainsi de stocker beaucoup d'énergie en augmentant leur apport alimentaire en vue d'une migration à venir. C'est cette faculté qui est utilisée dans la production de foie gras. Le foie gras des palmipèdes gavés est donc le résultat d'une stéatose hépatique nutritionnelle et hypertrophique (Salichon, 1991). Il existe cependant des variations génétiques importantes de la réponse au gavage. Ainsi, en France, sont principalement utilisés l'oie (*Anser anser*) de race Landaise, le canard de Barbarie (*Cairina moschata*) mais aussi, et surtout, le canard mulard, hybride stérile issu d'un croisement entre un canard de Barbarie et une cane commune Pékin (*Anas platyrhynchos*). Ce dernier bénéficie d'un effet d'hétérosis et partage des qualités propres à chacun de ses parents, notamment en présentant une capacité d'ingestion supérieure ainsi qu'un foie gras plus gros (Guy et al., 1995).

La physiologie du canard gavé a d'ores et déjà fait l'objet d'études portant principalement sur les mécanismes régulant la balance énergétique conduisant à une stéatose plus ou moins importante selon les espèces. En effet, le canard Pékin présente les poids de foie les plus faibles après gavage en comparaison du canard de Barbarie mais présente, en revanche, les proportions de gras périphériques les plus importants. La lipogenèse hépatique a de plus été démontrée comme plus active chez les canards de Barbarie et mulard grâce à l'activité accrue de protéines comme la Fatty Acid Synthase (FAS) agissant sur la synthèse des acides gras (AG) (Baeza et al., 2005). L'exportation des lipides quant à elle, est plus importante chez le Pékin, notamment par la formation des lipoprotéines : Very Low Density Lipoprotein (VLDL) (G Saez et al., 2009) et une activité accrue de l'enzyme permettant le captage des TG en périphérie, la LipoProtéine Lipase (LPL) (André et al., 2007). Contrairement au canard Pékin, les TG sont moins exportés chez les canards mulard et de Barbarie, suggérant un engraissement hépatique favorisé chez ses espèces (Hermier et al., 2003).

L'expression des gènes impliqués dans ces mécanismes a déjà fait l'objet de plusieurs publications. Hérault et collaborateurs (Hérault et al., 2010) ont notamment démontré une surexpression des gènes impliqués dans la lipogenèse tels que la FAS, la Stearoyl CoA Desaturase (SCD1) et la Di-acyl Glycerol Acyl Tranferase (DGAT2) chez des canards Pékin et Barbarie gavés lors de prélèvements à 12-14h après le repas.

Saez et al (G Saez et al., 2009) se sont eux intéressés à l'expression des gènes dans le muscle (*pectoralis major*) de canards Pékin et Barbarie et ont démontré une surexpression de la FAS chez le canard commun.

Cependant, peu d'études se sont intéressées aux différences d'expression des gènes entre les trois types génétiques de palmipèdes à savoir Pékin, Barbarie et leur hybride le mulard. Notamment, une question reste en suspens à savoir la part occupée par le retour des lipides non captés par les tissus périphériques revenant au foie et qui pourrait contribuer en partie au développement de la stéatose hépatique.

Cette thèse s'inscrit tout d'abord dans la compréhension des mécanismes généraux du développement de la stéatose hépatique au niveau de l'expression des gènes de la lipogenèse, de l'exportation et du captage des lipides en périphérie mais surtout aux récepteurs des lipoprotéines permettant le retour des lipides au foie. La première partie de ce manuscrit s'intéresse particulièrement à l'étude de ces mécanismes chez les trois types génétiques : Pékin, Barbarie et mulard. La seconde étude s'intéresse à la cinétique d'expression postprandiale des différents gènes impliqués dans les métabolismes glucidique et lipidique après le dernier repas de la période de gavage. Cette étude ayant pour objectif de déterminer le profil d'expression de chaque gène d'intérêt après un repas.

L'ensemble de ces études a pour but de mieux comprendre les mécanismes de mise en place de la stéatose hépatique chez le palmipède gavé. A long terme, une sélection des animaux exprimant un ou plusieurs facteurs favorables à un développement optimal et rapide du foie gras pourrait être envisagée afin d'améliorer le rendement en gavage.

Ce manuscrit se compose d'une étude bibliographique abordant les travaux précédents ainsi que les différents aspects étudiés. Une seconde partie présentera les principaux matériels et méthodes utilisés pour l'obtention des résultats, lesquels seront présentés à la suite sous forme d'articles. Enfin, une dernière partie discutera des résultats obtenus avant de conclure et d'évoquer les perspectives de ce travail.

Etude bibliographique

I. Modèles d'étude

Cette thèse s'est portée sur l'étude de trois types génétiques de palmipèdes afin d'évaluer les différentes réponses au gavage et d'en comprendre les mécanismes. Nous avons donc utilisé le canard de Barbarie (*Cairina moschata*), le canard commun dit aussi canard Pékin (*Anas platyrhynchos*) et leur hybride stérile issu d'un croisement entre un mâle de Barbarie et une cane Pékin, le mulard (Figure 1). Le canard de Barbarie et le canard Pékin n'appartiennent pas au même genre, le premier fait partie du genre *Cairinini*, le second du genre *Anas* et bien qu'appelé tous deux canards ils divergent phylogénétiquement de plusieurs millions d'années (Gonzalez et al., 2009) entraînant une infertilité de leur hybride.

I. 1. *Cairina moschata*

Cairina moschata ou canard de Barbarie est un oiseau originaire d'Amérique centrale et du nord de l'Amérique du sud, il a été amené en Europe par les Espagnols au XVIème siècle. C'est un canard qui niche dans les arbres pour se protéger des serpents, faculté qu'il a conservée. C'est un canard facile à élever et très résistant.

Dans la production de foie gras, le canard de Barbarie est le seul à bénéficier de l'appellation IGP « canard à foie gras du sud-ouest » avec le canard mulard. Les canards de Barbarie ont une forte aptitude de réponse au gavage et présentent un poids de foie élevé (>500g) après deux semaines de gavage (Baeza et al., 2005). Le canard de Barbarie présente également les poids et proportions de muscle par rapport au poids vif les plus importants en comparaison avec d'autres génotypes de canard (Baeza et al., 2005).

I. 2. *Anas platyrhynchos*

Le canard commun ou canard Pékin est un canard robuste et bon reproducteur, la cane peut produire jusqu'à 230 œufs sur 40 semaines. Il est issu du canard colvert dont il existe 7 sous espèces. Ses ailes ne lui servent qu'à planer car il est trop lourd pour voler. C'est un canard originaire de Chine où il est élevé depuis 2500 ans avant Jésus Christ, il a ensuite été amené en Europe et aux États-Unis au XIXème siècle. Il est très apprécié de par sa croissance rapide pour la production de viande essentiellement en Chine. En France, les canes Pékin sont principalement utilisées comme mères pour l'obtention du canard mulard.

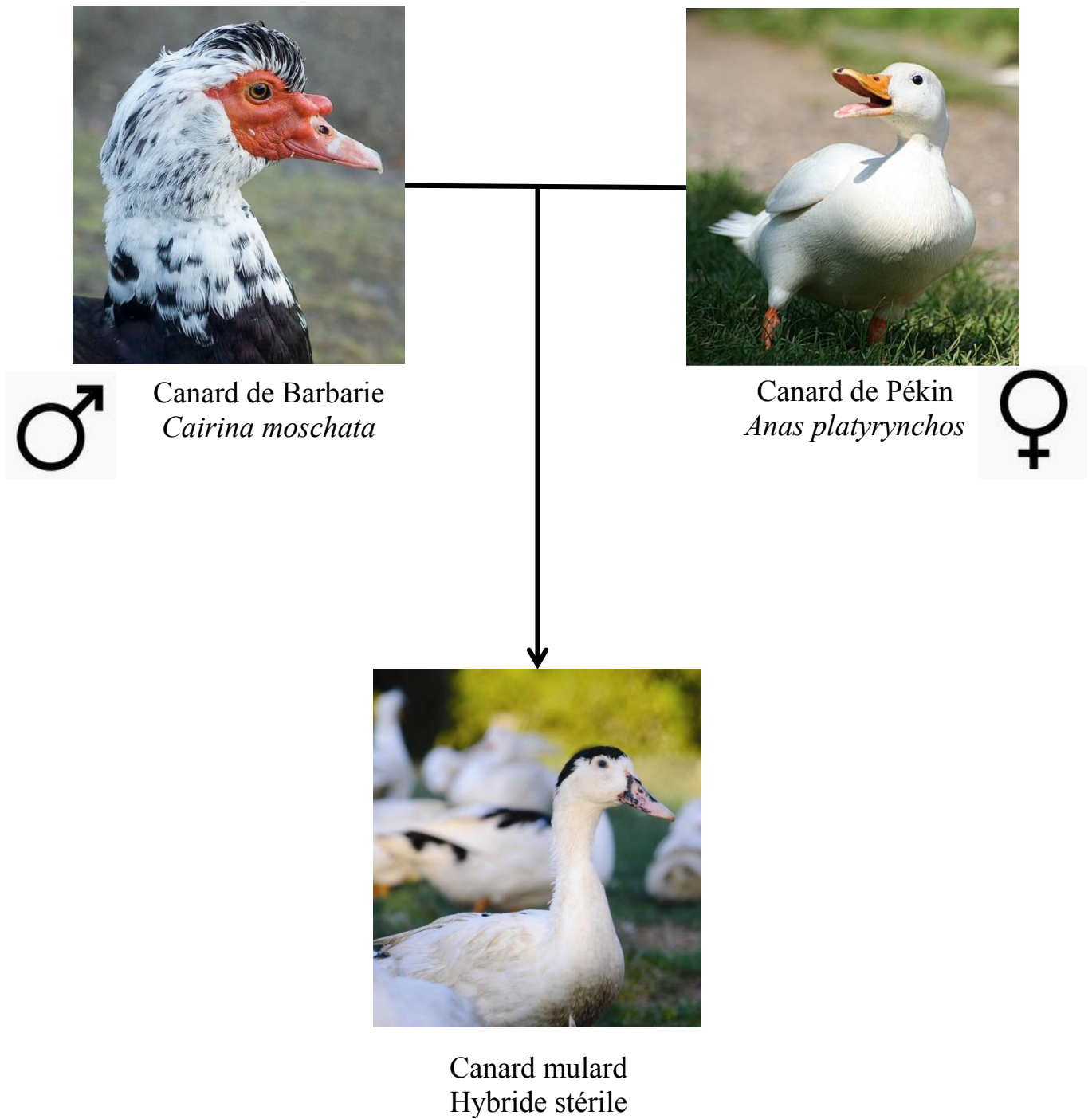


Figure 1. Types génétiques utilisés pendant la thèse

Les canards Pékin ne sont pas utilisés en gavage. En effet, ceux-ci présentent une faible aptitude au gavage et le stockage des lipides synthétisés se fait essentiellement dans les tissus périphériques tels que le gras sous-cutané (GSC) (Chartrin et al., 2006a).

I. 3. Le canard mulard

Le canard mulard est un hybride stérile au vu de la divergence phylogénétique trop lointaine entre la cane Pékin et le canard de Barbarie. Le croisement inverse, mâle Pékin et femelle Barbarie, permet, lui, d'obtenir un canard, également stérile, appelé hinny. Le hinny se rapproche des performances zootechniques du canard de Barbarie (Larzul et al., 2006) avec des poids de foie équivalents. De plus, la cane Pékin produit plus d'œufs à l'année que la cane Barbarie, c'est pourquoi le mulard est préféré. Sa production nécessite donc le maintien des deux lignées parentales. Seuls les canards mulards mâles sont utilisés dans la production de foie gras pour l'obtention de l'IGP. La carcasse est valorisée en magret et confit.

Le canard mulard bénéficie d'un effet d'hétérosis en couplant les caractères génétiques favorables de ses deux parents, ainsi, en gavage, le canard mulard présente les plus grands poids de foie (Baeza et al., 2005).

II. Le gavage

La découverte de la faculté des palmipèdes à faire du foie gras remonte à l'Égypte antique. En effet, en vue de préparer leur migration, les oies sauvages augmentaient leurs *ingesta* entraînant un engraissement hépatique important. Les égyptiens en abattant ces oiseaux et dégustant leur foie, se sont mis à mimer le phénomène en gavant les oies. La pratique a été ramenée en France par les Romains ("Le Foie Gras - Magazine officiel du Foie Gras," n.d.).

Le gavage se base donc sur un processus naturel et réversible acquis par les oiseaux en vue de longues migrations. Il permet d'accentuer les mécanismes physiologiques acquis pour la production de foie gras. Les animaux sont traditionnellement gavés sur 2 semaines (10 jours minimum, au rythme de 2 repas par jour) à partir de l'âge de 12 semaines environ (81 jours pour les canards mulards et 82 jours pour les canards de Barbarie).

Les repas sont quasi exclusivement composés de glucides sous la forme de maïs (grain entier et farine) et sont au minimum au nombre de 20, étalés sur les 10 jours de la période de gavage ("IGP Canard à foie gras du Sud Ouest," n.d.). Les repas pèsent aux environs de 300g en début de gavage et augmentent progressivement jusqu'à 600-700g à la fin du gavage. Cette progression dans l'augmentation des repas va activer la lipogenèse et conduire à la stéatose hépatique ainsi qu'à une augmentation du foie par 8 sur la période de gavage (Hermier et al., 1994). Il faut environ 8kg de maïs pour produire un foie gras de 550g.

Le gavage fait l'objet de plus en plus d'encadrement légal à cause d'une pratique sujette à de nombreuses controverses. Les recherches vont donc dans le sens d'améliorer le bien-être des animaux et de limiter la durée, le nombre des repas et/ou leur quantité. De fait, depuis le 1^{er} Janvier 2016, les canards sont gavés non plus en cages individuelles mais en cages collectives afin de leur assurer un meilleur bien-être. De plus, des recherches ont été menées sur une possible alternative au gavage qui consisterait à diminuer la durée des photopériodes après une période de restriction alimentaire en libérant les animaux sur une alimentation majoritairement composée de maïs et *ad libitum* sur une longue durée (Guy et al., 2014). Les oies issues de cette étude ont présenté un poids de foie augmenté de 95 à 514 g entre les semaines 19 et 31 et un pourcentage de lipides de près de 50%. Cependant, la variabilité individuelle est énorme et le coefficient de variation du poids du foie est de 45% à 31 semaines. Des études sont donc en cours afin de mieux comprendre les mécanismes de cet engraissement spontané.

III. Le métabolisme des oiseaux

Les voies métaboliques observées chez les mammifères sont, dans l'ensemble, les mêmes que celles des oiseaux. Il existe cependant des différences essentielles. Ainsi, le site principal de la lipogenèse aviaire est le foie (Léveillé et al., 1975) à l'inverse des porcs ou rongeurs où la synthèse des lipides a lieu dans le foie et le tissu adipeux (Hanson and Ballard, 1967; Mourot and Kouba, 1999).

De plus certains transporteurs ou enzymes peinent encore à être retrouvés chez les oiseaux. L'existence de la glucokinase (GK), catalysant la phosphorylation du glucose dès son entrée dans la cellule, a longtemps été controversée chez les oiseaux.

Des études ont démontré son absence (Niemeyer et al., 1975) mais les techniques modernes de biologie moléculaire ont permis de détecter un fragment d'ADN comportant de fortes homologues de séquence avec la GK des mammifères ainsi qu'une activité de type GK-like (Berradi et al., 2005).

III. 1. Le métabolisme glucidique

Les oiseaux présentent une glycémie basale jusqu'à deux fois plus élevée que celle des mammifères atteignant des valeurs comprises entre 1.90g/L et 2.20g/L (Farhat and Chavez, 2000; Hazelwood and Lorenz, 1959), le jeûne exerçant peu d'effet sur sa variation. Les oiseaux semblent insulino-résistants présentant des valeurs de glycémie stables suite à une exposition à l'insuline ou bien des hypoglycémies modérées induites par des expositions à des doses d'insuline supraphysiologiques (Chida et al., 2000; Tokushima et al., 2005). La glycémie est sous le contrôle de deux hormones pancréatiques, l'une hypoglycémisante : l'insuline, l'autre au rôle inverse : le glucagon.

III. 1. 1. Digestion et absorption du glucose

L'aliment de gavage est composé à plus de 90% de maïs lui-même composé à 75,4% MS d'amidon (FranceAgriMer, 2016). Cet amidon va être hydrolysé en molécule de glucose par les enzymes pancréatiques et intestinales telles que les amylases, maltases et isomaltases et être absorbé par les cellules intestinales. Chez la volaille, environ 97% de l'amidon de maïs est digéré.

Le principal transporteur de glucose au niveau intestinal est SGLT1 (Sodium Glucose Like Transporter 1). SGLT1 co-transporte le glucose avec le sodium avec une forte affinité au niveau apical des cellules intestinales (Garriga et al., 1999). Il est donc responsable de l'absorption du glucose dans les cellules intestinales. L'expression du gène SGLT1 est la plus forte dans le jejunum (Gilbert et al., 2008). Du côté baso-latéral, le transport du glucose est sodium-indépendant et ce sont les transporteurs de glucose appelés GLUT qui vont se charger de faire sortir le glucose de la cellule intestinale afin que ce dernier passe dans le sang. C'est notamment l'isoforme GLUT2 (Garriga et al., 1997) qui va permettre ce transport.

III. 1. 2. Les transporteurs de glucose chez l'oiseau

Jusqu'à aujourd'hui, quatorze isoformes de transporteurs de glucose (GLUT) ont été identifiées chez les mammifères et sont exprimées de façon tissu-spécifique (Tableau 1) (Karim et al., 2012). A ce jour, seuls les gènes codant pour les isoformes 1, 2, 3, 8, 9 et 12 sont caractérisés chez l'oiseau (Coudert et al., 2015; Kono et al., 2005; Seki et al., 2003).

GLUT1 a été le premier transporteur de glucose caractérisé (Mueckler et al., 1985). Il est exprimé de façon constitutive dans tous les tissus et permet le transport basal du glucose essentiel à chaque cellule. Il est, de plus, particulièrement exprimé dans les cellules constituant la barrière hémato-encéphalique (Maher et al., 1994). Chez l'oiseau, l'expression de GLUT1 a été détectée aussi bien dans le muscle, le cerveau, le foie ou encore le tissu adipeux (Kono et al., 2005; Sweazea and Braun, 2006). Il présente 95% de similarité avec la forme retrouvée chez les mammifères (Wagstaff et al., 1995).

Tableau 1. Distribution des différentes isoformes de GLUT chez le mammifère.

(C: Co-transport; E: Echangeur; F: transporteur facilité; O: transporteur orphelin. D'après Mueckler and Thorens, 2013)

Human gene name	Protein name	Aliases	Predominant substrates	Transport type/ coupling ions ^a	Tissue distribution and cellular/ subcellular expression
SLC2A1	GLUT1		Glucose, galactose, mannose, glucosamine	F	Erythrocytes, brain, blood-brain barrier, blood-tissue barrier, many fetal tissues
SLC2A2	GLUT2		Glucose, galactose, fructose, mannose, glucosamine	F	Liver, islet of Langerhans, intestine, kidney, brain
SLC2A3	GLUT3		Glucose, galactose, mannose, xylose	F	Brain (neurons), testis
SLC2A4	GLUT4		Glucose, glucosamine	F	Adipose tissue (white and brown), skeletal and cardiac muscle
SLC2A5	GLUT5		Fructose	F	Small intestine, kidney
SLC2A6	GLUT6	GLUT9	Glucose	F	Brain, spleen, leucocytes
SLC2A7	GLUT7		Glucose, fructose	F	Small intestine, colon, testis, prostate
SLC2A8	GLUT8	GLUTX1	Glucose, fructose, galactose	F	Testis, brain, adrenal gland, liver, spleen, brown adipose tissue, lung (intracellular)
SLC2A9	GLUT9	GLUTX, URATv1	Urate (glucose, fructose)		Kidney, liver, small intestine, placenta, lung and leucocytes
SLC2A10	GLUT10		Glucose, galactose	F	Heart, lung, brain, liver, skeletal muscle, pancreas, placenta and kidney
SLC2A11	GLUT11	GLUT10	Glucose, fructose	F	Heart, muscle
SLC2A12	GLUT12	GLUT8	Glucose	F	Heart, prostate, skeletal muscle, placenta
SLC2A13	HMIT	GLUT13	myo-inositol	C/H ⁺	Brain, adipose tissue
SLC2A14	GLUT14	SLC2A3P3		O	Testis

GLUT2 est présent dans la membrane baso-latérale des cellules intestinales (Thorens et al., 1990) mais aussi dans la membrane des hépatocytes ou des îlots pancréatiques (Guillam et al., 2000). Chez le poulet, GLUT2 est prédominant dans le foie en plus de son expression dans le jejunum (Garriga et al., 1997; Humphrey et al., 2004). Il est également retrouvé dans le rein où il pourrait jouer un rôle dans la réabsorption du glucose (Kono et al., 2005). C'est une isoforme à faible affinité mais forte capacité pour le transport du glucose à l'inverse des GLUT1 et 3 (Mueckler, 1994). Les souris invalidées pour l'isoforme GLUT2 présentent un diabète précoce résultant d'un dysfonctionnement au niveau de la réponse insulinaire au glucose (Guillam et al., 1997). Chez le poulet, il a été démontré que les lignées à poids élevés sur-exprimaient GLUT2 (Zhang et al., 2013).

La localisation de l'ARNm de GLUT3 est assez ubiquitaire chez l'homme bien que sa protéine ne soit retrouvée que dans le cerveau ou les testicules (Uldry and Thorens, 2004). Chez l'oiseau, son expression a été retrouvée dans le muscle, le rein et le cerveau (Sweazea and Braun, 2006).

GLUT8 a été caractérisé comme largement exprimé dans des tissus comme le cœur, le rein, le foie ou encore le muscle (Doerge et al., 2000). Il a, de plus, été mis en évidence comme étant responsable de l'entrée du glucose dans le blastocyste sous l'effet de l'insuline (Carayannopoulos et al., 2000) et pourrait se substituer aux fonctions de GLUT4 chez des souris invalidées pour ce récepteur (Katz et al., 1995). Chez l'oiseau, l'expression la plus importante de GLUT8 est retrouvée dans le tissu adipeux et le rein (Kono et al., 2005) et dans une moindre mesure dans le muscle, le foie et le tissu adipeux (Seki et al., 2003).

GLUT9 a été mis en évidence chez l'homme en 2000 (Phay et al., 2000) et présente la plus forte homologie de séquence avec GLUT5 (44%) qui est un transporteur de fructose. Il est présent dans de nombreux tissus sous la forme de deux variants alternatifs (Augustin et al., 2004). GLUT9 a d'abord été identifié comme un transporteur de glucose et / ou fructose, cependant, certaines publications n'ont pas démontré une grande activité de transport de ses sucres mais plutôt un transport d'acide urique avec une forte capacité (Bibert et al., 2009; Caulfield et al., 2008).

GLUT12 a été décrit dans les cellules de cancer du sein (Rogers et al., 2002) mais aussi dans les cellules musculaires squelettiques (Stuart et al., 2009) où sa translocation membranaire semble être sous le contrôle de l'insuline. Chez le poulet, Coudert et al. (Coudert et al., 2015) ont démontré que GLUT12 pourrait agir comme un transporteur de glucose sensible à l'insuline dans le muscle, cependant ce transporteur chez l'oiseau présente des conformations particulières pouvant expliquer sa faible sensibilité.

Alors que le transporteur de glucose GLUT4 apparaît comme le transporteur insulino-dépendant de référence chez les mammifères, celui-ci n'a pas été retrouvé chez les oiseaux (Seki et al., 2003). Chez les mammifères, il est retrouvé principalement dans les cellules musculaires et les adipocytes. Il va être transloqué vers la membrane plasmique sous l'action de l'insuline afin de permettre l'entrée du glucose dans la cellule (Nystrom and Quon, 1999). Son invalidation spécifique dans le muscle et le tissu adipeux chez la souris semble conduire le foie à capter davantage de glucose conduisant ainsi à une augmentation de la production de triglycérides suivie de leur exportation (Kotani et al., 2004).

III. 1. 2. L'utilisation du glucose

Dès son entrée dans la cellule, le glucose va subir une série de réactions enzymatiques appelée « glycolyse ». La glycolyse est l'unique voie du catabolisme du glucose chez tous les organismes, y compris les oiseaux. Cette voie regroupe un ensemble d'activités enzymatiques qui, à partir d'une molécule de glucose, va permettre la production de 2 molécules de pyruvate qui seront, après leur métabolisation dans le cycle de Krebs, à l'origine d'énergie sous forme d'ATP (Figure 2). La glycolyse a lieu dans le cytoplasme.

Le glucose est donc immédiatement phosphorylé par une enzyme appelée hexokinase (HK) pour être transformé en glucose-6-phosphate (G6P) et ne pourra ressortir de la cellule sous cette forme. Les hexokinases catalysent la première réaction de la glycolyse. Quatre isoenzymes (HK-I à IV) sont connues chez les vertébrés, toutes codées par des gènes différents. HK-1, -II et -III présentent une forte affinité pour le glucose et une inhibition par leur produit (le G6P) (Printz et al., 1993). En revanche, HK-IV possède une faible affinité pour le glucose et son activité n'est pas inhibée par la présence de G6P, son gène, de plus petite taille ne possède pas de domaine régulateur.

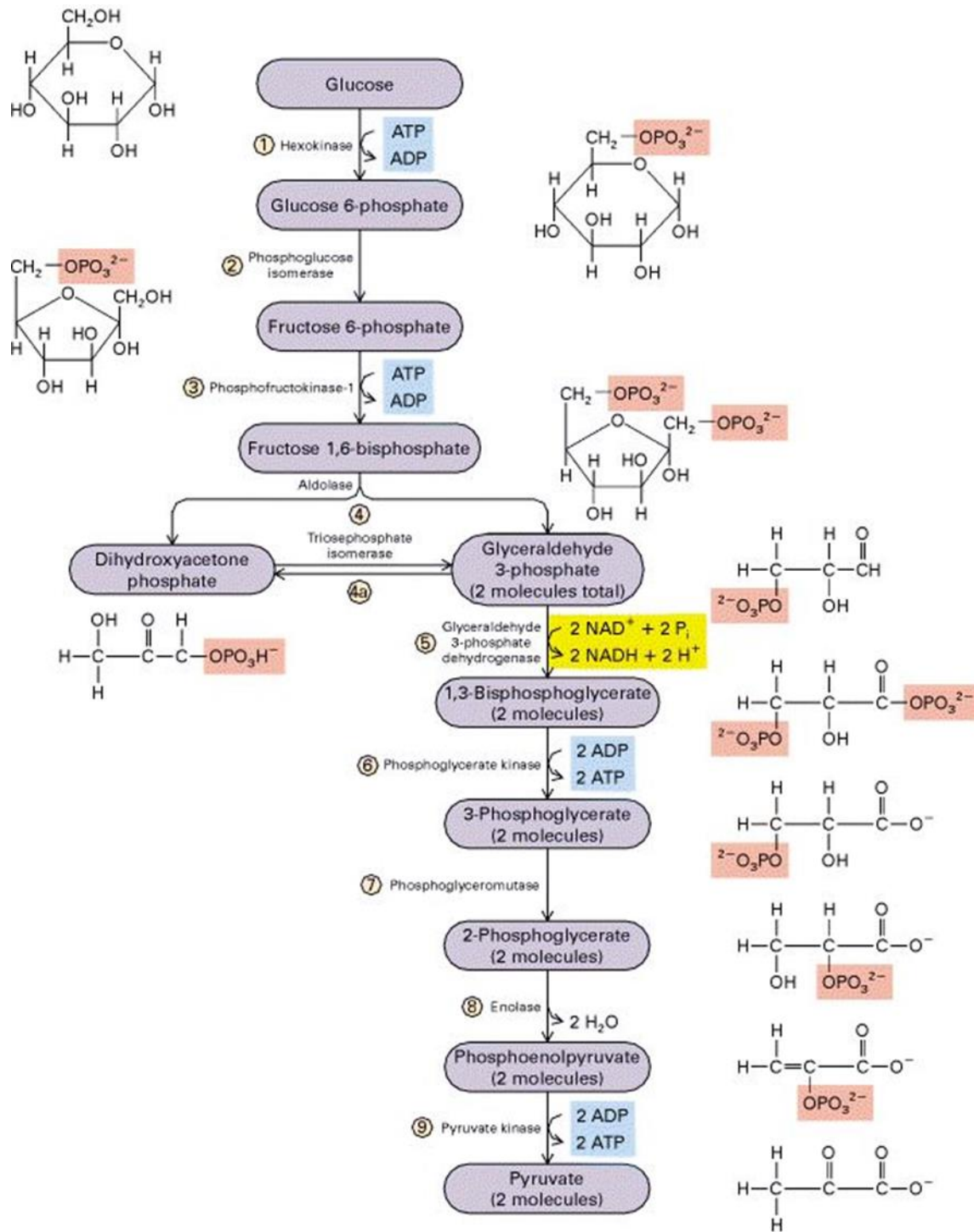


Figure 2. Réactions enzymatiques de la voie de la glycolyse.

ADP: Adénosine Di-Phosphate, ATP: Adénosine tri-Phosphate, NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide

http://aristote.datacenter.dsi.upmc.fr/disc/docs_Anim/Analyse_Molecules.htm

L'existence de l'isoforme IV, autrement appelée glucokinase (GK) est encore controversée chez l'oiseau bien qu'une activité enzymatique de type « GK-like » ait été détectée (Berradi et al., 2004) et serait notamment induite par le gavage chez le mulard. En effet, bien qu'à l'époque le génome du poulet n'ait pas été totalement séquencé, Berradi et al. (Berradi et al., 2005) ont réussi à détecter un fragment d'ADNc présentant une forte homologie de séquence (80%) avec la glucokinase humaine.

Une fois formé, le G6P va ensuite être catalysé par la phosphoglucoisomérase en fructose-6-phosphate, lequel est alors phosphorylé en fructose-1,6-bisphosphate par la 6-phosphofructose-1-kinase (6PF1K), seconde enzyme clé de la glycolyse. La pyruvate kinase (PK) est la troisième enzyme clé de la glycolyse, elle catalyse la dernière étape, à savoir, la transformation du phosphoénolpyruvate en pyruvate. Chez le poulet, la pyruvate kinase hépatique n'a pas été détectée à l'inverse de l'isoforme musculaire (Strandholm et al., 1943).

Le pyruvate va alors être transformé en Acétyl Coenzyme A (CoA) par le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH) dans la matrice mitochondriale. Cet Acétyl CoA va ensuite entrer dans le cycle de Krebs (Figure 3) afin de former des co-facteurs tels que le Nicotinamide Adénosine Diphosphate (NAD) qui serviront à produire de l'énergie par la chaîne respiratoire. L'Acétyl CoA peut également servir de substrat dans la lipogenèse *de novo* (DNL) pour la synthèse des lipides et des acides gras.

III. 2. Le métabolisme des lipides

Les lipides constituent une source principale d'énergie et sont stockés en vue de couvrir les besoins énergétiques de l'individu. La majorité des lipides n'est pas apportée par l'alimentation mais par un processus intracellulaire de fabrication des lipides appelé la lipogenèse *de novo* (DNL). Chez les oiseaux, la DNL s'effectue principalement dans les hépatocytes (Saadoun and Leclercq, 1986).

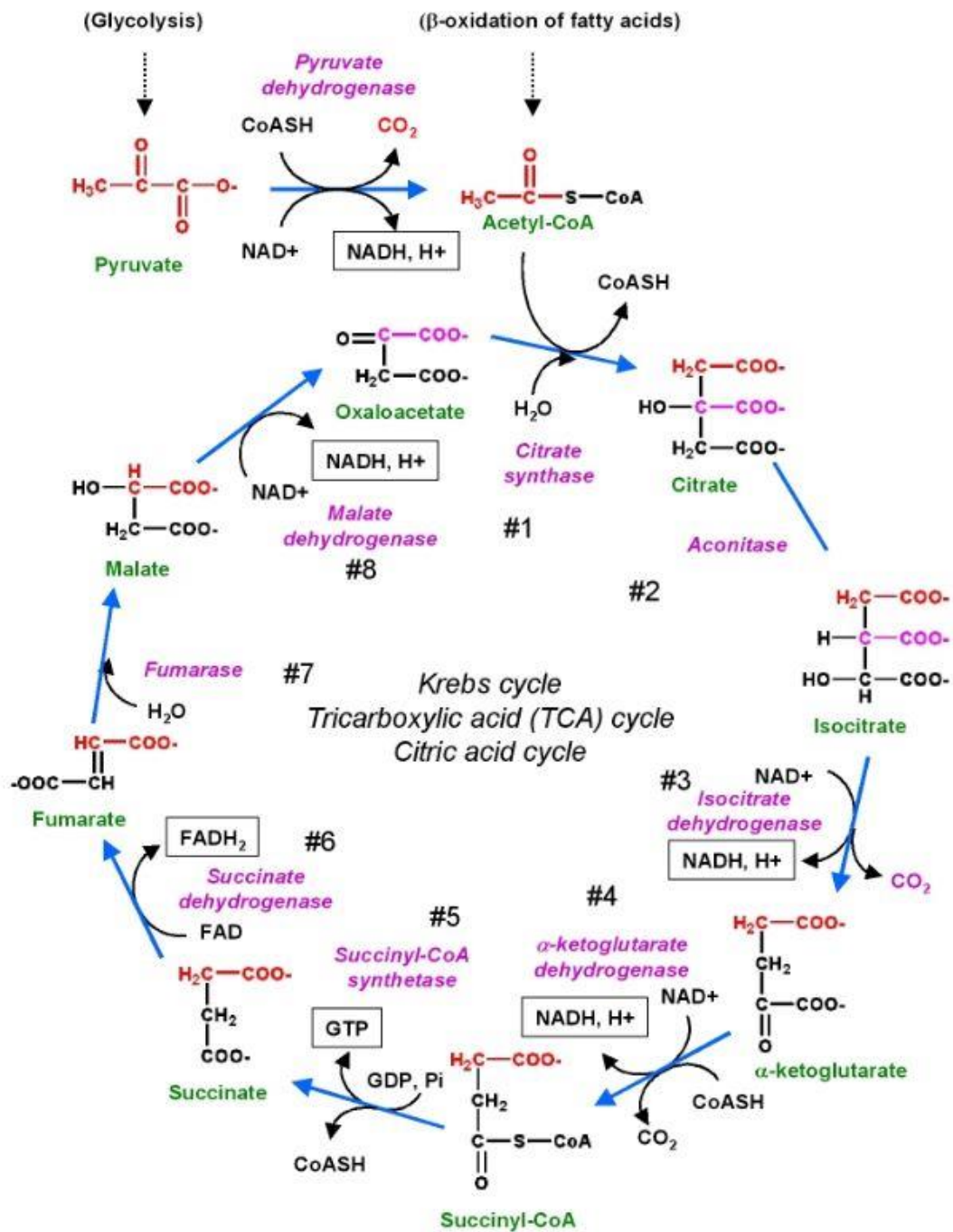


Figure 3. Réactions enzymatiques du cycle de Krebs.

GTP : Guanosine Tri-Phosphate, NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide, FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

http://chem.libretexts.org/Core/Biological_Chemistry/Metabolism/Kreb's_Cycle

III. 2. 1. La lipogenèse *de novo*

Chez les mammifères, la lipogenèse *de novo* a lieu dans le foie et le tissu adipeux. Chez les oiseaux, celle-ci se déroule essentiellement dans le foie (Léveillé et al., 1975). L'activité lipogénique est hautement liée à l'apport alimentaire, elle augmente lorsque l'apport calorique dépasse les besoins énergétiques et conduit ainsi à la mise en réserve des surplus nutritionnels sous la forme de triglycérides. Les mécanismes biochimiques de la synthèse des lipides restent cependant comparables. Le principe consiste à convertir les chainons carbonés issus du catabolisme des glucides en acides gras. La synthèse des acides gras (AG) se fait à partir de l'Acétyl CoA directement issu de la glycolyse ou de la transformation du citrate par l'ATP citrate Lyase (ACLY) à la sortie du cycle de Krebs. La lipogenèse se déroule dans le cytoplasme.

La première étape de la lipogenèse consiste donc en la transformation de l'Acétyl CoA en Malonyl CoA par l'Acétyl CoA Carboxylase (ACC ou ACX). Ce Malonyl CoA va alors être pris en charge par la Fatty Acid Synthase (FAS) pour former des AG. Le palmitate (C16 :0) ainsi obtenu va subir l'action d'une élongase, l'Elongation of very long chain fatty acids protein 6 (Elovl 6), qui va allonger les chaînes hydrocarbonées afin d'obtenir des AG à longues chaînes comme l'acide stéarique (C18 : 0). L'acide stéarique ainsi formé va pouvoir être désaturé par la Stéaroyl CoA Désaturase 1 (SCD1) en acide palmitoléique (C18 : 1) un AG mono-insaturé (AGMI).

Les AG ainsi formés vont pouvoir servir de substrat énergétique à la cellule ou être exportés vers d'autres tissus.

III. 2. 2. La beta oxydation

Les AG, néosynthétisés ou alimentaires, vont pouvoir également servir de substrat énergétique à la cellule, ils vont alors être oxydés (Figure 4). La β -oxydation constitue la principale voie de dégradation des acides gras et a lieu principalement dans la matrice mitochondriale. Il s'agit d'une voie très active en période de jeûne, notamment lorsque la lipolyse (c'est-à-dire l'hydrolyse de triglycérides en acides gras et glycérol à partir du tissu adipeux) est intense et libère de grandes quantités d'AG libres dans le sang.

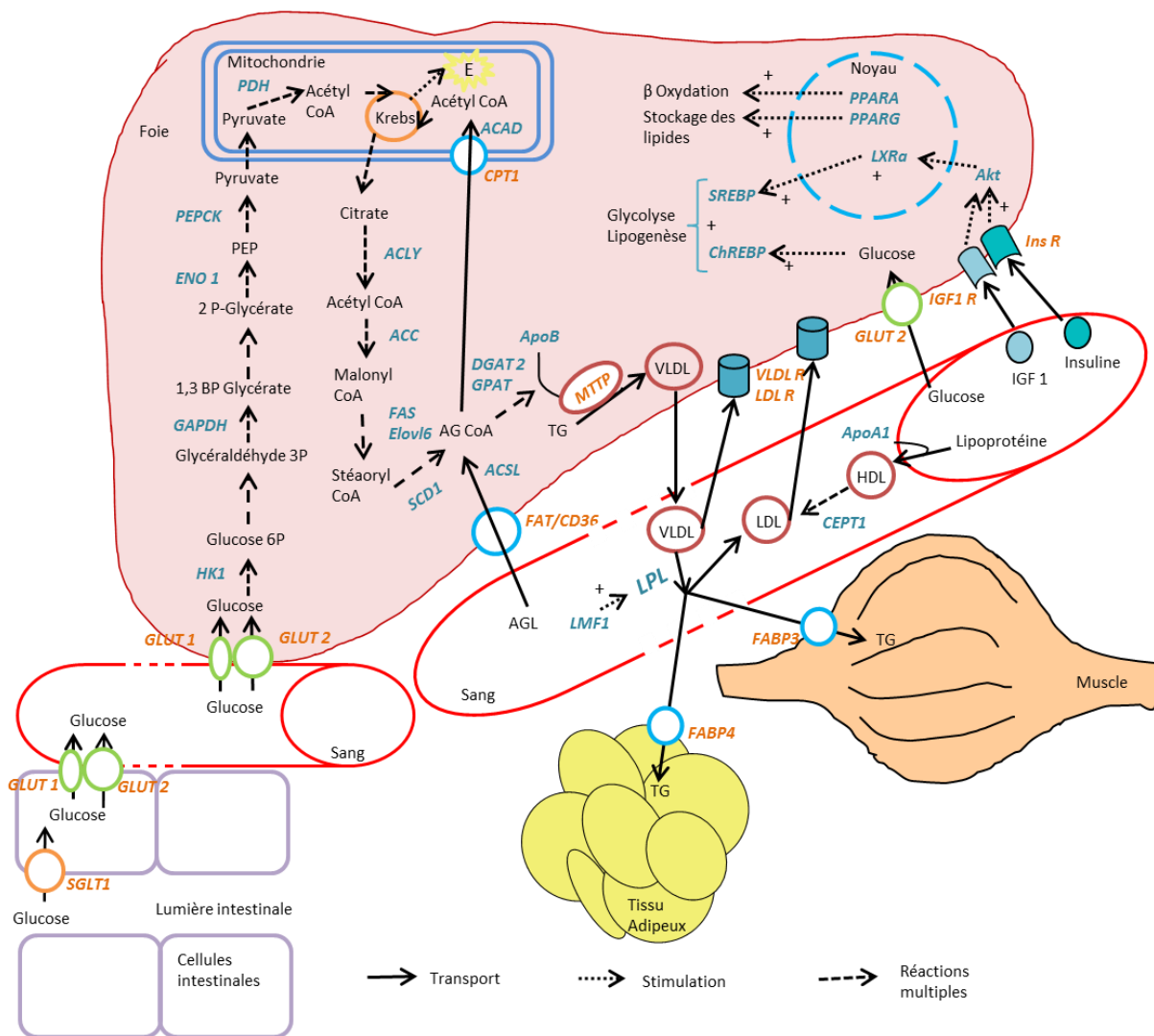


Figure 4. Métabolisme des glucides et des lipides.

ACAD : Acyl-CoA Dehydrogenase; **ACC** : Acetyl CoA Carboxylase; **ACLY** : ATP Citrate lyase; **ACSL** : Acyl CoA Synthetase Long chain; **Akt** : Akt / protein kinase B; **ApoAI** : Apolipoprotein AI; **ApoB** : Apolipoprotein B; **CEPT1** : Cholesteryl Ester Transfer Protein 1; **ChREBP** : Carbohydrate Response Element Binding Protein; **CPT1** : Carnitine Palmitoyl Transferase 1; **DGAT2** : Diacylglycerol AcylTransferase 2; **Elavl6** : Elongation of very long chain fatty acids protein 6; **ENO1** : Enolase 1; **FA** : Fatty Acid; **FABP** : Fatty Acid Binding Protein; **FAS** : Fatty Acid Synthase; **FAT/CD36** : Fatty Acid Transporter/Cluster of differentiation 36; **FAA** : Free Fatty Acid; **GAPDH** : Glyceraldehyde 3 Phosphate DeHydrogenase; **GLUT** : Glucose Transporter; **GPAT** : Glycerol-3-Phosphate AcylTransferase; **HDL** : High Density Lipoprotein; **HK1** : HexoKinase 1; **IGF1** : Insulin like Growth Factor; **InsR** : Insulin Receptor; **LDLR** : Low Density Lipoprotein Receptor; **LMF1** : Lipase Maturation Factor 1; **LPL** : Lipoprotein Lipase; **LXRA** : Liver X Receptor Alpha; **MTTP** : Microsomal Triglyceride Transfer Protein; **PDH** : Pyruvate DeHydrogenase; **PEPCK** : PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase; **PPARA/G** : Peroxysome Proliferator-Activated Receptor Alpha/Gamma; **SGLT1** : Sodium Glucose Linked Transporter 1; **TG** : Triglyceride; **VLDLR** : Very Low Density Lipoprotein Receptor.

Elle consiste en une succession de réactions au cours desquelles les AG sont découpés progressivement en molécules d'Acétyl CoA. La β -oxydation débute dans le cytoplasme, au niveau de la membrane externe mitochondriale, par l'activation des AG en Acyl CoA. Les Acyl CoA à chaîne courte (< à 6 carbones) et moyenne (> à 12 carbones) diffusent simplement au travers des membranes mitochondriales externe et interne, contrairement aux Acyl CoA à chaîne longue (> à 20 carbones) qui nécessitent un système de transport pour traverser les deux membranes mitochondriales. Ce système de transport est composé de 3 protéines. Il s'agit d'un complexe enzymatique rassemblant la Carnitine Palmitoyl Transferase 1 (CPT1), la Carnitine Acyl-Carnitine Translocase (CACT) et par la Carnitine Palmitoyl Transferase 2 (CPT2). La CPT1 est considérée comme l'enzyme limitante de la β -oxydation mitochondriale dans le foie (Eaton, 2002) et est inhibée, chez les mammifères, par le Malonyl CoA (McGarry and Brown, 1997). La β -oxydation va donc se dérouler dans la matrice mitochondriale sous l'action de diverses enzymes (comme l'Acyl-CoA Dehydrogenase ACAD) pour libérer des cofacteurs utilisables par la chaîne respiratoire dans la production d'énergie.

III. 2. 3. Le transport et l'exportation des lipides

Les AG vont également pouvoir être estérifiés en triglycérides (TG) *via* l'action successive d'enzymes. Parmi celles-ci, la Glycérol-3-Phosphate Acyl tranférase (GPAT) ou la DiacylGlycérol O-Acyl tranférase 2 (DGAT2) qui vont permettre de créer une liaison ester entre un alcool et un AG. Les TG ainsi formés vont alors constituer la majorité des lipides stockés lors de la stéatose (Fernandez et al., 2011). Les TG vont alors être intégrés dans la formation des lipoprotéines, essentiellement des Very Low Density Lipoprotein (VLDL), en vue de leur exportation. En effet, chez l'oiseau, à la différence des mammifères, les lipoprotéines sont préférées aux AG libres pour le transport des lipides (Weber, 2009).

Il existe différentes formes de lipoprotéines classées par ordre croissant de leur teneur en TG : High Density Lipoprotein (HDL), Low DL (LDL), Intermediate DL (IDL) et Very Low DL (VLDL). De plus, chez les oiseaux, en raison d'un système lymphatique intestinal peu développé, les lipoprotéines assemblées dans les entérocytes, dont le rôle est d'assurer le transport des lipides alimentaires, sont directement déversées dans la circulation porte et sont, de fait, appelées portomicrons (Bensadoun and Rothfield, 1972).

Leur composition (90% de TG) ainsi que leur taille sont très similaires à celles des chylomicrons des mammifères (Griffin et al., 1982). Les HDL et VLDL sont les deux classes de lipoprotéines qui sont synthétisées et sécrétées par le foie. De même, la fraction protéique de ces lipoprotéines, les apolipoprotéines, est également synthétisée par le foie. L'Apolipoprotéine B (ApoB) et l'ApoAI sont les constituants protéiques majeurs des VLDL et HDL (respectivement) chez le poulet (Banerjee and Redman, 1983; Siuta-Mangano et al., 1982). Les TG vont donc tout d'abord être pris en charge par la Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTTP) au sein du réticulum endoplasmique qui va les amener jusqu'au site d'assemblage des lipoprotéines. Là, les TG vont être liés à l'Apolipoprotéine B (ApoB) qui constitue une partie de l'enveloppe hydrophile des lipoprotéines et ainsi permet leur exportation *via* le système sanguin.

III. 2. 4. Le captage des lipides en périphérie

Les VLDL libérés dans le sang vont être hydrolysés par la Lipoprotéine Lipase (LPL). La LPL est une enzyme lipolytique synthétisée par les cellules parenchymateuses des tissus extra-hépatiques, en particulier les cellules adipeuses et musculaires. La LPL est ancrée à la surface des cellules endothéliales des capillaires des tissus périphériques par des groupements Héparane Sulfate Protéoglycanes (HSPG) (Wang and Eckel, 2009) et hydrolyse les TG des VLDL en AG libres et glycérol. Les acides gras libres sont alors soit stockés par le tissu adipeux soit utilisés par les tissus périphériques comme source d'énergie, soit réutilisés pour la synthèse hépatique des VLDL. L'activité de la LPL est sous contrôle hormonal (hormones pancréatiques). Après action de la LPL, les IDL (Intermediate Density Lipoprotein), LDL (Low Density Lipoprotein (LDL) et les particules résiduelles seront captées par des récepteurs spécifiques (hépatiques et extra-hépatiques), internalisées par endocytose puis dégradées dans des vésicules lysosomales. De leur côté, les AG vont être captés par les tissus hépatiques et périphériques par des transporteurs d'AG spécifiques tels que les Fatty Acid Binding Protein (FABP) ou la Fatty Acid Translocase homologue de l'antigène CD36 (FAT/CD36) (Abumrad et al., 1998; Stahl, 2004). Les FABP ont d'abord été identifiés dans le foie de rat (Stremmel et al., 1985) et 12 isoformes ont été décrites (Liu et al., 2008). Chez le canard, la forme hépatique de FABP (Liver FABP) a également été retrouvée dans le muscle ou encore le tissu adipeux (He et al., 2013). Plus particulièrement, l'isoforme 4 a été démontrée comme surexprimée dans le muscle de canards Pékin gavés en comparaison des canards de Barbarie (G Saez et al., 2009).

FAT/CD36, quant à lui, a une expression hépatique basale faible mais qui augmente sous régime riche en graisses chez la souris et serait à l'origine de dyslipidémies (Koonen et al., 2007). Chez l'oiseau, FAT/CD36 a été démontré comme favorisant le transport de l'acide linoléique contribuant ainsi à un dépôt de lipides plus important dans le muscle (Guo et al., 2013). Enfin, ces transporteurs ont déjà été mis en lumière par des études s'intéressant à la migration des oiseaux. En effet, ces deux transporteurs présentent une surexpression ainsi qu'une abondance protéique augmentée lors des saisons migratoires dans le muscle (McFarlan et al., 2009; Weber, 2009). Ce phénomène permettrait ainsi aux oiseaux d'augmenter le captage des lipides.

III. 3. Régulation des métabolismes glucidique et lipidique

Les hormones jouent un rôle clé dans la régulation de la balance énergétique, certaines activant la voie anabolique pour le stockage, d'autres la voie catabolique pour la production d'énergie.

L'insuline intervient dans la régulation des métabolismes glucidique, lipidique et protéique et joue un rôle anabolique majeur au sein de l'organisme pour la mise en réserve et l'utilisation des substrats énergétiques (Saltiel and Kahn, 2001). Elle agit sur une grande majorité des tissus de l'organisme dont le foie et le muscle. L'insuline est plus particulièrement connue pour son implication dans le contrôle de la glycémie. Elle est l'hormone hypoglycémiante par excellence, sa production a lieu dans les îlots β pancréatiques et est stimulée par l'arrivée de glucose dans la circulation porte (Goodridge et al., 1986). Le maintien de l'homéostasie glucidique implique l'action simultanée de plusieurs tissus : le foie, le pancréas, le muscle et le tissu adipeux. Suite à un repas, la concentration élevée de sucres et d'acides aminés circulant induit une sécrétion d'insuline dans le sang. Dans la plupart des tissus, le glucose diffuse passivement au travers de la membrane par l'intermédiaire des pores formés de GLUT. En revanche, dans le muscle et le tissu adipeux, chez les mammifères, la captation du glucose est contrôlée par l'insuline qui stimule la translocation des transporteurs GLUT4 depuis les compartiments intracellulaires vers la membrane plasmique. L'insuline favorise également la glycogénogénèse, inhibe la glycogénolyse et la néoglucogénèse hépatiques, stimule la synthèse protéique et inhibe la protéolyse. Elle est aussi capable de stimuler la lipogénèse *de novo* (Bedu et al., 2002) et permet donc au glucose d'être stocké sous forme de TG.

Chez les mammifères, elle stimule notamment les enzymes clés des métabolismes glucidique et lipidique, comme la GK, l'ACC ou encore la FAS prenant ainsi part à la glycolyse et à la formation des AG (Niemeyer et al., 1975; Saltiel and Kahn, 2001). Dans le foie, l'insuline va alors se fixer sur son récepteur et induire un signal allant activer la translocation nucléaire d'un facteur de transcription appelé Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c (SREBP1c), lui-même activant la transcription des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse (Figure 5) (Dentin et al., 2005).

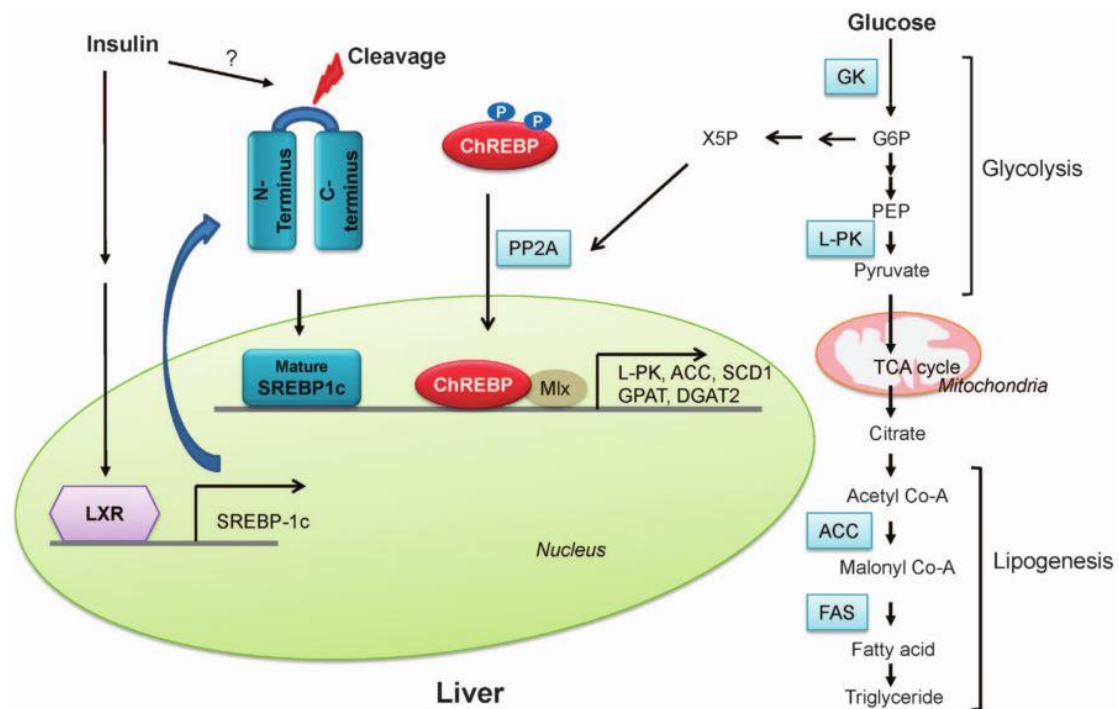


Figure 5. Régulation transcriptionnelle de la glycolyse et de la synthèse des lipides hépatiques.

(D'après Han et al. 2016)

ACC : Acétyl CoA Carboxylase, **ChREBP** : Carbohydrate Responsive Element Binding Protein, **DGAT2** : DiAcyl Glycerol Acyl Tranferase 2, **FAS** : Fatty Acid Synthase, **GK** : GlucoKinase, **GPAT** : Glycerol Phosphate Acyl Transferase, **G6P** : Glucose 6 Phosphate, **L-PK** : Liver Pyruvate Kinase, **LXR** : Liver X Receptor, **PEP** : PhosphoEnol Pyruvate, **PP2A** : Protein Phosphatase 2A, **SCD1** : Stearoyl CoA Desaturase, **SREBP-1c** : Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c, **X5P** : Xylulose 5 Phosphate

Récemment, l'insuline a été découverte comme ayant un rôle dans la clairance d'ApoB et donc dans la sécrétion des lipoprotéines (Haas et al., 2013). En effet, en physiologie basale, l'insuline entraîne une diminution d'expression de MTTP et d'ApoB, de même qu'une réduction de la lipolyse du tissu adipeux réduisant ainsi l'export d'AG vers le foie. Chez l'individu diabétique (présentant une hyperglycémie et une résistance à l'insuline, bien que la concentration de cette hormone soit augmentée), l'insuline ne supprime plus la lipolyse adipocytaire tout en continuant de stimuler la lipogénèse hépatocytaire. L'ensemble de ces phénomènes conduit à une hypertriglycéridémie et donc à une diminution de la clairance d'ApoB. Chez le poulet, en dépit de la concentration « normale » d'insuline plasmatique (3-4ng/mL), la glycémie reste très élevée (2g/L) (Hazelwood and Lorenz, 1959; Simon et al., 2011). Chez le canard gavé, les animaux présentent une hyperinsulinémie associée à une hyperglycémie bien qu'une résistance à l'insuline n'ait pas été mise en évidence (Gontier et al., 2013).

Le glucose peut également agir plus directement sur l'activation des gènes de la glycolyse ou de la lipogénèse. Ainsi, l'un des métabolites issu du cycle des pentoses phosphate, le Xylulose 5 Phosphate (X5P), va pouvoir activer la translocation nucléaire d'un facteur de transcription : Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) et induire l'expression de gènes cibles comme l'ACC ou la FAS (Figure 5) (Ishii et al., 2004; Kabashima et al., 2003).

Le glucagon est à l'inverse une hormone hyperglycémiant, il va mobiliser les stocks énergétiques afin de stimuler la production d'énergie (Gerich et al., 1976). Il est produit par les îlots α pancréatiques et est produit en réponse à une diminution de la glycémie lors d'un jeûne. Son effet étant inverse à celui de l'insuline, il va inhiber la lipogénèse et stimuler la glycolyse ou la β -oxydation afin de produire de l'énergie. De plus, les oiseaux, malgré le peu d'action de l'insuline exogène sur la glycémie, présentent une sensibilité élevée au glucagon (Léveillé et al., 1975). Cependant peu de données existent sur cette hormone en comparaison de l'insuline (Rideau, 2012).

En complément des hormones pancréatiques, d'autres hormones peuvent également réguler la balance énergétique. Parmi celles-ci, la leptine, codée par le gène *ob* (Zhang et al., 1994), indique au cerveau l'état des stocks énergétiques du tissu adipeux. La mutation du gène *ob* entraîne de sévères désordres conduisant à une obésité morbide (Farooqi et al., 1999).

Elle agit *via* son récepteur spécifique codé par le gène *db* (Tartaglia et al., 1995) pour inhiber la prise alimentaire et augmenter la dépense énergétique lorsque les stocks sont conséquents (Jéquier, 2002). La leptine est non seulement produite par le tissu adipeux, mais également par le muscle, le système nerveux central mais aussi l'estomac (Bado et al., 1998). Cependant, chez l'oiseau, son existence est encore sujette à discussion (Pitel et al., 2010; Sharp et al., 2008; Taouis et al., 1998; Wang et al., 2016) bien que son récepteur soit retrouvé (Dunn et al., 2000). Une autre adipokine peut agir sur la balance énergétique, il s'agit de l'adiponectine. Elle agit sur l'oxydation des AG et le captage du glucose circulant (Blum et al., 1990; Fruebis et al., 2001) *via* un mécanisme AMPK dépendant. Chez l'oiseau, et plus particulièrement le poulet, l'adiponectine a non seulement été détectée dans le tissu adipeux mais aussi dans d'autres tissus comme le muscle squelettique (Maddineni et al., 2005). Chez le poulet, son expression est négativement corrélée à l'expression de la FAS et au dépôt de lipides (Yan et al., 2014).

En opposition à la leptine, hormone anorexigène, on trouve la ghréline. Il s'agit d'une hormone produite par l'estomac capable de se lier au récepteur de l'hormone de croissance qui stimule la prise alimentaire chez le rat (Wren et al., 2000). En revanche des études menées chez le poulet, ont démontré un rôle inverse de la ghréline chez l'oiseau (Furuse et al., 2001) qui inhiberait la prise alimentaire agissant ainsi comme un peptide anorexigène. Enfin, une injection intraveineuse de ghréline diminuerait significativement l'expression de la FAS, de SREBP1 et de PPAR γ dans le foie de jeunes poulets (Buyse et al., 2009).

Les récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) sont également impliqués dans de nombreux mécanismes physiologiques. Initialement décrits comme acteurs stimulant la prolifération des peroxysomes (Lee, 1995), ils sont aujourd'hui également connus pour influencer sur la régulation de la balance énergétique et notamment le métabolisme lipidique. Leurs ligands physiologiques sont les AG polyinsaturés. La forme alpha (PPAR α) est impliquée dans de nombreuses pathologies, incluant l'athérosclérose ou le cancer (Kersten et al., 2000), c'est un acteur majeur de la β -oxydation (Poulsen et al., 2012). De plus, l'inactivation de PPAR α , chez des souris mises à jeun, provoque une stéatose hépatique importante (Hashimoto et al., 2000). PPAR γ , quant à lui, a d'abord été décrit comme stimulant l'adipogenèse dans des fibroblastes (Tontonoz et al., 1994) ou chez le poulet (Wang et al., 2008). PPAR γ a également été décrit comme régulant l'homéostasie des TG contribuant à la stéatose hépatique de modèles animaux diabétiques (Gavrilova et al., 2003).

IV. La stéatose hépatique

La stéatose hépatique est une accumulation de lipides dans le foie. Chez les animaux sauvages, c'est une situation physiologique qui permet de stocker de l'énergie en vue d'hibernation ou migration. A l'inverse, chez l'homme, c'est une situation pathologique appelée Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). Chez les palmipèdes, l'induction d'une stéatose hépatique par gavage est utilisée dans la production de foie gras.

IV. 1. La stéatose chez l'homme

La NAFLD est caractérisée par une accumulation anormale de lipides (>5% du poids de foie) dans les hépatocytes (on parle alors de stéatose) en absence de consommation d'alcool abusive. Elle est considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique (Abbas et al., 2012) qui comprend au moins 3 des facteurs suivants : l'obésité, le diabète de type II, l'hypertension, l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie. Son apparition est fortement liée à la résistance à l'insuline (Marchesini et al., 1999; Seppälä-Lindroos et al., 2002), caractérisée par une hyperglycémie associée à une hyperinsulinémie, et serait la succession de deux phénomènes. Le premier reflète la stéatose hépatique et donc l'accumulation de TG dans les hépatocytes par l'entrée de lipides alimentaires ou suite à une activation de la lipogenèse *de novo* causée par la résistance à l'insuline. Le second serait un stress oxydatif capable d'initier la peroxydation des lipides et de provoquer un dysfonctionnement mitochondrial *via* la production de radicaux hydroxyles (Day and James, 1998) conduisant à la NASH (Figure 6).

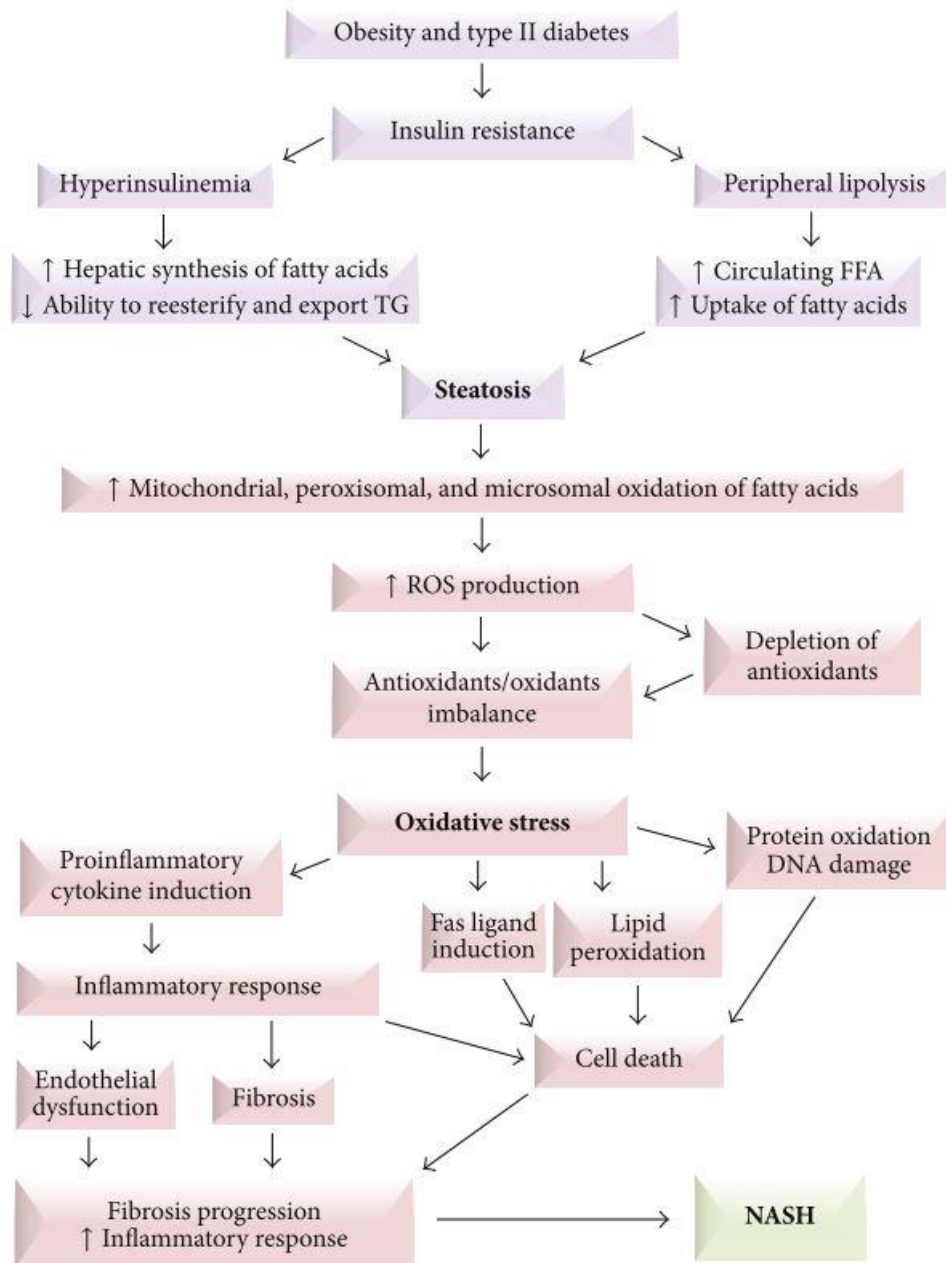


Figure 6. Principaux mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la NASH.

FFA : Free Fatty Acids, **ROS** : Reactive Oxygen Species, **TG** : Triglycerides.

(D'après Sanches et al., 2015 adapté d'Angulo 2002)

Dans une étude comparant des patients à fort et faible taux de lipides dans le foie, il a été démontré que l'expression des transporteurs d'AG (FABP et FAT/CD36) ainsi que le récepteur aux VLDL (VLDL R) étaient positivement corrélés au contenu lipidique du foie (Greco et al., 2008).

Des modèles animaux ont été conçus afin d'étudier au mieux les nombreux mécanismes à l'origine de cette pathologie. Les premiers modèles animaux sont basés sur un changement de régime riche en graisses ou encore riche en fructose, d'autres modèles animaux sont basés sur des manipulations génétiques comme des souris invalidées pour la leptine ou son récepteur (Figure 7) (Sanches et al., 2015). Ces modèles ne sont cependant pas optimaux et ne sont pas totalement adaptés à la physiopathologie des NAFLD. Le canard gavé et sa stéatose hépatique nutritionnelle pourrait être une bonne piste dans la recherche d'un modèle animal performant.

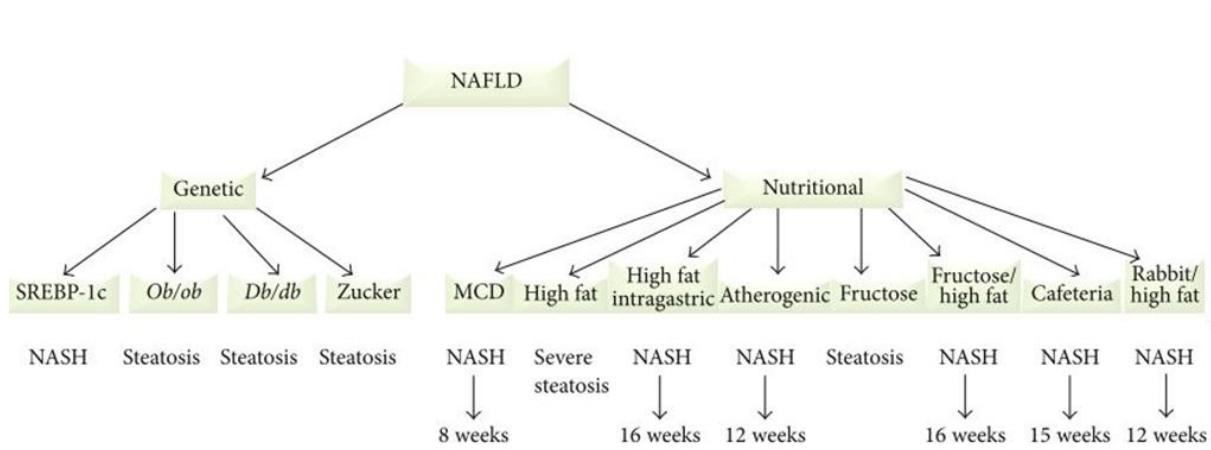


Figure 7. Comparaison entre les modèles animaux nutritionnels et génétiques en regard de la survenue de la stéatose hépatique ou de la NASH.

(D'après Sanches et al., 2015)

IV. 2. La stéatose hépatique chez l'oiseau

Chez les oiseaux migrateurs, la stéatose hépatique est un moyen naturel de stocker beaucoup d'énergie en vue de longs vols (Dolnik and Blyumental, 1967). La stéatose est, chez les palmipèdes, induite par le gavage pour la production de « foie gras ». Cette stéatose est intense puisque le poids de foie peut être multiplié par 10 en 15 jours chez l'oie (Hermier et al., 1999).

Comme évoqué précédemment, le foie est le site principal de la lipogenèse chez les oiseaux, la lipogenèse étant très limitée dans le tissu adipeux (Léveillé et al., 1975). La synthèse des AG, dépendant des précurseurs glucidiques, est fortement stimulée en période de gavage de par la composition riche en amidon du maïs. En effet, la pâtée de gavage est un aliment très énergétique (3250 kcal/kg) et très riche en glucide (plus de 85%). Le foie gras est donc le résultat d'une forte activité hépatique de la lipogenèse *de novo* conduisant à l'accumulation de lipides (principalement TG) (Fernandez et al., 2011) menant à la stéatose (Hermier et al., 1991). Cependant, il existe une forte variabilité de la réponse au gavage dépendante du génotype utilisé.

IV. 1. Les différences de réponse au gavage

IV. 1. 1. Zootechnie

Le canard mulard bénéficie d'un effet d'hétérosis pour le foie gras notamment avec un poids de foie supérieur aux types parentaux mais aussi au canard hinny, issu du croisement inverse entre un canard commun et une cane Barbarie (Larzul et al., 2006). La composition corporelle est également différentielle chez les trois types génétiques (Tableau 2). En effet, le canard Pékin, maigre ou gavé, présente les poids et proportion de foie et muscle par rapport au poids vif les plus faibles ainsi qu'un engraissement sous cutané plus important que les canards de Barbarie et mulard en fin de gavage (Guy et al., 1995; Hermier et al., 2003). Enfin, le canard mulard présente aussi une capacité d'ingestion améliorée et consomme jusqu'à 25% de plus que les deux types parentaux (Baeza et al., 2005). Cette capacité d'ingestion est un paramètre clé pour la production de foie gras. En effet, lorsque les animaux sont gavés en ajustant leur ingéré alimentaire à leur poids vif, ce sont les canards de Barbarie qui présentent des poids de foie supérieurs aux canards Pékin et mulard (Davail et al., 2003). La capacité de production de foie gras du mulard est donc, entre autre, liée à sa capacité d'ingestion.

Tableau 2. Composition corporelle de 4 types génétiques de canard. (PM : *Pectoralis major*) (D'après Baeza et al., 2005)

Génotypes		Barbarie	Hinny	Mulard	Pékin	Effet du génotype	Effet du gavage	Interaction
Poids vif (g)	G	6 393 ± 441 a	6 315 ± 402 a	6 473 ± 351 a	5 999 ± 353 a	***	***	**
	T	5 418 ± 245 b	4 854 ± 497 c	4 455 ± 392 c	4 623 ± 426 c			
Foie (g)	G	467 ± 90 a	495 ± 85 a	494 ± 97 a	318 ± 75 b	***	***	***
	T	77 ± 7 c	61 ± 6 c	61 ± 13 c	56 ± 11 c			
Gras abdominal (g)	G	220 ± 23	256 ± 27	224 ± 42	265 ± 22	***	***	ns
	T	109 ± 20	107 ± 35	73 ± 35	155 ± 29			
PM (g)	G	408 ± 49	290 ± 25	309 ± 28	208 ± 33	***	ns	ns
	T	398 ± 39	297 ± 29	278 ± 30	216 ± 18			

La composition du foie évolue au cours du gavage. Ainsi, après les premiers jours de gavage, chez le canard de Barbarie, où le foie stocke du glycogène (x3 entre J0 et J3, Figure 8), le taux de triglycérides augmente considérablement (1 à 53%) jusqu'à la fin du gavage (Baudonnet Lenfant, 1993) au détriment de celui de l'eau et des protéines. Les triglycérides qui composent cette fraction sont en majorité des Acides Gras Mono Insaturés (AGMI) en particulier l'acide oléique (Tableau 3). Cette composition chimique du foie est, elle aussi, différente selon le type génétique. Hermier et al. (Hermier et al., 2003) ont effectivement démontré que le canard commun présentait un pourcentage de TG supérieur à celui du canard de Barbarie (10,40 % pour le canard Pékin contre 5,90 % pour le canard de Barbarie).

A l'inverse, à la fin du gavage, le canard de Barbarie présente le plus fort taux de lipides hépatique (61,9% pour le canard de Barbarie contre 50,1 % pour le canard Pékin). De plus, la composition des lipides hépatiques peut elle-même varier. Le canard mulard présente ainsi un taux de cholestérol total inférieur à celui du canard de Barbarie (2,7 % pour le canard de Barbarie contre 1,7 % pour le canard mulard) (Salichon et al., 1994).

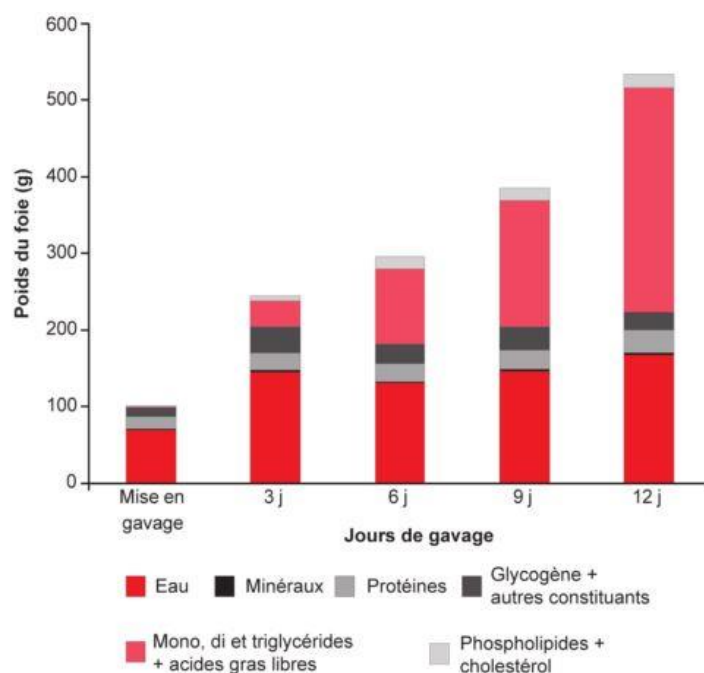


Figure 8. Evolution de la composition chimique du foie au cours du gavage chez le canard de Barbarie (d'après Baudonnet Lenfant, 1993)

Tableau 3. Evolution des quantités d'AG du foie (%) au cours du gavage chez le canard de Barbarie (D'après Baudonnet Lenfant, 1993)

	Stades de gavage (jours)				
	0	3	6	9	12
C12:0	nd	0,06 ^a	0,06 ^a	0,07 ^{ab}	0,08 ^b
C14:0	0,43 ^a	1,32 ^b	1,60 ^c	1,54 ^c	1,52 ^c
C16:0	32,65 ^b	38,82 ^c	31,66 ^b	31,69 ^b	29,73 ^a
C17:0	0,17 ^a	0,05 ^b	nd	nd	nd
C18:0	22,18 ^c	8,99 ^a	15,18 ^b	15,80 ^b	15,52 ^b
C20:0	0,24 ^{bc}	0,07 ^a	0,23 ^c	0,13 ^{ab}	0,20 ^{bc}
AGS	55,67^b	49,31^a	48,73^a	49,23^a	47,05^a
C14:1 n-5	0,13 ^a	0,22 ^b	0,25 ^b	0,18 ^{ab}	0,21 ^b
C16:1 n-7	1,24 ^a	7,64 ^c	5,41 ^b	4,72 ^b	4,59 ^b
C18:1 n-9	22,10 ^a	39,94 ^b	42,85 ^c	43,42 ^c	45,74 ^d
C20:1 n-9	nd	nd	0,73 ^a	0,70 ^a	0,86 ^b
AGMI	23,47^a	47,80^b	49,24^{bc}	49,02^{bc}	51,40^c
C18:2 n-6	19,84 ^d	2,85 ^c	1,93 ^b	1,65 ^b	1,44 ^a
C18:3 n-3	0,54 ^c	0,06 ^a	0,09 ^{ab}	0,08 ^{ab}	0,11 ^b
AGPI	20,38^c	2,91^b	2,02^{ab}	1,73^a	1,55^a

^{a, b, c} : effet significatif du stade de gavage à P < 0,001 ; nd : non détecté
 AGS, AGMI, AGPI : Acides Gras Saturés, Mono et PolyInsaturés.

IV. 1. 2. Paramètres plasmatiques

La triglycéridémie et la glycémie sont des paramètres plasmatiques fortement influencés non seulement par le gavage mais aussi par le fond génétique.

La glycémie des oiseaux est deux fois plus élevée que celle des mammifères même après un jeûne de courte durée (Belo et al., 1976; Hazelwood and Lorenz, 1959). Chez le canard gavé, la glycémie varie en fonction du temps de prélèvement lors du gavage et peut aller jusqu'à 4g/L après le dernier repas (Farhat and Chavez, 2000). Au premier repas de gavage, il existe d'ores et déjà des différences inter-génotypes. En effet, une heure après ce dernier, la glycémie des canards Pékin et de Barbarie présente un pic qui n'est pas retrouvé chez le canard mulard (Davail et al., 2003). Au cours de la période de gavage, lorsque le prélèvement se fait 70 minutes après le repas, il n'y a pas de variation de la glycémie chez le canard Pékin, à l'inverse chez les canards de Barbarie et mulard, il y a une augmentation de celle-ci après le dernier repas de gavage (Gontier et al., 2013).

En raison de la nature migratrice de l'espèce et du fort besoin énergétique du muscle, les oiseaux ont une stratégie différente de celle des mammifères pour amener les lipides au muscle. En effet, la formation de lipoprotéines est favorisée chez l'oiseau, transportant plus d'énergie que les AGL choisis par les mammifères (Weber, 2009). La triglycéridémie reste constante tout au long du gavage quel que soit le génotype excepté au dernier repas où elle augmente considérablement (Gontier et al., 2013). Cependant, la triglycéridémie du canard mulard est inférieure à celle des deux autres au dernier repas. De plus, Hermier et al. (Hermier et al., 2003) ont démontré que des canards Pékin sacrifiés plus de 12h après le repas présentaient le plus fort taux de TG plasmatiques en comparaison des canards Barbarie et mulard suggérant une capacité d'exportation accrue des TG. A l'inverse, le canard de Barbarie synthétiserait plus de HDL (High Density Lipoprotein) moins riche en TG.

Enfin, le rapport insuline/glucagon est également différentiel selon le type génétique. En effet, ce dernier est significativement plus faible chez les canards Pékin après le premier repas de gavage suggérant une lipogenèse moins intense pour ce génotype (Davail et al., 2003). Par contre, l'insulinémie au 10^{ème} jour de gavage est plus élevée chez les canards Pékin en comparaison des canards mulard et de Barbarie ce qui pourrait favoriser la captation hépatique du glucose, la lipogenèse mais aussi l'activation de la LPL et donc la captation des AG en périphérie en fin de gavage.

IV. 1. 3. Paramètres moléculaires

Chez le canard gavé, il a d'ores et déjà été démontré des différences intergénomiques en regard de l'expression de gènes ou de la quantité/activité de protéines.

Notamment, Hérault et al. (Hérault et al., 2010) ont démontré une large augmentation de l'expression hépatique des gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* tels que FAS, SCD1, ChREBP ou DGAT2 associée à une sous-expression d'ApoB et CPT1 et cela après 12h de jeûne chez des animaux gavés. Ces observations suggèrent donc bien une augmentation de la synthèse des lipides associée à une diminution de leur exportation *via* les VLDL mais aussi de leur oxydation, le tout conduisant à l'accumulation des lipides dans le foie. De plus, une autre partie de cette étude a démontré que les canards Pékin présentaient une plus forte expression de DGAT2 et SCD1 que les canards de Barbarie après 2 à 4 h de jeûne dans le foie. Dans le muscle, le canard Pékin présente la plus forte expression de FAS et FABP4 en comparaison du canard de Barbarie ce qui expliquerait un plus fort taux de lipides intramusculaire (Saez et al., 2009).

L'activité de certaines enzymes participant à la mise en place du foie gras est aussi impactée par le fond génétique. Ainsi, la FAS et l'ACC ont une activité augmentée dans le foie chez le canard de Barbarie en comparaison du canard Pékin lors du gavage (Baeza et al., 2005), le canard mulard présentant une activité intermédiaire. Enfin, au niveau périphérique, la LPL, permettant le captage des lipides au niveau des tissus périphériques, présente une activité similaire chez les trois génotypes en début de gavage, cependant après 10 jours de gavage, cette activité chute chez les canards de Barbarie et mulard, alors qu'elle reste élevée chez le canard Pékin (Davail et al., 2003). La capacité d'hydrolyse, plus importante chez le canard commun, reste donc à l'origine de dépôts importants des lipides au niveau du muscle et du tissu adipeux chez ce génotype.

V. Techniques de biologie moléculaire

Afin d'étudier les différences intergénomiques de réponse au gavage, nous nous sommes orientés vers les techniques de biologie moléculaire nous permettant de comparer l'expression des différents gènes d'intérêt.

V. 1. La Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR est une technique de biologie moléculaire permettant d'amplifier de petits fragments d'ADN à partir d'amorces spécifiques ciblant un gène en particulier. Les amorces vont s'apparier aux brins simples d'ADN préalablement dénaturés par une forte température et l'ADN polymérase va allonger les brins néoformés. L'aspect cyclique de la réaction va permettre d'obtenir de nombreuses copies du fragment cible, celui-ci s'amplifiant de façon exponentielle à chaque étape (Mullis et al., 1986). La PCR classique permet la quantification de l'ADN dite « en point final » après migration sur gel.

V. 2. La PCR quantitative (qPCR)

La qPCR se base sur le même principe que la PCR à l'exception que celle-ci permet une quantification en temps de l'ADN formé à chaque cycle. Cette détection est basée sur la présence d'un fluorochrome, ici le SYBR green, qui va s'intercaler entre les deux brins d'ADN nouvellement synthétisés. La fluorescence va alors renseigner sur la quantité d'ADN, étant proportionnelle à la quantité d'ADN néoformé (Kubista et al., 2006).

V. 3. La qPCR utilisant le BioMark

Cette technique, utilisée dans cette thèse, permet de traiter en une même plaque 96 échantillons croisant 96 couples d'amorces soit 9216 réactions à la fois, localisées chacune dans des cellules indépendantes (Pieprzyk and High, 2009). Elle est basée sur une technique simple de qPCR avec comme fluorochrome l'EvaGreen.

Matériels et méthodes

Ce chapitre « matériels et méthodes » rassemble la description des techniques utilisées lors des deux expérimentations menées au cours de cette thèse. La première expérimentation portant sur la comparaison des trois génotypes au cours du gavage sera nommée « DuckPhy », la seconde, portant sur la cinétique d'expression des gènes après le dernier repas de gavage chez le mulard, « DuckKinetic ». Toutes les procédures expérimentales incluant des canards ont été menées en accord avec les lois françaises pour le bien-être animal à des fins de recherche.

I. Conditions d'élevage, de gavage et d'abattage des canards pour les deux expérimentations

Les canards, en provenance du couvoir Grimaud (Roussay, France), sont arrivés à la station expérimentale de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) au « Domaine d'Artiguères » (Benquet, France, numéro d'agrément : B40-037-1) à l'âge d'un jour, épointés et vaccinés. Dès le premier jour de vie jusqu'à 4 semaines d'âge, ils ont été nourris *ad libitum* avec des granulés de 2,5 mm sur la base d'un régime fournissant 11,93 MJ / kg d'aliment et 17,5% de protéines brutes (PB). De 5 à 8 semaines d'âge, les oiseaux ont été nourris avec un aliment de croissance fournissant 11,72 MJ / kg d'aliment et 15,5% de PB (Tableau 4). A partir de 8 semaines, la moitié des effectifs de chaque type génétique a subi un rationnement horaire de préparation au gavage, l'autre moitié est restée alimentée *ad libitum*.

A 12 semaines, les effectifs concernés sont partis en gavage pendant 12 jours. Ces deux semaines de gavage ont compris 24 repas (2 / jour) dont la quantité a été définie selon la capacité d'ingestion de chaque type génétique. Les canards Pékin et Barbarie, ayant la plus faible capacité d'ingestion, présentent une courbe de gavage plus basse que celle appliquée aux canards mulards (Figure 9). La pâtée de gavage était composée de 36% de farine de maïs et de 26% de grain de maïs le tout mélangé à de l'eau. Durant toute la période, le gavage a été réalisé par un seul gaveur et les animaux concernés mis en stabulation collective à raison de 4 par cage.

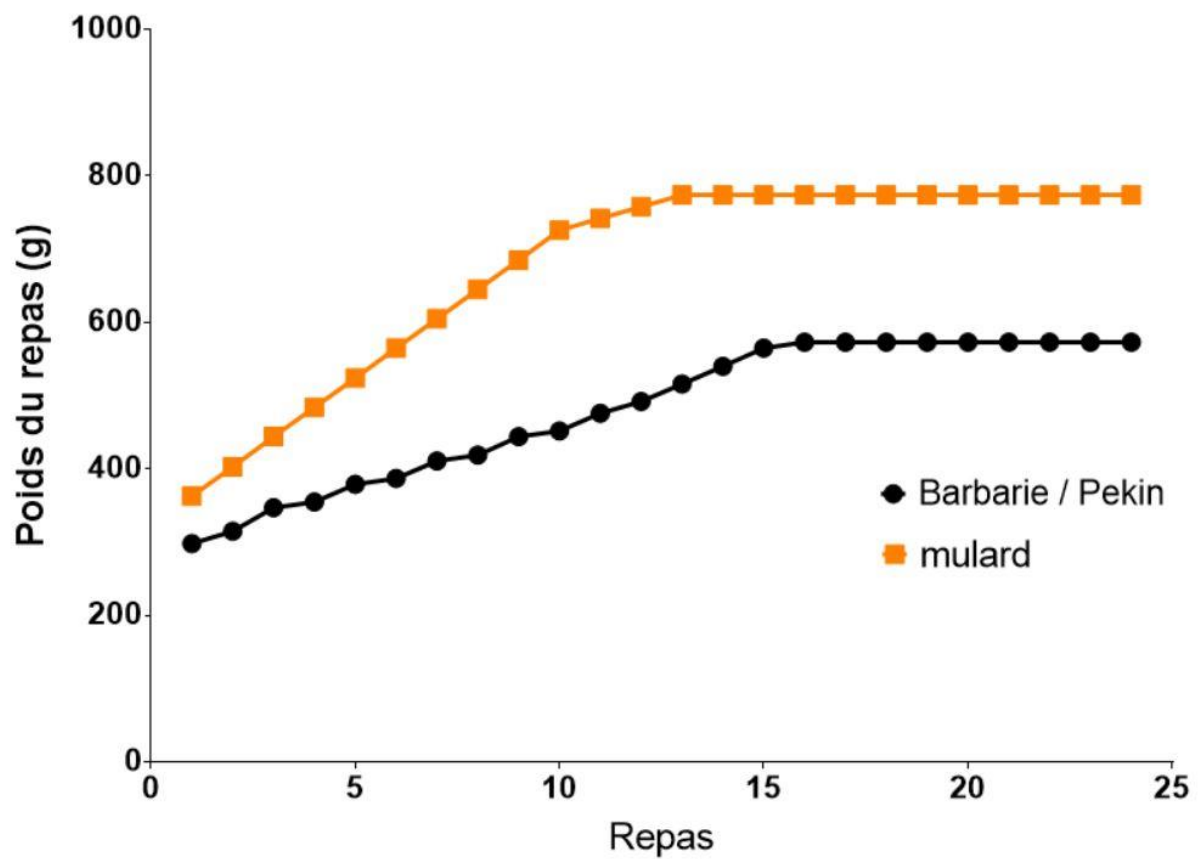


Figure 9. Courbe de gavage des trois types génétiques utilisés pour DuckPhy

Tableau 4. Composition des différents aliments utilisés en élevage pour les deux expérimentations

Aliment de démarrage				Aliment de croissance				Aliment de gavage	
Ingrédients		Nutriments		Ingrédients		Nutriments		Nutriments	
Blé	43,958	E.M.(MJ/kg)	2752,824	Blé	34,997	E.M.(MJ/kg)	2803,13	E.M.MJ	-
Maïs	24,350	Humidité	12,279	Maïs	32,95	Humidité	12,356	Humidité	-
Drèches de Maïs	5,000	Protéine Brute	17,5	Drèches de Maïs	10	Protéine Brute	14,999	Protéine Brute	8,91
Tourteau de colza déshuilé	7,000	Cellulose brute	5,151	Tourteau de colza déshuilé	6,25	Cellulose brute	6,411	Cellulose brute	2,77
Tourteau de soja	8,150	Cendres Brutes	5,457	Tourteau de soja	10,5	Cendres Brutes	4,71	Cendres Brutes	-
Tourteau de tournesol	8,000	Amidon	41,915	Tourteau de tournesol	2,5	Amidon	43,205	Amidon	75,91
Carbonate de calcium	1,475	Acides aminés	5,203	Carbonate de calcium	1,55	Acides aminés	4,221	Acides aminés	-
Phosphate Bicalcique	0,675	Acide Linoléique	1,332	Phosphate Bicalcique	0,225	Acide Linoléique	1,772	Acide Linoléique	-
Ronozyme	0,030	Calcium	1,053	Ronozyme	0,03	Calcium	0,903	Calcium	-
Lysine	0,402	Phosphore	0,562	Lysine	0,406	Phosphore	0,502	Phosphore	-
M.H.A. Liquide	0,225	Sodium	0,14	M.H.A. Liquide	0,133	Sodium	0,14	Sodium	-
Chlorure de Choline	0,060	Chlore	0,248	Chlorure de Choline	0,04	Phosphore disponible	0,302	Phosphore disponible	-
Prémix + sel	0,675	Phosphore Disponible	0,362	Prémix +sel	0,42				

I.1. DuckPhy

Cette expérimentation a pour but d'étudier les mécanismes de régulation du captage lipidique et glucidique, périphérique et hépatique, chez les palmipèdes afin d'expliquer les divergences de capacité à développer une stéatose hépatique constatées chez divers types génétiques de canards, à savoir, Pékin, mulard et Barbarie. Afin de répondre à l'objectif, des canards de Barbarie, mulard et Pékins, ont été élevés. Certains ont été gavés pour induire une stéatose hépatique alors que d'autres sont restés alimentés à volonté. Les différentes modalités sont exprimées en traitement et sont résumées dans le Tableau 5.

Tableau 5. Effectifs et modalités. Expérimentation DuckPhy (B : Barbarie ; m : mulard ; P : Pékin)

Traitement	1	2	3	4	5	6
Type génétique	B	B	m	M	P	P
Gavage	Non	Oui	Non	Oui	Non	Oui
Pré gavage	Non	Oui	Non	Oui	Non	Oui
Effectif	48	48	48	48	48	48

Durant la phase d'élevage, l'évolution pondérale des canards a été suivie par des pesées à 4, 6, 8, 10, 12 et 14 semaines (Figure 10). Des prélèvements sanguins sur tubes héparinés ont été effectués 3h après le repas en début des semaines 9, 10, 11, et 12, puis après les 4^{ème}, 12^{ème} (mi-gavage), 18^{ème} et 24^{ème} (fin gavage) repas de gavage. Le plasma a été récupéré par centrifugation (3000 x g, 10 min) et conservé à -20°C.

Des abattages ont eu lieu à la station expérimentale (INRA, Artiguères) avant l'entrée en gavage (semaine 12 ou point 1), à mi-gavage (semaine 13 ou point 2) et à la fin du gavage (semaine 14 ou point 3) par groupes de 16 canards par modalités. Les prélèvements suivants ont été effectués à chaud : foie, muscle (*pectoralis major*), gras sous-cutané (GSC) et muqueuses jéjunales (par scrapping de la face interne de l'intestin). Les échantillons ont directement été congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'à leur traitement. Les canards restés en alimentation *ad libitum* (canards maigres) ont subi les mêmes prélèvements que les canards gavés.

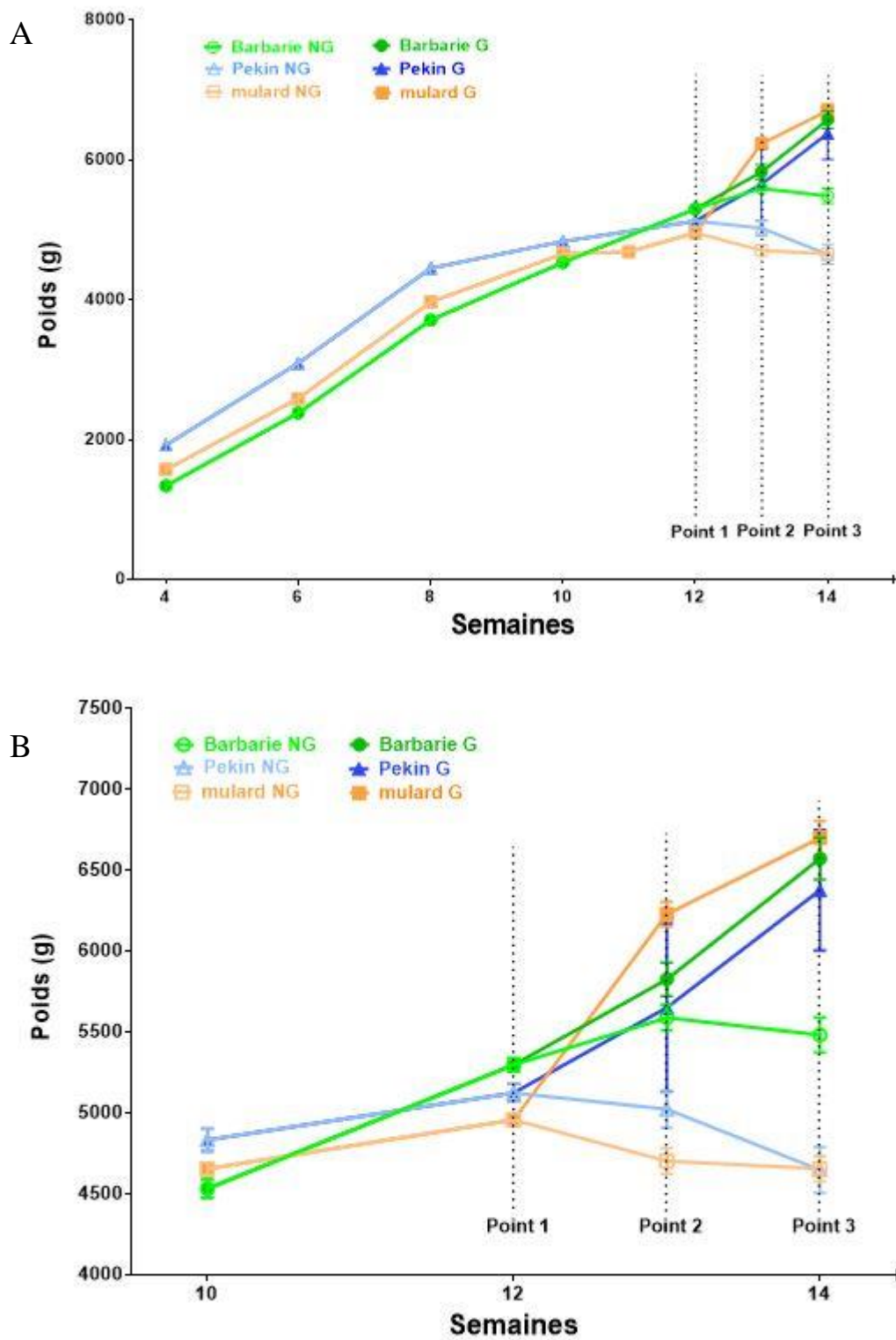


Figure 10. Courbes de croissance des trois types génétiques utilisés pour DuckPhy.

A : période de 4 à 14 semaines, B : focus sur la période de 10 à 14 semaines.

I. 2. DuckKinetic

Cette expérimentation a pour but d'identifier les mécanismes moléculaires mis en place après un repas de gavage afin de mieux comprendre le développement de la stéatose hépatique mais également d'établir un profil d'expression de chaque gène d'intérêt sur une échelle de temps. Afin de répondre à l'objectif, des canards mulards ont été élevés. Les différentes modalités et effectifs sont résumés dans le Tableau 6.

Les abattages ont eu lieu à la station expérimentale (INRA, Artiguères) à la fin du gavage (semaine 14 ou point 3) au moment du dernier repas de gavage (24^{ème}) par lots de 10 canards par temps d'échantillonnage. Le sang a été récupéré après sacrifice sur tube hépariné, le plasma récupéré après centrifugation (3000 x g, 10 min) puis conservé à -20°C. Les prélèvements suivants ont été effectués à chaud : foie, muscle (*pectoralis major*), gras sous-cutané (GSC) et muqueuses jéjunales. Les échantillons ont été congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C avant leur traitement.

Tableau 6. Effectifs et temps de prélèvement. Expérimentation DuckKinetic.

Heure du repas	Temps par rapport à l'heure du repas	Heure prise de sang/abattage	Nombre de canards en gavage
7h	- 30 min	6h30	10
	+ 20 min	7h20	10
	+ 40 min	7h40	10
	+ 60 min	8h	10
	+ 2 h	9h	10
	+ 3 h	10h	10
	+ 5 h	12h	10
	+ 7 h	14h	10
	+ 9 h	16h	10
	+ 12 h	19h	10

II. Analyses biochimiques

II.1. Dosages plasmatiques

La glycémie et la triglycéridémie ont été quantifiées par méthode colorimétrique en utilisant les kits enzymatiques Glucose RTU (Biomérieux) et Triglycérides LDB (Biodirect). Un mélange de 10 µL de plasma (ou de standard) et de réactif a été effectué, et après un temps d'incubation de 20 minutes à température ambiante, l'absorbance a été lue à 505 nm.

La concentration plasmatique en acides gras libres (AGL) a été mesurée grâce au kit NEFA HR2 (Wako). Un mélange de 7 μ L de plasma (ou de standard) et du premier réactif a été réalisé, puis, après 3 minutes d'incubation à 37°C, le second réactif a été ajouté. Pour finir, l'absorbance a été lue à 546 nm après 7 minutes.

Les différentes concentrations plasmatiques ont été calculées sur la base d'un standard de concentration connue.

II.2. Détermination du pourcentage en eau et de lipides totaux

Afin de réaliser ces deux mesures, les tissus ont été préalablement réduits en poudre sous action mécanique après congélation dans l'azote liquide. L'ensemble des mesures a été effectué sur le foie, le muscle et le GSC des canards gavés et maigres à mi et fin gavage.

La quantification de la teneur en eau des tissus a été obtenue après avoir séché une fine couche de tissu en poudre (préalablement pesée) sur du sable dans une étuve à 103°C.

Les lipides totaux ont été extraits grâce à la méthode de Folch (FOLCH, 1959). Une prise d'essai de 400 mg pour le foie et 800 mg pour le muscle et le GSC a été homogénéisée avec 40 mL d'un mélange chloroforme / méthanol (2 volumes de chloroforme pour 1 volume de méthanol) et laissée une nuit à 4°C. Le jour suivant, le mélange a été filtré, mélangé à une solution saline (4 %) et laissé dans un bain froid pour 4h de décantation. La fraction supérieure (10 mL) a été récupérée puis évaporée dans un SpeedVac pendant 8h.

Dans les deux cas, le pourcentage a été calculé en rapportant la masse finale à la masse initiale en tenant compte de la tare des contenants.

III. Biologie moléculaire

III. 1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à partir des tissus congelés suivant la méthode du TRIZOL (Invitrogen/Life technologies). Les échantillons (100 mg pour le foie, 200 mg pour le muscle et 1 g pour le GSC) ont été broyés dans 1mL de Trizol avec un Ultra-Turrax (IKA). Une étape de clarification a ensuite été ajoutée afin de faire culotter les débris non broyés (10 minutes, 7000 x g).

La phase supérieure récupérée a été mélangée à 200 μL de chloroforme et l'ensemble a été centrifugé à 4°C (Eppendorf 5804R) à 15294 x g pendant 20 minutes. Le surnageant a été collecté dans un nouveau tube et les ARN ont été précipités avec 500 μL d'isopropanol avant d'être centrifugés une nouvelle fois à 4°C à 15294 x g pendant 20 minutes. Le culot d'ARN a ensuite subi deux lavages (éthanol 75%), puis a été solubilisé dans un volume approprié d'eau RNase free (eau milliQ traitée au DiEthyl PyroCarbonate, DEPC). Typiquement, le volume de solubilisation était de 300 μL pour le foie et les muqueuses jéjunales, 100 μL pour le muscle et 50 μL pour le GSC. Les ARN extraits sont ensuite stockés à -80°C. La concentration totale des ARN extraits a été déterminée par dosage spectrophotométrique au NanoVue (GE Healthcare) et l'ensemble a été normalisé à 500 ng/ μL . La qualité des ARN a ensuite été vérifiée par électrophorèse.

III. 2. Transcription inverse

La rétro-transcription est réalisée sur 3 μg d'ARN totaux grâce à l'enzyme Superscript III d'Invitrogen. Elle rétro-transcrit indistinctement tous les ARN à partir d'amorces aléatoires (Random primer, Promega) ou d'oligonucléotides à queue poly T (Oligo dT, Promega) et de polynucléotides (dNTP, Promega). La réaction se fait avec le StepOne (Applied Biosystem, en commande manuelle) et se décompose en deux étapes : une étape de dénaturation des ARN et une étape de rétro-transcription. 2 contrôles négatifs différents ont été réalisés afin de vérifier l'absence de contamination en ADN génomique lors de l'amplification. Le premier contrôle est un blanc sans ARN de départ permettant de vérifier la contamination éventuelle des réactifs (nommé Blanc RT), le second est un blanc sans enzyme de rétro-transcription permettant de vérifier la contamination possible de l'échantillon lui-même (Blanc ADN).

III. 2. 1. Dénaturation des ARN

Le mix 1 est distribué dans tous les puits (Tableau 7) et l'ensemble est placé dans le StepOne suivant le programme : 65°C / 5 minutes, 4°C ∞ .

Tableau 7. Composition du mix 1 en vue de la dénaturation d'ARN

Mix 1	Volume par réaction
OligodT primers	0,5 μL
Random primers	0,5 μL
PCR Mix (dNTP)	1 μL
H ₂ O	4,5 μL

III. 2. 2. Transcription inverse des ARN

Deux mix sont utilisés pour cette étape afin de réaliser d'une part la synthèse des ADN complémentaires et d'autre part le blanc ADN (Tableau 8). Les tubes sont ensuite placés dans le StepOne et subissent le programme suivant : 25°C / 5 minutes, 55°C / 1 h, 70°C / 15 minutes, 4°C ∞.

Tableau 8. Composition des mix en vue de la rétro-transcription

Mix 2 Blanc	Volume par tube « Blanc ADN »
H ₂ O	2 µL
Tampon 5X	4 µL
dTT	1 µL
RNase OUT	1µL
Mix 2 SIII	Volume par tube « échantillon + Blanc RT »
H ₂ O	1,5 µL
Tampon 5X	4 µL
dTT	1 µL
RNase OUT	1µL
Superscript III	0,5µL

IV. Validation des amorces

Du fait que cette étude soit réalisée sur trois types génétiques, dont un hybride, et que seul le canard commun (Pékin, *Anas platyrhynchos*) soit séquencé, les amorces utilisées en qPCR ont nécessité une mise au point spécifique.

IV. 1. Conception des amorces

A l'heure actuelle, le canard commun est le seul palmipède séquencé parmi nos types génétiques d'intérêt. Afin de nous assurer une hybridation des amorces correcte pour les trois génotypes, nous avons construit nos amorces en partant des séquences les plus conservées pour chaque gène étudié. En effet, en alignant les séquences protéiques de l'homme, de la souris et du canard commun sur MultAlin (Corpet, 1988), nous avons identifié les exons les plus conservés. Ces exons sont ensuite traités sur Primer3 (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser et al., 2012) afin de construire des amorces spécifiques. Les couples d'amorces ont été sélectionnés pour qu'au moins une des deux amorces présente un chevauchement sur deux exons séparés d'un intron.

Enfin, le produit PCR doit contenir au moins un exon entier. L'ensemble de ces spécificités nous ont permis d'éviter au maximum l'amplification d'ADN génomique.

IV. 2. Test des amorces en qPCR

Les ADN complémentaires (ADNc) ont été amplifiés et quantifiés à l'aide du StepOne puis analysés *via* le StepOne Software (©Applied Biosystems v2.3). Toutes les validations ont été réalisées dans des plaques 48 puits avec le mix réactionnel SYBr Green FastMix (Quanta) selon le programme suivant : 10 minutes à 95°C ; 40 cycles d'amplification avec dénaturation à 95°C pendant 3 secondes puis hybridation / amplification à 60°C pendant 30 secondes.

Un mélange (pool) de tous les tissus pour chaque génotype a été fait. Ce pool a ensuite été dilué en cascade au demi de façon à obtenir 5 points de gamme (1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320). Les tubes correspondants aux « Blancs ADN et RT » ont également été mélangés et dilués au 1/75^{ème}. Après amplification, les primers ont été validés s'ils remplissaient les conditions suivantes :

- 85% d'efficacité minimum
- r^2 compris entre 0.98 et 1
- Un seul pic sur la courbe de fusion
- Aucune amplification dans les contrôles négatifs

Enfin, la taille des produits PCR a été vérifiée sur gel d'électrophorèse à 3%. La taille expérimentale identifiée grâce à un marqueur de poids moléculaire, a été comparée à la taille attendue du produit. Les séquences des primers validés sont compilées dans le Tableau 9.

Tableau 9. Séquences des primers validés

	Gène (nom et symbole)	Séquence des amorces 5'-3'	Taille du produit (bp)
Métabolisme des lipides	Acyl CoA deshydrogenase 11	TGGTTGTACCTCGAGCTGTG	238
	ACAD 11	CATCCACATGAGAGGGCTTT	
	Acyl CoA Synthetase Long-chain 1	GGCTGGCTTCATACAGGAGA	247
	ACSL 1	CTCTTTTCTTGCCCCATTTG	
	Acyl CoA Synthetase Long-chain 5	TGCTCCTGTAGCCCAAGTCT	250
	ACSL 5	GAACAGCTCAGGGTGGATGT	
	Apolipoprotein B	TCTCACCGTGACTTGAGTGC	137
	ApoB	TCCCAGCAGAAGGTGAAGAT	
	Apolipoprotein A	CAAACAGCTCGACCTGAAGC	121
	ApoA	GGTGTCTTCAGCCACATCT	
	ATP Citrate Lyase	ACCCCACTGTTGGACTATGC	241
	ACLY	GCTTCAAGCGCTTCTGATCT	
	Carnitine Palmitoyl transferase A	GATTTGGACCAGTGGCTGAT	219
	CPT1 A	GAAGGTTGCTTTGCACCAAT	
	Choline/Ethanolamine	CTGCTGTGCAGCTCTTTGAA	246
	Phosphotransferase 1 CEPT1	CGCAGTATCGAAGCAAATCA	
	Diglyceride acyl transferase 2	TGGGGCTTGTTACCGTACTC	250
	DGAT2	TGGAGAAGATGGGCTGAATC	
	Fatty Acid Binding Protein 4	AATGGCTCACTGAAGCAGGT	143
	FABP4	TGGCTTCTTCATGCCTTTTC	
	Fatty Acid Synthase	TGAAGAAGGTCTGGGTGGAG	97
	FAS	CTCCAATAAGGTGCGGTGAT	
	Fatty Acid Translocase/Cluster of	AGTTTGCCAAAAGGCTTCAA	228
	Differentiation 36 FAT/CD36	CGAGGAACACCACAGAACCT	
	Glycerol 3Phosphate	ACAACCTCAGCGGTCCTGTT	221
	Acyltransferase 1 GPAT 1	GCGCTGAGGTAGGAACGTAG	
	Glycerol 3Phosphate	TGCCAATCGAGTGAAGTCAG	80
	Acyltransferase 6 GPAT 6	TCTCCCTCTTCAGACCTCCA	
	Lipase maturation factor	CCTTCCAGACCTACGAGCAG	215
	LMF1	GCCGATCCTCTTCCGAATCC	
	Low Density Lipoprotein Receptor	TGTGGCCTTCAGAAAGCTCG	151
	LDLR	ATCTCGTGCTGCATGTAGGG	
Microsomal Triglycerides Transfer	TGCAGATGGACAGAGTCGAG	176	
MTTP	GGATGCAGTGCTGAAAACCT		
Stearyl CoA Desaturase	AGTGCTGCTCACATGTTTGG	184	
SCD1	TGAAGTCGATGAAGGCTGTG		
Very Low Density Lipoprotein	CGTAACTGGCAGCACAAGAA	179	
Receptor VLDLR	TGCTGATCCAGTGCTCAAAC		
Facteurs de transcription	Carbohydrate Response Element	TCCTCCACACTGCAAACCTG	80
	Binding Protein ChREBP	ACCATGCCGTTGAAAGACTC	
	Liver X Receptor Alpha	CATCTCGACGCTACAATCCA	247
	LXRA	GTGTGCTGCAGTCTCTCCAC	
	Myocyte Enhancer Factor 2	CTGGCAACAGCAACACCTAC	168
	MEF2C	GGTGTGGTGGTACGGTCTCT	
	Peroxisome Proliferator Activated	GGATGCTGGTAGCCTATGGA	247
	Receptor Alpha PPARA	ACGTGCACAATGCTCTCTTG	
	Peroxisome Proliferator Activated	CCCAAGTTTGAGTTCGCTGT	196
Receptor Gamma PPARG	GCTGTGACGACTCTGGATGA		

	Gène (nom et symbole)	Séquence des amorces 5'-3'	Taille du produit (bp)		
Métabolisme des glucides	Acetyl CoA Carboxylase AcoX	CATGTTTGAGTGGGCAAAGA TTTTTCAGGGCAGGAAAATTG	137		
	Enolase Alpha Eno1	CGCTACATGGGGAAAGGTGT AAGGTCAGCAATGTGACGGT	246		
	Glucose Transporter 1 GLUT1	CGGGGATCAATGCGGTTTTTC GTGAAGGGTCTACGTCCAG	158		
	Glucose Transporter 2 GLUT2	GGAGTTGACCAACCCGTTTA CCCACCTCGAAGAAGATGAC	242		
	Glucose Transporter 3 GLUT3	TTCTCCAGAACTCCGTGGC GGCTCTGTGATACCAGCTCG	238		
	Glucose Transporter 8 GLUT8	ACTGGGAGGCTATCTTGTGG CAAGAGCCAAGCATAACCACG	225		
	Hexokinase HK	GAGGGAGCAGACGTTGTGAA GCCGCATCTCCTCCATGTAA	190		
	Insulin like Growth Factor 1 Receptor IGF1R	TACCAAGGCATGACCAATGA AGACCTCTTTGAACGCTGGA	196		
	Succinate Deshydrogenase Complex, Subunit A SDHA	TGGAACACTGACTTGGTGGA CCTTGGAGTGGCTTGGGAATA	164		
	Gènes de Reference	Actin B ActB	CCAGCCATCTTTCTTGGGTA ATGCCTGGGTACATTGTGGT	141	
		Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit F EIF3F	GATGAGGTGGCGGTGGATAT TGGATTGGATTGTGCGCTTC	167	
		Glycéraldéhyde 3 Phosphate Deshydrogenase	CAGAGGACCAGGTTGTCTCC CACCACACGGTTGCTGTATC	146	
		Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase HPRT1	ACTGGAAGGCGAGAACAAGA TCGGTAATCCAAGGGACTG		
		RNA Polymerase II Pol2RC	TCGGAGCAGAGATAACGACC AGTGCATTGTCCGGGTCATA	180	
		Tubulin Alpha 1C TubA1C	ATGCCAAGCGACAAAACCAT AGTGTAATGACCTCGAGCGT	222	
Apoptose		Caspase 3 Casp 3	GCAGACAGTGGACCAGATGA CTTGCATGTTTCCTTCAGCAC	161	
		Caspase 8 Casp 8	GGAAAGCAGTGCCAGAACTC TAAAATGAAGGGTGCCGAAG	96	
		Stress cellulaire	Cytochrome P450 2E1 CYP2E1	GCCAGATGCCCTACACAGAT GGTACCGTTTGGATTTCAGGA	227

V. qPCR

Afin de pouvoir réaliser un grand nombre de réactions et de limiter les effets « plaque-dépendants », les quantifications ont été réalisées au Génopôle (Plateau Transcriptomique Quantitative (TQ), Toulouse, France) en utilisant la technologie Fluidigm, Biomark permettant de traiter simultanément 96 échantillons et 96 couples d'amorces.

Avant tout, les échantillons (concentration = 5 ng / μL) ont subi une étape de pré-amplification utilisant le mix PreAmp Master Mix (Fluidigm). On dépose 1,3 μL d'ADNc par puit avec 5 μL de mix. La plaque est ensuite mise dans l'appareil (Veriti 96 Fast) suivant le programme : 95°C / 2 minutes, 14 cycles d'amplification comprenant la dénaturation à 95°C / 15 secondes et l'hybridation/amplification à 60°C / 4 minutes, et enfin 10°C ∞ . Les mix réactionnels sont décrits dans le Tableau 10.

Tableau 10. Mix réactionnel de l'étape de pré-amplification

Réactifs	μL	Puce 96x96 (μL)
Eau	1,5	159
Pool de primers à 0,2 μM	1,25	132,5
Fluidigm PreAmp Master Mix	1	106
Total	3,75	397,5

Les échantillons sont ensuite soumis à l'exonucléase afin d'éliminer les ADN double brins selon le programme : digestion 37°C / 30 minutes, inactivation 80°C / 15 minutes, puis 10°C ∞ . Les mix réactionnels sont décrits dans le Tableau 11.

Tableau 11. Mix réactionnel de l'étape d'exonucléase

Réactifs	μL	Puce 96x96 (μL)
Eau	1,4	147
Exonuclease I Reaction Buffer	0,2	21
Exonuclease I	0,4	42
Total	2	210

Enfin, la puce BioMark a été préparée et remplie d'une part avec les échantillons (samples) et d'autre part avec les primers (Assays). Pour faciliter les dépôts, les différents composés sont tout d'abord répartis dans deux plaques de 96 puits. La première pour les ADNc (2 μL dilués au 1/5) avec 6 μL du mix décrit dans le Tableau 12.

La seconde pour les primers (2 μL à 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) avec 6 μL de mix (2 volumes de 2X Assay Loading Reagent pour 1 volume de TE low EDTA).

Tableau 12. Mix réactionnel de l'étape de qPCR, plaque « samples »

Sample Pre-Mix	Puce 96x96 (μL)
2X TaqMan Gene Expression Master Mix	440
20X DNA Binding Dye Sample Loading Rgt	44
20X EvaGreen	44
TE low EDTA	132
Total	660

Les deux plaques sont ensuite distribuées comme décrit dans la Figure 11.

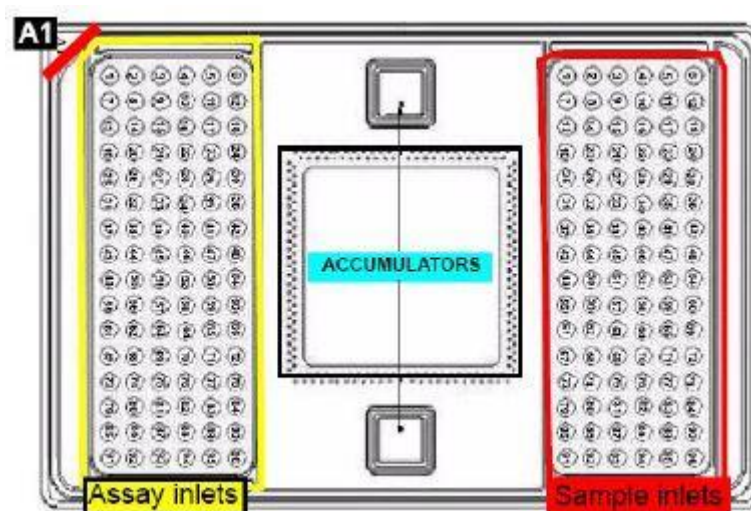


Figure 11. Illustration de la plaque utilisée pour le BioMark, Fluidigm

La plaque a enfin été placée dans le BioMark (Fluidigm) et l'amplification a été lancée. Le programme d'amplification a été celui décrit dans le Tableau 13.

Tableau 13. Programme d'amplification BioMark

	Thermal Mix			UNG	Hold	35 Cycles		Melt Curve	
T °C	50	70	25	50	95	95	60	60	95
Temps (min)	2	30	10	2	10	15 sec	1	30 sec	1°C / 3 sec

L'étape « Thermal mix » élève la température de la plaque jusque 70°C permettant une meilleure diffusion des ADNc dans les chambres réactionnelles.

L'étape « UNG » est dépendante du mix utilisé qui contient de l'Uracil DNA Glucosidase (UNG). Cette enzyme va dégrader les contaminants double brin éventuellement présents dans le milieu réactionnel. L'étape « hold » permet de dénaturer l'enzyme avant les cycles de PCR afin d'éviter qu'elle ne dégrade les brins néoformés.

Toutes les données ont été recueillies puis traitées par le logiciel Fluidigm Real-time PCR analysis (Fluidigm corporation v4.1.3).

VI. Analyse et traitements statistiques des résultats

Le gène de référence choisi est l'actine B mais l'ensemble des résultats a été vérifié avec la GAPDH. Tous les Cycle Threshold (Ct) ont été collectés. Les résultats obtenus sont exprimés en expression relative calculée par la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Le $\Delta\Delta Ct$ a été calculé comme suit :

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{cible} - Ct_{ref})_{ech} - (Ct_{cible} - Ct_{ref})_{standard}$$

- Ct_{cible} est le Ct du gène d'intérêt
- Ct_{ref} est le Ct du gène de référence (Actine B)
- $(Ct_{cible}-Ct_{ref})_{ech}$ est le ΔCt calculé pour les échantillons
- $(Ct_{cible}-Ct_{ref})_{standard}$ est le ΔCt calculé pour le standard : Pekin Point 1 pour DuckPhy, point avant repas pour DuckKinetic

Le choix du standard « Pékin point 1 » est appuyé par le fait que ce dernier est le seul séquencé et qu'il a d'ores et déjà été utilisé comme standard dans d'autres études (Hérault et al., 2010), de plus, le point avant gavage reflète la situation physiologique basale de l'animal.

Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Une Analyse de variance (ANOVA) a été effectuée suivie d'un test de comparaison multiple (Tukey). Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Prism (GraphPad Prism v.6). La prévalence minimale a été fixée à 0,05 et considérée comme statistiquement significative.

Chapitre 1 : DuckPhy

Objectif du travail

La stéatose hépatique chez le palmipède gavé est un processus complexe mettant en jeu de nombreux facteurs comme la durée du gavage, le nombre de repas mais aussi et surtout le fond génétique. Comme introduit précédemment, de nombreuses études se sont intéressées à la physiologie du palmipède gavé et plus particulièrement aux différences génotypiques observées en gavage. Cependant, la bibliographie reste pauvre sur la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la mise en place de la stéatose, notamment englobant une comparaison des trois génotypes de canards Barbarie, Pékin et mulard. Cette étude sera divisée en deux articles, le premier portant sur le métabolisme des lipides, le second sur celui des glucides.

Dans la première partie basée sur le métabolisme des lipides, une question en particulier reste en suspens, à savoir la part de lipides retournant au foie. L'objectif principal de cette première partie est donc de caractériser les acteurs de la formation du foie gras, aussi bien en termes de lipogenèse, d'exportation et de captage périphérique des lipides mais surtout de leur recaptage au niveau hépatique en plus de leur régulation par des facteurs de transcription. Le second objectif de cette étude réside dans la comparaison des différents types génétiques utilisés dans la production en terme d'expression de gènes. Enfin, le dernier objectif sera d'évaluer l'évolution du profil d'expression des gènes sur toute la durée du gavage.

La seconde partie de l'étude permettra d'étudier le métabolisme glucidique chez les trois types génétiques. En effet, peu de données sont retrouvées dans la bibliographie concernant les transporteurs de glucose ou encore les enzymes impliquées dans la glycolyse. Cette partie s'intéressera particulièrement aux transporteurs de glucose présents dans la muqueuse intestinale (jejunum) ainsi qu'au niveau hépatique et périphérique en plus de certaines enzymes impliquées dans le catabolisme du glucose. Une comparaison entre les différents génotypes sera également effectuée en plus d'une étude sur l'évolution de l'expression des gènes d'intérêt pendant les 12 jours de gavage.

En complément de ces analyses moléculaires, ces deux parties regrouperont également des données sur la zootechnie et les différents paramètres biochimiques des animaux tels que les concentrations plasmatiques de glucose, TG et NEFA mais aussi le pourcentage en lipides des différents tissus. Ces données seront mises en parallèle avec les expressions de gènes observées.

Ces travaux font l'objet d'articles soumis dans des journaux à comité de lecture ou en préparation :

Article 1: **Annabelle Tavernier**, Stéphane Davail, Karine Ricaud, Marie Dominique Bernadet, Karine Gontier. *Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks*. Molecular and Cellular Biochemistry (accepté).

Article 2: **Annabelle Tavernier**, Karine Gontier, Karine Ricaud, Marie Dominique Bernadet, Stéphane Davail. *Inter-genotype differences in expression of genes involved in glucose metabolism in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks*. Comparative biochemistry and physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology (en préparation).

Article 1: Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks.

Molecular and Cellular Biochemistry

Nos principaux objectifs étaient de déterminer les gènes impliqués dans le développement de la stéatose hépatique chez trois génotypes de palmipèdes. Pour répondre à cette question, nous avons comparés des canards de Barbarie, Pékin et leur hybride le mulard en état gavé ou nourris *ad libitum*. Nous avons démontré une surexpression hépatique de la Fatty Acid Synthase (FAS) et de la Di-acyl Glycerol Acyl Tranferase 2 (DGAT2) chez les individus gavés, où DGAT2 semble plus régulée. Cette augmentation dans l'expression des gènes de la lipogenèse est associée avec une diminution de ceux liés à la formation des lipoprotéines chez les canards de Barbarie et mulard, plus spécifiquement l'Apolipoprotéine B (ApoB) et la Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTTP) menant à une accumulation de lipides dans le foie. Chez les canards Pékin, l'expression de MTTP est augmentée suggérant une meilleure exportation des lipides hépatiques. Concernant le re-captage des lipides, la Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) et le Very Low Density Lipoprotein Receptor (VLDLR) apparaissent surexprimés dans le foie des canards mulards à la fin de la période de gavage. Ce phénomène met en lumière un mécanisme inconnu jusqu'à aujourd'hui. En effet, le canard mulard peut réintégrer dans son foie plus de lipides que les deux autres génotypes conduisant ainsi à une stéatose hépatique plus intense. Pour conclure, nos résultats confirment la variabilité génotypique de réponse au gavage, et mettent en exergue l'importance des mécanismes cellulaires qui se mettent en place lors de la dernière semaine de gavage chez le canard mulard. Des observations similaires ont été décrites dans les Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) chez l'Homme. Ces observations posent dès lors la question de considérer le canard comme un modèle animal adapté pour l'étude des troubles métaboliques tels que l'accumulation de triglycérides dans le foie et les NAFLD.

Mots clés : Stéatose hépatique, lipides, expression de gènes, canards, NAFLD

Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks

Tavernier Annabelle^{1,2}; Davail Stéphane^{1,2}; Ricaud Karine^{1,2}; Bernadet Marie-Dominique³;
Gontier Karine^{1,2}

¹UMR 1419 INRA UPPA NuMéA, 371 Rue du Ruisseau 40000 Mont de Marsan FRANCE;

²UMR 1419 INRA UPPA NuMéA, Quartier Ibarron 64310 Saint Pée sur Nivelle ; ³INRA
UEPFG, 1076 Route de Haut Maucq 40280 Benquet FRANCE

Corresponding author: Gontier Karine

UMR 1419 INRA UPPA NuMéA, 371 Rue du Ruisseau 40000 Mont de Marsan FRANCE

e-mail: karine.gontier@univ-pau.fr; tel.: +33 558 513 706; fax: +33 558 513 737

Abstract. Our main objectives were to determine genes involved in the establishment of hepatic steatosis in three genotypes of palmipeds. To respond to this question we have compared Muscovy ducks, Pekin ducks and their crossbreed the mule duck fed *ad libitum* or overfed. We have shown a hepatic overexpression of Fatty Acid Synthase (FAS) and Di-acyl Glycerol Acyl Transferase 2 (DGAT2) in overfed individuals, where DGAT2 seemed to be more regulated. This increase in lipogenesis genes is associated with a decrease of those of lipoprotein formation in Muscovy and mule ducks, especially Apolipoprotein B (ApoB) and Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTTP) leading to lipid accumulation in liver. In Pekin ducks, MTTP expression is upregulated suggesting a better hepatic lipids exportation. Regarding lipids re-uptake, Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) and Very Low Density Lipoprotein Receptor (VLDLR) are overexpressed in liver of mule ducks at the end of the overfeeding period. This phenomenon puts light on a mechanism unknown until today. In fact, mule can incorporate more lipids in liver than the two other genotypes leading to an intensified hepatic steatosis. To conclude, our results confirmed the genotype variability to overfeeding. Furthermore, similar observations are already described in Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in human and ask if ducks could be an animal model to study hepatic triglyceride accumulation.

Keywords: Hepatic steatosis, lipids, gene expression, ducks, NAFLD

Acknowledgments. We thank the “Conseil Général des Landes” and the “Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras” (CIFOG) for financing this work. We also thank the technical staff of INRA Artiguères for rearing ducks (Certificate of Authorization to Experiment on Living animals, no. B40-037-1, Ministry of Agriculture and Fish Products, ethic committee Aquitaine birds and fish no.C2EA-73). We are grateful to Hélène Manse and team of GenPhySE for their excellent technical assistance in Folch analysis (INRA UMR 1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d’Elevage (GenPhySE), F-31326 Castanet-Tolosan, France). We would also like to thank Frédéric Martins and Jean-José Maoret for performing Fluidigm analysis (Génopole Toulouse/Midi-pyrénées, Plateau Transcriptomique Quantitative (TQ), Toulouse, France).

1. Introduction

In domestic waterfowls, hepatic steatosis (also called fatty liver or “foie gras”) is induced by overfeeding. The fatty liver is the result of a strong activity of liver de novo lipogenesis resulting in lipids accumulation (mainly triacylglycerol), (Fernandez et al., 2011) leading to hepatic steatosis (Hermier et al., 1991; Saadoun and Leclercq, 1986). Nevertheless, the metabolic response to overfeeding is extremely variable and depends on the genotype, underlying an important genetic determinism. In fact, the common duck or Pekin (*Anas platyrhynchos*), in addition of a high hepatic lipogenesis, presents an intramuscular lipogenesis and a higher lipid exportation to peripheral organs (such as adipose tissues and *Pectoralis major*) than Muscovy (*Cairina moschata*) or mule ducks (the sterile hybrid from male Muscovy and female Pekin used for “foie gras” production) (Chartrin et al., 2006b; Davail et al., 2003). These differences in feeding performance between these three genotypes can be explained by a difference in the regulation of the imbalance between triglycerides (TG) synthesis and secretion. For example, the Pekin duck exhibits a better exportation of TG via the Very Low Density Lipoprotein (VLDL) (G Saez et al., 2009) and a higher activity of the lipoprotein lipase (enzyme that catalyses the hydrolysis of TG in fatty acid (FA) and their importation into peripheral tissues) which contributes to peripheral fattening (André et al., 2007). On the contrary, this activity decreased over the overfeeding period for Muscovy and mule ducks leading to a poor uptake at peripheral level. Unlike Pekin ducks, the TG in Muscovy and mule ducks are less excreted and contribute to more developed fatty liver (Hermier et al., 2003). It is already known that some genes (Fatty Acid Synthase FAS, Stearoyl CoA Desaturase SCD1, Di-acyl Glycerol Acyl Transferase DGAT2) involved in lipogenesis are upregulated in liver of overfed Pekin and Muscovy ducks (Hérault et al., 2010). However, an additional hypothesis of this TG accumulation in liver is the re-uptake of the VLDL and lipids by the liver, contributing in hepatic fattening. Given that the ability to make fatty liver occurs in these species, formerly migratory, we decided to focus our research on the carriers involved during the migration of birds. In fact, studies report changes in transporters (Fatty Acid Binding Protein (FABP) and Fatty Acid Translocase/Cluster of differentiation (FAT/CD36)) expression during migration (McFarlan et al., 2009; Weber, 2009). Therefore, we can ask if these carriers would not intervene during the development of fatty liver in overfed ducks promoting either peripheral or hepatic storage. In this study, we compared overfeeding and genotype effects on gene expression involved in lipid metabolism, body composition and biochemical parameters during overfeeding period.

We have especially investigated the re-uptake of lipids by the liver studying the expression of VLDL Receptor (VLDLR) and Fatty Acid Binding Protein (FABP) genes. The main objective was to identify the different response to overfeeding between the three genotypes, the two parents, Pekin and Muscovy ducks, and their crossbreed, the mule duck.

2. Material and methods

2.1. Animals.

All experimental procedures involving ducks were in accordance with the French national Guidelines for the care of animal for research purposes. Animals used were male ducks from the Pekin (*Anas platyrhynchos*, genotype Star 53), the Muscovy (*Cairina moschata*, genotype Canedins R71) and the mule genotypes. They were provided by Grimaud Company (Roussay, France) at the age of one day. All ducks were reared under usual conditions of light and temperature at the Experimental Station for Waterfowl breeding (INRA, Artiguères, France). All ducks were fed *ad libitum*, from hatching to 4 weeks of age, with a starting diet (2752 kcal/kg; crude proteins: 17, 5%) and from 4 to 8 weeks of age with a growing diet (2803kcal/kg; crude proteins: 15%). At the age of 8 weeks, the half of the animals were fed *ad libitum* (corresponding to lean ducks) with the same growing diet until they were slaughtered. The other half of the animals was subjected to hourly rationing in order to prepare the overfeeding. At 12 weeks of age, these ducks were overfed with corn and corn meal at the maximum of their ingestion ability during 2 weeks (24 meals). Animals were weighed at the age of 4, 6, 8, 10, 12, 13 and 14 weeks. Blood samples were collected 3 hours after meal on heparin tubes at weeks 9, 10, 11 and 12; and at the 4th, 12th, 18th and 24th meals during overfeeding period. Plasma was separated by centrifugation at 3000 x g for 10 minutes at 4°C and stored at -20°C. All ducks were slaughtered 3 hours after meal by bleeding after electronarcosis at the Experimental Station for Waterfowl breeding (INRA, Artiguères, France) at three time: point 1: before the overfeeding period (12 weeks of age), point 2: at the middle of the overfeeding period (13 weeks of age) and point 3: at the end of the overfeeding period (14 weeks of age). After dissection, liver, *pectoralis major* (muscle) and subcutaneous adipose tissue (SAT) were weighed and sampled into 2 parts. A part (20g) was stored at -20°C before determining lipid content and moisture, the other part was stored at -80°C for the study of gene expression.

2.2. Biochemical assays

Plasmas. Triglyceridemia and Non Esterified Fatty Acid (NEFA) plasma concentration were quantified by colorimetric method using enzymatic kit (Triglycérides LDB, Biodirect; NEFA HR2, Wako). *Lipid content.* The percentage of lipid content in liver, muscle and SAT was determined according to Folch method (FOLCH, 1959).

2.3. RNA isolation and reverse transcription

RNA extraction. Total RNA were isolated from frozen tissue according to the TRIZOL method (Invitrogen/Life technologies). Total RNA concentration was measured by spectrophotometry (optical density at 260nm) using a NanovuePlus (GE Healthcare) and all the samples were normalised at 500ng/ μ l. The integrity of total RNA was analysed by electrophoresis. *Reverse transcription.* cDNA were obtained by reverse transcription using the enzyme Superscript III (Life technologies) and a mix of oligo dT and random primers (Promega). 3 μ g of total RNA were used and the absence of contamination by DNA was verified by different negative control. The reaction was made in StepOne (Applied Biosystem) according to this program 25°C/5min, 55°C/60min, 70°C/15min and retention at 4°C until storage at -20°C.

2.4. Determination of mRNA levels

qPCR EvaGreen using BioMark. Before performing Fluidigm step, a Specific Target Amplification (STA) has been done with 5ng/ μ L of cDNA. This step consists in PCR using PreAmp Master Mix and specific primer in order to normalize all samples and to ensure that there is enough copies of cDNA in each well. This step is recommended by the fabricant because the method used nanovolumes. After the STA, all target and samples were distributed in a 96 x 96 chip for Fluidigm Gene Expression Array. The primers were provided by Applied Biosystems and were used at a concentration of 20 μ M. Primers sequences are presented in Table 1. The reaction was made thanks to 20X EvaGreen dye following the program: holding stage 95°C during 10 minutes, 35 cycles of amplification: 95°C 15 seconds, 60°C 1minute. All the data were analysed with the Fluidigm Real-Time PCR Analysis Software (Fluidigm Corporation v4.1.3). This part of the work was performed at the Platform of Quantitative Transcriptomic GeT-TQ (GenoToul, Toulouse, France).

Table 1. Primers used for determination of mRNA levels

	Gene (name and symbol)		Primer sequence 5'-3'	Product size (bp)
Lipid metabolism	Acyl CoA deshydrogenase 11 ACAD 11	Forward Reverse	TGGTTGTACCTCGAGCTGTG CATCCACATGAGAGGGCTTT	238
	Acyl CoA Synthetase Long-chain 1 ACSL 1	Forward Reverse	GGCTGGCTTCATACAGGAGA CTCTTTTCTTGGCCCATTTG	247
	Apolipoprotein B ApoB	Forward Reverse	TCTCACCGTGACTTGAGTGC TCCCAGCAGAAGGTGAAGAT	137
	Apolipoprotein AI ApoAI	Forward Reverse	CAAACAGCTCGACCTGAAGC GGTGTCTTCAGCCACATCT	121
	Carnitine Palmitoyl Transferase A CPT1 A	Forward Reverse	GATTTGGACCAGTGGCTGAT GAAGGTTGCTTTGCACCAAT	219
	Diglyceride Acyl Transferase 2 DGAT2	Forward Reverse	TGGGGCTTGTTACCGTACTC TGGAGAAGATGGGCTGAATC	250
	Fatty Acid Binding Protein 4 FABP4	Forward Reverse	AATGGCTCACTGAAGCAGGT TGGCTTCTTCATGCCTTTTC	143
	Fatty Acid Synthase FAS	Forward Reverse	TGAAGAAGGTCTGGGTGGAG CTCCAATAAGGTGCGGTGAT	97
	Fatty Acid Translocase/Cluster of Differentiation 36 FAT/CD36	Forward Reverse	AGTTTGCCAAAAGGCTTCAA CGAGGAACACCACAGAACCT	228
	Low Density Lipoprotein Receptor LDLR	Forward Reverse	TGTGGCCTTCAGAAAGCTCG ATCTCGTGCTGCATGTAGGG	151
	Microsomal Triglycerides Transfer Protein MTTP	Forward Reverse	TGCAGATGGACAGAGTTCGAG GGATGCAGTGCTGAAAACCT	176
	Very Low Density Lipoprotein Receptor VLDLR	Forward Reverse	CGTAACTGGCAGCACAAGAA TGCTGATCCAGTGCTCAAAC	179
	Transcription factors	Liver X Receptor Alpha LXRA	Forward Reverse	CATCTCGACGCTACAATCCA GTGTGCTGCAGTCTCTCCAC
Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha PPARA		Forward Reverse	GGATGCTGGTAGCCTATGGA ACGTGCACAATGCTCTCTTG	247
Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma PPARG		Forward Reverse	CCCAAGTTTGAGTTCGCTGT GCTGTGACGACTCTGGATGA	196
Reference genes		Actin B ActB	Forward Reverse	CCAGCCATCTTTCTTGGGTA ATGCCTGGGTACATTGTGGT
	Glyceraldehyde 3 Phosphate Deshydrogenase	Forward Reverse	CAGAGGACCAGGTTGTCTCC CACCACACGGTTGCTGTATC	146

Gene expression analysis. The chosen reference gene was Actin B but all the results were confirmed with GlycerAldehyde 3 Phosphate DeHydrogenase (GAPDH). All Cycle threshold (Ct) were collected. Results are expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) with $\Delta\Delta Ct = (Ct_{target} - Ct_{ref})_{sample} - (Ct_{target} - Ct_{ref})_{standard}$. Ct_{target} is Ct for the target gene; Ct_{ref} is Ct for reference gene; $(Ct_{target} - Ct_{ref})_{sample}$ is the first ΔCt calculated for samples and $(Ct_{target} - Ct_{ref})_{standard}$ is the second ΔCt calculated for the standard : Pekin Point 1.

2.5. Statistical analysis.

The results are expressed as mean \pm SEM. An ANOVA following by a Tukey test was made using Prism software (GraphPad Prism Software), a test of Student was also performed for certain comparison. Accepted p-value was 0.05 and considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Body and tissue weights (Tables 2 and 3)

Before overfeeding, Muscovy lean ducks show a higher BW than mule lean ducks. All genotypes exhibit an increase of BW after 2 weeks of overfeeding (+28%, +23% and +31% for Muscovy, Pekin and mule respectively). This increase is statistically higher in mule duck than in Pekin. Regarding to feed efficiency, there is an overfeeding effect in the three genotypes but no genotype effect in overfed ducks. In lean ducks, there is no statistical difference in BW between 12 and 14 weeks whatever the genotype. They are all in a maintenance status. Results for point 1 (12 weeks) are not shown as there were no significant differences between point 1 and point 2 lean ducks whatever the genotype.

3.1.1. Liver

In lean and before overfeeding, liver weight (not shown) and liver weight relative to BW (liver/BW %) are similar in the three genotypes. Overfeeding increase liver weight (not shown) and liver / BW (%) whatever the point and the genotype. We can see that overfed mule ducks have the higher liver/BW (%) than the two others genotypes either at the mid-overfeeding period or at the end, Muscovy and mule ducks differ of Pekin ducks. An increase of liver/BW (%) is observed between point 2 and 3 only for Muscovy and mule ducks.

Table 2. Overfeeding (Lean vs Overfed) and genotype (Muscovy vs Pekin vs mule) effects on body weight (BW) gain and feed efficiency. (n=16, means ± SEM) Overfeeding effect ***P< 0.001. Genotype effect P<0.05: a=Pekin ≠ Muscovy; b=Muscovy ≠ mule; c=Pekin ≠ mule.

Genotype	Treatment	BW		BW gain (g)	BW gain (%)	Feed intake (g)	Feed efficiency (BW gain/feed intake)
		12weeks (g)	14weeks (g)				
Muscovy	Overfed	5129 ± 81	6573 ± 128 ***	1444 ± 77 ***	28.14 ± 1.48 ***	11557	0.125 ± 0.007 ***
	Lean	5397 ± 99 b	5516 ± 106 a, b	119 ± 29 a, b	2.2 ± 0.52 a, b	4474	0.0267 ± 0.007 a, b
Pekin	Overfed	5189 ± 111	6378 ± 93 ***	1189 ± 73 ***, c	23.32 ± 1.71 ***, c	11557	0.103 ± 0.006 ***
	Lean	4963 ± 138	4648 ± 142 a	-372 ± 45 a	-6.95 ± 0.94 a	2419	-0.154 ± 0.019 a, c
mule	Overfed	5117 ± 80	6701 ± 105 ***	1583 ± 93 ***, c	31.17 ± 1.98 ***, c	16289	0.097 ± 0.006 ***
	Lean	4876 ± 77 b	4656 ± 78 b	-221 ± 20 b	-4.52 ± 0.44 b	2734	-0.081 ± 0.007 b, c

Table 3. Overfeeding (Lean vs Overfed), time (Point 2 vs point 3) and genotype (Muscovy vs Pekin vs mule) effects on tissue relative body weight (%BW) at mid and end of the overfeeding period. (n=16, means ± SEM) Overfeeding effect: *P<0.05. Genotype effect P<0.05: a=Pekin ≠ Muscovy; b=Muscovy ≠ mule; c=Pekin ≠ mule. Time effect P<0.5: 1= lean point 2 ≠ point 3; 2= overfed point 2 ≠ point 3.

% BW	13 Weeks / Point 2		14 Weeks / Point 3	
	Lean	Overfed	Lean	Overfed
Liver				
Muscovy	1.54 ± 0.06	3.84 ± 0.08 *, 2, b	1.66 ± 0.05	6.50 ± 0.27 *, 2, a
Pekin	1.51 ± 0.03	3.76 ± 0.3 *, c	1.4 ± 0.04	4.15 ± 0.16 *, a, c
mule	1.95 ± 0.04	5.30 ± 0.21 *, 2, b, c	1.61 ± 0.04	7.23 ± 0.3 *, 2, c
Muscle				
Muscovy	7.34 ± 0.13 a	6.38 ± 0.10 *, a, b	7.33 ± 0.09 a	6.17 ± 0.09 *, a, b
Pekin	5.89 ± 0.22 a, c	4.96 ± 0.15 *, a	5.95 ± 0.21 a, c	4.76 ± 0.16 *, a
mule	6.90 ± 0.37 c	5.09 ± 0.08 *, b	7.16 ± 0.12 c	4.74 ± 0.06 *, b
SAT				
Muscovy	1.95 ± 0.07 a	1.56 ± 0.05 *, a	1.87 ± 0.06 a	1.83 ± 0.05 a, b
Pekin	3.01 ± 0.14 a, c	2.77 ± 0.08 a, c	2.94 ± 0.09 a, c	3.12 ± 0.08 a, c
mule	2.02 ± 0.06 c	1.84 ± 0.06 2, c	2.11 ± 0.08 c	2.65 ± 0.08 *, 2, b, c

3.1.2. Muscle

In lean, Muscovy ducks exhibit the higher muscle weight (not shown) and muscle weight relative to BW (muscle/BW %). Mule ducks only exhibit a higher muscle/BW (%) (not for muscle weight, not shown) than Pekin ducks at 13 weeks, and a higher value for both parameters at 14 weeks. In overfed ducks, we can see a decrease in muscle/BW (%) (not for muscle weight, not shown) in all genotypes compared to corresponding lean whatever the time. There is no time effect on muscle/BW (%) in any genotype and nutritional state.

3.1.3. Subcutaneous Adipose Tissue (SAT)

In lean, Pekin ducks exhibit the most important percentage of SAT in comparison with Muscovy and mule ducks at point 2 and 3. Intergenotype differences observed in lean are the same in overfed, excepted for point 3 where Pekin is higher than mule, which is higher than Muscovy. Overfeeding effect is less observed in this tissue. We just notice that there is a decrease in SAT/BW (%) in Muscovy for point 2, and an increase in mule ducks for point 3.

3.2. Biochemical assays

3.2.1. Triglyceridemia (Figure 1)

Overfeeding effect is statistically significant with an increase in triglyceridemia during overfeeding period whatever the genotype and time in comparison with lean individuals (data not shown). A higher concentration of triglycerides is observed in mule ducks at point 1 in comparison with Muscovy ducks. At the 4th meal, an important increase in plasma triglycerides in mule and Muscovy ducks occurs with the highest values for the mule, followed by the Muscovy and to finish Pekin ducks (5.24mmol/L; 4.14mmol/L; 2.06mmol/L respectively). From the 12th meal to the end of the overfeeding period, Pekin exhibits the highest triglyceridemia (from 5.17 to 5.92mmol/L) in comparison with the two others genotypes. At point 3, only the Muscovy differs from the Pekin.

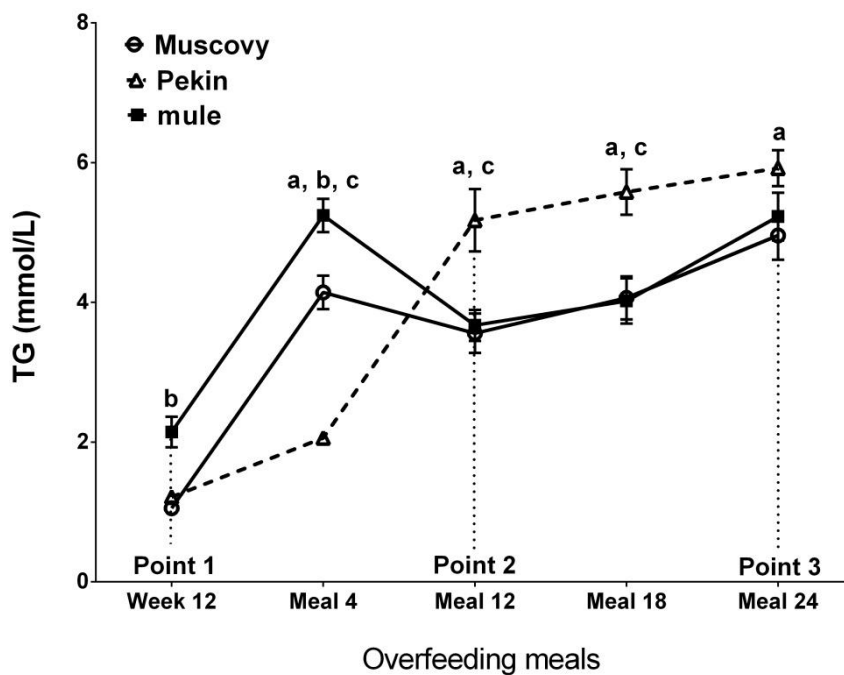


Figure 1. Genotype effect during overfeeding period on plasma TG concentration. (n=16, means \pm SEM) Genotype effect $P < 0.05$: a=Pekin \neq Muscovy; b=Muscovy \neq mule; c=Pekin \neq mule.

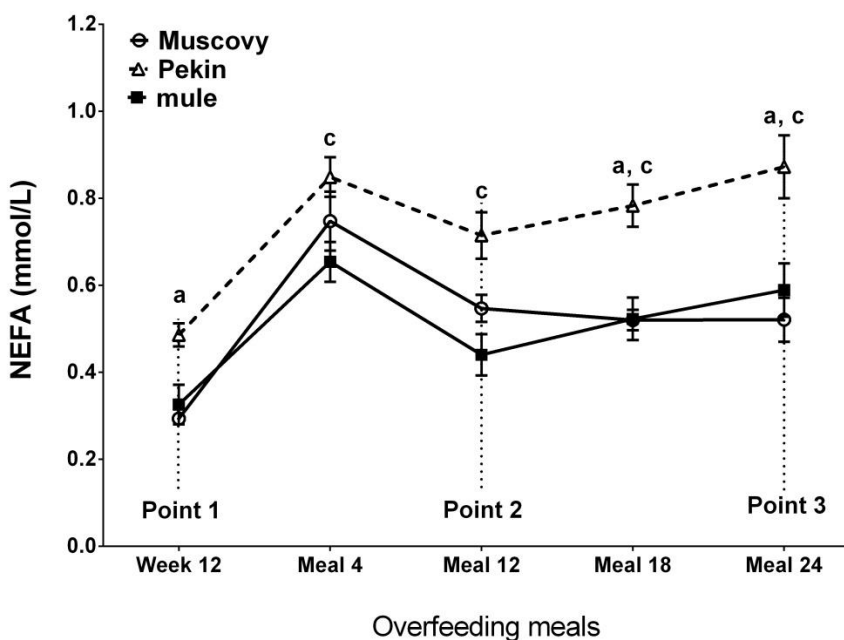


Figure 2. Genotype effect during overfeeding period on plasma NEFA concentration. (n=16, means \pm SEM) Genotype effect $P < 0.05$: a=Pekin \neq Muscovy. b=Muscovy \neq mule; c=Pekin \neq mule.

3.2.2. Non Esterified Fatty Acid (NEFA) plasma concentration (Figure 2)

At point 1, NEFA plasma concentration is higher in lean Muscovy and mule ducks in comparison with overfed individuals (data not shown). For mule and Muscovy ducks, there is a significant peak at the 4th meal in comparison with the lean groups (data not shown). For Pekin ducks the same peak is observed and remains constant until point 3. For Muscovy and mule ducks, NEFA concentration decreases at point 2 and remains stable for Muscovy until point 3 whereas a slight increase is observed for mule ducks. Regarding genotype effect, Pekin ducks exhibits the highest NEFA plasma level at each time (higher than 0.7mmol/L from the 4th meal), it differs statistically from the two others genotypes (smaller than 0.6mmol/L for Muscovy and mule at meal 12th and 24th).

3.2.3. Total lipid content (Table 4)

Regarding liver, we notice an important overfeeding effect with an increase of the percentage of total lipid content whatever the genotype. Nevertheless, this increase is smaller in Pekin ducks (x0,5) in comparison with the two others genotypes. We can also notice a statistical increase in each genotype between point 2 and point 3. In muscle, Muscovy ducks exhibit the smallest value whatever the point and we can see that it is the only genotype which do not show an overfeeding effect at point 2 and 3. In SAT, Pekin has the highest lipid content in point 2, but in point 3, mule ducks catch up Pekin ducks.

Table 4. Genotype and overfeeding effects in lipid content in liver, muscle (*Pectoralis major*) and Subcutaneous Adipose Tissue (SAT) in Muscovy (M), Pekin (P) and mule (m) ducks at point 2 and 3.

(n=16, means \pm SEM). Overfeeding effect *P< 0.001. Genotype effect P<0.05: a=Pekin \neq Muscovy. b=Muscovy \neq mule; c=Pekin \neq mule. Time effect P<0.05: 1=differences between point 2 and 3 in lean; 2=differences between point 2 and 3 in overfed.

Total lipids (%)	13 Weeks / Point 2		14 Weeks / Point 3	
	Lean	Overfed	Lean	Overfed
Liver				
Muscovy	5.3 \pm 0.23	32.06 \pm 1.36 *, 2, a	5.85 \pm 0.17	50.50 \pm 2.32 *, 2, a
Pekin	5.43 \pm 0.56	16.41 \pm 1.73 *, 2, a, c	5.2 \pm 0.19	31.84 \pm 2.25 *, 2, a, c
mule	4.64 \pm 0.21	35.07 \pm 1.64 *, 2, c	5.29 \pm 0.18	55.7 \pm 1.4 *, 2, c
Muscle (<i>Pectoralis major</i>)				
Muscovy	3.03 \pm 0.17 a	3.39 \pm 0.17 a, b	3.50 \pm 0.1 a, b	4.55 \pm 0.3 a, b
Pekin	6.17 \pm 0.33 a, c	5.87 \pm 0.3 2, a	5.86 \pm 0.31 a	7.82 \pm 0.5 *, 2, a
mule	3.9 \pm 0.13 c	4.89 \pm 0.37 2, b	5.01 \pm 0.28 b	8.19 \pm 0.38 *, 2, b
SAT				
Muscovy	66.61 \pm 1.54 a	70.48 \pm 2.88 a	65.08 \pm 1.66 a	74.19 \pm 0.8 *, a, b
Pekin	77.52 \pm 2.11 a, c	80.24 \pm 0.96 a, c	78.09 \pm 0.89 a	82.6 \pm 0.65 a
mule	65.05 \pm 2.27 c	69.87 \pm 2.7 2, c	70.98 \pm 1.16	83.62 \pm 0.67 *, 2, b

3.3. Gene expression

3.3.1. Genotype effect before overfeeding (Tables 5 and 6)

At point 1, we can observe that there are already some differences between the three genotypes. Acyl CoA Synthetase Long-chain 1 (ACSL1) is overexpressed in the liver of mule ducks. In muscle, ACSL1 and Diglyceride Acyl Transferase 2 (DGAT2) are upregulated in Pekin ducks. Gene implicated in β oxidation are overexpressed in mule and Pekin ducks in liver (except for ACAD11) and muscle. Apolipoproteins (AI and B) and Microsomal Triglycerides Transfer Protein (MTTP), implicated in lipoprotein formation, are overexpressed in liver of mule and Pekin ducks; there is no difference in muscle.

For Fatty Acid (FA) transport, there is no statistical difference in relative expression of Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) between the three genotypes in liver or muscle. However, relative gene expression of Fatty Acid Translocase/Cluster of Differentiation 36 (FAT/CD36) is higher in mule liver than in Pekin. In muscle, FAT/CD36 is overexpressed in Pekin and mule in comparison with Muscovy. For Subcutaneous Adipose Tissue (SAT), there is an upregulation of both genes studied in FA transport in mule. Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) is upregulated in mule's liver whereas Very Low Density Lipoprotein Receptor (VLDLR) is overexpressed in Pekin's muscle. Relative expression of transcription factors is higher in mule liver in comparison with the two others genotypes.

Table 5. Genotype effect on relative gene expression of genes implicated in lipids metabolism in liver, in Muscovy (M), Pekin (P) and mule (m) ducks at point 1. (n=6, means \pm SEM) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, none=no statistical effect. Slash bar (/) means that the two genotype are no statistically different from each other, > means that one is bigger than the other.

Point 1		Species			Effects
Organ	Gene	Muscovy	Pekin	mule	
Liver					
	FAS	1.65 \pm 0.48	1.08 \pm 0.16	1.51 \pm 0.19	none
Lipogenesis	ACSL1	2.26 \pm 0.58	1.19 \pm 0.28	3.09 \pm 0.45	m > P / M *
	DGAT 2	0.004 \pm 0.0006	0.004 \pm 0.0005	0.004 \pm 0.0004	none
β Oxidation	CPT1A	0.16 \pm 0.06	1.1 \pm 0.19	1.30 \pm 0.17	m / P > M **
	ACAD11	1.73 \pm 0.31	1.05 \pm 0.11	2.09 \pm 0.29	m / M > P **
Lipoprotein formation	ApoB	0.62 \pm 0.07	1.08 \pm 0.15	1.37 \pm 0.14	m / P > M *
	ApoAI	0.95 \pm 0.22	1.15 \pm 0.25	2.15 \pm 0.21	m > P / M *
	MTTP	0.54 \pm 0.04	1.10 \pm 0.20	1.26 \pm 0.09	m / P > M *
FA Transport	FABP4	1.77 \pm 0.51	1.17 \pm 0.25	3.12 \pm 1.20	none
	FAT/CD36	1.42 \pm 0.17	1.10 \pm 0.18	1.91 \pm 0.23	m > P *
Lipoprotein receptors	VLDLR	1.19 \pm 0.28	1.20 \pm 0.23	1.23 \pm 0.33	none
	LDLR	0.052 \pm 0.006	0.075 \pm 0.005	0.097 \pm 0.013	m / P > M *
Transcription Factors	PPARG	1.25 \pm 0.09	1.04 \pm 0.10	1.36 \pm 0.10	m > P *
	PPARA	1.65 \pm 0.20	1.09 \pm 0.17	2.21 \pm 0.27	m > P **
	LXRA	0.85 \pm 0.13	1.09 \pm 0.16	1.67 \pm 0.09	m > P / M **

Table 6. Genotype effect on relative gene expression of genes implicated in lipids metabolism in muscle (Pectoralis major) and Subcutaneous Adipose Tissue (SAT), in Muscovy (M), Pekin (P) and mule (m) ducks at point 1. (n=6, means \pm SEM) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, none=no statistical effect. Slash bar (/) means that the two genotype are no statistically different from each other, > means that one is bigger than the other.

Point 1		Species			Effects
Organ	Gene	Muscovy	Pekin	mule	
Muscle					
	FAS	0.92 \pm 0.34	1.62 \pm 0.71	1.30 \pm 0.37	none
Lipogenesis	ACSL1	0.2 \pm 0.05	1.06 \pm 0.17	0.47 \pm 0.10	P > m > M *
	DGAT 2	0.28 \pm 0.05	1.04 \pm 0.13	1.01 \pm 0.19	P / m > M **
β Oxidation	CPT1A	0.047 \pm 0.003	1.142 \pm 0.253	0.743 \pm 0.182	P / m > M ***
	ACAD11	0.41 \pm 0.10	1.11 \pm 0.24	0.89 \pm 0.18	P / m > M *
Lipoprotein formation	ApoB	0.48 \pm 0.20	1.89 \pm 0.74	0.80 \pm 0.21	none
	ApoAI	0.28 \pm 0.13	1.25 \pm 0.45	0.57 \pm 0.19	none
	MTTP	0.35 \pm 0.14	1.41 \pm 0.49	0.91 \pm 0.24	none
FA Transport	FABP4	0.56 \pm 0.15	1.01 \pm 0.06	0.79 \pm 0.27	none
	FAT/CD36	0.12 \pm 0.03	1.03 \pm 0.11	1.00 \pm 0.11	P / m > M ***
Lipoprotein receptors	VLDLR	0.16 \pm 0.04	0.97 \pm 0.19	0.45 \pm 0.08	P > m > M *
	LDLR	0.48 \pm 0.20	1.62 \pm 0.66	0.80 \pm 0.21	none
SAT					
FA Transport	FABP4	0.73 \pm 0.07	1.01 \pm 0.07	1.45 \pm 0.11	m > P > M *
	FAT/CD36	0.80 \pm 0.09	1.04 \pm 0.12	1.44 \pm 0.17	m > M *

3.3.2. Overfeeding and genotype effects at mid-overfeeding (Tables 7 and 8)

At point 2, we have studied two effects: differences between lean and overfed individuals in the same species and differences observed between species in overfed ducks.

For overfeeding effect, we can see that overfeeding increases relative expression of genes implicated in lipogenesis in liver whatever the genotype. In muscle, this increase is observed for FAS in the three palmipeds; for ACSL1 only in mule and for DGAT2 we noted a greater expression in mule followed by Pekin then Muscovy. Overfeeding decreases expression of genes implicated in β oxidation in liver.

In muscle, Pekin ducks exhibit a decrease of CPT1A expression, while mule ducks show an increase of ACAD11 expression when they are overfed. Overfeeding reduces ApoB expression in liver of mule and Pekin ducks. ApoAI and MTTP are upregulated in liver of Muscovy and Pekin ducks. In *pectoralis major* of Pekin ducks, overfeeding increases the expression of the three gene of lipoprotein formation studied. In mule muscle, only ApoAI and MTTP are overexpressed, and in Muscovy, only MTTP. Regarding FA transport, there is no difference between lean and overfed individuals for FABP4 in liver and for FATCD36 in muscle. An effect of diet is noticed with the decrease of expression of FATCD36 in liver of mule and Pekin ducks, and an upregulation of FABP4 in mule muscle. In SAT, only FABP4 is upregulated in Pekin and mule ducks. There is no overfeeding effect at point 2 on VLDLR expression in liver. In muscle, there is just an overexpression for mule ducks. In contrast, LDLR is downregulated in liver of Muscovy and mule ducks, and is upregulated in muscle of Pekin and mule ducks. To finish with overfeeding effect, among hepatic transcription factors, only PPARG is upregulated in overfed palmipeds at point 2.

Regarding genotype effect in overfed individuals, there is no difference in expression of lipogenesis gene in liver contrary to muscle. FAS, ACSL1 and DGAT2 are overexpressed in mule muscle in comparison with the two others genotypes. Concerning genes implicated in β Oxidation, Pekin ducks exhibit the highest value in liver for CPT1A and in muscle they are overexpressed in mule ducks. Lipoprotein formation related genes are overexpressed in Pekin liver and in mule muscle. FABP4 is upregulated only in Pekin SAT, no differences are noticed in other tissues. Concerning relative expression of FAT/CD36, it is higher in liver of Muscovy ducks, and in muscle of mule ducks in comparison with the two others genotypes. No variation is observed in SAT. Regarding re-uptake of lipoprotein, only LDLR differs in the three genotypes in liver: Pekin exhibits the highest values. In muscle relative expression of LDLR and VLDLR are higher in Pekin and mule ducks in comparison with Muscovy. Regarding expression of transcription factors in liver, there is an upregulation of LXRA in Pekin in comparison with Muscovy.

Table 7. Genotype and overfeeding effects on relative expression of genes implicated in lipids metabolism in liver, in Muscovy (M), Pekin (P) and mule (m) ducks at point 2. (n=6, means \pm SEM) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, none=no statistical effect. Slash bar (/) means that the two genotype are no statistically different from each other, > means that one is bigger than the other.

Point 2		Muscovy		Pekin		mule		Effects	
Organ	Gene	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Feeding	Species
Liver									
	FAS	1.11 \pm 0.27	8.09 \pm 1.43	1.05 \pm 0.19	5.99 \pm 1.46	2.34 \pm 0.42	7.58 \pm 0.89	M / P / m **	none
Lipogenesis	ACSL1	1.20 \pm 0.52	1.77 \pm 0.37	1.36 \pm 0.43	2.83 \pm 0.84	0.94 \pm 0.11	1.28 \pm 0.22	M / P / m **	none
	DGAT 2	0.003 \pm 0.0006	0.232 \pm 0.0346	0.004 \pm 0.0005	0.288 \pm 0.0611	0.006 \pm 0.0011	0.357 \pm 0.0684	M / P / m ****	none
β Oxidation	CPT1A	0.14 \pm 0.02	0.018 \pm 0.001	1.55 \pm 0.29	0.19 \pm 0.03	0.43 \pm 0.08	0.07 \pm 0.02	M / P / m **	P > m > M *
	ACAD11	1.07 \pm 0.12	0.56 \pm 0.16	1.53 \pm 0.34	0.70 \pm 0.14	1.09 \pm 0.18	0.44 \pm 0.10	M / m *	none
Lipoprotein formation	ApoB	0.37 \pm 0.02	0.30 \pm 0.03	0.73 \pm 0.09	0.23 \pm 0.04	1.01 \pm 0.11	0.22 \pm 0.04	P / m ***	none
	ApoAI	0.49 \pm 0.07	1.19 \pm 0.16	0.75 \pm 0.07	1.33 \pm 0.33	0.75 \pm 0.12	0.80 \pm 0.11	M / P **	none
	MTTP	0.56 \pm 0.05	0.84 \pm 0.12	1.01 \pm 0.17	2.08 \pm 0.39	0.92 \pm 0.12	1.11 \pm 0.12	M / P *	P > m / M *
FA Transport	FABP4	4.04 \pm 2.67	1.80 \pm 0.49	0.64 \pm 0.16	3.66 \pm 2.2	0.63 \pm 0.16	1.56 \pm 0.49	none	none
	FAT/CD36	1.20 \pm 0.14	1.01 \pm 0.11	1.01 \pm 0.10	0.37 \pm 0.08	1.41 \pm 0.14	0.48 \pm 0.09	m / P ***	M > m / P **
Lipoprotein receptors	VLDLR	1.70 \pm 0.22	0.86 \pm 0.30	0.79 \pm 0.24	1.10 \pm 0.22	1.21 \pm 0.28	1.10 \pm 0.18	none	none
	LDLR	0.045 \pm 0.006	0.022 \pm 0.002	0.089 \pm 0.008	0.066 \pm 0.014	0.071 \pm 0.006	0.025 \pm 0.004	m / M **	P > m / M *
Transcription Factors	PPARG	0.86 \pm 0.11	3.36 \pm 0.58	0.76 \pm 0.07	2.34 \pm 0.36	0.71 \pm 0.10	2.51 \pm 0.38	M / P / m ****	none
	PPARA	1.10 \pm 0.20	0.91 \pm 0.08	1.11 \pm 0.14	1.14 \pm 0.12	1.05 \pm 0.12	0.73 \pm 0.16	none	none
	LXRA	0.82 \pm 0.06	0.73 \pm 0.06	1.44 \pm 0.20	1.17 \pm 0.15	1.29 \pm 0.12	0.96 \pm 0.12	none	P > M *

Table 8. Genotype and overfeeding effects on relative expression of genes implicated in lipids metabolism in muscle (*pectoralis major*) and SAT, in Muscovy (M), Pekin (P) and mule (m) ducks at point 2. (n=6, means \pm SEM) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, none=no statistical effect. Slash bar (/) means that the two genotype are no statistically different from each other, > means that one is bigger than the other.

Point 2		Muscovy		Pekin		mule		Effects	
Organ	Gene	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Feeding	Species
Muscle									
	FAS	0.67 \pm 0.15	9.50 \pm 3.65	1.60 \pm 0.48	17.00 \pm 6.15	3.40 \pm 0.99	40.48 \pm 7.59	M / P / m *	m > M / P *
Lipogenesis	ACSL1	0.33 \pm 0.08	0.28 \pm 0.05	1.13 \pm 0.21	0.41 \pm 0.05	0.34 \pm 0.04	1.98 \pm 0.41	P / m *	m > M / P ****
	DGAT 2	0.35 \pm 0.06	1.22 \pm 0.21	3.69 \pm 0.47	6.11 \pm 1.24	1.79 \pm 0.33	14.11 \pm 2.88	M / m **	m > P > M **
β Oxidation	CPT1A	0.053 \pm 0.012	0.030 \pm 0.004	0.888 \pm 0.135	0.450 \pm 0.085	0.316 \pm 0.031	0.404 \pm 0.092	P*	P / m > M **
	ACAD11	0.85 \pm 0.06	0.99 \pm 0.26	2.20 \pm 0.40	1.52 \pm 0.26	0.77 \pm 0.12	2.94 \pm 0.44	m ****	m > P / M **
Lipoprotein formation	ApoB	0.39 \pm 0.11	0.73 \pm 0.24	0.69 \pm 0.23	3.71 \pm 1.15	1.66 \pm 0.56	3.98 \pm 0.91	P *	P / m > M **
	ApoAI	0.63 \pm 0.27	1.86 \pm 0.77	0.91 \pm 0.25	4.65 \pm 1.49	1.37 \pm 0.64	4.54 \pm 0.90	P / m *	m > M *
	MTTP	0.42 \pm 0.06	1.20 \pm 0.29	0.84 \pm 0.30	7.78 \pm 3.13	1.05 \pm 0.45	12.20 \pm 2.30	M / P / m *	P / m > M *
FA Transport	FABP4	0.91 \pm 0.22	0.72 \pm 0.21	1.34 \pm 0.48	1.14 \pm 0.44	0.36 \pm 0.08	2.24 \pm 0.64	m *	none
	FAT/CD36	0.29 \pm 0.05	0.22 \pm 0.04	0.51 \pm 0.17	0.29 \pm 0.07	0.59 \pm 0.12	0.71 \pm 0.06	none	m > P / M **
Lipoprotein receptors	VLDLR	0.28 \pm 0.07	0.25 \pm 0.03	1.15 \pm 0.08	0.78 \pm 0.20	0.42 \pm 0.11	1.27 \pm 0.19	m *	P / m > M *
	LDLR	0.39 \pm 0.11	0.73 \pm 0.24	0.69 \pm 0.23	3.71 \pm 1.15	1.66 \pm 0.56	3.98 \pm 0.91	P / m *	P / m > M *
SAT									
FA Transport	FABP4	1.14 \pm 0.12	1.00 \pm 0.22	1.16 \pm 0.18	4.80 \pm 1.63	1.07 \pm 0.08	1.59 \pm 0.15	P / m *	P > m / M *
	FAT/CD36	0.57 \pm 0.07	0.69 \pm 0.18	0.84 \pm 0.15	0.6 \pm 0.13	1.31 \pm 0.13	1.07 \pm 0.09	none	none

3.3.3. Overfeeding and genotype effects at the end of the overfeeding period (Tables 9 and 10)

At point 3, we can observe overfeeding and genotype effects. First, in liver, overfeeding triggers an increase in relative expression of FAS in Pekin, and of DGAT2 in liver of all genotypes. In muscle FAS and DGAT2 are upregulated in the three palmipeds. For β Oxidation, CPT1A and ACAD11 (except for Muscovy) are downregulated in liver of overfed individuals whereas in muscle there is a downregulation for CPT1A in Pekin and an upregulation for ACAD11 in Muscovy. Concerning lipoprotein formation, expression of ApoB is decreased in liver of all overfed ducks, MTP and ApoAI are decreased only in overfed mule ducks. In muscle, there is an overexpression of genes implicated in lipoprotein formation in all genotypes. Expression of FABP4 is upregulated in liver of overfed ducks, especially in mule ducks (96 times more expressed than in lean one, and respectively 26 times and 7 times for Muscovy and Pekin ducks) which exhibit also an increase of FABP4 expression in muscle. Expression of VLDLR is overexpressed in liver of mule ducks whereas expression of LDLR is downregulated. No difference exists between lean and overfed individuals in relative expression of VLDLR and LDLR in muscle. Regarding transcription factors in liver, there is an upregulation of PPARG in all genotypes and a downregulation of PPARA and LXRA in Pekin and mule. In SAT, overfed Muscovy exhibits the highest value for relative expression of FABP4 in comparison with lean one. Relative expressions of FABP4 and FAT/CD36 in SAT of Pekin overfed are quite non-existent.

Regarding species effects, there is an overexpression of genes implicated in lipogenesis in liver and muscle of Pekin ducks in comparison of the two others genotypes. CPT1A is also upregulated in Pekin liver and muscle. Hepatic expression of genes implicated in lipoprotein formation are increase in Pekin. In muscle, Pekin and mule ducks exhibit the highest values for ApoB and ApoAI. There is an increase of FABP4 and VLDLR expression in liver of mule ducks. Mule ducks exhibit the highest expression of FABP4 in muscle. Regarding transcription factors, we can observe an upregulation of PPARG and LXRA in Pekin liver. No differences are observed in relative expression of VLDLR and LDLR in muscle.

Table 9. Genotype and overfeeding effects on relative expression of genes implicated in lipids metabolism in liver, in Muscovy (M), Pekin (P) and mule (m) ducks at point 3. (n=6, means \pm SEM) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, none=no statistical effect. Slash bar (/) means that the two genotype are no statistically different from each other, > means that one is bigger than the other.

Point 3		Muscovy		Pekin		mule		Effects	
Organ	Gene	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Feeding	Species
Liver									
	FAS	5.55 \pm 1.21	10.56 \pm 2.00	3.71 \pm 0.54	12.40 \pm 1.87	2.20 \pm 0.49	2.89 \pm 0.78	P ***	P / M > m ****
Lipogenesis	ACSL1	0.89 \pm 0.12	0.94 \pm 0.11	1.29 \pm 0.09	2.16 \pm 0.37	2.46 \pm 0.75	1.39 \pm 0.30	M / P / m **	P > M ***
	DGAT 2	0.004 \pm 0.0011	0.084 \pm 0.0240	0.006 \pm 0.0013	0.364 \pm 0.0652	0.003 \pm 0.0008	0.150 \pm 0.0409	M / P / m **	P > M / m ****
β Oxidation	CPT1A	0.09 \pm 0.03	0.024 \pm 0.007	2.33 \pm 0.38	0.24 \pm 0.04	1.58 \pm 0.37	0.15 \pm 0.04	P / M / m *	P / m > M **
	ACAD11	0.82 \pm 0.25	0.42 \pm 0.07	1.24 \pm 0.12	0.46 \pm 0.07	0.71 \pm 0.16	0.31 \pm 0.08	P / m *	none
Lipoprotein formation	ApoB	0.96 \pm 0.12	0.46 \pm 0.11	1.68 \pm 0.16	0.87 \pm 0.13	1.61 \pm 0.29	0.41 \pm 0.05	M / P / m **	P > M / m *
	ApoAI	1.39 \pm 0.15	1.97 \pm 0.29	1.79 \pm 0.27	2.01 \pm 0.24	3.26 \pm 0.65	1.64 \pm 0.22	m *	none
	MTTP	0.77 \pm 0.07	0.73 \pm 0.13	1.16 \pm 0.13	1.54 \pm 0.23	2.28 \pm 0.36	1.25 \pm 0.21	m *	P > M *
FA Transport	FABP4	0.89 \pm 0.20	23.40 \pm 7.04	1.38 \pm 0.29	9.42 \pm 3.27	2.39 \pm 1.16	229.4 \pm 74.44	M / P / m *	m > M / P **
	FAT/CD36	1.52 \pm 0.21	1.00 \pm 0.21	1.48 \pm 0.13	0.77 \pm 0.14	1.72 \pm 0.09	0.59 \pm 0.06	P / m **	none
Lipoprotein receptors	VLDLR	1.12 \pm 0.38	1.17 \pm 0.28	1.52 \pm 0.27	1.62 \pm 0.11	1.18 \pm 0.13	3.55 \pm 1.27	m **	m > M **
	LDLR	0.067 \pm 0.022	0.028 \pm 0.008	0.157 \pm 0.020	0.057 \pm 0.006	0.103 \pm 0.024	0.029 \pm 0.003	P / m *	P > M / m *
Transcription Factors	PPARG	0.94 \pm 0.12	1.73 \pm 0.27	1.34 \pm 0.13	3.41 \pm 0.56	0.79 \pm 0.18	2.41 \pm 0.33	M / P / m *	P > M *
	PPARA	1.26 \pm 0.12	0.84 \pm 0.17	1.67 \pm 0.18	0.74 \pm 0.10	1.69 \pm 0.10	0.34 \pm 0.05	P / m **	M / P > m *
	LXRA	0.97 \pm 0.08	0.84 \pm 0.12	1.84 \pm 0.13	1.51 \pm 0.18	1.35 \pm 0.26	0.74 \pm 0.06	m *	P > M / m **

Table 10. Genotype and overfeeding effects on relative expression of genes implicated in lipids metabolism in muscle (Pectoralis major) and SAT, in Muscovy (M), Pekin (P) and mule (m) ducks at point 3. (n=6, means \pm SEM) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, none=no statistical effect. Slash bar (/) means that the two genotype are no statistically different from each other, > means that one is bigger than the other.

Point 3		Muscovy		Pekin		mule		Effects	
Organ	Gene	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Feeding	Species
Muscle									
Lipogenesis	FAS	2.14 \pm 0.38	22.77 \pm 7.30	2.73 \pm 0.67	33.88 \pm 7.35	3.81 \pm 1.36	11.88 \pm 1.91	M / P / m *	P > m **
	ACSL1	0.40 \pm 0.11	0.69 \pm 0.17	0.64 \pm 0.08	0.90 \pm 0.28	0.68 \pm 0.19	0.87 \pm 0.10	none	none
	DGAT 2	0.72 \pm 0.16	3.71 \pm 0.87	3.12 \pm 0.51	17.9 \pm 3.38	2.50 \pm 0.29	7.98 \pm 1.44	M / P / m **	P > m > M **
β Oxidation	CPT1A	0.057 \pm 0.010	0.038 \pm 0.005	1.323 \pm 0.450	0.531 \pm 0.133	0.615 \pm 0.164	0.374 \pm 0.057	P *	P / m > M **
	ACAD11	0.85 \pm 0.13	1.89 \pm 0.32	2.09 \pm 0.40	1.59 \pm 0.29	1.69 \pm 0.53	2.52 \pm 0.57	M **	none
Lipoprotein formation	ApoB	0.64 \pm 0.20	1.44 \pm 0.50	1.43 \pm 0.48	3.82 \pm 0.61	2.02 \pm 0.85	5.45 \pm 0.48	P / m *	P / m > M *
	ApoAI	0.56 \pm 0.12	2.62 \pm 0.48	1.39 \pm 0.36	4.70 \pm 0.55	2.01 \pm 0.60	5.17 \pm 0.65	M / P / m **	P / m > M *
	MTTP	0.48 \pm 0.14	5.96 \pm 2.23	2.51 \pm 0.90	12.86 \pm 2.88	2.46 \pm 0.86	9.10 \pm 1.26	M / P / m *	none
FA Transport	FABP4	1.04 \pm 0.18	1.76 \pm 0.50	1.82 \pm 0.49	3.43 \pm 1.66	1.40 \pm 0.57	6.51 \pm 1.93	m *	m > M *
	FAT/CD36	0.22 \pm 0.04	0.52 \pm 0.11	0.49 \pm 0.09	0.59 \pm 0.14	0.57 \pm 0.11	0.66 \pm 0.08	M *	none
Lipoprotein receptors	VLDLR	0.30 \pm 0.07	0.48 \pm 0.10	1.26 \pm 0.26	0.83 \pm 0.20	0.66 \pm 0.18	0.75 \pm 0.20	none	none
	LDLR	0.66 \pm 0.14	1.44 \pm 0.50	1.33 \pm 0.10	1.54 \pm 0.32	1.00 \pm 0.14	0.92 \pm 0.11	none	none
SAT									
FA Transport	FABP4	0.83 \pm 0.15	1.34 \pm 0.14	2.03 \pm 0.31	0.0005 \pm 0.00005	1.55 \pm 0.46	1.57 \pm 0.32	M / P *	M / m > P *
	FAT/CD36	0.93 \pm 0.18	1.41 \pm 0.16	1.50 \pm 0.17	0.004 \pm 0.004	0.92 \pm 0.18	1.25 \pm 0.14	P *	M / m > P *

3.3.4. Time effect in liver of overfed individuals (Table 11)

Regarding evolution of relative gene expression between point 2 and point 3 in overfed ducks, we can see that each genotype differs. Muscovy and mule show a downregulation of DGAT2 at point 3 and Pekin an upregulation of FAS at point 3 in comparison with point 2. For lipoprotein formation, there is an upregulation of ApoB in Pekin and mule (in addition with ApoAI) at point 3. Finally, regarding re-uptake of FA and TG, there is an overexpression of FABP4 at point 2 in Muscovy ducks and at point 3 in all genotypes, mule exhibiting the highest value. In addition, mule ducks exhibit also an upregulation of VLDLR at the end of the overfeeding in comparison with mid-overfeeding.

Table 11. Relative gene expression between point 2 and point 3 in liver of overfed Muscovy, Pekin and mule ducks. (n=6, means \pm SEM). *P<0.05; > < means that one is bigger than the other.

		Point 2	Point 3	Effects
Species	Gene			Time
Muscovy	DGAT 2	0.232 \pm 0.0346	0.084 \pm 0.0240	pt2 > pt3 *
	FABP4	1.80 \pm 0.49	23.40 \pm 7.04	pt2 < pt3 *
	PPARG	3.36 \pm 0.58	1.73 \pm 0.27	pt2 > pt3 *
Pekin	FAS	5.99 \pm 1.46	12.40 \pm 1.87	pt2 < pt3 *
	ApoB	0.23 \pm 0.04	0.87 \pm 0.13	pt2 < pt3 *
mule	FAS	7.58 \pm 0.89	2.89 \pm 0.78	pt2 > pt3 *
	DGAT 2	0.357 \pm 0.0684	0.150 \pm 0.0409	pt2 > pt3 *
	ApoB	0.22 \pm 0.04	0.41 \pm 0.05	pt2 < pt3 *
	ApoAI	0.80 \pm 0.11	1.64 \pm 0.22	pt2 < pt3 *
	FABP4	1.56 \pm 0.49	229.4 \pm 74.44	pt2 < pt3 *
	VLDLR	1.10 \pm 0.18	3.55 \pm 1.27	pt2 < pt3 *

4. Discussion and conclusion

The genetic heterogeneity of overfeeding response is well documented. First of all, Guy et al. (Guy et al., 1995) have shown differences in overfeeding response in Muscovy and mule regarding body composition. Hermier et al. (Hermier et al., 2003), have also shown different body composition (with a lower subcutaneous adiposity and a higher muscular development for Muscovy in comparison with Pekin) but also differences in TG plasma concentration (Pekin higher than Muscovy). Our experiment confirmed these results previously described and allow the comparison of the three genotypes in the same experimentation. In our study, mule and Muscovy exhibit the higher body weight gain linked to a higher ratio of liver/BW (%) and hepatic lipid content at the end of the overfeeding (Tables 2, 3 and 4). Regarding muscle, Muscovy shows the higher ratio muscle/BW (%) but the lower percentage of total lipid in accordance with Chartrin et al. (Chartrin et al., 2006a). On the other side, Pekin exhibits the higher ratio SAT/BW (%) associated with a high lipid content. All together these results confirmed the better potential of mule ducks in fatty liver production and the improved peripheral storage of Pekin ducks with a better lipid exportation in our study.

Regarding genes expression, some data are already available. Hérault et al. (2010), have demonstrated that overfeeding upregulates the hepatic expression of *de novo* lipogenesis genes such as FASN, SCD1 and DGAT2 12 hours after the last meal. They also demonstrated that Pekin ducks exhibit the highest relative expression for DGAT2 and SCD1 in comparison with Muscovy 2-4h after the last meal. Furthermore, it has been shown that FAS activity was increased in Muscovy liver (in comparison with Pekin and mule) just after the first meal of overfeeding period (Baeza et al., 2005). Our study allows us to explore gene expression on the entire duration of the overfeeding period simultaneously in the three genotype of palmipeds.

Firstly, just before the beginning of overfeeding, we noticed differences in gene expression (Tables 5 and 6). In liver, we have shown that studied genes are overexpressed mostly in mule ducks, whereas in muscle, Pekin often exhibits the highest expression of studied genes, especially for ACSL1. ACSL1 is an enzyme known to increase lipid intake in hepatic cells (Parkes et al., 2006) and has been shown upregulated in liver of geese after overfeeding (Zhu et al., 2011). In our case, it may be a predictive marker of lipid accumulation. In our study, we did not show genotype differences in FAS relative expression before overfeeding.

Nevertheless, Pekin and mule ducks overexpress genes implicated in lipoprotein formation, suggesting that the neosynthesized lipids should be exported. The upregulation of FABP4 and FAT/CD36 in SAT suggest that these lipids should be incorporated in SAT from point 1. This results suggests that there are already genotype differences in ducks before overfeeding and confirmed that mule and Pekin do not exert lipogenesis in the same tissue.

During overfeeding period, hepatic steatosis is induced and *de novo* lipogenesis is enhanced (Tables 7, 8, 9 and 10). We have demonstrated a hepatic upregulation of genes implicated in lipids synthesis such as FAS, DGAT2 and ACSL1 in overfed individuals. This increase was earlier in mule and Muscovy liver especially for DGAT2 (Table 11) in correlation with their higher liver lipid content. DGAT2 is already describes as a main actor of lipids accumulation in liver. In mice overexpressing this gene, an important lipid accumulation can be observed (Monetti et al., 2007) and when DGAT2 is silenced, it reduced lipid content in liver of obese mice gene (Cheol et al., 2007). In our case, DGAT2 is induced at higher levels than FAS and ACSL1 and can be the key enzyme of lipid accumulation in liver, as previously described by Herault et al. (Hérault et al., 2010). However, hepatic expression of genes involved in lipogenesis do not differ between the three genotypes at point 2, nevertheless, at point 3, Pekin exhibits the highest values. In addition, mRNA level of genes implicated in lipid secretion are higher in lean individuals, except for MTP in liver of overfed Pekin at mid overfeeding which shows the highest value in comparison of the two others genotypes. These observations support the ability of mule and Muscovy to produce fatty liver whereas Pekin promotes the export of TG through lipoprotein formation leading to a smaller hepatic lipid content. This result can also be linked to the highest TG and NEFA (Fig 1 and 2) plasma concentrations in Pekin ducks that reflect lipids export already describes by Baéza et al. (Baeza et al., 2005). Regarding the re-uptake of fatty acids and lipoproteins, we have demonstrated a huge increase of FABP4 and VLDLR in overfed mule liver at the end of the overfeeding (as well as in the two other genotypes but to a lesser extent). The expression of FABP4 in liver might be quite surprising because its isoform is mainly expressed in adipose tissue. Nevertheless, it has been already shown that FABP4 expression can be ectopic and play a key role in metabolic disorders (Auguet et al., 2014; Furuhashi et al., 2014). These results put light on a mechanism that remains unknown and suggest that, at the end of the overfeeding period, hepatic lipid accumulation is less the result of lipogenesis than re-uptake of fatty acids and triglycerides.

Concerning LDLR expression, we have noticed a downregulation of this gene suggesting a smaller incorporation of LDL, this have been already noticed in Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) where LDLR is downregulated (Nakamuta et al., 2010). To finish, expression of PPARG in liver was increase in all overfed palmipeds. This transcription factor is very well known to regulate lipids accumulation and adipogenesis (Ahmadian et al., 2013; Wang et al., 2008) and especially shown overexpressed in fatty liver of animal models of obesity and diabetes (Rogue et al., 2010) and can be responsible for the increase of FABP4 expression (Memon et al., 2000).

In muscle, we have demonstrated an overexpression of gene involved in lipogenesis during overfeeding in the three genotypes at point 2 and 3 suggesting an activation of TG synthesis. Nevertheless, this expression remains weak in contrast to that observed in the liver. In fact, the liver is the essential organ for lipid synthesis in birds. Peripheral tissues (muscle and adipose tissues) present a low capacity *de novo* biosynthesis of triglyceride (Chartrin et al., 2006a; Saadoun and Leclercq, 1986). This observation is in accordance with those of Saez et al. (G Saez et al., 2009) who observed an upregulation of FAS in muscle of Pekin and Muscovy ducks. However, there is also an upregulation of gene implicated in lipoprotein formation which can lead to a higher exportation of lipids. This observation can be linked with the smaller lipid content of muscle in all genotype in comparison with liver. Furthermore, Pekin shows the highest values for relative expression of genes implicated in lipoprotein formation in muscle. Regarding the uptake of FA and lipoprotein in muscle, we have shown an upregulation of FABP4, LDLR and VLDLR in overfed mule suggesting an incorporation of lipids in muscle but this phenomenon is earlier and smaller than these observed in liver. In addition, there is a genotype effect with an overexpression of VLDLR and LDLR in Pekin and mule ducks in comparison with Muscovy at point 2. These observations can be linked to the total lipid content which increase in mule between point 2 and 3 and which is smaller in Muscovy ducks in comparison with the other two palmipeds.

Finally in SAT an upregulation at point 2 of FABP4 in Pekin is observed suggesting an increase in FA incorporation linked to higher lipid content and higher LPL activity already described (André et al., 2007). The total absence of relative expression for FABP4 and FAT/CD36 at point 3 in Pekin is quite surprising. In fact, some expression have been detected in this tissue and for the same sample but for other genes (like Actin B which has a stable expression). We can hypothesize that SAT is already at the highest expression for these genes leading to the best efficiency in lipid incorporation in Pekin.

To summarize (Figures 3 and 4), hepatic steatosis is the result of many mechanisms. First, even if Pekin ducks exhibit the highest values for gene involved in liver lipogenesis (FAS, DGAT2), it exhibits also the highest gene expression of ApoB and MTTP which participate to lipoprotein formation. Furthermore, Pekin ducks show an overexpression of CPT1A in liver at all times studied, suggesting a highest catabolism for this specie. These two phenomenons lead to less lipid content in Pekin ducks liver. In addition, we have demonstrated a huge increase in relative expression of FABP4 and VLDLR at the end of the overfeeding period in mule ducks. These genes are key factors of lipid accumulation in mule liver at the end of the overfeeding period. These new data allow us to completely understand a mechanism unknown until today. In fact, besides an active lipogenesis, a lack in lipids exportation and an uptake of lipids at peripheral level, mule can incorporate more lipids in liver than the two other genotypes leading to a bigger and fatter liver. However; this study need further investigations and genes expression must be confirmed by a study of protein quantity and activity.

Some studies have already demonstrated difference on proteome during overfeeding. In fact, FAS protein was only detected at the end of the overfeeding period in mule ducks (Bax et al., 2012) and FABP4 was detected in overfed mule ducks presenting a high fat loss when liver is cooked (Theron et al., 2011). This study is based on proteomic approach but it must be interesting to target specifically proteins presenting an increase of mRNA expression in order to determined their quantity and activity.

To conclude, this study allows us to better understand the mechanisms of lipids metabolism in the three genotypes during overfeeding. These mechanisms are complex and gather many genes involved in synthesis, exportation and incorporation both in the liver than in peripheral tissue (Figures 3 and 4). Furthermore, our results can also be compared to those measured during the development of NAFLD in humans, and we can ask if overfed ducks could be an animal model to study mechanisms of NAFLD. However, further investigations are necessary to understand the underlying mechanisms, a kinetic study might put lights on interaction between genes in order to explain some quite surprising results. This would be of a great interest for researchers studying lipid metabolism and NAFLD, and this new knowledge in duck physiology could be used to investigate human lipid disorders.

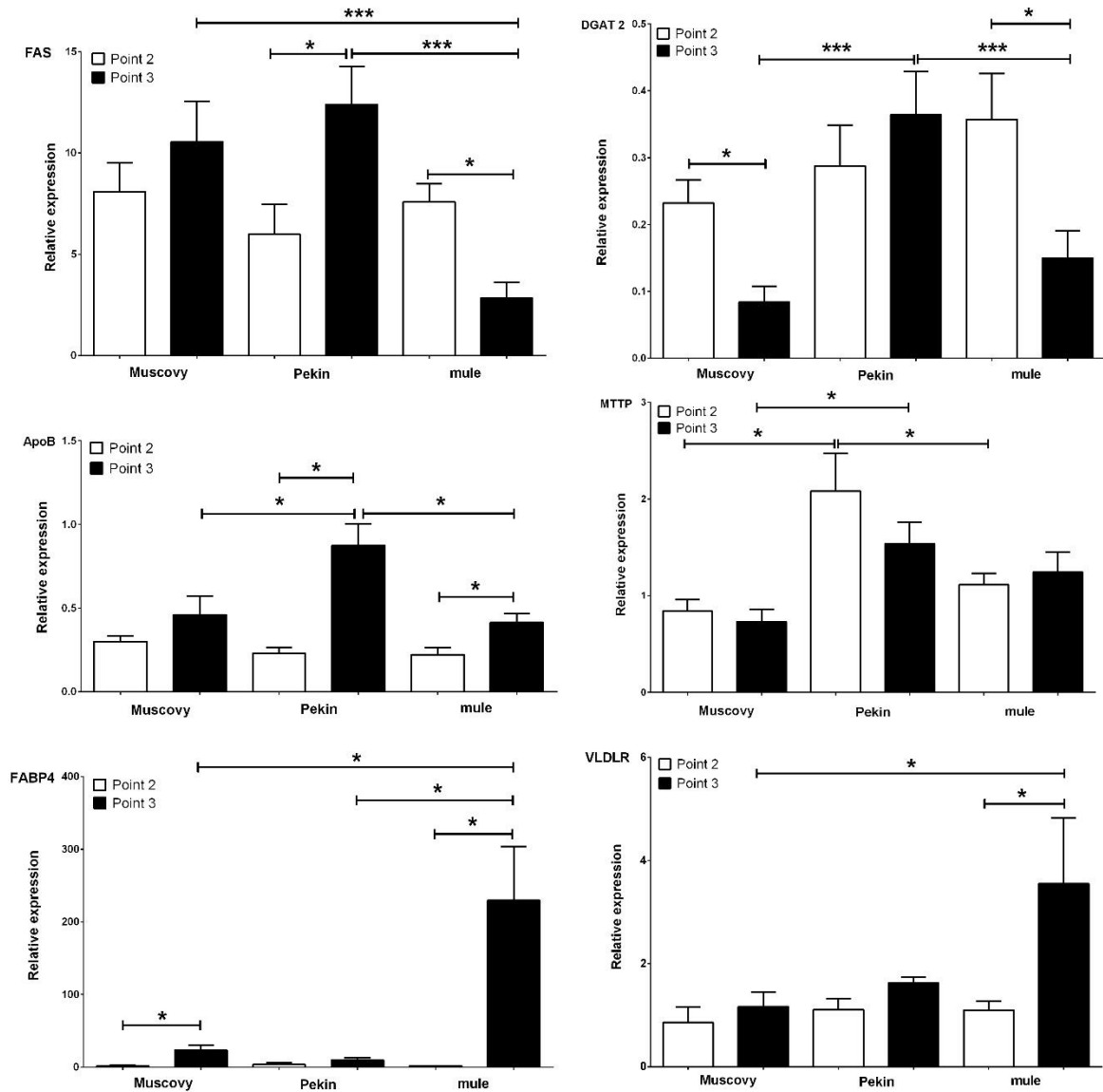


Figure 3. Summary of relative gene expression of key genes implicated in lipogenesis, lipoprotein formation and fatty acid transport in each genotype at point 2 and 3.

(n=16, means ± SEM) * p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

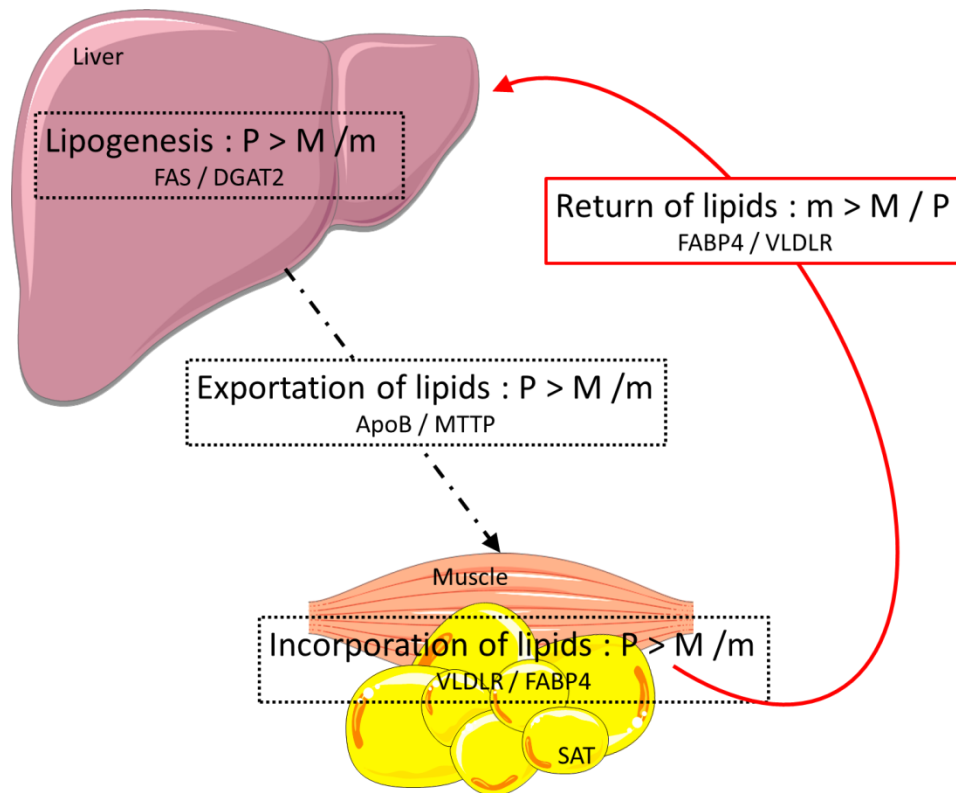


Figure 4. Genotype effect on key genes studied during overfeeding.

Pekin ducks exhibit the highest hepatic lipogenesis regarding overexpression of FAS and DGAT2 but also the greater exportation (upregulation of MTTP/ApoB) and peripheral uptake. However mule ducks demonstrate a huge re-uptake capacity of the liver leading to a higher fatty liver.

Résultats non publiés

Cette première étude a fait l'objet de résultats non publiés comprenant la mesure du taux de fonte du foie ainsi que la quantification de la matière sèche dans les tissus.

La fonte se traduit par une exsudation de nature essentiellement lipidique qui a lieu lors des traitements thermiques de conservation : pasteurisation ou stérilisation. Ces données sont illustrées dans la Figure A.

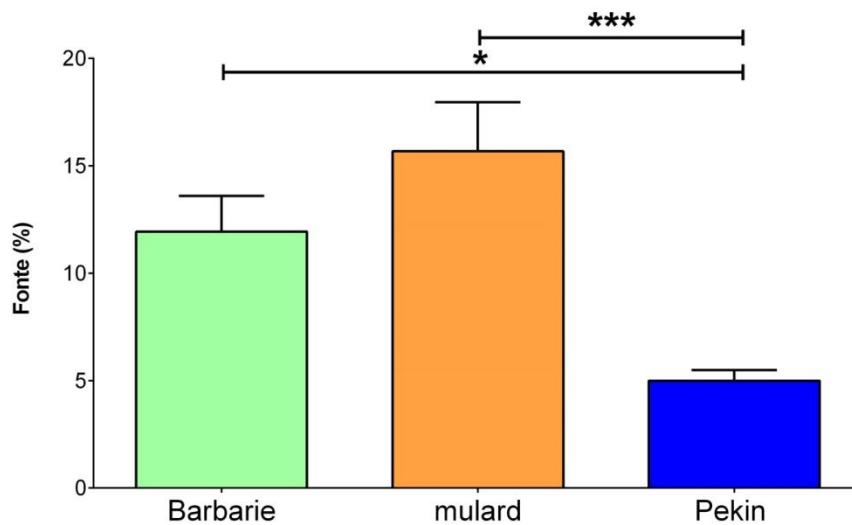


Figure A. Taux de fonte chez les trois types génotypes de canards à savoir Barbarie, Pékin et mulard au point 3.

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

Nous avons démontré que le canard Pékin présentait le plus faible taux de fonte en comparaison des deux autres types génétiques. Ce résultat est à relier au poids réduit du foie de ce canard en fin de gavage ainsi qu'à son contenu en lipides plus faible. En effet, il a d'ores et déjà été démontré une corrélation positive entre le poids de foie ou le taux de lipides et le taux de fonte (Blum et al., 1990; Théron et al., 2013). Enfin, le pourcentage de fonte observé dans chaque génotype répond parfaitement aux standards de commercialisation pour ce produit (Décret n°93-999 du 9 Août 1993) fixant à 30% le maximum de graisse exsudée.

Tableau A. Effet du genotype et du gavage sur le contenu en eau du foie, du muscle (*pectoralis major*) et du Gras Sous Cutané (GSC) chez les canards de Barbarie, Pékin et mulard aux points 2 et 3.

(n=16, moyenne \pm SEM). Effet du gavage *P< 0.001. Effet du génotype P<0.05: a=Pekin \neq Muscovy. b=Muscovy \neq mule; c=Pekin \neq mule. Effet du temps P<0.05: 1=différences entre les points 2 et 3 chez les maigres ; 2=différences entre les points 2 et 3 chez les gavés.

Contenu en eau (%)	13 semaines		14 semaines	
	Point 2		Point 3	
	Maigres	Gavés	Maigres	Gavés
Foie				
Barbarie	68,87 \pm 3,09 *	50,62 \pm 1,48 *, 2, a	68,51 \pm 0,46 *	35,74 \pm 1,78 *, 2, a
Pekin	70,91 \pm 0,65 *	64,37 \pm 1,6 *, 2, a, c	71,61 \pm 0,35 *	52,16 \pm 2,14 *, 2, a, c
mulard	68,74 \pm 0,39 *	48,86 \pm 1,51 *, 2, c	70,18 \pm 0,34 *	35,61 \pm 1,39 *, 2, c
Muscle				
Barbarie	74,65 \pm 0,21	75,22 \pm 0,24 a, b	74,37 \pm 0,19 a	73,41 \pm 0,35 a, b
Pekin	72,42 \pm 1,05	72,09 \pm 0,3 a	71,82 \pm 0,33 a	69,97 \pm 0,61 a
mulard	73,35 \pm 0,15	72,41 \pm 0,45 2, b	72,97 \pm 0,53 *	69,46 \pm 0,35 *, 2, b
GSC				
Barbarie	28,10 \pm 1,38 a	26,56 \pm 1,37 a	28,43 \pm 0,76 a	18,66 \pm 1,63 a, b
Pekin	18,66 \pm 1,63 a	15,63 \pm 0,53 a, c	18,72 \pm 0,67 a	15,51 \pm 0,57 a
mulard	30,95 \pm 2,29 1	22 \pm 1,02 2, c	24,39 \pm 0,86 1	13,42 \pm 0,77 2, b

Le contenu hépatique en eau est fortement diminué par le gavage quel que soit le génotype et le point (Tableau A). Néanmoins, cette diminution est moins marquée chez le canard Pékin en comparaison des deux autres types génétiques. Enfin, un effet temps est également décelé avec un pourcentage en eau largement diminué en point 3 en comparaison du point 2. Dans le muscle, seul le canard mulard présente un effet du gavage sur la teneur en eau associé à une évolution significative entre les points 2 et 3. Le canard de Barbarie, quant à lui, présente la plus haute teneur en eau dans ce tissu. Dans le GSC, les résultats sont assez similaires à ceux du muscle. Ces valeurs évoluent à l'inverse de celles obtenues pour la teneur en lipides. Cette observation suggère le remplacement de la part d'eau par une part de lipides au cours du gavage.

Article 2: Inter genotype differences in expression of genes involved in glucose metabolism in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks.

Comparative biochemistry and physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology

L'étude du métabolisme lipidique chez les trois génotypes a permis de mettre en avant de nombreuses différences entre les canards Pékin, Barbarie et mulard. Nous avons donc décidé de voir si des variations pourraient également exister en comparant les transporteurs de glucose et quelques enzymes du métabolisme glucidique chez ces trois espèces. En effet, l'amidon de maïs étant digéré en glucose, un meilleur traitement de ce dernier pourrait permettre une augmentation des capacités de stéatose hépatique. Nous avons démontré que le canard Pékin présentait une glycémie inférieure aux deux autres types génétiques, et ce, dès le 4^{ème} repas de gavage. Cette diminution peut être reliée à la surexpression des GLUT dans les tissus périphériques (muscle et tissu adipeux sous-cutané). De plus, GLUT2 n'est retrouvé que très faiblement dans la muqueuse jéjunale et un autre GLUT semble prendre le relais : GLUT3. Cependant, ce résultat nécessite plus de recherches. Dans le foie, c'est majoritairement le canard Pékin qui présente les plus hautes expressions des transporteurs de glucose et des enzymes du métabolisme glucidique. Enfin, le peu de variations significatives dans l'expression des gènes du métabolisme du glucose entre les trois génotypes et l'expression spécifique momentanée des transporteurs de glucose ne nous permettent pas de détecter une réelle spécificité de chaque génotype. Pour conclure, les différences de réponse au gavage chez le canard Pékin, Barbarie et mulard ne peuvent s'expliquer par des variations d'expression du métabolisme glucidique (captage du glucose, ou glycolyse).

Mots clés : Stéatose hépatique, métabolisme du glucose, expression de gènes, canards.

Inter genotype differences in expression of genes involved in glucose metabolism in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks.

Tavernier Annabelle^{1,2}; Gontier Karine^{1,2}; Ricaud Karine^{1,2}; Bernadet Marie-Dominique³;
Davail Stéphane^{1,2}

¹UMR 1419 INRA UPPA NuMÉA, 371 Rue du Ruisseau 40000 Mont de Marsan FRANCE;

²UMR 1419 INRA UPPA NuMÉA, Quartier Ibarron 64310 Saint Pée sur Nivelle ; ³INRA
UEPFG, 1076 Route de Haut Maucq 40280 Benquet FRANCE

Corresponding author: Gontier Karine

UMR 1419 INRA UPPA NuMÉA, 371 Rue du Ruisseau 40000 Mont de Marsan FRANCE

e-mail: karine.gontier@univ-pau.fr; tel.: +33 558 513 706; fax: +33 558 513 737

Abstract. In waterfowls, overfeeding leads to a hepatic steatosis, also called “foie gras”. Our main objectives were to determine what is the share of involvement of genes of glucose metabolism in the establishment of fatty liver in the three genotypes of palmipeds: Muscovy (*Cairina moschata*), Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) and their crossbreed, the mule duck. We have shown that Pekin ducks exhibit the lowest glycemia during all the overfeeding period in comparison with the two other genotypes. This observation can be linked to the upregulation of glucose transporters (GLUT) in peripheral tissues (muscle or adipose tissue) in this specie. In addition, GLUT2 was not found in jejunal mucosa and another GLUT seems to replace it 3 hours after the meal: GLUT3. Mule ducks upregulating precociously GLUT3 compared to Pekin ducks. However, these results need further investigations, for example at another time of sampling after the meal. In liver, globally, Pekin ducks exhibit the highest expression of GLUT or enzymes implicated in glycolysis. The few significant variations of gene expressions in glucose metabolism between the three genotypes and the momentary specific overexpression of glucose transporters do not allow us to detect a lot of specific genotype differences. To conclude, the differences in response to overfeeding of Pekin, Muscovy and mule ducks, for the establishment of hepatic steatosis, cannot be only explained by the glucose metabolism (glucose uptake and glycolysis).

Keywords: Hepatic steatosis, glucose metabolism, gene expression, ducks

Acknowledgments. We thank the “Conseil Général des Landes” and the “Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras” (CIFOG) for financing this work. We also thank the technical staff of INRA Artiguères for rearing ducks (Certificate of Authorization to Experiment on Living animals, no. B40-037-1, Ministry of Agriculture and Fish Products, ethic committee Aquitaine birds and fish no.C2EA-73). We would also like to thank Frédéric Martins and Jean-José Maoret for performing Fluidigm analysis (Génopole Toulouse/Midi-pyrénées, Plateau Transcriptomique Quantitative (TQ), Toulouse, France). We finally thank Patrick Daniel, Karine Bellet and Martine Chague of the laboratory Pyrénées Landes (LPL, Mont de Marsan) to let us use their material.

1. Introduction

In domestic waterfowls, hepatic steatosis induced by overfeeding (also called fatty liver or “foie gras”) is the result of many mechanisms, leading to a strong activity of *de novo* lipogenesis resulting in hepatic lipids accumulation. This pathology is frequently associated with metabolic disorders such as insulin resistance with or without hyperglycemia (Fon Tacer and Rozman, 2011). During the development of hepatic steatosis, lipids are mainly triglycerides derived from the esterification of three fatty acids with a glycerol-3-phosphate (Hermier et al., 1991; Saadoun and Leclercq, 1986; Theron et al., 2011) principally newly synthesized from glucose by hepatic lipogenesis. Indeed, overfeeding consists in distributing over a short period a large quantity of food principally based on corn (starch-rich raw material), which, after ingestion, is degraded into glucose and then absorbed *via* carriers from the intestinal lumen to the bloodstream. Finally, glucose is brought to various organs to be stored (as glycogen, lipids...) or used as energy fuel. Birds exhibit a higher glycemia than this of mammals (Hazelwood and Lorenz, 1959) even after a short fasting (Belo et al., 1976). In addition, birds appear insulin-insensitive with blood sugar levels either unaffected by exposure to insulin or with moderate hypoglycemia induced only by exposure to supra-physiological insulin levels (Chida et al., 2000; Tokushima et al., 2005). In *ad libitum* fed ducks, mean circulating glucose is about 1.90 to 2.20 g/L (Farhat and Chavez, 2000) whereas in overfed ducks, glycemia depends on genotype and time of sampling. In fact, during the overfeeding period, glycemia can vary between 2,5 g/L and 4 g/L at the last meal of the overfeeding period according to the genotype (Gontier et al., 2013). Many actors are involved in the absorption and the transport of glucose. Glucose transporters family is divided into 3 classes with particular specificities. They have specific roles in whole body glucose homeostasis because of their substrate specificity, tissue distribution, cellular location and regulation mechanisms. Firstly, in gastrointestinal tract, glucose absorption is principally achieved by a high affinity active transport through Sodium Glucose Linked Transporter 1 (SGLT1) (Gal-garber et al., 2000; Wright and Turk, 2004) located on the apical membrane of the enterocytes. On basolateral membrane, the output of glucose is mediated through facilitated non-dependent sodium transporter: GLUcose Transporter 2 (GLUT2), which is also present on the membrane of the hepatocytes (B Thorens et al., 1990). In chicken’s liver, expression of GLUT1, GLUT3 and 8 have already been detected at smaller levels (Kono et al., 2005). In skeletal muscle of chickens, there is no detectable expression of GLUT2, nevertheless, GLUT3 has been described (Humphrey et al., 2004).

To finish, GLUT12 has been recently described in bird muscle and may respond to insulin signal (Coudert et al., 2015). Despite all these data, little is known about the evolution of glycemia and expression of genes involved in glucose metabolism after a meal. Davail et al. (Davail et al., 2003) have already studied plasma glucose concentration after the first meal of overfeeding in three genotype of palmipeds: the common duck or Pekin (*Anas platyrhynchos*), the Muscovy duck (*Cairina moschata*) and the mule duck (the sterile hybrid from male Muscovy and female Pekin used for “foie gras” production). They have observed an increase in glycemia 1 hour after the meal in Pekin and Muscovy ducks but not in mule ducks. The comparison of these three genotypes is very interesting for understand the molecular and cellular mechanisms involved in the development of fatty liver. Indeed, they exhibit differences in overfeeding response. In fact, Pekin duck, in addition of a high hepatic lipogenesis, presents an intramuscular lipogenesis and higher lipid exportation to peripheral organs (such as adipose tissues and muscles) than Muscovy or mule ducks (André et al., 2007; Chartrin et al., 2006a; G Saez et al., 2009). We have already demonstrated many differences and key genes involved in lipid metabolism in these genotypes that would explain the different responses in a situation of nutritional overload. The identified genes were especially implicated in the re-uptake of lipids at the hepatic level at the end of the overfeeding period in mule ducks (Personnal communication Tavernier article 1). So, in addition to these data on lipid metabolism and as part of a comprehensive study of the mechanisms that influence the development of fatty liver, we decided to observe the actors implicated in glucose metabolism in the three genotype of palmipeds during the overfeeding period.

Therefore, we studied glycemia and expression of genes involved in glucose metabolism at hepatic and peripheral levels at different time of the overfeeding period in Pekin, Muscovy and mule ducks. We begin the study with glucose transporter expression in intestinal mucosa, especially jejunum as it presents the greater capacity to transfer sugar in chickens or in pigeons (Dong et al., 2012; Ferrer et al., 1994; Gilbert et al., 2007). We continue the study in the liver, the main organ of lipogenesis in ducks (Saadoun and Leclercq, 1986), and in peripheral tissues: muscle (*pectoralis major*) and subcutaneous adipose tissue (SAT). In these tissues, we study some enzyme of the glucose metabolism, especially those of glycolysis like Hexokinase (HK), ENOLase (ENO); Succinate DeHydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA) implicated in the Krebs Cycle and also a transcription factor known to respond to glycemia: Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP).

The main objective of this study was to identify if genes involved in glucose metabolism can take part in the different responses of Pekin, Muscovy and mule ducks to overfeeding.

2. Material and methods

2. 1. Animals.

All experimental procedures involving ducks were in accordance with the French National Guidelines for the care of animal for research purposes. Animals used were male ducks from the Pekin (*Anas platyrhynchos*, genotype Star 53), the Muscovy (*Cairina moschata*, genotype Canedins R71) and the mule genotypes. They were provided by Grimaud Company (Roussay, France) at the age of one day. All ducks were reared under usual conditions of light and temperature at the Experimental Station for Waterfowl breeding (INRA, Artiguères, France). All ducks were fed *ad libitum*, from hatching to 4 weeks of age, with a starting diet (2752 kcal/kg; crude proteins: 17,5 %) and from 4 to 8 weeks of age with a growing diet (2803 kcal/kg; crude proteins: 15 %). At the age of 8 weeks, the half of the animals were fed *ad libitum* (corresponding to lean ducks) with the same growing diet until they were slaughtered. The other half of the animals was subjected to hourly rationing in order to prepare the overfeeding. At 12 weeks of age, these ducks were overfed with corn and corn meal at the maximum of their ingestion ability during 2 weeks (24 meals). Animals were weighed at the age of 4, 6, 8, 10, 12, 13 and 14 weeks. Blood samples were collected 3 hours after the meal on heparin tubes at weeks 9, 10, 11 and 12; and at the 4th, 12th, 18th and 24th meals during the overfeeding period. Plasma was separated by centrifugation at 3000 x g for 10 minutes at 4°C and stored at -20°C. All ducks were slaughtered 3 hours after the meal by bleeding after electronarcosis at the Experimental Station for Waterfowl breeding (INRA, Artiguères, France) at three time: point 1: before the overfeeding period (12 weeks of age), point 2: at the middle of the overfeeding period (13 weeks of age) and point 3: at the end of the overfeeding period (14 weeks of age). After dissection, liver, *pectoralis major* (muscle) and subcutaneous adipose tissue (SAT) were weighed, sampled and was stored at -80°C for the study of gene expression. The jejunum mucosa was also taken by scrapping the internal face of jejunum and was stored at -80°C.

2. 2. Biochemical assays

Plasmas. Glycemia was quantified by colorimetric method using enzymatic kit (Glucose RTU, Biomérieux).

2. 3. RNA isolation and reverse transcription

RNA extraction. Total RNA were isolated from frozen tissue according to the TRIZOL method (Invitrogen/Life technologies). Total RNA concentration was measured by spectrophotometry (optical density at 260 nm) using a NanovuePlus (GE Healthcare) and all the samples were normalised at 500 ng/ μ l. The integrity of total RNA was analysed by electrophoresis. *Reverse transcription.* cDNA were obtained by reverse transcription using the enzyme Superscript III (Life technologies) and a mix of oligo dT and random primers (Promega). 3 μ g of total RNA were used and the absence of contamination by DNA was verified by different negative control. The reaction was made in StepOne (Applied Biosystem) according to this program 25°C / 5 min, 55°C / 60 min, 70°C / 15 min and retention at 4°C until storage at -20°C.

2. 4. Determination of mRNA levels

qPCR EvaGreen using BioMark. Before performing Fluidigm step, a Specific Target Amplification (STA) has been done with 5 ng/ μ L of cDNA. This step consists in PCR using PreAmp Master Mix and specific primer in order to normalize all samples and to ensure that there are enough copies of cDNA in each well. This step is recommended by the fabricant because the method used nanovolumes. After STA, all target and samples were distributed in a 96 x 96 chip for Fluidigm Gene Expression Array. The primers were provided by Applied Biosystems and were used at a concentration of 20 μ M. Primers sequences are presented in Table 1. The reaction was made thanks to 20X EvaGreen dye following the program: holding stage 95°C during 10 minutes, 35 cycles of amplification: 95°C 15 seconds, 60°C 1minute. All the data were analysed with the Fluidigm Real-Time PCR Analysis Software (Fluidigm Corporation v4.1.3). This part of the work was performed at the Platform of Quantitative Transcriptomic GeT-TQ (GenoToul, Toulouse, France). *Gene expression analysis.* The chosen reference gene was Actin B but all the results were confirmed with GlycerAldehyde 3 Phosphate DeHydrogenase (GAPDH). All Cycle threshold (Ct) were collected.

Table 1. Primers used for determination of mRNA levels.

	Genes		Primer sequences 5'-3'	Product size (bp)
Transcription factors	Carbohydrate Response Element Binding Protein ChREBP	Forward	TCCTCCACACTGCAAAACTG	80
		Reverse	ACCATGCCGTTGAAAGACTC	
Glucids Metabolism	Enolase Alpha	Forward	CGCTACATGGGGAAAGGTGT	246
	Eno1	Reverse	AAGGTCAGCAATGTGACGGT	
	Glucose Transporter 1	Forward	CGGGGATCAATGCGGTTTTTC	158
	GLUT1	Reverse	GTGAAGGGTCCTACGTCCAG	
	Glucose Transporter 2	Forward	GGAGTTGACCAACCCGTTTA	242
	GLUT2	Reverse	CCCACCTCGAAGAAGATGAC	
	Glucose Transporter 3	Forward	TTCTCCAGAAACTCCGTGGC	238
	GLUT3	Reverse	GGCTCTGTGATACCAGCTCG	
	Glucose Transporter 8	Forward	ACTGGGAGGCTATCTTGTGG	225
	GLUT8	Reverse	CAAGAGCCAAGCATAACCACG	
	Sodium Glucose Linked Transporter 1	Forward	GCAGTGGGACTATGGGCTAT	157
	SGLT1	Reverse	CTGCTGCTGTTCCCTGCTATG	
	Hexokinase	Forward	GAGGGAGCAGACGTTGTGAA	190
	HK	Reverse	GCCGCATCTCCTCCATGTAA	
Succinate Deshydrogenase Complex, Subunit A SDHA	Forward	TGGAACACTGACTTGGTGGGA	164	
	Reverse	CCTTGGAGTGGCTTGGGAATA		
Reference genes	Actin B	Forward	CCAGCCATCTTTCTTGGGTA	141
	ActB	Reverse	ATGCCTGGGTACATTGTGGT	
	Glyceraldehyde 3 Phosphate Deshydrogenase GAPDH	Forward	CAGAGGACCAGGTTGTCTCC	146
		Reverse	CACCACACGGTTGCTGTATC	

Results are expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) with $\Delta\Delta Ct = (Ct_{target} - Ct_{ref})_{sample} - (Ct_{target} - Ct_{ref})_{standard}$. Ct_{target} is Ct for the target gene; Ct_{ref} is Ct for reference gene; $(Ct_{target} - Ct_{ref})_{sample}$ is the first ΔCt calculated for samples and $(Ct_{target} - Ct_{ref})_{standard}$ is the second ΔCt calculated for the standard : Pekin Point 1.

2. 5. Statistical analysis.

The results are expressed as mean \pm SEM. An ANOVA following by a Tukey test was made using Prism software (GraphPad Prism Software), a test of Student was also performed for certain comparison. Accepted p-value was 0.05 and considered as statistically significant.

3. Results

3. 1. Glycemia (Figure 1)

Glucose plasma concentration is increased in overfed individuals in comparison with lean ones. This increase is observed for Muscovy and mule ducks from the 4th meal to the end of the overfeeding period and, for Pekin ducks, this increase is only noticed from the 18th to the 24th meal. Regarding genotype effect, we can see that Pekin ducks present a glycemia lower than the two others genotypes along the overfeeding period.

3. 2. Gene expressions

3. 2. 1. Genotype effect before overfeeding (Table 2)

In jejunum, all GLUcose Transporters (GLUT1, 2, 3 and 8), without distinction, and SGLT1 are expressed in Pekin ducks. Whereas GLUT3 and SGLT1 expressions are predominant in jejunum Muscovy ducks, in mule ducks, only GLUT3 appears very upregulated. In liver, Muscovy ducks present the lowest values of relative gene expression for any GLUT studied and enzymes of glucose metabolism. Mule ducks overexpressed GLUT2 and GLUT8 as well as the transcription factor ChREBP and the enzyme genes SDHA, ENO1, in comparison of Pekin or Muscovy ducks. In muscle, Pekin and mule ducks exhibit the highest values for GLUTs or enzymes studied except for ENOlase 1 (ENO1) which does not present any statistical variation between genotypes. There is no difference in relative expression of GLUTs or glucose metabolism enzymes in SAT.

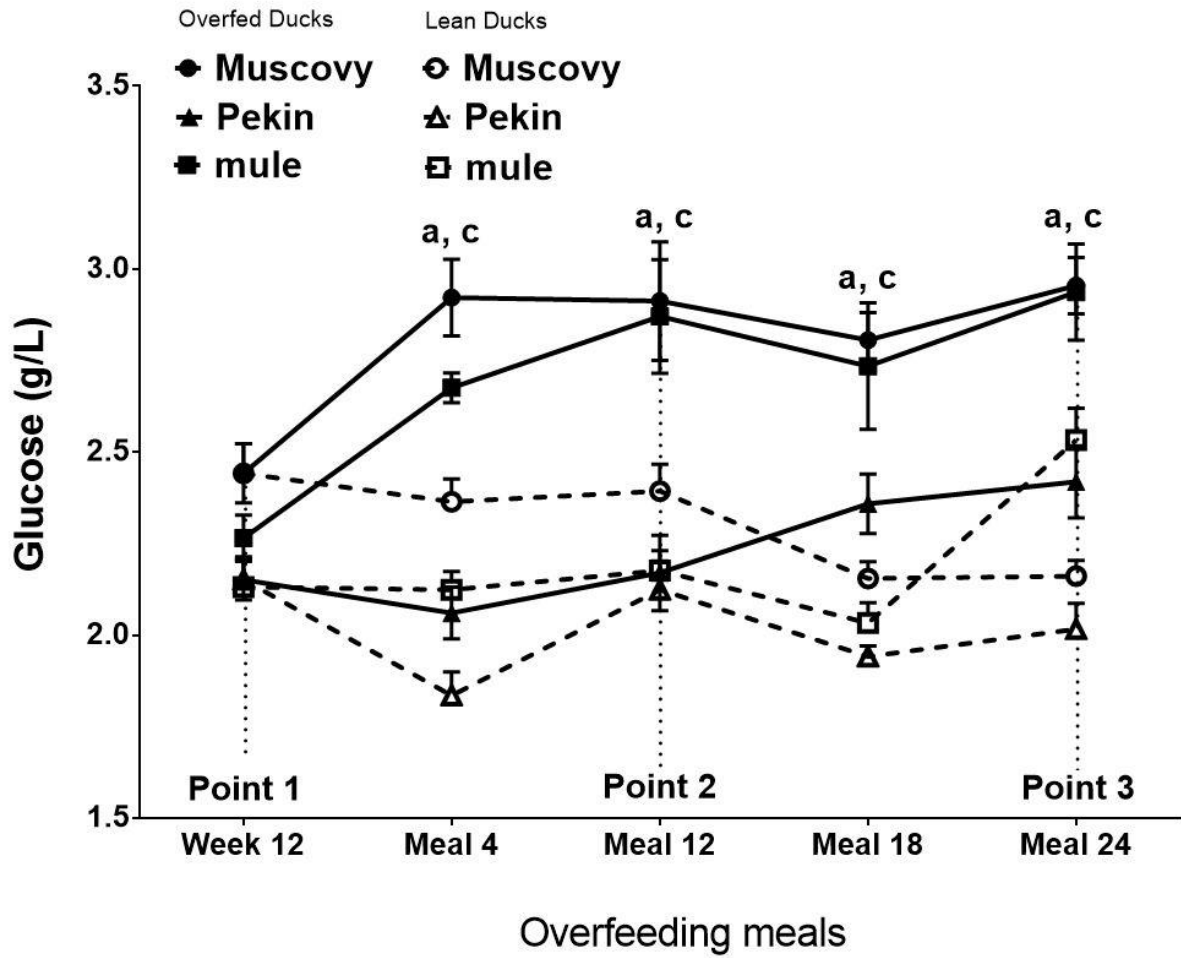


Figure 1. Genotype effect during overfeeding period on plasma glucose concentration.

(n=16, means ± SEM) Genotype effect P<0.05: a=Pekin ≠ Muscovy; b=Muscovy ≠ mule; c=Pekin ≠ mule.

Table 2. Genotype effect on relative expression of genes implicated in glucose metabolism in jejunum, muscle and SAT in Muscovy (M), Pekin (P) and mule (m) ducks at point 1.

(n=6, means \pm SEM) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, none=no statistical effect. Slash bar (/) means that the two genotype are no statistically different from each other, > means that one is bigger than the other.

Point 1	Muscovy	Pekin	mule	Effects	
Organ	Gene	Species			
Jejunum					
Glucose transport	GLUT1	0.39 \pm 0.22	1.24 \pm 0.28	0.54 \pm 0.11	P > M / m *
	GLUT2	0.71 \pm 0.08	1.07 \pm 0.16	0.24 \pm 0.12	P / M > m *
	GLUT3	1.63 \pm 0.38	1.04 \pm 0.12	3.1 \pm 0.76	m > P *
	GLUT8	1.08 \pm 0.14	1.03 \pm 0.10	0.85 \pm 0.13	none
	SGLT1	1.50 \pm 0.28	1.02 \pm 0.08	0.20 \pm 0.04	P / M > m ***
Liver					
Glucose transport	GLUT1	1.16 \pm 0.59	1.06 \pm 0.19	1.16 \pm 0.25	none
	GLUT2	0.63 \pm 0.25	1.57 \pm 0.47	2.71 \pm 0.76	m > M *
	GLUT3	0.36 \pm 0.07	1.28 \pm 0.38	0.37 \pm 0.05	P > M / m ***
	GLUT8	0.69 \pm 0.05	1.03 \pm 0.10	1.35 \pm 0.13	m / P > M *
Glucose metabolism	HK1	0.63 \pm 0.06	1.06 \pm 0.13	1.01 \pm 0.11	P / m > M *
	ENO1	0.39 \pm 0.13	1.11 \pm 0.20	1.41 \pm 0.22	P / m > M *
	SDHA	1.16 \pm 0.12	1.04 \pm 0.10	1.64 \pm 0.17	m > P *
Transcription factor	ChREBP	1.73 \pm 0.47	1.11 \pm 0.21	3.36 \pm 0.41	m > P *
Muscle					
Glucose transport	GLUT1	0.45 \pm 0.05	1.05 \pm 0.15	0.92 \pm 0.27	P / m > M *
	GLUT3	0.27 \pm 0.05	1.09 \pm 0.20	0.69 \pm 0.06	P / m > M *
	GLUT8	0.55 \pm 0.08	1.05 \pm 0.13	0.98 \pm 0.16	P / m > M *
Glucose metabolism	HK1	0.28 \pm 0.05	1.02 \pm 0.11	1.00 \pm 0.09	P / m > M *
	ENO1	0.49 \pm 0.13	1.09 \pm 0.23	1.34 \pm 0.29	none
	SDHA	0.25 \pm 0.07	1.14 \pm 0.22	0.54 \pm 0.07	P > m > M *
GSC					
Glucose transport	GLUT1	0.59 \pm 0.13	1.07 \pm 0.17	1.03 \pm 0.13	none
	GLUT3	1.86 \pm 0.44	1.03 \pm 0.12	1.14 \pm 0.18	none
	GLUT8	1.53 \pm 0.19	1.04 \pm 0.15	1.68 \pm 0.09	none

3. 2. 2. Overfeeding and genotype effects at mid-overfeeding (Tables 3 and 4)

At point 2, we have studied two effects: differences between lean and overfed individuals in the same species and differences observed between species in overfed ducks.

Concerning overfeeding effect, we can see an important overexpression of GLUT3 and 8 in jejunum of overfed mule ducks. However, overfed Pekin ducks exhibit an increase of GLUT1 and GLUT2 but to a lesser extent. For GLUT2 in jejunum of mule ducks, we were not able to detect any expression. In liver, in a general way, overfed individuals present a downregulation of GLUTs, especially GLUT2 in mule ducks (and a downward trend in the other genotypes) and also for GLUT8 in mule and Pekin ducks. Concerning glucose metabolism, there is an increase in HK1 expression in Muscovy and Pekin ducks but a decrease in this of ENO1 in Pekin and mule ducks. There is also a downregulation of SDHA in liver of overfed mule ducks. Regarding peripheral tissues, Pekin ducks exhibit a decrease in GLUT1 expression in muscle and SAT at the contrary of mule ducks which present an increase of relative gene expression of GLUT1 and 8, as Pekin ducks for GLUT3. In addition, ENO1, SDHA and HK1 are downregulated in Pekin ducks muscle whereas they are overexpressed in mule ducks. In SAT, there is less variation in expression of GLUT, except for GLUT1 in Pekin ducks which presents a downregulation in overfed individuals.

Regarding genotype effects, in overfed ducks, we can see that mule ducks exhibit the highest values for GLUT3 and 8 in comparison with the two other genotypes in jejunum. No expression of GLUT2 was detected in jejunum of overfed mule ducks. In liver, Muscovy ducks showed the highest values for GLUT8 and ENO1. In muscle, GLUT1 and 8 in addition to HK1 are overexpressed in mule ducks. Only GLUT3 is upregulated in Pekin ducks in comparison with mule and Muscovy ducks. In SAT, Pekin and Muscovy ducks exhibit the highest value for GLUT8.

No statistical overfeeding effect nor genotype effect are observed for ChREBP expression at point 2 in liver.

Table 3. Genotype and overfeeding effects on relative expression of genes implicated in glucose metabolism in jejunum and liver, in Muscovy (M), Pekin (P) and mule (m) ducks at point 2.

(n=6, means \pm SEM) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, none=no statistical effect. Slash bar (/) means that the two genotype are no statistically different from each other, > means that one is bigger than the other.

Point 2		Muscovy		Pekin		mule		Effects	
Organ	Gene	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Feeding	Species
Jejunum									
Glucose transport	GLUT1	0.44 \pm 0.11	0.90 \pm 0.22	0.31 \pm 0.10	1.06 \pm 0.28	0.77 \pm 0.66	0.66 \pm 0.36	P *	none
	GLUT2	0.10 \pm 0.03	0.21 \pm 0.06	0.12 \pm 0.03	0.52 \pm 0.05	1.07 \pm 0.02	None	P *	none
	GLUT3	1.10 \pm 0.29	1.77 \pm 0.37	1.22 \pm 0.40	0.77 \pm 0.08	1.41 \pm 0.31	19.57 \pm 2.61	m ***	m > M > P *
	GLUT8	2.00 \pm 0.51	1.64 \pm 0.20	1.44 \pm 0.31	1.23 \pm 0.23	1.00 \pm 0.11	2.22 \pm 0.17	m **	m > M / P *
	SGLT1	0.09 \pm 0.03	0.16 \pm 0.05	0.28 \pm 0.14	0.27 \pm 0.05	0.08 \pm 0.03	0.11 \pm 0.02	none	none
Liver									
Glucose transport	GLUT1	0.84 \pm 0.14	0.78 \pm 0.16	1.66 \pm 0.23	1.14 \pm 0.43	1.44 \pm 0.21	1.35 \pm 0.26	none	none
	GLUT2	1.94 \pm 0.51	1.71 \pm 0.26	2.47 \pm 0.30	2.05 \pm 0.24	2.97 \pm 0.32	1.19 \pm 0.09	m **	P > m **
	GLUT3	0.40 \pm 0.05	0.34 \pm 0.04	0.22 \pm 0.03	0.35 \pm 0.12	0.32 \pm 0.03	0.20 \pm 0.03	none	none
	GLUT8	0.72 \pm 0.11	0.93 \pm 0.09	0.74 \pm 0.07	0.40 \pm 0.06	1.32 \pm 0.13	0.54 \pm 0.09	m / P **	M > P / m *
Glucose metabolism	HK1	0.69 \pm 0.10	1.33 \pm 0.13	0.44 \pm 0.07	1.03 \pm 0.10	0.77 \pm 0.14	0.99 \pm 0.09	M / P **	none
	ENO1	0.59 \pm 0.07	0.94 \pm 0.15	1.08 \pm 0.13	0.36 \pm 0.05	1.09 \pm 0.17	0.57 \pm 0.05	M / P / m *	M > m > P *
	SDHA	0.97 \pm 0.10	1.06 \pm 0.10	0.91 \pm 0.11	0.67 \pm 0.11	1.37 \pm 0.09	0.64 \pm 0.10	m *	none
Transcription factor	ChREBP	2.27 \pm 0.43	3.48 \pm 0.49	1.98 \pm 0.43	1.45 \pm 0.11	1.66 \pm 0.12	2.13 \pm 0.28	none	none

Table 4. Genotype and overfeeding effects on relative expression of genes implicated in glucose metabolism in muscle (*pectoralis major*) and Subcutaneous Adipose Tissue (SAT), in Muscovy (M), Pekin (P) and mule (m) ducks at point 2.

(n=6, means \pm SEM) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, none=no statistical effect. Slash bar (/) means that the two genotype are no statistically different from each other, > means that one is bigger than the other.

Point 2		Muscovy		Pekin		mule		Effects	
Organ	Gene	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Feeding	Species
Muscle									
Glucose transport	GLUT1	0.59 \pm 0.16	1.04 \pm 0.25	1.16 \pm 0.17	0.58 \pm 0.14	0.93 \pm 0.10	2.06 \pm 0.36	P / m *	m > M / P *
	GLUT3	0.29 \pm 0.04	0.56 \pm 0.09	0.78 \pm 0.05	2.57 \pm 0.72	0.76 \pm 0.12	1.06 \pm 0.17	P ***	P > M / m *
	GLUT8	0.85 \pm 0.11	1.04 \pm 0.15	1.29 \pm 0.19	1.04 \pm 0.20	1.05 \pm 0.18	2.12 \pm 0.20	m *	m > M / P *
Glucose metabolism	HK1	0.55 \pm 0.10	0.74 \pm 0.20	2.28 \pm 0.26	1.73 \pm 0.54	1.18 \pm 0.43	2.66 \pm 0.46	m *	m > M **
	ENO1	0.54 \pm 0.27	0.46 \pm 0.10	1.77 \pm 0.12	0.72 \pm 0.27	0.62 \pm 0.09	1.27 \pm 0.29	P **	none
	SDHA	0.50 \pm 0.07	0.43 \pm 0.08	1.75 \pm 0.28	0.45 \pm 0.11	0.50 \pm 0.12	0.91 \pm 0.26	P *	none
SAT									
Glucose transport	GLUT1	0.41 \pm 0.10	0.69 \pm 0.22	2.40 \pm 0.28	0.80 \pm 0.23	1.89 \pm 0.23	1.30 \pm 0.29	P **	none
	GLUT3	3.81 \pm 1.10	3.87 \pm 0.80	1.22 \pm 0.37	1.91 \pm 0.78	3.20 \pm 0.75	1.68 \pm 0.48	none	none
	GLUT8	1.27 \pm 0.12	1.73 \pm 0.20	1.20 \pm 0.10	2.33 \pm 0.78	1.75 \pm 0.13	1.09 \pm 0.09	none	P / M > m *

3. 2. 3. Overfeeding and genotype effects at the end of the overfeeding period (Tables 5 and 6)

At point 3, we can observe overfeeding (lean vs overfed) and genotype effects (in overfed individuals of the three genotypes). First, in jejunum, only GLUT1 is overexpressed in Pekin ducks in comparison of the two other palmipeds. A huge overexpression is observed for GLUT3 in Pekin and mule overfed ducks. In liver, Pekin ducks exhibit the highest values of relative gene expression, especially for GLUT2, GLUT8 and ENO1 in comparison with mule and Muscovy ducks. For GLUT 1 and 3, mule and Pekin ducks are statistically higher than Muscovy ducks regarding expression. An overexpression of GLUT1 and GLUT2 induced by overfeeding is observed in Pekin ducks. While mule ducks only upregulate GLUT1 and downregulate GLUT8. Hepatic HK1 is overexpressed in mule ducks in comparison with Pekin ducks. We can observe a decrease of the expression of SDHA induced by overfeeding in Muscovy and mule ducks. While HK1 and ENO1 are overexpressed. In peripheral tissues, only GLUT3 (muscle and SAT) and GLUT8 (SAT) are upregulated in Pekin ducks when compared with mule and Muscovy ducks.

Table 5. Genotype and overfeeding effects on relative expression of genes implicated in glucose metabolism in jejunum and liver, in Muscovy (M), Pekin (P) and mule (m) ducks at point 3.

(n=6, means \pm SEM) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, none=no statistical effect. Slash bar (/) means that the two genotype are no statistically different from each other, > means that one is bigger than the other.

Point 3		Muscovy		Pekin		mule		Effects	
Organ	Gene	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Feeding	Species
Jejunum									
Glucose transport	GLUT1	0.41 \pm 0.05	0.72 \pm 0.16	0.87 \pm 0.24	1.91 \pm 0.41	0.60 \pm 0.09	0.66 \pm 0.20	none	P > M / m
	GLUT2	0.12 \pm 0.07	0.28 \pm 0.08	0.16 \pm 0.05	0.46 \pm 0.12	0.11 \pm 0.04	0.20 \pm 0.03	none	none
	GLUT3	2.78 \pm 0.93	7.88 \pm 3.72	1.33 \pm 0.37	11.91 \pm 4.64	1.71 \pm 0.33	12.44 \pm 3.55	m / P *	none
	GLUT8	1.93 \pm 0.30	2.10 \pm 0.35	1.01 \pm 0.13	2.00 \pm 0.31	1.02 \pm 0.16	2.00 \pm 0.34	m *	none
	SGLT1	0.08 \pm 0.03	0.31 \pm 0.08	0.11 \pm 0.03	0.48 \pm 0.15	0.16 \pm 0.05	0.18 \pm 0.01	M *	none
Liver									
Glucose transport	GLUT1	1.53 \pm 0.17	1.73 \pm 0.15	3.00 \pm 0.55	3.98 \pm 0.54	1.61 \pm 0.29	2.89 \pm 0.40	m*	P / m > M *
	GLUT2	3.13 \pm 0.49	3.19 \pm 0.46	5.51 \pm 0.75	8.80 \pm 1.46	3.51 \pm 0.43	4.83 \pm 0.81	P *	P > M / m **
	GLUT3	0.37 \pm 0.05	0.45 \pm 0.05	0.65 \pm 0.07	0.73 \pm 0.07	0.58 \pm 0.16	0.99 \pm 0.23	none	P / m > M *
	GLUT8	1.09 \pm 0.12	0.92 \pm 0.17	1.37 \pm 0.13	1.05 \pm 0.07	1.35 \pm 0.24	0.64 \pm 0.07	m *	P > m *
Glucose metabolism	HK1	1.16 \pm 0.04	2.06 \pm 0.36	1.43 \pm 0.14	1.63 \pm 0.14	1.41 \pm 0.18	2.89 \pm 0.34	M / m *	m > P **
	ENO1	1.05 \pm 0.14	0.66 \pm 0.06	1.89 \pm 0.23	1.67 \pm 0.29	1.69 \pm 0.33	0.73 \pm 0.12	m *	P > M / m *
	SDHA	1.71 \pm 0.19	0.64 \pm 0.09	1.37 \pm 0.13	1.07 \pm 0.09	1.67 \pm 0.23	0.67 \pm 0.07	M / m **	none
Transcription factor	ChREBP	3.22 \pm 0.66	3.27 \pm 0.60	1.63 \pm 0.20	1.84 \pm 0.22	1.96 \pm 0.30	1.61 \pm 0.18	none	none

Table 6. Genotype and overfeeding effects on relative expression of genes implicated in glucose metabolism in muscle (*pectoralis major*) and Subcutaneous Adipose Tissue (SAT), in Muscovy (M), Pekin (P) and mule (m) ducks at point 3.

(n=6, means \pm SEM) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, none=no statistical effect. Slash bar (/) means that the two genotype are no statistically different from each other, > means that one is bigger than the other.

Point 3		Muscovy		Pekin		mule		Effects	
Organ	Gene	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Lean	Overfed	Feeding	Species
Muscle									
Glucose transport	GLUT1	0.93 \pm 0.12	1.41 \pm 0.23	0.78 \pm 0.15	2.08 \pm 0.51	0.96 \pm 0.21	1.07 \pm 0.20	none	none
	GLUT3	0.39 \pm 0.03	0.67 \pm 0.11	0.98 \pm 0.14	2.18 \pm 0.21	0.73 \pm 0.09	1.32 \pm 0.20	P / m *	P > m > M *
	GLUT8	0.96 \pm 0.09	1.81 \pm 0.13	2.17 \pm 0.31	2.90 \pm 0.64	1.42 \pm 0.30	1.53 \pm 0.10	none	none
Glucose metabolism	HK1	0.61 \pm 0.11	1.25 \pm 0.25	1.83 \pm 0.30	2.36 \pm 0.49	1.94 \pm 0.40	1.78 \pm 0.31	none	none
	ENO1	0.38 \pm 0.09	0.58 \pm 0.08	0.99 \pm 0.16	0.73 \pm 0.21	0.74 \pm 0.21	0.47 \pm 0.11	none	none
	SDHA	0.49 \pm 0.12	0.55 \pm 0.13	2.21 \pm 0.41	1.08 \pm 0.30	0.95 \pm 0.19	0.68 \pm 0.08	P *	none
SAT									
Glucose transport	GLUT1	1.50 \pm 0.22	1.47 \pm 0.10	1.69 \pm 0.29	1.19 \pm 0.61	1.80 \pm 0.37	1.03 \pm 0.29	none	none
	GLUT3	2.18 \pm 0.71	1.74 \pm 0.49	1.72 \pm 0.21	12.18 \pm 1.23	2.77 \pm 1.42	3.36 \pm 0.63	P *	P > M / m ***
	GLUT8	2.27 \pm 0.19	1.15 \pm 0.11	1.16 \pm 0.25	2.87 \pm 0.36	1.09 \pm 0.11	1.70 \pm 0.27	P / M **	P > M / m *

3. 2. 4. Time effect GLUTs expression in jejunum, liver, muscle and SAT of overfed individuals (Tables 7)

In jejunum, only GLUT3 is upregulated at point 3 in comparison with point 2 in Pekin ducks. In liver, GLUT1 is upregulated at point 3 in comparison with point 2 in all overfed ducks. GLUT2 and 8 are upregulated at the end of the overfeeding period in Pekin ducks. In mule ducks, GLUT2, GLUT3 present an increase at point 3 in comparison with point 2. In muscle, Pekin ducks upregulated GLUT1 and 8 in point 3. While Muscovy ducks exhibit an increase of GLUT8 mRNA expression. In subcutaneous adipose tissue, GLUT1 and GLUT3 are overexpressed respectively in point 3 in Muscovy and Pekin ducks in comparison with point 2.

4. Discussion and conclusion

Many studies have been conducted to better understand why the three waterfowls (Muscovy, Pekin ducks and their hybrid, the mule) have divergent growth performances in response to overfeeding. These differences can be explained by a difference in the regulation of the imbalance between triglycerides synthesis and secretion, as observed in Pekin ducks which exhibit a better exportation of TG via VLDL (G Saez et al., 2009). This phenomenon is also associated with a higher lipoprotein lipase activity in peripheral tissues contributing to peripheral fattening to the detriment of fatty liver (André et al., 2007). On the contrary, Muscovy and mule ducks less secrete neo-synthesized TG contributing to more developed fatty liver (Hermier et al., 2003). Likewise, it is known that genes involved in de novo lipogenesis (Fatty Acid Synthase, Stearoyl CoA Desaturase, Di-acyl Glycerol Acyl Transferase) are upregulated in liver of overfed Pekin and Muscovy ducks (Hérault et al., 2010). Moreover, added to this, we recently demonstrated the importance of the lipid re-uptake by the liver with an overexpression of Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) and Very Low Density Lipoprotein Receptor (VLDLR) detected in the liver of mule ducks at the end of the overfeeding period (Personal communication Tavernier article 1). Thus, in general, studies that have been conducted focused more on lipid metabolism but few reported if there were differences in glucose uptake between these three genotypes. This study provides additional information on the first step involved in the development of fatty liver, namely the entry and the metabolization of glucose which can be different depending on the species. We compare genes involved in glucose metabolism to explain how they can take part in the different responses of Pekin, Muscovy and mule ducks during the overfeeding period.

Table 7. Relative GLUTs expression between point 2 and point 3 in jejunum, liver, muscle and SAT of overfed Muscovy, Pekin and mule ducks.

(n=6, means \pm SEM). *P<0.05; > < means that one is bigger than the other.

		Point 2	Point 3	Effects
Species/organ	Gene			Time
Jejunum				
Pekin	GLUT3	0.77 \pm 0.08	11.91 \pm 4.64	pt2 < pt3 *
Liver				
Muscovy	GLUT1	0.78 \pm 0.16	1.73 \pm 0.15	pt2 < pt3 *
Pekin	GLUT1	1.14 \pm 0.43	3.98 \pm 0.54	pt2 < pt3 *
	GLUT2	2.05 \pm 0.24	8.80 \pm 1.46	pt2 < pt3 *
	GLUT8	0.40 \pm 0.06	1.05 \pm 0.07	pt2 < pt3 *
mule	GLUT1	1.35 \pm 0.26	2.89 \pm 0.40	pt2 < pt3 *
	GLUT2	1.19 \pm 0.09	4.83 \pm 0.81	pt2 < pt3 *
	GLUT3	0.20 \pm 0.03	0.99 \pm 0.23	pt2 < pt3 *
Muscle				
Muscovy	GLUT8	1.04 \pm 0.15	1.81 \pm 0.13	pt2 < pt3 *
Pekin	GLUT1	0.58 \pm 0.14	2.08 \pm 0.51	pt2 < pt3 *
	GLUT8	1.04 \pm 0.20	2.90 \pm 0.64	pt2 < pt3 *
SAT				
Muscovy	GLUT1	0.69 \pm 0.22	1.47 \pm 0.10	pt2 < pt3 *
Pekin	GLUT3	1.91 \pm 0.78	12.18 \pm 1.23	pt2 < pt3 *

We observed the expression of various glucose transporters for glucose uptake, HK1 and ENO, enzymes implicated respectively at the beginning and at the end of the glycolysis; SDHA, implicated in the Krebs cycle (respiratory chain) to produce energy; and the transcription factor ChREBP, whose expression is dependent on high concentrations of glucose and induced the activation of target genes, including those of glycolysis. Their expressions were measured at the intestinal (jejunum), hepatic and peripheral levels (muscle and adipose tissue).

Concerning glycemia, as soon as they start the overfeeding, it increases in mule and Muscovy ducks while Pekin ducks present a glycemia that remains almost unchanged over the duration of the overfeeding and remains on average 1.3 times lower than in mule or Muscovy ducks. This species seems to better adjust its glycemia. This lower rate was yet observed in previous study (Gontier et al., 2013).

In jejunum, before overfeeding, while mule and Muscovy ducks express more GLUT3 (and SGLT1 for Muscovy), Pekin ducks show no specificity, all the glucose transporters are expressed on the same value. However, we can note a general low expression of glucose transporters. This can be explained by the fact that our sampling was performed 3 hours after the meal. In fact, a recent kinetic study of gene expression during 12 hours after the last meal of the overfeeding period (Personal communication Tavernier article 1) shows a much earlier expression. SGLT1 appears the first gene upregulated in jejunal cells with a peak of expression from 20 minutes until 2 hours (associated to GLUT1 and 8 at this time), while GLUT3 is overexpressed 1 hour and 3 hours after the meal. All along the overfeeding, we can note that all species weakly express GLUT2 (or not express, as overfed mule in Point 2). In the kinetic study (Personal communication Tavernier article 1), GLUT2 were not detected in jejunum of overfed mule. These results are surprising as GLUT2 expression (whose affinity for glucose is lowest but has the highest transport capacity) is detected in jejunum in birds as chicken (Garriga et al., 1997; Ruhnke et al., 2015). Generally, GLUT2, localized at the basolateral membrane in epithelial cells of the small intestine, work in tandem with SGLTs to allow trans-epithelial transport of glucose from the intestinal lumen to the blood. In our study, the weak expression of GLUT2 seems to be compensated by high affinity but low capacity glucose transporters (as GLUT3, responsible for basal glucose uptake in mammals). The more we advance on the overfeeding period (Points 2 and 3), the more mule ducks overexpressed GLUT3 and 8 (described as an intracellular glucose transporter that is ubiquitously expressed across most tissues) in the jejunum (respectively 14- and 2,2-fold greater than in lean ducks in point 2 and 7,3- and 2-fold in point 3). We can note that mule ducks precociously overexpress GLUT3 in jejunum (20-fold) compared to the two other genotypes. Likewise, overfed Pekin ducks only overexpressed GLUT3 in point 3 (9-fold).

In the liver, as expected, GLUT2, known to be the major glucose transporter in this organ (Kono et al., 2005; Mueckler and Thorens, 2013), is expressed, as well as GLUT1, 3 and 8. GLUT2 is known to mediate uptake of glucose across a wide range of physiological concentrations, playing an important role in maintain glucose flux in liver cells. Before the beginning of the overfeeding period mule ducks differ from the two other genotypes with an overexpression of ChREBP, which can be correlated to an overexpression of SDHA and ENO1. This is in accordance with the kinetic expression of genes implicated in lipid metabolism which appeared overexpressed in mule ducks at the last meal (Personal communication Tavernier article 1).

At the middle of the overfeeding period, we can note a downregulation of glucose transporters expression in overfed mule and Pekin ducks (GLUT2 and 8), in accordance with the decrease of the expression of the enzymes of the glucose metabolism. Only Muscovy ducks differ from the 2 other genotypes with an upregulation of GLUT8 and ENO1. At the end of the overfeeding, mule and Pekin ducks overexpressed GLUT1 and GLUT2 (approximately 1,5-fold than lean ducks). Nevertheless, when we compare the 3 overfed genotypes, Pekin ducks overexpressed GLUT1 and 2 from 1.5 to 2.8 times more than mule or Muscovy ducks. These results are in concordance with those observed by Zhang et al. (Zhang et al., 2013). They evaluated expression of GLUTs in different tissues in chickens from lines selected for low or high body weight: there was greater expression in high body weight line than low for GLUT1 and 2 in the liver, and the expression of GLUT2 was greater in the liver than in intestine. These results suggested that Pekin ducks have the greater capacity for glucose uptake in this tissue, especially at the end of the overfeeding period.

At peripheral level, muscle or adipose tissues, no inter-genotype differences were observed before the beginning of the overfeeding period, except for Muscovy ducks which has the lowest expression of glucose transporters or enzyme genes of the glucose metabolism in *pectoralis major*. During overfeeding, mule ducks overexpressed GLUT1 and 8 in muscle only in point 2, associated with HK1 and ENO1 upregulation. While Pekin ducks facilitate the entry of glucose in muscle with GLUT3 (this gene being 2,5 to 4,5 times more expressed in Pekin than respectively mule or Muscovy ducks) and in adipose tissue with GLUT8. At the end of the overfeeding period, Pekin duck differs from mule and Pekin ducks presenting a general overexpression of GLUTs (1,2,3) in muscle and of GLUT3 and 8 in GSC (being 7 or 4 times and 2.5 or 1.6 times respectively more expressed than in Muscovy or mule ducks).

In view of the specificity of the glycemia of the Pekin duck, we can note that this genotype overexpressed GLUT3 in muscle at the middle of the overfeeding period which is maintained in point 3 and followed by an overexpression of GLUT3 and 8 in subcutaneous adipose tissue. Pekin ducks seem overexpressed glucose transporters in peripheral tissues along the overfeeding period. Thus contributing to the decrease in glycemia. These observations are in accordance with a previous study demonstrating an upregulation of lipogenesis (FAS) in muscle of Pekin (G Saez et al., 2009). In the other tissues, genes study in this experiment not allows to justify the specific lowest glycemia observed in Pekin ducks. None seems limiting or specifically overexpressed.

Nevertheless, another glucose transporter, potentially insulin-sensitive has been identified in chicken (Coudert et al., 2015): GLUT12. This GLUT, originally described in breast cancer cells, has been detected in human adipose and muscle tissues acting in muscle as an insulin-sensitive transporter that is qualitatively similar to the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4 (Gaster et al., 2004). Insulin administration or fed conditions elicited membrane GLUT12 recruitment. These results suggested that the facilitate glucose transporter protein GLUT12 could act in chicken muscle as an insulin-sensitive transporter that is qualitatively similar to GLUT4 in mammals. GLUT12 could be implicated in the facilitated transport of glucose in Pekin ducks. Further investigations must be done.

The time effect on glucose transporter expression during overfeeding, summarized in Table 7, shows a change in gene expression in the liver of mule and Pekin ducks. Indeed, it can be noted a significant upregulation of the relative expressions of GLUTs since the middle to the end of the overfeeding period. While Muscovy ducks upregulated only GLUT1. In jejunum, Pekin duck exhibits a huge upregulation of GLUT3 (15-fold). It is the same, in peripheral tissues (muscle and subcutaneous tissue), with a significant increase of GLUTs in Muscovy and Pekin ducks. Generally, we can note that Pekin ducks overexpressed glucose transporters during overfeeding both in jejunum (GLUT3), liver (GLUT1, 2, 8), muscle (GLUT1, 8) and SAT (GLUT3) leading to an effective glucose uptake. While mule ducks promote hepatic glucose uptake (associated with a precocious overexpression of GLUTs at the jejunum level since point 2) and Muscovy present an uptake distributed among peripheral and hepatic tissues (in accordance with its capacity to develop hepatic steatosis and well-developed muscles).

Finally, this study shows few significant variations of expressions of genes of glucose metabolism between the three genotypes but a momentary specific overexpression of glucose transporters. To conclude, the differences in response to overfeeding of Pekin, Muscovy and mule ducks cannot be only explained by the glucose metabolism (glucose uptake, glycolysis).

Chapitre 2 : DuckKinetic

Objectif du travail

Après avoir mis en avant les différents mécanismes impliqués chez les trois types génétiques (Barbarie, Pékin et mulard), nous nous sommes intéressés à l'évolution de ces mêmes gènes après le dernier repas de gavage. En effet, cette question s'est posée après avoir éprouvé des difficultés à mettre en avant certains gènes du métabolisme glucidique au temps de prélèvement 3h après le repas, posant ainsi le problème récurrent du temps « idéal » de prélèvement des échantillons après le repas. Nous avons donc décidé de construire une expérimentation ayant pour base une cinétique d'expression postprandiale chez le canard mulard en fin de gavage.

Cette expérimentation regroupe l'étude des deux métabolismes glucidique et lipidique en s'appuyant sur les résultats issus de la première expérimentation. Les gènes d'intérêt sont donc ceux ayant été mis en avant par l'étude des métabolismes des trois génotypes comme DGAT2, FABP4 ainsi que VLDLR dans les foies et dans les tissus périphériques (muscle et tissu adipeux) ainsi que l'expression des transporteurs de glucose, en particulier dans le jejunum en plus des autres organes.

L'objectif principal de cette étude est donc d'établir un profil d'expression de chaque gène d'intérêt en vue d'observer les régulations transcriptionnelles après le dernier repas de gavage. Cette expérimentation permettra, à terme, un meilleur ciblage des points de prélèvements en vue de l'étude de gènes particuliers. De plus, cette expérimentation s'est déroulée jusqu'à 12 heures après le repas et permet une compréhension élargie des régulations post-prandiales des métabolismes glucidique et lipidique. Enfin, en parallèle des analyses moléculaires, les paramètres plasmatiques des animaux ont été évalués, notamment la glycémie, la triglycémie et la concentration en NEFA.

Ces travaux font l'objet d'articles soumis dans des journaux à comité de lecture ou en préparation :

Article 3: **Annabelle Tavernier**, Stéphane Davail, Karine Ricaud, Marie Dominique Bernadet, Karine Gontier. *Kinetic of expression of genes involved in glucose metabolism in overfed mule ducks*. *Molecular and Cellular Biochemistry* (soumis).

Article 4: **Annabelle Tavernier**, Karine Gontier, Karine Ricaud, Marie Dominique Bernadet, Stéphane Davail. *Kinetic of expression of genes involved in lipid metabolism in overfed mule ducks*. Molecular and Cellular Biochemistry (en préparation)

Article 3: Kinetic of expression of genes involved in glucose metabolism in overfed mule ducks

Molecular and Cellular Biochemistry

Chez les palmipèdes, le gavage conduit à une stéatose hépatique également appelée « Foie gras ». Après avoir déterminé les principaux gènes impliqués dans sa mise en place chez trois génotypes de canards, nous avons décidé d'évaluer le rôle du métabolisme du glucose dans la mise en place de la stéatose en cinétique post prandiale. Pour cela, nous avons mesuré l'expression des gènes de ce métabolisme au cours des 12 heures suivant le dernier repas de gavage. Comme attendu, nous avons démontré une expression précoce des transporteurs de glucose (GLUT) dans les muqueuses jéjunales, en particulier le Sodium Glucose Linked Transporter 1 (SGLT1), connu pour être le transporteur majoritaire de la membrane apicale des entérocytes. Dans le foie, GLUT2 et l'Héxokinase 1 (HK1) sont surexprimées en même temps et semblent travailler de concert pour importer le glucose dans la cellule. Dans les tissus périphériques, comme le muscle et le tissu adipeux sous-cutané (GSC), l'expression des gènes d'intérêt est plus tardive que celle observée dans le jejunum et le foie. Ces résultats sont en accord avec l'évolution de la glycémie qui présente un pic 1h après le repas. Cette étude permet de connaître et de mieux comprendre le traitement métabolique du glucose après un repas chez le canard gavé. De plus, cette expérimentation permettra aux prochaines études de mieux cibler leur point de prélèvement en ayant connaissance du point optimal d'expression de chaque gène.

Mots clés : Stéatose hépatique, métabolisme glucidique, cinétique, canards

Kinetic of expression of genes involved in glucose metabolism in overfed mule ducks

Tavernier Annabelle^{1,2}; Davail Stéphane^{1,2}; Ricaud Karine^{1,2}; Bernadet Marie-Dominique³;
Gontier Karine^{1,2}

¹UMR 1419 INRA UPPA NuMÉA, 371 Rue du Ruisseau 40000 Mont de Marsan FRANCE;

²UMR 1419 INRA UPPA NuMÉA, Quartier Ibarron 64310 Saint Pée sur Nivelle; ³INRA
UEPFG, 1076 Route de Haut Maucq 40280 Benquet FRANCE

Corresponding author: Gontier Karine

UMR 1419 INRA UPPA NuMÉA, 371 Rue du Ruisseau 40000 Mont de Marsan FRANCE

e-mail: karine.gontier@univ-pau.fr; tel.: +33 558 513 706; fax: +33 558 513 737

Keywords: Hepatic steatosis, glucose metabolism, kinetic, ducks

Abstract. In waterfowls, overfeeding leads to a hepatic steatosis, also called “foie gras”. We decided to investigate the role of glucose metabolism in steatosis emergence. For it, we measured the expression of genes during the 12 hours following the last meal of the overfeeding period. As expected, we have shown that expression of glucose transporter is more precocious in jejunal mucosa, especially SGLT1, known to be the major transporter at apical surface. In liver, GLUT2 and HK1 are upregulated at the same time and seem to work together to import glucose. In peripheral tissue, such as muscle and subcutaneous adipose tissue (SAT), expression of genes of interest is later than this in jejunum and liver. These results are in accordance with the evolution of glycemia. This study allows us to better understand the kinetic treatment of glucose after a meal in overfed ducks. It also will allow researcher to better target their sampling time knowing the optimal point of expression of each gene.

Acknowledgments. We thank the “Conseil Général des Landes” and the “Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras” (CIFOG) for financing this work. We also thank the technical staff of INRA Artiguères for rearing ducks (Certificate of Authorization to Experiment on Living animals, no. B40-037-1, Ministry of Agriculture and Fish Products, ethic committee Aquitaine birds and fish no.C2EA-73). We are grateful to Frédéric Martins and Jean-José Maoret for performing Fluidigm analysis (Génopole Toulouse/Midi-pyrénées, Plateau Transcriptomique Quantitative (TQ), Toulouse, France). We finally thank Patrick Daniel, Karine Bellet and Martine Chague of the laboratory Pyrénées Landes (LPL, Mont de Marsan) to let us use their material.

1. Introduction

In domestic waterfowls, hepatic steatosis (also called fatty liver or “foie gras”) is the result of many mechanisms, leading to a strong activity of *de novo* lipogenesis resulting in hepatic lipids accumulation. This pathology is frequently associated with metabolic disorders such as insulin resistance with or without hyperglycemia (Fon Tacer and Rozman, 2011). During the development of hepatic steatosis, lipids are mainly triglycerides derived from the esterification of three fatty acids with a glycerol-3-phosphate (Fernandez et al., 2011; Hermier et al., 1991; Saadoun and Leclercq, 1986) principally newly synthesized from glucose by hepatic lipogenesis. Indeed, the feeding of waterfowl during the overfeeding period is mainly based on corn (starch-rich raw material), which, after ingestion, is degraded into glucose and then absorbed via carriers from the intestinal lumen to the bloodstream and then to various organs for purposes of storage or oxidative. Regarding glucose metabolism, bird’s glycemia is two time higher than these of mammals (Hazelwood and Lorenz, 1959) even after a short fasting (Belo et al., 1976). In *ad libitum* fed ducks, mean circulating glucose is about 1.90 to 2.20 g/L (Farhat and Chavez, 2000). In overfed ducks, glycemia depends on genotype and time of sampling during the overfeeding period, in fact, glycemia varies between 2,5g/L and 4g/L at the last meal of the overfeeding period (Gontier et al., 2013). Many actors are involved in the absorption and transport of glucose. In chickens, glucose absorption in gastrointestinal tract is principally achieved by active transport through Sodium Glucose Linked Transporter 1 (SGLT1) with high affinity (Gal-garber et al., 2000; Wright and Turk, 2004). The output of glucose across basolateral membrane is mediated through facilitated non-dependent sodium transporter: GLUcose Transporter 2 (GLUT2), which is also present on the membrane of hepatocytes (Bernard Thorens et al., 1990). In chickens, expression of GLUT1 and 2 have already been detected in liver but also GLUT3 and 8 at smaller levels (Kono et al., 2005). Skeletal muscle of chickens also exhibits expression of GLUT3, with no detectable expression of GLUT2 (Humphrey et al., 2004). Another GLUT has been recently described in bird, GLUT12 which may respond to insulin signal and expressed principally in muscles (Coudert et al., 2015). To finish, less is known about the evolution of glycemia and expression of genes involved in glucose metabolism after a meal. Davail et al. (Davail et al., 2003) have already studied glycemia after the first meal of overfeeding and demonstrated that an increase in glycemia was observed in Pekin and Muscovy ducks but not in mule ducks. In fact, some differences in overfeeding response have been observed in these three genotypes (Pekin, Muscovy and mule ducks).

In reality, Pekin ducks exhibit the weakest overfeeding response with a small fatty liver, an important lipid exportation and a greater intramuscular lipogenesis in addition to that of the liver (André et al., 2007; Chartrin et al., 2006a; Gladys Saez et al., 2009) compared to the others genotypes. So, as part of a comprehensive study of the mechanisms that influence the development of fatty liver, we decided to observe the actors implicated in glucose metabolism first in mule ducks (mainly used in production because of its performance), to elucidate peaks of expression of each interest gene in each tissue after a meal. Thereafter, another study in Pekin and Muscovy will investigate glucose response in this genotype.

Therefore, we studied glycemia and expression of genes involved in glucose metabolism at hepatic and peripheral levels at different time after the last meal of the overfeeding period. We begin the study with glucose transporters expression in intestinal mucosa, especially *jejunum* as it presents the better capacity to transfer sugar in chickens or in pigeons (Dong et al., 2012; Ferrer et al., 1994; Gilbert et al., 2007). We continue the study in the liver, the main organ of lipogenesis in duck (Saadoun and Leclercq, 1986), and in peripheral tissues: muscle (*pectoralis major*) and subcutaneous adipose tissue (SAT). In these tissues, we study some enzyme of glucose metabolism, especially those of glycolysis like Hexokinase (HK), ENOLase (ENO); one of the Krebs Cycle: Succinate DeHydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA) and also a transcription factor known to respond to glycemia: Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP).

The main objective was to identify the peak of expression of each gene of interest in order to better understand the postprandial mechanisms of glucose metabolism in overfed ducks. This study will allow targeting the better sampling point for interest genes for the research of biomarkers implicated in hepatic steatosis.

2. Material and methods

Animals. All experimental procedures involving ducks were in accordance with the French national Guidelines for the care of animal for research purposes. Animals used were male ducks from the mule genotype (MMG*PKL). They were provided by Ducourneau (Bonnegarde, France) at the age of one day. All ducks were reared under usual conditions of light and temperature at the Experimental Station for Waterfowl breeding (INRA, Artiguères, France). All ducks were fed *ad libitum*, from hatching to 4 weeks of age, with a starting diet (2752 kcal/kg; crude proteins: 17, 5%) and from 4 to 8 weeks of age with a growing diet (2803kcal/kg; crude proteins: 15%).

At the age of 8 weeks, the animals were subjected to hourly rationing in order to prepare the overfeeding. At 12 weeks of age, ducks were overfed with corn and corn meal at the maximum of their ingestion ability during 2 weeks (24 meals). Ducks were sacrificed by slaughtering after electronarcosis at the Experimental Station for Waterfowl breeding (INRA, Artiguères, France) at ten times. The first time was just before the 24th meal, the other 9 times were 20, 40 minutes and 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12 hours after the last meal of overfeeding. After dissection, the liver, the *pectoralis major* (muscle) and the subcutaneous adipose tissue (SAT) were weighed, sampled and immersed in liquid nitrogen. Samples were stored at -80°C for the study of gene expression. The jejunum mucosa was also taken by scrapping the internal face of jejunum and was stored at -80°C. *Plasmas*. Glycemia was quantified by colorimetric method using enzymatic kit (Glucose RTU, Biomérieux).

RNA isolation and reverse transcription. Total RNA were isolated from frozen tissue according to the TRIZOL method (Invitrogen/Life technologies). Total RNA concentration was measured by spectrophotometry (optical density at 260nm) using a NanovuePlus (GE Healthcare) and all the samples were normalized at 500ng/μl. The integrity of total RNA was analyzed by electrophoresis. cDNA were obtained by reverse transcription using the enzyme Superscript III (Life technologies) and a mix of oligo dT and random primers (Promega). 3μg of total RNA were used and the absence of contamination by DNA was verified by different negative control. The reaction was made in StepOne (Applied Biosystem) according to this program: 25°C/5min, 55°C/60min, 70°C/15min and retention at 4°C until storage at -20°C. *qPCR EvaGreen using BioMark*. After the step of Specific Target Amplification (STA) with 5ng/μL of cDNA, all target and samples were distributed in a 96 x 96 chip for Fluidigm Gene Expression Array. The primers were provided by Applied Biosystems and were used at a concentration of 20μM. Primers sequences are presented in Table 1. The reaction was made thanks to 20X EvaGreen dye following the program: holding stage 95°C during 10 minutes, 35 cycles of amplification: 95°C 15 seconds, 60°C 1minute. All the data were analyzed with the Fluidigm Real-Time PCR Analysis Software (Fluidigm Corporation v4.1.3). This part of the work was performed at the Platform of Quantitative Transcriptomic GeT-TQ (GenoToul, Toulouse, France).

Gene expression analysis. The chosen reference gene was Actin B but all the results were confirmed with GlycerAldehyde 3 Phosphate DeHydrogenase (GAPDH). All Cycle threshold (Ct) were collected. Results are expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) with $\Delta\Delta Ct = (Ct_{target} - Ct_{ref})_{sample} - (Ct_{target} - Ct_{ref})_{standard}$. Ct_{target} is Ct for the target gene; Ct_{ref} is Ct for reference gene; $(Ct_{target}-Ct_{ref})_{sample}$ is the first ΔCt calculated for samples and $(Ct_{target}-Ct_{ref})_{standard}$ is the second ΔCt calculated for the standard : before the 24th meal.

Statistical analysis. The results are expressed as mean \pm SEM. An ANOVA following by a Tukey test was made using Prism software (GraphPad Prism Software). Accepted p-value was 0.05 and considered as statistically significant.

3. Results.

3.1. Glycemia (Figure 1)

There is little variation of plasma glucose concentration during the 12h after the last meal of the overfeeding period in the overfed mule ducks. The glycemia is quite constant and little statistical differences are observed over time. However, there is a peak at 1 hour after the meal (2.88g/L) in comparison with pre-prandial point.

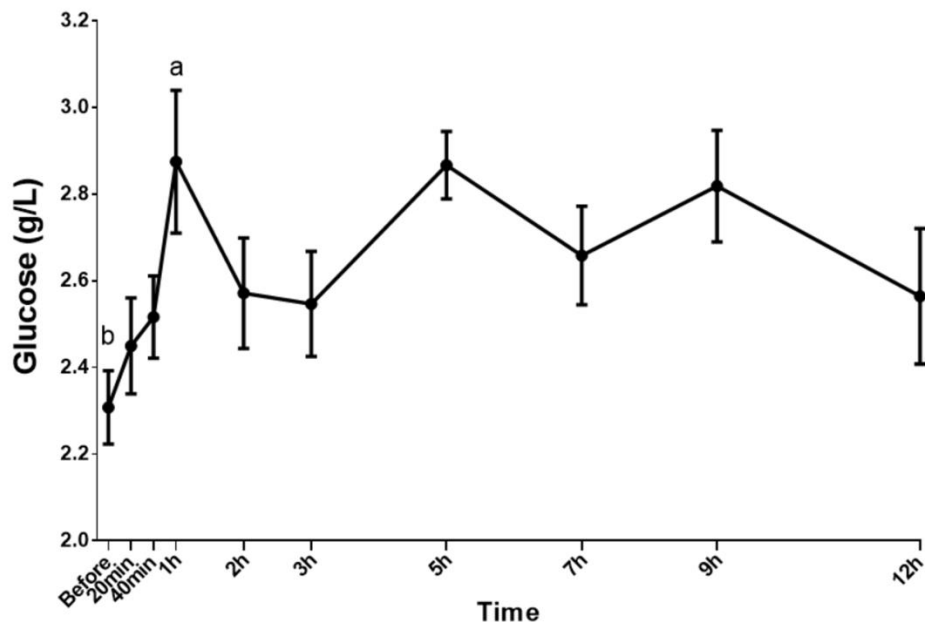


Figure 1. Evolution of preprandial and postprandial plasma glucose concentration in overfed mule ducks during the last meal of the overfeeding period.

(n=10, means \pm SEM). Time effect $P < 0.05$: a \neq b.

3.2. Gene expressions

3.2.1. Jejunal expression (Figure 2)

Regarding expression of genes at intestinal level, we notice an important overexpression of glucose transporters in the first 2 hours after the last meal. In fact, SGLT1 is upregulated precociously at 20 minutes and this increase continues until 2 hours after the last meal. GLUT1 and 8 expressions increase progressively and show a peak at 2 hours whereas GLUT3 expression presents a double overexpression at 1 hour and 3 hours after the meal. Concerning the transcription factor Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP), we can observe a peak of expression 2 hours after the meal.

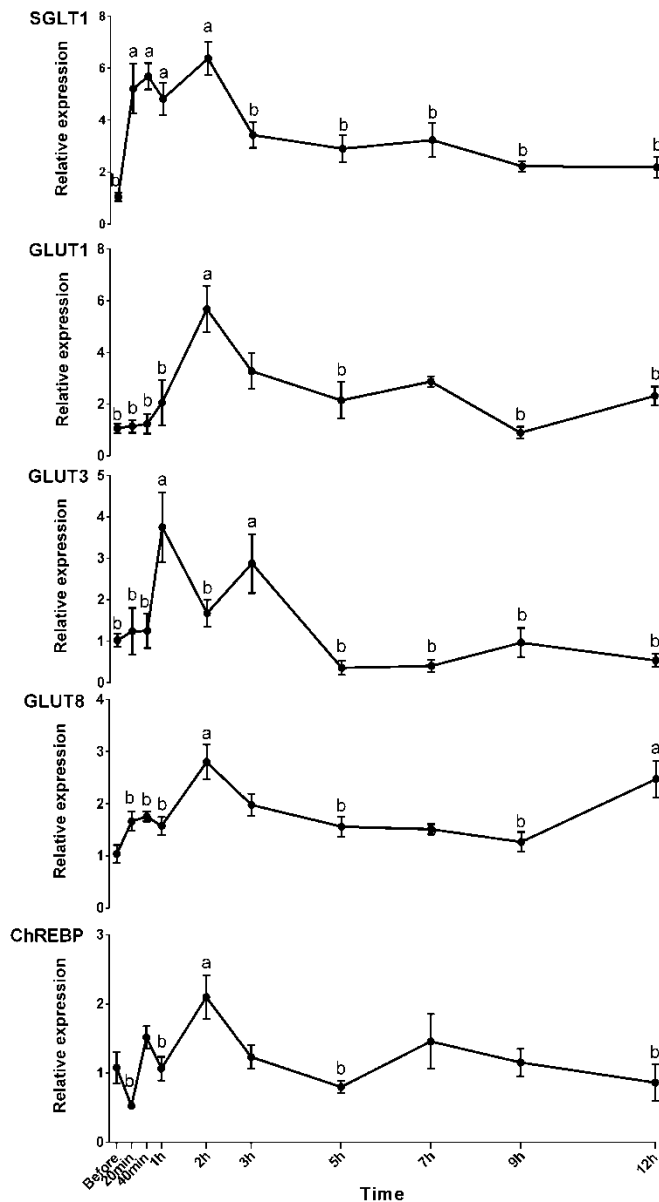


Figure 2. Gene expression of glucose transporters SGLT1, GLUT1, GLUT3 and GLUT8, and factor transcription ChREBP in jejunal mucosa in overfed mule ducks before the last meal of the overfeeding period and 20/40 minutes, 1/2/3/5/7/9/12 hours after the meal.

(n=6, means ± SEM). Time effect P<0.05: a ≠ b.

3.2.2. Hepatic expression (Figure 3)

In liver, we can notice an increase of the expression of GLUT2 and HexoKinase 1 (HK1) during the 2 hours after the last meal of the overfeeding period. ENO1ase 1 (ENO1) does not vary over time. Regarding Succinate CoA Dehydrogenase (SDHA), we cannot observe any significant variation of expression. ChREBP is upregulated at 40 minutes and 5 hours after the last meal.

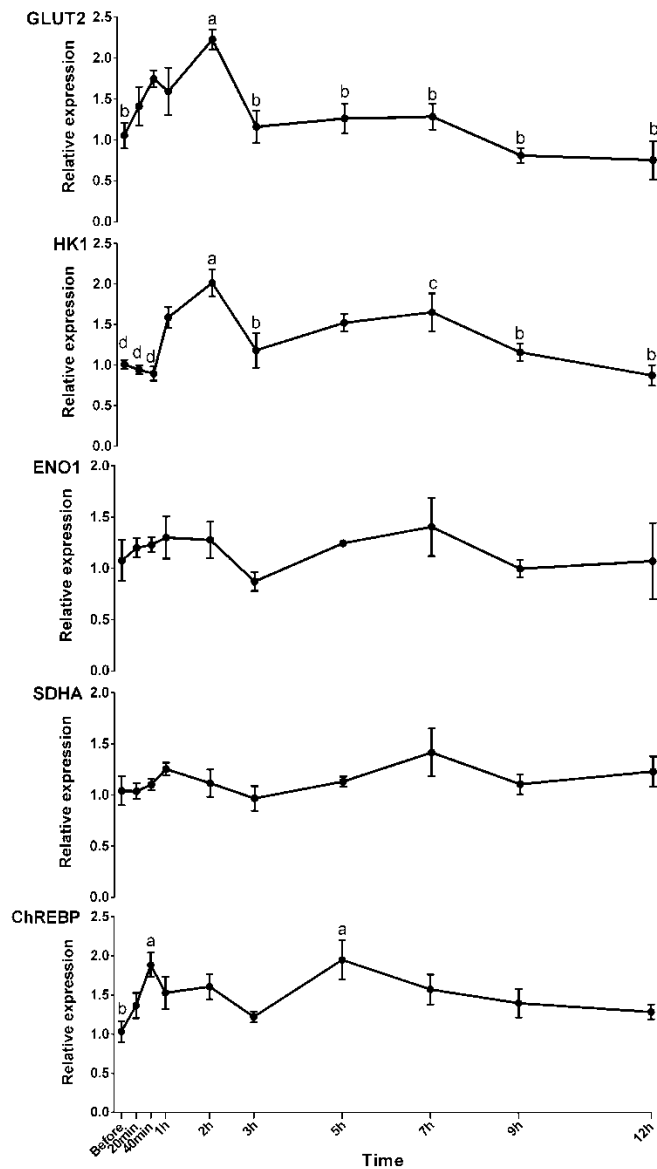


Figure 3. Gene expression of glucose transporter GLUT2, enzymes HK1, ENO1, SDHA and factor transcription ChREBP in liver of overfed mule ducks before the last meal of the overfeeding period and 20/40 minutes, 1/2/3/5/7/9/12 hours after the meal.

(n=6, means ± SEM). Time effect P<0.05: a ≠ b; except for HK1 a ≠ b, a ≠ d, c ≠ d.

3.2.3. Muscle expression (Figure 4)

Concerning muscle, the higher expression of GLUT8, HK1, ENO1 is found 5 hours after the meal whereas GLUT3 present an overexpression between 20 minutes and 1 hour, and 9 hours after the last meal. It appears downregulated 5 hours after the meal. SDHA appears overexpressed on the 2nd and the 5th hours.

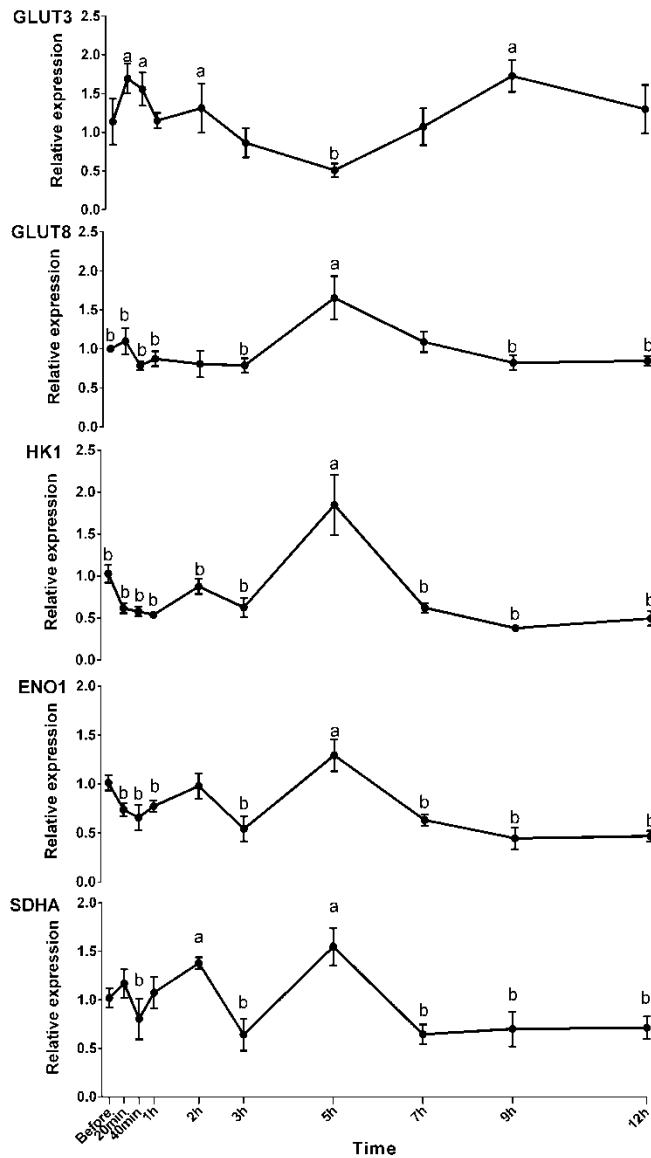


Figure 4. Gene expression of glucose transporters GLUT3 and 8, enzymes HK1, ENO1, SDHA in muscle of overfed mule ducks before the last meal of the overfeeding period and 20/40 minutes, 1/2/3/5/7/9/12 hours after the meal.

(n=6, means ± SEM). Time effect P<0.05: a ≠ b.

3.2.4. Subcutaneous adipose tissue (SAT) expression (Figure 5)

Regarding glucose transporter expression in SAT, we can see that GLUT1 is overexpressed 2, 7 and 9 hours after the meal whereas GLUT3 is overexpressed only 20 minutes after the last meal. There is no statistical variation in GLUT8 expression. Regarding enzyme expression, two peaks are observed: 2 and 5 hours after the last meal for SDHA and only 5 hours after the last meal for HK1.

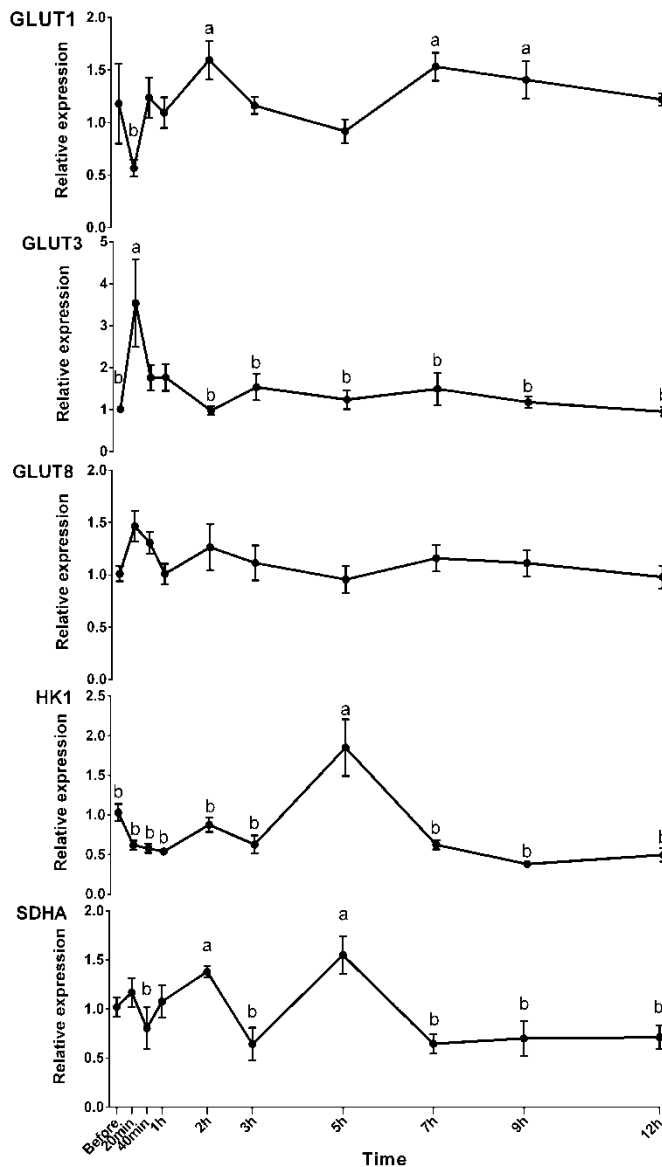


Figure 5. Gene expression of glucose transporters GLUT1, 3 and 8, enzymes HK1, ENO1 in Subcutaneous Adipose Tissue (SAT) of overfed mule ducks before the last meal of the overfeeding period and 20/40 minutes, 1/2/3/5/7/9/12 hours after the meal.

(n=6, means ± SEM). Time effect P<0.05: a ≠ b.

4. Discussion and conclusion

This study is the first experiment on postprandial gene expression involved in glucose metabolism in ducks. We have targeted principally glucose transporters but also genes of the glucose metabolism. After digestion and cell incorporation, the glucose undergoes multiple reactions in order to produce energy or to be stored in lipid *via* lipogenesis principally performed in liver in overfed ducks (Saadoun and Leclercq, 1986). In our study, we studied glycemia after the 24th meal of the overfeeding period and we have shown that glycemia is quite constant within 12 hours after the meal except a peak at 1 hour after the meal. This observation is in accordance with the variation observed for Pekin and Muscovy ducks by Davail et al. (Davail et al., 2003) but not for mule ducks, whose glycemia remained constant. However, their study was performed after the first meal of overfeeding period. We can hypothesize that mule ducks can quickly integrate and manage all the glucose at the beginning of the overfeeding period but may take longer at the end, after 2 weeks of daily overfeeding, as if the system was saturated. This difference could be also explained by a different crossbreed resulting in a different genetic background in mule ducks (male Albatre Muscovy duck * female F 29 Pekin duck in Davail et al. study (Davail et al., 2003), and male MMG Muscovy duck * female PKL Pekin duck in our study).

Regarding gene expression, less is known about a kinetic of expression of gene after a meal in overfed ducks. The order and function of genes studied are summarized in Figure 6.

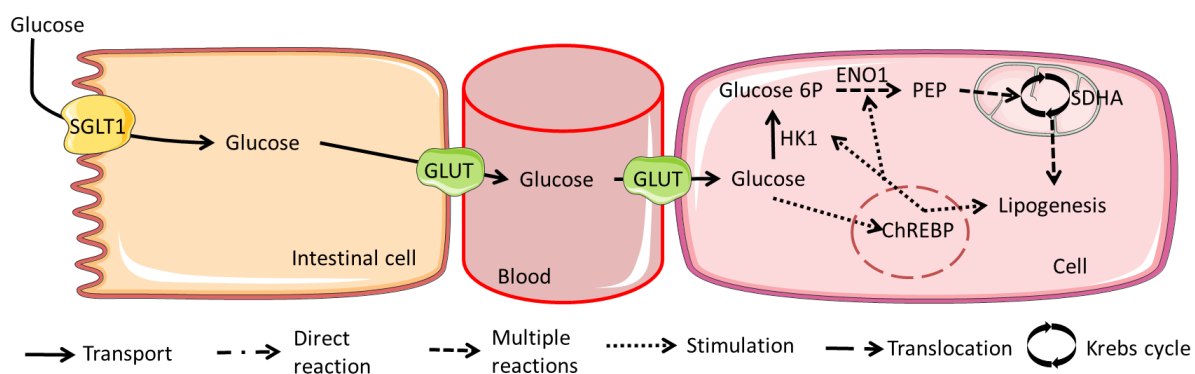


Figure 6. Scheme of the main genes studied and their implication in glucose metabolism. ChREBP: Carbohydrate Response Element Binding Protein; ENO1: Enolase 1; GLUT: Glucose Transporter; HK1: HexoKinase 1; PEP: Phosphoenol pyruvate, SDHA: Succinate Deshydrogenase Complex, Subunit A, SGLT1: Sodium Glucose Linked Transporter 1.

First of all, we studied glucose transporters in each tissue. SGLT1 has been identified as the transporter responsible for glucose absorption in chicken small intestine (Garriga et al., 1999). In our study, we have shown that SGLT1 (known to have a higher affinity for glucose than GLUTs) is the first gene upregulated in jejunal cells after the meal with a peak of expression between 20 minutes until 2 hours suggesting a rapid incorporation of glucose across the apical membrane using this principal co-transporter. Concerning GLUT expression in small intestine, we can see that the peak of expression of GLUT1 and GLUT8 are concomitants 2 hours after the meal and that they are inversely correlated with the expression of GLUT3 whose peak of expression appears 1 and 3 hours after the meal. We can hypothesize that a relay between these isoforms exists. Enterocytes express several isoforms that cooperate. The coexistence of the two isoforms, GLUT1 and GLUT3 (which has the highest affinity for glucose), ensures an optimal facilitated diffusion of glucose.

The glucose uptake in the intestine of avian species is known to be primarily provided by apically located SGLT-1 and the basolateral located GLUT2 transporters (whose affinity for glucose is lowest but has the highest transport capacity) (Humphrey et al., 2004; Mueckler, 1994; Uldry and Thorens, 2004). In our case, in mule ducks, GLUT2 expression was not detected in mule jejunal mucosa whereas its expression is observed in birds as in chicken (Garriga et al., 1997; Ruhnke et al., 2015), zebra finch (Welch et al., 2013) ... This observation may be due to the fact that our animals are in extreme conditions of nutritional overload: they are fed since 2 weeks with an unbalanced diet based only on corn (starch). This dietary imbalance may be considered as a stress. Studies have yet reported the effect of stress on the gene expression of nutrient transporters in jejunum of broiler chickens (Li et al., 2009; Sun et al., 2014). Studies on rodents demonstrated that environmental stress decreased GLUT2 expression at the brush border membrane level but did not alter SGLT1 expression (Shepherd et al., 2004). Similarly, a modification of the intestinal microbiota may alter the expression of glucose transporters. As observed in chicken jejunum infected by *Campylobacter jejuni* and whose GLUT2 expression was down-regulated (Awad et al., 2014). Moreover, the impact of overfeeding can also come from its composition. In fact, corn is clearly identified as source of flavonoids (Schettler, 2003). Some studies report an impact of flavonoids causing an inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2, whereas SGLT1 was unaffected (Kwon et al., 2007). In our case, the absence of GLUT2 mRNA expression is compensated by high affinity glucose transporters (GLUT1 and 3).

In liver, only GLUT2 has been found among all glucose transporters studied even it has been published that GLUT3 or 8 were found in this tissue (Kono et al., 2005). In fact, these isoforms present different characteristics. GLUT2 is known to be the major glucose transporter in liver (Kono et al., 2005; Mueckler and Thorens, 2013). GLUT1 and GLUT3 are expressed ubiquitously in all cell types (Uldry and Thorens, 2004), but the second present a higher affinity for glucose. Furthermore, GLUT8 is known to be an insulin-responsive glucose transporter in mammalian blastocyst (Carayannopoulos et al., 2000) and can be the unknown transporter that can compensate GLUT4 activity in GLUT4 KO mice (Doege et al., 2000; Katz et al., 1995). In bird's case, the lack of GLUT4 and the little expression of GLUT8 can be responsible, at least in part, of the hyperglycemia observed (Seki et al., 2003). In liver, we can see that GLUT2 expression is increasing until 2 hours after the meal, this is later than this of SGLT1 and concomitant with these of GLUT1 and 8 in jejunal cells which is in accordance with the glycemia evolution.

Regarding muscle and SAT, any expression of GLUT2 has been detected, this is in accordance with Kono et al. (Kono et al., 2005) in chickens. However, in muscle we can see a precocious overexpression of GLUT3 (between 20 minutes and 2 hours after the meal) and a later expression at 9 hours whereas GLUT8 is expressed at 5 hours. Once again, GLUT3 and GLUT8 are expressed at different times after the meal, and appear to be regulated in mirror. We can hypothesize that these isoforms are working together to incorporate glucose into cells.

In SAT, like in muscle, we can observe an increase of GLUT3 expression 20 minutes after the meal, promoting a peripheral uptake of the glucose. There is less variation in others GLUT except for GLUT1, this is possibly due to the fact that SAT is not the site of storage or transformation of glucose.

After corn digestion, glucose is incorporated in cells to undergo multiple reactions (figure 6). First of all, HexoKinase 1 (HK1), which take part of the first reactions of glucose metabolism in cell, is expressed earlier in liver than in muscle and SAT. Its expression is concomitant with this of GLUT2. These results are in accordance with precedent data demonstrating that HK and GLUT2 work together to facilitate the entry of glucose. Furthermore, GLUT2 and HK would potentially be involved in the signaling system of the insulin secretory response (Guerre-Millo, 1995). This precocious expression is in adequacy with glucose metabolism which is incorporated first in liver and after in peripheral organs.

Furthermore, HK1 is already known to be upregulated in fatty liver in goose (Lu et al., 2015) using transcriptomic approach and early expression of this enzyme after the meal, in the liver, can participate more effectively to the development of hepatic steatosis. In addition, HK1 and SDHA have the same profile of expression in muscle and SAT with an overexpression at 5 hours. This phenomenon is possibly due to facilitate entry and degradation of glucose. This upregulation after a meal was also demonstrated in zebrafish, with an overexpression of HK1 6 hours after refeeding in muscle (Seiliez et al., 2013).

To finish, we have studied expression of a transcription factor that is regulated directly by glucose: ChREBP (Carbohydrate-responsive element-binding protein) which can induce expression of genes implicated in glucose and lipid metabolism (Iizuka et al., 2004). Regarding ChREBP expression in our study, we can notice an overexpression 2 hours after the meal in jejunum, which is in accordance with the peaks of expression of GLUTs observed in this tissue. ChREBP, being activated by high concentration of glucose, induce glucose transporter expression and lead to glucose uptake and its transfer to bloodstream.

In the liver, an overexpression of ChREBP is observed earlier (40 minutes) and later (5h) promoting the establishment of glucose transporters, the glucose uptake by the hepatocytes and the activation of genes implicated in the establishment of the hepatic steatosis.

To conclude, this study allows us to better understand the postprandial mechanism of glucose metabolism in overfed ducks. It will permit to researchers in duck physiology to build experiment knowing when each gene is upregulated and is at its optimal threshold of expression. However, another study can be done using another time of sampling and interest gene. For example, it could be interesting to build a kinetic all along the overfeeding period and to sample tissue after many meals at different time in order to see gene expression evolution. It could also be interesting to study others gene involved in glucose metabolism such as Pyruvate Kinase, Insulin Receptor or the transcription factor SREBP.

Article 4: Kinetic of expression of genes involved in lipid metabolism in overfed mule ducks.

Molecular and Cellular Biochemistry

Après avoir élucidé le traitement postprandial du glucose chez le canard mulard nous avons décidé de poursuivre l'étude en nous intéressant au métabolisme des lipides. Nous avons donc choisi d'étudier aussi bien des enzymes de la lipogenèse (FAS, DGAT2...), de la formation des lipoprotéines (ApoB, MTTP), de la β -oxydation (ACAD11, CPT1) ou encore du recaptage des lipides (FABP4, VLDLR...). Nous avons également regardé l'expression de PPAR γ , un facteur de transcription que nous avons démontré comme différentiellement exprimé dans les différents génotypes. Dans cette étude, nous avons donc démontré une expression précoce (dans les 2 heures) de FAS et ACSL1 dans le foie et le muscle des canards mulard en plus d'un pic plus tardif. De plus, DGAT2 présente la plus grande induction d'expression dans le foie en plus d'une expression assez continue et stable dans le temps. Ces observations positionnent DGAT2 comme une enzyme clé de la lipogenèse et sont assez similaires dans le muscle. La sécrétion des lipoprotéines est régulée à la hausse dans la période postprandiale, avec une surexpression d'ApoB et MTTP qui débute 5 heures après le repas dans le foie ou le muscle. Concernant le recaptage hépatique des lipides, peu de variations sont observées, suggérant que FABP4 et VLDLR sont déjà à leur maximum d'expression spécifiquement dans ce tissu. En effet, ce phénomène a été observé dans notre précédente expérimentation « DuckPhy » chez le canard mulard. Dans le muscle, VLDLR et LDLR sont surexprimés 5 heures après le repas, ceci associé à une expression augmentée de LMF1 dans le tissu adipeux impliqué dans la maturation de la LPL. Ces résultats nous permettent, tout comme pour le métabolisme glucidique, de mieux comprendre le traitement postprandial des lipides chez le canard gavé en plus de permettre aux chercheurs de mieux cibler leur point de prélèvement.

Mots clés : Stéatose hépatique, métabolisme lipidique, cinétique, canards

Kinetic of expression of genes involved in lipid metabolism in overfed mule ducks

Tavernier Annabelle^{1,2}; Gontier Karine^{1,2}; Ricaud Karine^{1,2}; Bernadet Marie-Dominique³;
Davail Stéphane^{1,2}

¹UMR 1419 INRA UPPA NuMÉA, 371 Rue du Ruisseau 40000 Mont de Marsan FRANCE;

²UMR 1419 INRA UPPA NuMÉA, Quartier Ibarron 64310 Saint Pée sur Nivelle; ³INRA
UEPFG, 1076 Route de Haut Maucq 40280 Benquet FRANCE

Corresponding author: Gontier Karine

UMR 1419 INRA UPPA NuMÉA, 371 Rue du Ruisseau 40000 Mont de Marsan FRANCE

e-mail: karine.gontier@univ-pau.fr; tel.: +33 558 513 706; fax: +33 558 513 737

Keywords: Hepatic steatosis, lipid metabolism, kinetic, ducks

Abstract. In palmipeds, overfeeding leads to hepatic steatosis, also called “foie gras” which is the results of many metabolic mechanisms. In order to understand these mechanisms, we decided to build an experimentation measuring the expression of genes implicated in lipid metabolism during 12 hours following the last meal of the overfeeding period. We have shown that there is a precocious expression (within 2 hours) of Fatty Acid Synthase (FAS) and Acyl CoA Synthetase Long-chain 1 (ACSL1) in liver and muscle of mule ducks in addition with a later peak. Furthermore, Di-acyl Glycerol Acyl Tranferase (DGAT2) presents the highest induction of expression in liver and it is overexpressed quite a long time, positioning this enzyme as a key factor in hepatic steatosis. These observations are quite similar in muscle. Lipoprotein secretion is upregulated later in postprandial period, with an upregulation of Apolipoprotein (ApoB) and Microsomal Triglycerides Transfer Protein (MTTP) beginning at 5 hours in liver or muscle. Regarding hepatic re-uptake of lipid, less variation is observed, suggesting that Fatty Acid Binding Protein (FABP4) and Very Low Density Lipoprotein Receptor (VLDLR) are already at their maximum expression specifically in this tissues observed in our precedent experimentation in mule ducks. In muscle, VLDLR and LDLR upregulation is observed 5 hours after the meal, associated with an overexpression in the adipose tissue of Lipase Maturation Factor 1 (LMF1) involved in the maturation of lipoprotein lipase. These findings will allow us to better understand the kinetic treatment in lipid metabolism after a meal in overfed ducks. This first report on kinetic expression will allow researcher to better target their sampling time knowing the optimal point of expression of each gene.

Acknowledgments. We thank the “Conseil Général des Landes” and the “Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras” (CIFOOG) for financing this work. We also thank the technical staff of INRA Artiguères for rearing ducks (Certificate of Authorization to Experiment on Living animals, no. B40-037-1, Ministry of Agriculture and Fish Products, ethic committee Aquitaine birds and fish no.C2EA-73). We are grateful to Frédéric Martins and Jean-José Maoret for performing Fluidigm analysis (Génopole Toulouse/Midi-pyrénées, Plateau Transcriptomique Quantitative (TQ), Toulouse, France). We finally thank Patrick Daniel, Karine Bellet and Martine Chague of the laboratory Pyrénées Landes (LPL, Mont de Marsan) to let us use their material.

1. Introduction

In palmipeds, hepatic steatosis (also called fatty liver or “foie gras”) is induced by overfeeding. The fatty liver is the result of many mechanisms including a strong activity of hepatic *de novo* lipogenesis (Hermier et al., 1991; Saadoun and Leclercq, 1986). The accumulation of neo-synthesized lipids (mainly triacylglycerol, Fernandez et al., 2011) leading to hepatic steatosis. Nevertheless, the metabolic response to overfeeding is extremely variable and depends on the genotype. In fact, the Muscovy (*Cairina moschata*) or mule ducks (the sterile hybrid from male Muscovy and female Pekin) present a higher faculty to produce fatty liver than the common Pekin duck (*Anas platyrhynchos*) which presents a higher lipid exportation to peripheral organs (such as adipose tissues and muscles, as *pectoralis major*) (Chartrin et al., 2005; Davail et al., 2003). These differences in overfeeding response between these three genotypes can be explained by an imbalance between triglycerides (TG) synthesis and their exportation. For example, Pekin duck exhibits a greater exportation and peripheral collection of TG. This phenomenon is illustrated by a higher Very Low Density Lipoprotein (VLDL) formation (G Saez et al., 2009) and a higher activity of the lipoprotein lipase (LPL, enzyme that works in cooperation with FA transporters and lipoprotein receptors, and that catalyzes the hydrolysis of TG into fatty acid (FA) allowing their incorporation into peripheral tissues) (André et al., 2007). On the contrary, Muscovy and mule ducks present a decreased LPL activity through the overfeeding period leading to a poor uptake at peripheral level and present a smaller exportation of TG than that observed in Pekin ducks (Hermier et al., 2003). Furthermore, some genes of lipogenesis have already been described upregulated in overfed Pekin and Muscovy ducks such as Fatty Acid Synthase (FAS), Stearoyl CoA Desaturase (SCD1) and Di-acyl Glycerol Acyl Transferase (DGAT2) (Hérault et al., 2010). FAS, enzyme that catalyzes the conversion of Acetyl CoA in palmitate, is found in many organisms (Wakil et al., 1983) and has been described to vary under different nutritional conditions (Goodridge et al., 1986; Morris et al., 1984). DGAT2, the final enzyme in the triglyceride (TG) synthesis cascade, has been previously described as a key factor in hepatic lipid accumulation (Hérault et al., 2010). In addition, in mice, a hepatic overexpression of this gene leads to lipid accumulation (Monetti et al., 2007). However, many other genes have been shown to be implicated in hepatic steatosis or, at least, in lipid metabolism. For example, Acyl CoA Synthetase Long-chain 1 (ACSL1), an enzyme known to potentiate lipid uptake in hepatic cells (Parkes et al., 2006) is overexpressed in goose fatty liver (Zhu et al., 2011).

Fatty acid transporters are also implicated in the development of steatosis such as Fatty Acid Binding Protein (FABP) and Fatty Acid Translocase Cluster of Differentiation 36 (FAT/CD36). These two transporters play a key role in metabolic disorders (Auguet et al., 2014; Furuhashi et al., 2014; Koonen et al., 2007), as for example, FABP4 has been shown overexpressed at the end of the overfeeding period in mule ducks (Personnal communication Tavernier Article 1) allowing the re-uptake of circulating lipids and emphasizing the hepatic steatosis. Furthermore, FABP4 expression have also been correlated with human NAFLD and steatosis (Thumser et al., 2014). The imbalance between synthesis and exportation is also illustrated by a failure in lipoprotein formation: overfed ducks exhibiting a downregulation of Apolipoproteins (ApoB or ApoAI) (Hérault et al., 2010; Lu et al., 2015). Microsomal Triglycerides Transfer Protein (MTTP), which allows VLDL formation, is also an important factor in steatosis development. In fact, mice with a hepatic Knock Out (KO) of MTTP developed steatosis (Raabe et al., 1999). Regarding transcription factors, it is already known that Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c (SREBP1c) stimulate lipogenesis and its overexpression leads to a higher steatosis (Roblin et al., 2011). As well, Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPARG) have been also described to promote lipid storage in liver (Ahmadian et al., 2013).

So, in order to better understand the mechanisms leading to hepatic steatosis, we decided to investigate the physiological response after the last meal (24th) of the overfeeding period in mule ducks. We study gene expression in liver and peripheral organs such as muscle (*pectoralis major*) and Subcutaneous Adipose Tissue (SAT). The main objective was to establish a postprandial expression profile of genes of interest that have been shown to be implicated in hepatic steatosis. These results will allow to better understand the postprandial mechanisms induced by an overfeeding meal and to target sampling point for each gene of interest.

2. Material and methods

2.1. Animals.

All experimental procedures involving ducks were in accordance with the French National Guidelines for the care of animal for research purposes. Animals used were male ducks from the mule genotype (MMG*PKL). They were provided by Ducourneau (Bonnegarde, France) at the age of one day.

All ducks were reared under usual conditions of light and temperature at the Experimental Station for Waterfowl breeding (INRA, Artiguères, France). All ducks were fed ad libitum, from hatching to 4 weeks of age, with a starting diet (2752 kcal/kg; crude proteins: 17, 5%) and from 4 to 8 weeks of age with a growing diet (2803kcal/kg; crude proteins: 15%). At the age of 8 weeks, the animals were subjected to hourly rationing in order to prepare the overfeeding. At 12 weeks of age, ducks were overfed with corn and corn meal at the maximum of their ingestion ability during 2 weeks (24 meals). Ducks were sacrificed by slaughtering after electronarcosis at the Experimental Station for Waterfowl breeding (INRA, Artiguères, France) at ten times. The first time was just before the 24th meal, the other 9 times were 20, 40 minutes and 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12 hours after the last meal of overfeeding. After dissection, the liver, the *pectoralis major* (muscle) and the subcutaneous adipose tissue (SAT) were weighed, sampled and immersed in liquid nitrogen. Samples were stored at -80°C for the study of gene expression.

2.2. Biochemical assays

Plasmas. Triglyceride (TG) and Non Esterified Fatty Acid (NEFA) plasma concentrations were quantified by colorimetric method using enzymatic kit (Triglycérides LDB, Biodirect; NEFA HR2, Wako).

2.3. RNA isolation and reverse transcription.

RNA extraction. Total RNA were isolated from frozen tissue according to the TRIZOL method (Invitrogen/Life technologies). Total RNA concentration was measured by spectrophotometry (optical density at 260nm) using a NanovuePlus (GE Healthcare) and all the samples were normalized at 500ng/μl. The integrity of total RNA was analyzed by electrophoresis. *Reverse transcription.* cDNA were obtained by reverse transcription using the enzyme Superscript III (Life technologies) and a mix of oligo dT and random primers (Promega). 3μg of total RNA were used and the absence of contamination by DNA was verified by different negative control. The reaction was made in StepOne (Applied Biosystem) according to this program: 25°C/5min, 55°C/60min, 70°C/15min and retention at 4°C until storage at -20°C.

2.4. Determination of mRNA levels

qPCR EvaGreen using BioMark. Before performing Fluidigm step, a Specific Target Amplification (STA) has been done with 5ng/μL of cDNA. This step consists in PCR using PreAmp Master Mix and specific primer in order to normalize all samples and to ensure that there are enough copies of cDNA in each well. This step is recommended by the fabricant because the method used nanovolumes. After STA, all target and samples were distributed in a 96 x 96 chip for Fluidigm Gene Expression Array. The primers were provided by Applied Biosystems and were used at a concentration of 20μM. Primers sequences are presented in Table 1. The reaction was made thanks to 20X EvaGreen dye following the program: holding stage 95°C during 10 minutes, 35 cycles of amplification: 95°C 15 seconds, 60°C 1minute. All the data were analyzed with the Fluidigm Real-Time PCR Analysis Software (Fluidigm Corporation v4.1.3). This part of the work was performed at the Platform of Quantitative Transcriptomic GeT-TQ (GenoToul, Toulouse, France). *Gene expression analysis.* The chosen reference gene was Actin B but all the results were confirmed with GlycerAldehyde 3 Phosphate DeHydrogenase (GAPDH). All Cycle threshold (Ct) were collected. Results are expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) with $\Delta\Delta Ct = (Ct_{target} - Ct_{ref})_{sample} - (Ct_{target} - Ct_{ref})_{standard}$. Ct_{target} is Ct for the target gene; Ct_{ref} is Ct for reference gene; $(Ct_{target}-Ct_{ref})_{sample}$ is the first ΔCt calculated for samples and $(Ct_{target}-Ct_{ref})_{standard}$ is the second ΔCt calculated for the standard : before the 24th meal.

2.5. Statistical analysis.

Statistical analysis. Results are expressed as mean \pm SEM. An ANOVA following by a Tukey test was made using Prism software (GraphPad Prism Software). Accepted p-value was 0.05 and considered as statistically significant.

Table 1. Primers used for determination of mRNA levels

	Gene (name and symbol)		Primer sequence 5'-3'	Product size (bp)
Lipid metabolism	Acyl CoA deshydrogenase 11	Forward	TGGTTGTACCTCGAGCTGTG	238
	ACAD 11	Reverse	CATCCACATGAGAGGGCTTT	
	Acyl CoA Synthetase Long-chain 1	Forward	GGCTGGCTTCATACAGGAGA	247
	ACSL 1	Reverse	CTCTTTTCTTGGCCCATTTG	
	Apolipoprotein B	Forward	TCTCACCGTGACTTGAGTGC	137
	ApoB	Reverse	TCCCAGCAGAAGGTGAAGAT	
	Apolipoprotein AI	Forward	CAAACAGCTCGACCTGAAGC	121
	ApoAI	Reverse	GGTGTCTTCAGCCACATCT	
	Carnitine Palmitoyl Transferase A	Forward	GATTTGGACCAGTGGCTGAT	219
	CPT1 A	Reverse	GAAGGTTGCTTTGCACCAAT	
	Diglyceride Acyl Transferase 2	Forward	TGGGGCTTGTTACCGTACTC	250
	DGAT2	Reverse	TGGAGAAGATGGGCTGAATC	
	Fatty Acid Binding Protein 4	Forward	AATGGCTCACTGAAGCAGGT	143
	FABP4	Reverse	TGGCTTCTTCATGCCTTTTC	
	Fatty Acid Synthase	Forward	TGAAGAAGGTCTGGGTGGAG	97
	FAS	Reverse	CTCCAATAAGGTGCGGTGAT	
	Fatty Acid Translocase/Cluster of	Forward	AGTTTGCCAAAAGGCTTCAA	228
	Differentiation 36 FAT/CD36	Reverse	CGAGGAACACCACAGAACCT	
	Lipase maturation factor	Forward	CCTTCCAGACCTACGAGCAG	215
	LMF1	Reverse	GCCGATCCTCTTCCGAATCC	
	Low Density Lipoprotein Receptor	Forward	TGTGGCCTTCAGAAAGCTCG	151
	LDLR	Reverse	ATCTCGTGCTGCATGTAGGG	
	Microsomal Triglycerides Transfer	Forward	TGCAGATGGACAGAGTCGAG	176
	Protein MTP	Reverse	GGATGCAGTGCTGAAAACCT	
	Very Low Density Lipoprotein Receptor VLDLR	Forward	CGTAACTGGCAGCACAAGAA	179
		Reverse	TGCTGATCCAGTGCTCAAAC	
	Transcription factors	Liver X Receptor Alpha	Forward	CATCTCGACGCTACAATCCA
LXRA		Reverse	GTGTGCTGCAGTCTCTCCAC	
Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha PPARA		Forward	GGATGCTGGTAGCCTATGGA	247
		Reverse	ACGTGCACAATGCTCTCTTG	
Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma PPARG		Forward	CCCAAGTTTGAGTTCGCTGT	196
	Reverse	GCTGTGACGACTCTGGATGA		
Reference genes	Actin B	Forward	CCAGCCATCTTTCTTGGGTA	141
	ActB	Reverse	ATGCCTGGGTACATTGTGGT	
	Glyceraldehyde 3 Phosphate Deshydrogenase GAPDH	Forward	CAGAGGACCAGGTTGTCTCC	146
		Reverse	CACCACACGGTTGCTGTATC	

3. Results

3. 1. Biochemical assays

3. 1. 1. Triglyceridemia (Figure 1)

Triglyceridemia presents an increase very precociously with a peak between 40 minutes and 1 hour. The plasma triglyceride (TG) concentration is quite constant over 1 hour after the meal. However, a little increase can be observed at 5 hours, but it is not significant.

3. 1. 2. Plasma NEFA concentration (Figure 1)

Plasma NEFA concentration evolves in the same way as triglyceridemia with an early peak around the meal (before the meal, 20 and 40 minutes after the meal). Later, after the meal, plasma NEFA concentration does not change anymore.

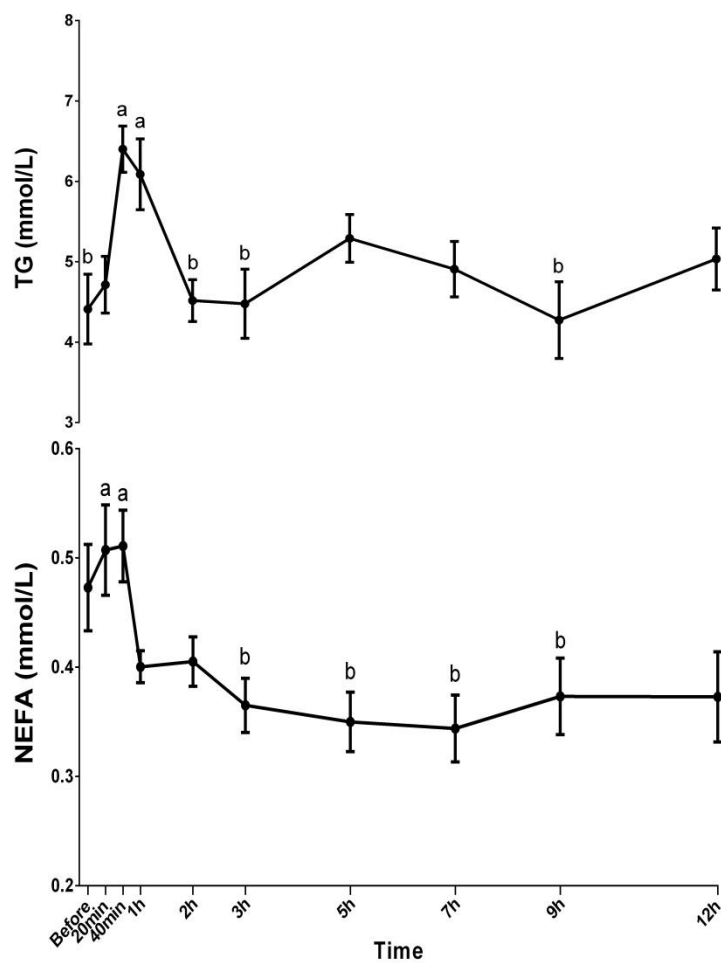


Figure 1. Evolution of pre and postprandial plasma triglycerides and NEFA concentration in overfed mule ducks during the last meal of the overfeeding period.

(n=10, means \pm SEM). Time effect $P < 0.05$: a \neq b.

3. 2. Gene expression

In this result section, all the genes presented in Table 1 have been measured, but only those presenting variations will be discussed below.

3. 2. 1. Hepatic expression (Figure 2)

In liver, FAS presents a profile with two period of overexpression, the first is extended between 20 minutes and 2 hours, the second appears 7 hours after the meal. ACSL1 is expressed very earlier after the meal, with a single peak at 40 minutes. DGAT2 is upregulated between 2 and 9 hours after the meal, furthermore, this enzyme present a huge fold change between the point “before meal” and this peak of expression at 7/9hours after the meal (from 1 to 31). ApoB and MTTP evolve almost in the same way. MTTP present an early overexpression (2 first hours) and a late one at 5/7 hours which is concomitant with that of ApoB. A down regulation is observed 3 hours after the meal. FATCD36 expression does not change over the collection period, except at 12 hours after the meal. FABP4 (data not shown) does not exhibit variations during all the time. Regarding lipoprotein uptake, we do not observe any variation in VLDLR expression (data not shown), however, LDLR is upregulated 2 hours after the last meal of the overfeeding period. As observed for FAT/CD36, CPT1A is upregulated at 12 hours after the meal but it also presents an overexpression 20 min after the meal. Regarding the other gene of β oxidation, ACAD11, it presents an overexpression at 5 and 9 hours after the meal. To finish, the transcription factor PPARG exhibits a peak at 2 hours after the meal whereas PPARA does not vary (data not shown).

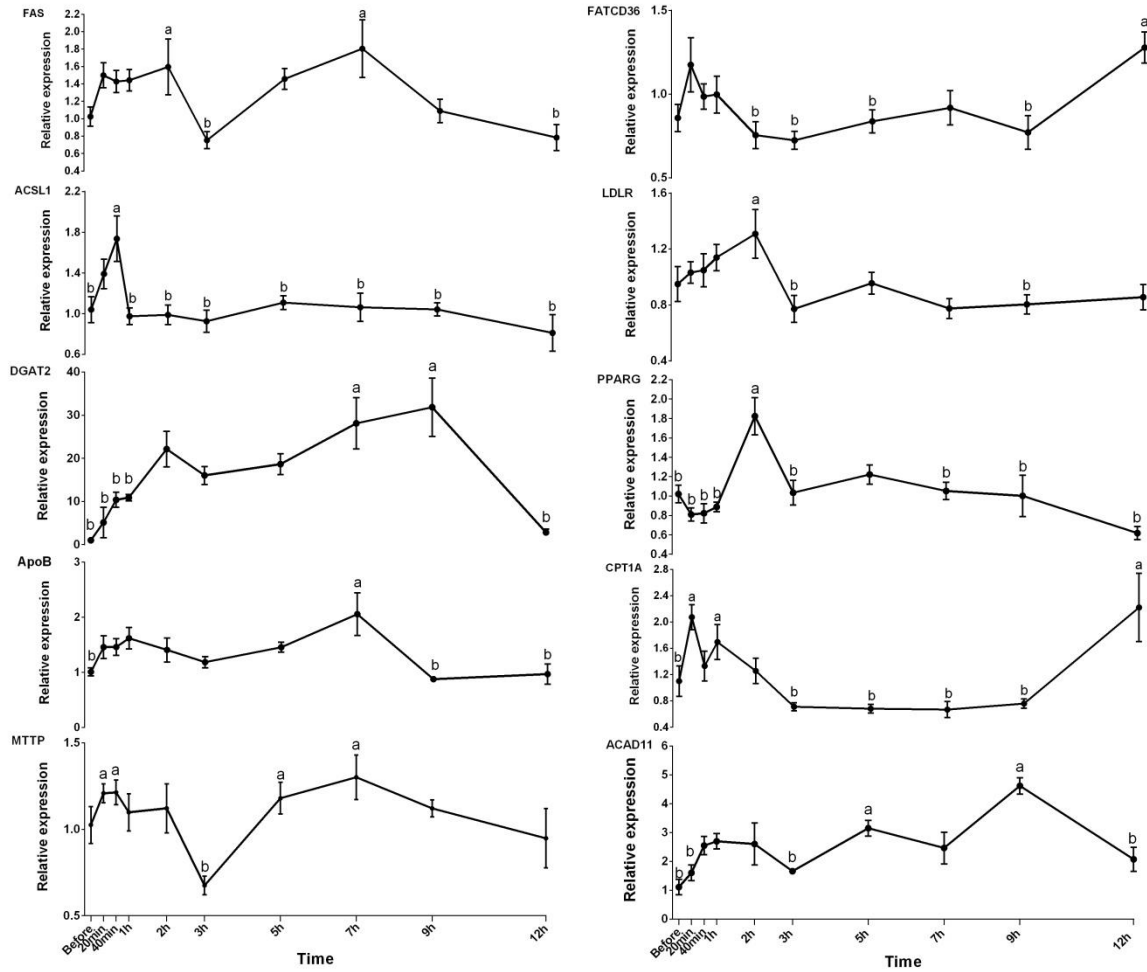


Figure 2. Gene expression of FAS, ACSL1, DGAT2, ApoB, MTTP, FATCD36, LDLR, PPARG, CPT1A and ACAD11 in liver of overfed mule ducks before the last meal of the overfeeding period and 20/40 minutes, 1/2/3/5/7/9/12 hours after the meal.

(n=6, means ± SEM). Time effect P<0.05: a ≠ b.

3. 2. 2. Muscle expression (figure 3)

Expression of FAS exhibits an increase 40 minutes after the meal, and from 5 to 7 hours. This profile looks like this of ACSL1, DGAT2 and ApoB which exhibit two upregulations, one earlier than the other (1 or 2 hours and 5 hours after the meal). Concerning fatty acid transport; we notice a peak of expression at 7 hours after the meal for FABP4 and at 5 hours for LDLR and VLDLR (this last shows too an overexpression just before the meal). CPT1A is precociously overexpressed, with an upregulation between 20 minutes before and after the last meal of the overfeeding period.

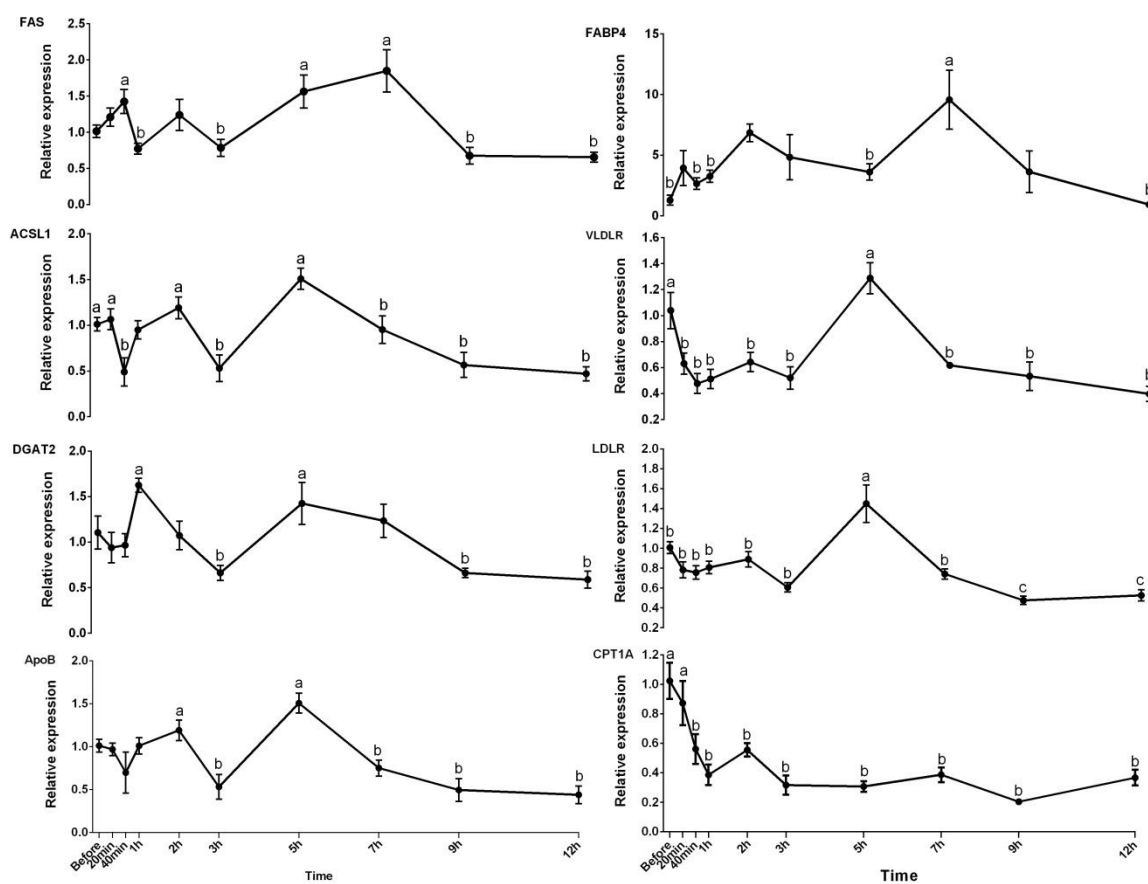


Figure 3. Gene expression of FAS, ACSL1, DGAT2, ApoB, FABP4, VLDLR, LDLR and CPT1A in muscle of overfed mule ducks before the last meal of the overfeeding period and 20/40 minutes, 1/2/3/5/7/9/12 hours after the meal.

(n=6, means ± SEM). Time effect P<0.05: a ≠ b.

3. 2. 3. Subcutaneous adipose tissue (SAT) expression (figure 4)

In, SAT, as expected, we were not able to detect as many genes as in the other tissues, we decided to focus on genes involved in lipid absorption. There are no statistical variations in relative expression of FABP4 in SAT. However, we can observe a peak in relative expression of LMF1 5 hours after the last meal of the overfeeding period.

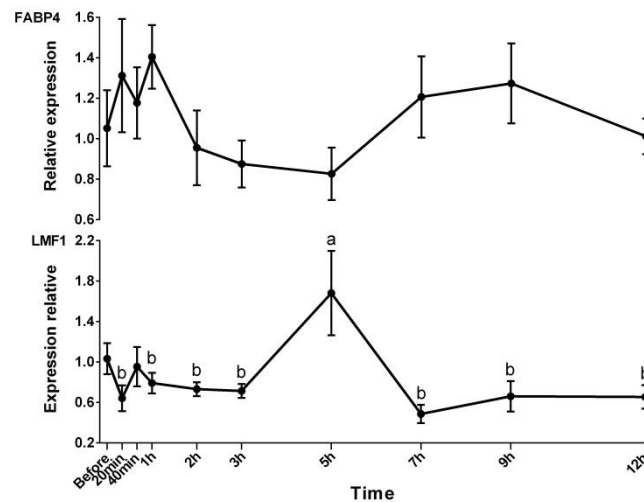


Figure 4. Gene expression of FABP4 and LMF1 in SAT of overfed mule ducks before the last meal of the overfeeding period and 20/40 minutes, 1/2/3/5/7/9/12 hours after the meal.

(n=6, means ± SEM). Time effect $P < 0.05$: a ≠ b.

4. Discussion and conclusion

This is the first report on postprandial kinetic expression of genes involved in lipid metabolism in ducks. We studied many genes implicated in lipid synthesis, exportation, uptake and regulation at hepatic and peripheral levels in order to completely understand lipid metabolism mechanisms under overfeeding conditions.

After intestinal enzymatic digestion, corn (the major constituent of the overfeeding mash: 98%) is incorporated into cells as molecule of glucose. From there, glucose will undergo multiple reactions to produce energy (through β -oxidation) or to be stored in lipids *via* lipogenesis which takes place principally in liver in palmipeds (Saadoun and Leclercq, 1986).

First of all, we have shown that triglyceridemia and plasma NEFA concentration exhibit higher values just after the last meal of the overfeeding period (≤ 1 hour). Plasma TG concentration reaches a pic until 6,4 mmol/L and plasma NEFA concentration: 0,51 mmol/L, respectively at 40 minutes and 1 hour after the meal. This is in accordance with the observations of Gontier et al (Gontier et al., 2013) which measured a plasma TG concentration of 5,74 mmol/L 70 minutes after the last meal of the overfeeding period. This very precocious concentration of circulating lipids (observed even before the peak of glycemia which is noted 1h after the meal, not shown) concentration of circulating lipids may be quite surprising and was not observed in Davail et al kinetic (Davail et al., 2003). However, their study was performed on the first day of the overfeeding period; these differences can be justified by a very different physiological status in our experience. This precocious increase in TG and NEFA plasma concentrations after a meal has already been observed in women consuming high glucose beverage (Teff et al., 2004). It can be the result of the inhibition of the clearance of TG by lipoprotein lipase (LPL) (Grant et al., 1994). It is well known that LPL activity is highly regulated by several factors, including apolipoproteins, hormones and NEFA levels (Farese et al., 1991; Pagliialunga et al., 2009). The increase of the concentration of free fatty acids (which could come from lipolysis, ie hydrolysis of TG from adipose tissue in AG, in case of fasting) inhibits LPL activity ensuring a protective effect in limiting the formation of free fatty acids which are cytotoxic (Dombret, 1996), hence the observed increase of plasma TG levels. A previous study has yet demonstrated the impact of LPL inhibition on ducks triglyceridemia. In fact, injection of anti-LPL antibodies in overfed ducks leads to a dramatic increase of TG plasma concentration (André et al., 2007). It has also been demonstrated that LPL activity decrease during overfeeding in mule ducks. So we can hypothesize that this precocious increase in TG concentration is due to the inhibition of LPL activity resulting in a decrease of the TG clearance. We can suppose that the peak of fatty acids observed as close to the meal may be a clearance of lipids by adipose tissue for energy use. This hypothesis may be confirmed by the peak of expression of CPT1A in muscle, as in liver, at the same time (around 1 hour after the meal). CPT1A is the limiting enzyme of β -oxidation (Eaton, 2002). Its expression pattern is relatively in mirror with this of DGAT2, which is in agreement as the reduction of DGAT2 mRNA has already been demonstrated to increase CPT1 expression in liver (Cheol et al., 2007). In addition, a downregulation of Lipase Maturation Factor 1 (LMF1) in adipose tissue is observed just after the meal.

This enzyme is involved in the maturation and transport of LPL, and its mutation causes an important hypertriglyceridemia and lipase deficiency (Péterfy et al., 2007). This down regulation could also explain the peak of triglyceridemia observed.

Regarding gene expression, some data are already available. Héroult et al. (Héroult et al., 2010) have demonstrated that overfeeding upregulates FAS, SCD1 and DGAT2 12 hours after the last meal. Furthermore, it has been shown that FAS activity was increased in Muscovy liver (in comparison with Pekin and mule) just after the first meal of overfeeding period (Baeza et al., 2005). Our study will allow us to better understand the postprandial profile of each gene implicated in hepatic steatosis and to target the proper sampling point for each gene. The order and function of genes are summarized in Figure 5. These genes can be grouped into theme: synthesis, export, re-uptake and β -oxidation.

First of all, we can see that *de novo* lipogenesis is rapidly upregulated with precocious overexpression of FAS in liver and muscle (respectively 1 hour and 40 minutes) but also later (7 hours after the meal). FAS is known to vary under different nutritional conditions (Goodridge et al., 1986; Morris et al., 1984). Seiliez et al (Seiliez et al., 2013) have already demonstrated that FAS is overexpressed 6 hours after a refeeding in zebrafish. Likewise, the refeeding induces expression of FAS in rat (Paulauskis and Sul, 1988). The precocious expression might be the result of a memory mechanism that induces early upregulation of genes involved in glucose or lipid metabolisms in order to maintain the homeostasis of the organism.

ACSL1 plays a major role in FA entry into cell and has been shown upregulated in fatty liver of geese (Zhu et al., 2011). In liver, it can facilitate FA transport, across the plasma membrane, which can undergo β -oxidation or esterification for TG production (Parkes et al., 2006). So we can hypothesize that this ACSL1 precocious hepatic expression (40 minutes) participates to FA clearance and plasma NEFA concentration decrease early after the meal. In muscle, we can observe two upregulation of ACSL1, one before 2 hours and the other 5 hours after the meal. The first increase can also participate in FA clearance, and the second may contribute, with FAS, to lipogenesis. For it, DGAT2 is known as a key factor of lipid accumulation in liver. Studies have already demonstrated that DGAT2 overexpression in mice induces fatty liver (Monetti et al., 2007). We have noted a huge upregulation of this key enzyme in liver from 2 hours after the meal until to 9 hours.

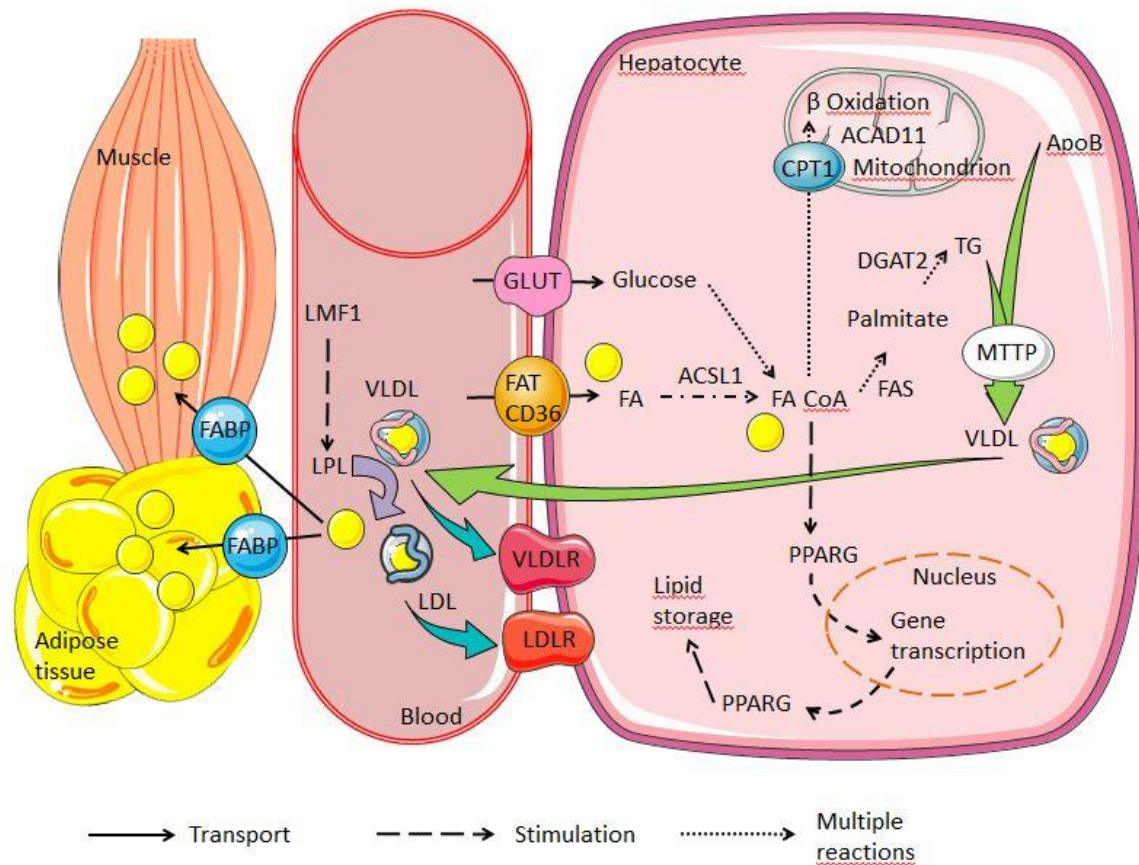


Figure 5. Scheme of the main genes studied and their implication in lipid metabolism.

ACAD : Acyl-CoA Dehydrogenase; **ACC** : Acetyl CoA Carboxylase; **ACLY** : ATP Citrate lyase; **ACSL** : Acyl CoA Synthetase Long chain; **ApoB** : Apolipoprotein B; **CPT1** : Carnitine Palmitoyl Transferase 1; **DGAT2** : Diacylglycerol AcylTransferase 2; **FA** : Fatty Acid ; **FABP** : Fatty Acid Binding Protein; **FAS** : Fatty Acid Synthase; **FAT/CD36** : Fatty Acid Transporter/ Cluster of differentiation 36; **FAA** : Free Fatty Acid; **HDL** : High Density Lipoprotein; **LDLR** : Low Density Lipoprotein Receptor; **LMF1** : Lipase Maturation Factor 1; **LPL** : Lipoprotein Lipase; **MTP** : Microsomal Triglyceride Transfer Protein; **PPARG** : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha/Gamma; **TG** : Triglyceride; **VLDLR** : Very Low Density Lipoprotein Receptor.

This observation is the reflect of how much this enzyme can be regulated in lipogenesis way and can play a central role in steatosis development. In muscle, DGAT2 presents 2 peaks, which are concomitant with those of FAS and ACSL1. These enzymes seem work together in muscle in order to performed lipogenesis.

According to the exportation, ApoB is a structural protein which takes part in lipoprotein formation, especially VLDL, LDL and IDL (Intermediate Density Lipoprotein) (Gruffat et al., 1996). MTP allows the transfer of lipid into nascent lipoprotein. These two genes can be regulated by insulin secretion (Brown and Gibbons, 2001). It has been demonstrated that their downregulations affect clearly VLDL secretion in overfed goose (Han et al., 2015). In our case, in liver, we have observed a precocious hepatic overexpression of MTP (first postprandial hour, which is in accordance with the hypertriglyceridemia observed) and a later upregulation of MTP and ApoB (5/7 hours after the meal, combined with a slight increase of plasma TG). In muscle, ApoB upregulation is observed at 2 and 5 hours too after the meal. However, these peaks of expression in genes implicated in the lipoprotein formation do not impact greatly plasma TG concentration. Three hypotheses can be made: first, a post-transcriptional or post-translational regulation of these genes, which can block lipid secretion; secondly, an efficient re-uptake of lipoproteins provided by VLDLR or LDLR (upregulated 5 hours after the meal in muscle) and finally, an efficient LPL activity (enzymes that we can assume that they are present according to the expression of LMF1 in GSC at 5 hours).

Regarding FA, we were not able to detect any variations of FABP4 expression in liver after the meal (data not shown). This observation can be explained by an already huge overexpression of this gene at the end of the overfeeding period (Personal communication Tavernier 2016 Article 1) which not allows any postprandial variations. In muscle, we can see a late overexpression of FABP4 (7 hours after the meal). This result asks the question of FABP4 regulation and how evolves their expression all along of the overfeeding period. It will be interesting to build others kinetics precociously (at the beginning and the middle of the overfeeding) to evaluate their global evolution.

Concerning the evolution of transcription factors, PPARG, known to regulate adipogenesis and lipid accumulation (Ahmadian et al., 2013; Wang et al., 2008), and which appears upregulated in overweight and diabetic animal models presenting fatty liver (Rogue et al., 2010), is overexpressed in liver of mule ducks 2 hours after the last meal of the overfeeding period. This overexpression could induce the upregulation observed of DGAT2 at 2 hours.

Finally, little variation is observed in SAT. Only LMF1 is found overexpressed 5 hours after the meal. This upregulation may be a consequence of the slight increase of triglyceridemia observed 5 hours after the meal to promote their incorporation in peripheral tissues.

In conclusion, this is the first report on postprandial gene expression in overfed ducks. This study allows us to completely understand the postprandial mechanisms of lipid metabolism and will permit researcher to target the better sampling point in their experimental design. However, it will be essential to complete the experimentations with proteomic, enzyme activity and hormone measurements. It will be also very interesting to build another experimentation to study the evolution of postprandial expression all along the overfeeding period studying others meals.

Discussion générale

Cette thèse s'inscrit dans une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la mise en place de la stéatose hépatique chez les palmipèdes à foie gras. Elle a permis de décrire les différences intergénomiques au niveau du transcriptome mais également d'établir un profil d'expression des gènes d'intérêt impliqués dans les métabolismes lipidique et glucidique.

Influence d'une surcharge alimentaire et du génotype sur le développement de la stéatose hépatique (Articles 1 et 2)

Ces deux articles se sont appuyés sur la compréhension des métabolismes lipidique et glucidique chez trois types génétiques de palmipèdes à savoir les canards de Barbarie (*Cairina moschata*), Pékin (*Anas platyrhynchos*) et leur hybride stérile, le canard mulard. Nous avons tout d'abord confirmé les différences zootechniques et biochimiques observées auparavant dans notre étude avant d'établir un lien avec les différences d'expression de gènes d'intérêt.

Concernant les données biochimiques, le mulard et le canard de Barbarie présentent une glycémie qui augmente significativement dès le début du gavage (dès le 4^{ème} repas) alors que celle du canard Pékin reste quasiment inchangée sur toute la durée du gavage et reste 1,3 fois plus faible (augmentation significative uniquement à partir du 18^{ème} repas). Cette espèce ajuste mieux sa glycémie malgré le gavage. Ce faible taux a déjà été observé dans une étude précédente (Gontier et al., 2013). Au contraire, alors que le canard Pékin présente une triglycéridémie plus faible en début de gavage (4^{ème} repas), celle-ci dépasse significativement celle du canard de Barbarie et du mulard dès la mi-gavage. De même, le taux de NEFA plasmatique est augmenté chez ce canard en comparaison des deux autres types génétiques à partir du 18^{ème} repas. Concernant les différences zootechniques, nous avons bien observé un impact du gavage sur la répartition tissulaire. En effet, comme précédemment décrit par Hermier et al. (Hermier et al., 2003) et Guy et al. (Guy et al., 1995), le canard de Barbarie gavé présente une adiposité périphérique plus faible (x 0,5 ; 1,83 % du poids vif en fin de gavage) associée à un développement musculaire augmenté (x 1,3 ; 6,17 % poids vif) en comparaison du canard Pékin qui démontre le plus haut rapport GSC / poids vif (3,12 %).

Ces résultats ont bien été confirmés dans notre étude avec la comparaison complémentaire du canard mulard, leur hybride, qui présente un développement intermédiaire du gras sous-cutané (x 0,8 ; 2,65 % du poids vif) et un muscle comparable à celui du canard Pékin (4,74 % et 4,76 % pour le canard Pékin). Nos résultats montrent aussi que la composition corporelle est également différente au niveau hépatique avec, pour le canard de Barbarie et le canard mulard, un poids de foie plus élevé (respectivement 429 g et 481 g, soit 6,5 % et 7,23 % du poids vif) et un pourcentage hépatique en lipides en lipides totaux plus important en fin de gavage (50,50 % et 55,70 %) en comparaison du canard Pékin (263 g soit 4,15 % du poids vif, contenant 31,84 % lipides totaux). Le canard de Barbarie présente un muscle à faible teneur en lipide totaux (4,55 %) en accord avec les observations de Chartrin et al. (Chartrin et al., 2006b), ainsi que le gras sous-cutané le moins riche en lipides totaux (74,19 % contre 83 % pour les deux autres types génétiques). Ces résultats confirment bien que le canard mulard présente le meilleur potentiel pour la production de foie gras, alors que le Pékin montre une plus grande aptitude au stockage périphérique au niveau sous-cutané associée à une plus forte exportation de lipides.

Concernant l'étude de l'expression des gènes, Hérault et al. (Hérault et al., 2010) avaient déjà démontré que le gavage stimulait l'expression de certains gènes de la lipogenèse *de novo* dans le foie, tels que FAS, SCD1 ou DGAT2, ceci 12 heures après le dernier repas de gavage. Des différences génotypiques avaient également été mises en avant dans cette étude, notamment une surexpression de DGAT2 et SCD1 chez le canard Pékin en comparaison du canard de Barbarie lorsque le prélèvement était effectué 2 à 4 heures après le repas. Enfin, l'activité de la FAS avait également été décrite comme augmentée chez le canard de Barbarie par rapport aux deux autres génotypes (Pékin et mulard) juste après le premier repas de la période de gavage (Baeza et al., 2005). Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à une analyse globale de l'expression des gènes impliqués dans les métabolismes glucidique et lipidique aussi bien dans le foie ou les tissus périphériques en associant la comparaison des trois types génétiques tout au long du gavage.

Notre étude sur le métabolisme glucidique chez les canards Pékin, Barbarie et mulard (Article 2), a démontré le traitement particulier du glucose plasmatique chez le canard Pékin dont la concentration reste faible en comparaison des deux autres types génétiques. Cette observation avait déjà été mise en évidence par Gontier et al. (Gontier et al., 2013).

Au regard de l'expression des transporteurs de glucose dans les différents tissus sur la durée du gavage, cette faible glycémie semble reliée à la surexpression des GLUT dans le muscle (*pectoralis major*) et le tissu adipeux sous-cutané. Notamment une surexpression des transporteurs GLUT3 et 8. Ce captage facilité du glucose au niveau périphérique est en accord avec les études de Saez et al. (G Saez et al., 2009) qui ont démontré une surexpression de la lipogenèse musculaire chez le Pékin.

Nous avons aussi étudié le captage intestinal, plus particulièrement au niveau du jejunum. Cette étude montre bien la présence du co-transporteur membranaire Sodium/Glucose SGLT1 et des transporteurs GLUT1, 3 et 8. Bien que nous ayons identifié une expression des GLUT2, ayant une faible affinité pour le glucose mais une grande capacité de transport, celle-ci reste très faible, voire parfois absente chez le canard mulard gavé. Pourtant, ce transporteur a déjà été clairement identifié chez le poulet (Garriga et al., 1997; Ruhnke et al., 2015). Dans nos études, cette faible expression intestinale semble compensée par l'expression du transporteur GLUT3. Ce transporteur est d'ailleurs surexprimé précocement chez le mulard comparé au canard Pékin.

Au niveau hépatique, GLUT2 apparait comme le transporteur privilégié, associé au GLUT1 en fin de gavage. Nous pouvons noter des différences intergénomiques : le canard Pékin surexprime davantage ces transporteurs en fin de gavage. Tout comme Zhang et al (Zhang et al., 2013), qui ont démontré une plus forte expression des transporteurs de GLUT1 et 2 dans le foie chez les lignées grasses de poulet comparées aux lignées maigres, le canard Pékin semble présenter une plus grande capacité de captage du glucose au niveau hépatique.

En conclusion de cette étude, lorsque l'on inclut l'effet temps, à savoir l'expression des gènes sur toute la durée du gavage, on peut noter une augmentation significative de l'expression des transporteurs de glucose en général. Le canard Pékin montre simultanément une surexpression des transporteurs de glucose au niveau jéjunal (GLUT3), hépatique (GLUT1, 2, 8), musculaire (GLUT1, 8) et adipeux (GLUT3). Alors que le canard mulard facilite davantage le captage hépatique du glucose et que le canard de Barbarie présente une absorption répartie entre les tissus périphériques et le foie (conformément à sa capacité à développer une stéatose hépatique et des muscles bien développés).

Cependant, cette étude permet peu de conclusions franches quant aux différences génotypiques de réponse au gavage et nécessite de plus amples investigations. En effet, le point de prélèvement placé 3 heures après le repas semble critique pour l'étude du métabolisme glucidique. Les gènes d'intérêt, prenant part au traitement postprandial du glucose, pourraient être exprimés plus précocement. C'est pourquoi, l'idée d'une cinétique regroupant plusieurs points de prélèvement après le repas s'est développée. Nous avons donc construit la seconde étude « DuckKinetic » dans ce but.

Concernant le métabolisme lipidique, nous avons décidé d'étudier l'ensemble des mécanismes de synthèse, sécrétion et captage périphérique et hépatique chez les trois génotypes. Des données étaient déjà disponibles dans la littérature notamment sur les mécanismes de synthèse, d'exportation et de captage périphérique des lipides. En effet, il était déjà connu que le canard Pékin bien que présentant une lipogenèse hépatique, présente également une lipogenèse musculaire accrue ainsi qu'une exportation périphérique des lipides améliorée (Chartrin et al., 2006b; Davail et al., 2003). De plus, le canard Pékin présente une activité de la LPL augmentée ainsi qu'une concentration en VLDL plasmatique plus importante le conduisant à un engraissement périphérique accru (André et al., 2007; G Saez et al., 2009). Cependant, peu de ces études se sont intéressées à évaluer la part de re-captage des lipides circulants revenant au foie, ce qui pourrait contribuer à la stéatose hépatique.

Cette étude (Article 1) s'est donc intéressée non seulement à mettre en parallèle l'ensemble des paramètres moléculaires jouant sur la balance synthèse / exportation, mais aussi et surtout, à la part de lipides revenant au foie et ce, chez les canards de Barbarie, Pékin et mulard sur toute la durée du gavage.

Nous avons alors démontré que le canard Pékin exprimait de façon plus importante les gènes de la lipogenèse comme FAS ou DGAT2, et que l'expression de DGAT2 était régulée dans de plus fortes proportions que FAS chez tous les individus gavés. Cette expression est, de plus, plus précoce dans le foie des canards de Barbarie et mulard en lien avec un pourcentage en lipides déjà augmenté dès le point 2 chez ces génotypes. Des études ont, par ailleurs, déjà démontré la forte implication de DGAT2 dans la stéatose hépatique (Cheol et al., 2007; Monetti et al., 2007). Ces observations la placent comme enzyme clé de la lipogenèse et de l'accumulation des lipides au niveau hépatique (déjà été mis en avant par Hérault et al., 2010).

Parallèlement, le canard Pékin présente les plus fortes expressions des gènes liés à la sécrétion des lipoprotéines comme ApoB ou MTTP également associées à une surexpression de CPT1A participant à un catabolisme accru des AG dans le foie de ce génotype. Ces phénomènes sont à relier à la plus faible teneur en lipides du foie observée chez le canard Pékin ainsi qu'au taux de lipides circulants augmenté observé dans notre étude et précédemment décrit par Baéza et al. (Baeza et al., 2005). Dans le muscle, l'expression des enzymes prenant part à la lipogenèse est également stimulée chez tous les individus gavés mais dans de moindres mesures que celles retrouvées dans le foie. La surexpression de FAS avait déjà été mise en avant dans le muscle des canards Pékin et Barbarie (G Saez et al., 2009). Dans le tissu adipeux, seul FABP4 est surexprimé à mi-gavage chez le canard Pékin. Ce résultat suggère une plus forte aptitude au captage des lipides circulants chez ce génotype dans ce tissu et est en adéquation avec le pourcentage de lipides observé dans le GSC plus important pour ce type génétique. De plus, ce phénomène pourrait être relié à une augmentation de l'activité de la LPL précédemment décrite (André et al., 2007).

Enfin, nous avons réussi à mettre en avant un mécanisme jusqu'alors non décrit : le recaptage hépatique des lipides circulants.

En effet, des changements ont été mis en avant chez des espèces d'oiseaux migratoires concernant les transporteurs d'AG comme les FABP ou FAT/CD36 (McFarlan et al., 2009; Weber, 2009). Nous avons donc émis l'hypothèse que ces transporteurs pourraient également prendre part au développement de la stéatose hépatique chez le canard étant, à l'origine, une espèce migratrice. De plus, FABP4 a déjà été décrit comme un transporteur d'AG prenant part au développement de désordres métaboliques tels que l'insulino-résistance ou l'obésité (Furuhashi et al., 2014).

Au cours de cette étude, nous avons donc démontré que le canard mulard présentait une forte surexpression hépatique du transporteur FABP4 (expression relative de 229,4 chez le canard mulard contre 23,40 et 9,42 chez les canards de Barbarie et Pékin, respectivement) ainsi que du récepteur aux lipoprotéines VLDLR (expression relative de 3,55 chez le canard mulard contre 1,17 et 1,62 chez les canards de Barbarie et Pékin) à la fin de la période de gavage. Cependant, cette augmentation n'est pas accompagnée d'une différence du profil d'AG du foie gras du canard mulard en comparaison des canards de Barbarie et Pékin (Tableau 14) (Chartrin et al., 2006b).

La capacité de réponse au gavage du canard mulard et donc sa capacité d'accumulation des lipides dans le foie serait donc moins le résultat d'une augmentation de la lipogenèse que celui du retour des lipides vers le foie. Ces résultats sont résumés dans la Figure 12.

Tableau 14. Effet du gavage et du génotype sur la composition hépatique en AG (% lipides totaux)

Moyenne ± SE, n=8, d'après Chartrin et al., 2006b

Fatty acids	Muscovy		Mule		Pekin		Genotype Effect	Overfeeding Effect
	Overfed	Control	Overfed	Control	Overfed	Control		
Σ SFA	43.75±1.29 ab	43.26±2.71 ab	43.31±2.28 ab	44.02±1.94 a	38.15±2.70 c	40.54±3.29 b	***	ns
Σ MUFA	54.40±1.29 b	32.57±7.46 d	55.04±2.27 b	25.53±2.79 e	59.40±2.67 a	37.94±6.30 c	***	***
Σ PUFA	1.85±0.35 e	23.45±5.73 b	1.65±0.42 f	28.94±2.07 a	2.45±1.15 d	20.17±1.67 c	***	***

*** : effet significatif à $P < 0,001$, ns : non significatif, a-f : différence significative entre les groupes pour un critère, $P < 0,05$ (Intéraction génotype et gavage). SFA / MUFA / PUFA: Saturated; mono-unsaturated et poly-unsaturated fatty acids

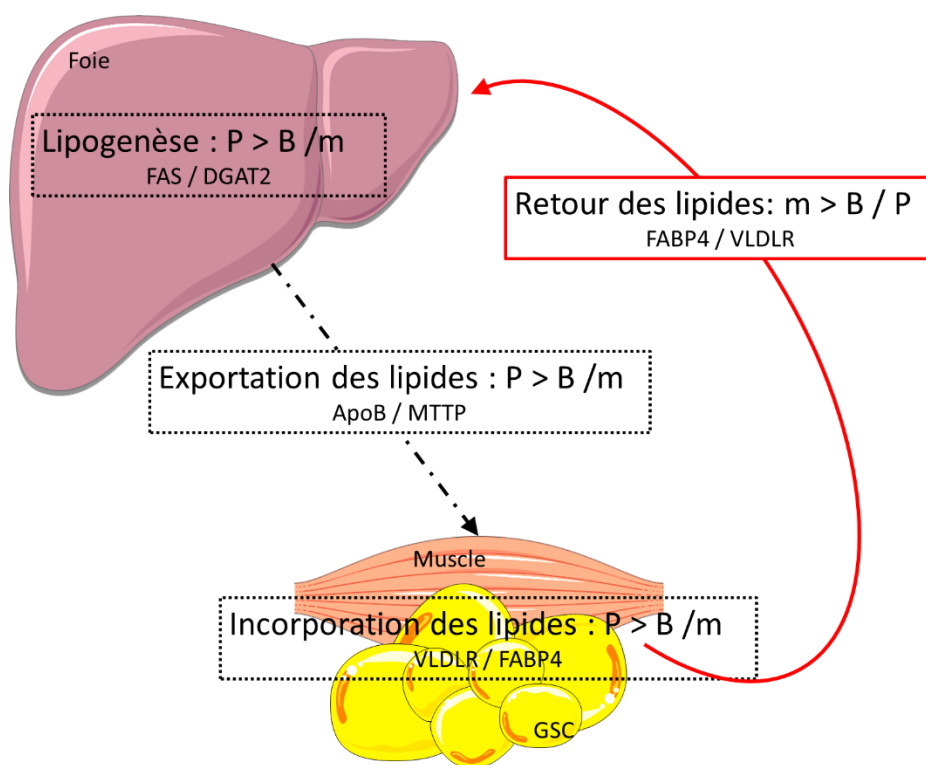


Figure 12. Effet du génotype sur les principaux gènes du métabolisme lipidique étudiés lors du gavage (P : Pékin, B : Barbarie, m : mulard)

En parallèle de ces résultats, nous avons également mis en avant la surexpression hépatique d'un facteur de transcription connu pour son implication dans l'adipogenèse ou l'accumulation des lipides : PPAR γ (Ahmadian et al., 2013; Wang et al., 2008). En effet, ce facteur de transcription pourrait être à l'origine de la surexpression de FABP4 comme Memon et al. (Memon et al., 2000) l'ont déjà démontré chez des souris déficientes en leptine et, par conséquent, obèses.

Pour conclure, cette étude a permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de la stéatose hépatique chez les trois types génétiques de palmipèdes. De plus, les observations démontrées ici peuvent être mises en parallèle avec des résultats obtenus chez l'homme développant une NAFLD comme la surexpression de FABP et VLDLR (Greco et al., 2008) et on peut alors se demander si le canard gavé pourrait être un bon modèle animal pour l'étude de cette pathologie.

Comme évoqué précédemment, nous avons rencontré des difficultés pour mettre en avant des différences de réponse au gavage entre les trois types génétiques en ce qui concerne le métabolisme glucidique. En effet, le temps de prélèvement situé 3 heures après le repas ne semble pas optimal pour l'étude de ce métabolisme. Nous avons donc décidé de construire une expérimentation en cinétique postprandiale afin d'établir le profil d'expression non seulement des gènes impliqués dans le traitement du glucose mais également dans le traitement des lipides. Cette étude ne s'est intéressée qu'au canard mulard étant le génotype le plus utilisé dans la production de foie gras et donc destiné à être le plus étudié.

Cinétique postprandiale d'expression des gènes des métabolismes glucidique et lipidique chez le canard mulard (Articles 3 et 4)

Ces deux articles rassemblent les résultats obtenus sur l'expression des gènes des métabolismes glucidique et lipidique chez le canard mulard. En effet, nous avons réalisé des prélèvements de tissus à plusieurs temps après le dernier repas de la période de gavage s'étalant jusqu'à 12 heures.

Les résultats sur le métabolisme glucidique ont tout d'abord démontré une expression rapide du transporteur SGLT1 dans le jejunum (de 20 minutes à 2 heures) suggérant une incorporation précoce du glucose issu de la digestion.

En effet, ce transporteur est connu comme étant le principal responsable de l'absorption du glucose dans l'intestin, localisé sur la membrane apicale des entérocytes au contact de la lumière intestinale (Garriga et al., 1999). Ce phénomène est, de plus, illustré par le pic de glycémie observé 1 heure après le repas. Concernant les GLUT, nous n'avons pas été en mesure de détecter la présence de GLUT2 dans le jejunum (ce qui avait déjà été observé lors de la première expérimentation), or, ce transporteur est connu pour se positionner à la membrane baso-latérale des entérocytes (Humphrey et al., 2004; Mueckler, 1994; Uldry and Thorens, 2004). Cette observation peut être expliquée par deux hypothèses. La première est que le gavage induirait un état de stress chez l'animal conduisant à la diminution d'expression de ce transporteur. En effet, il a été démontré que les situations stressantes pouvaient influencer sur l'expression des transporteurs de nutriments dans le jejunum du poulet (Li et al., 2009; Sun et al., 2014) ou encore chez le rongeur (Shepherd et al., 2004). La seconde hypothèse réside dans la composition de l'aliment de gavage, le maïs, riche en flavonoïdes (Schettler, 2003) qui ont déjà été décrit comme inhibiteurs de l'expression de GLUT2 sans pour autant influencer sur l'expression de SGLT1 (Kwon et al., 2007). Dans notre cas, l'absence de GLUT2 semble être compensée par la surexpression de GLUT1 et 3.

Dans le foie, les surexpressions de GLUT2 et de HK1 sont concomitantes (2 heures après le repas) et semblent travailler ensemble pour faciliter l'entrée du glucose. De plus, HK1 a déjà été démontrée comme augmentée dans le foie gras d'oie (Lu et al., 2015) et son expression hépatique précoce après le repas pourrait participer plus efficacement au développement de la stéatose hépatique. En ce qui concerne les tissus périphériques, les enzymes HK1 et SDHA ont des profils similaires que ce soit dans le muscle ou le GSC, cette expression est plus tardive qu'au niveau hépatique (5 heures après le repas). Cette observation a déjà été faite chez le zebrafish qui présente une surexpression de HK1 6 heures après une réalimentation (Seiliez et al., 2013).

Enfin, l'expression du facteur de transcription ChREBP a également été étudiée. Ce facteur est capable d'induire la transcription des gènes des métabolismes glucidique et lipidique sous la stimulation du glucose (Ishii et al., 2004). L'expression de ChREBP est induite à 2 heures dans le jejunum et à 40 minutes et 5 heures dans le foie. Cette observation est à mettre en lien avec la surexpression des transporteurs de glucose dans ces deux tissus qui pourrait être sous l'influence de ce facteur (Iizuka et al., 2004).

Cette étude de l'expression des gènes en cinétique postprandiale s'est poursuivie par l'étude des gènes du métabolisme lipidique en lien avec la concentration plasmatique en TG et NEFA. En effet, après le traitement du glucose par les enzymes de la glycolyse, ce dernier va principalement être stocké sous forme de lipides *via* la lipogenèse qui prend place essentiellement dans le foie chez le palmipède (Saadoun and Leclercq, 1986).

Pour commencer, nous avons démontré une forte augmentation de la concentration plasmatique des lipides (TG et NEFA) juste après le dernier repas de gavage (pics observés dans la première heure).

Cette augmentation précoce peut être surprenante et n'a pas été observée après le premier repas de gavage dans l'étude de Davail et al. (Davail et al., 2003). Les valeurs observées sont, cependant, semblables à celles obtenues par Gontier et al. 70 minutes après le dernier repas de gavage (Gontier et al., 2013). Une telle augmentation précoce des lipides circulants a déjà été observée chez des femmes ayant consommé des boissons riches en glucose (Teff et al., 2004) et pourrait être le résultat d'un défaut de clairance des TG par la LPL (Grant et al., 1994). En effet, l'activité de cette enzyme décroît au cours du gavage chez le canard mulard (André et al., 2007) ce qui conduit à la diminution de la clairance des TG. En parallèle, nous avons démontré une diminution de l'expression de LMF1 juste avant le repas dans le GSC qui pourrait expliquer ce phénomène. En effet, cette enzyme permet la maturation de la LPL et sa mutation est connue pour entraîner une hypertriglycéridémie ainsi qu'une déficience en LPL (Péterfy et al., 2007). Concernant le pic d'acides gras observé aussi près du repas, celui-ci peut être expliqué par une clairance des lipides par le tissu adipeux suite à une activation de la lipolyse à des fins énergétiques.

Cette hypothèse peut être confirmée par le pic d'expression de CPT1A, enzyme limitante de la β -oxydation (Eaton, 2002), observé dans le muscle, comme dans le foie, au même moment (environ 1 heure après le repas). Cette augmentation de la concentration en acides gras libres peut aussi être à l'origine de l'inhibition de l'activité LPL assurant alors un effet protecteur afin de limiter la formation d'acides gras libres cytotoxiques.

Concernant l'expression des gènes du métabolisme lipidique, nous avons observé une rapide surexpression de FAS dans le foie et le muscle (respectivement à 1 heure et 40 minutes après le dernier repas) mais aussi plus tardivement (7 heures après le repas). Cette expression tardive a déjà été mise en évidence chez le zebrafish 6 heures après la réalimentation (Seiliez et al., 2013).

Cependant, l'expression précoce de la FAS après un repas n'est pas retrouvée, à notre connaissance, dans la littérature. Ce phénomène peut être expliqué par un mécanisme de mémoire induisant l'expression précoce des gènes des métabolismes glucidique et lipidique.

DGAT2, enzyme ayant déjà été décrite comme enzyme clé de la lipogenèse dans notre précédente expérimentation « DuckPhy », est, ici aussi, fortement régulée dans le foie après le repas présentant de fort taux de surexpression de 2 à 9 heures après le repas. Ce résultat est à relier à la baisse des lipides circulants ainsi qu'au potentiel de DGAT2 à induire une stéatose hépatique déjà mis en avant chez des souris qui le surexprimaient (Monetti et al., 2007). Cela traduit clairement à quel point cette enzyme peut être régulée après un repas. Enfin, PPARG est surexprimé 2 heures après le repas dans le foie du canard mulard et pourrait être à l'origine de l'induction de l'expression de DGAT2.

Après avoir dénoté une énorme surexpression hépatique de FABP4 et VLDLR en fin de gavage chez le mulard (expérimentation DuckPhy, 3 heures après le repas), nous nous sommes penchés sur leur régulation postprandiale. Malheureusement aucune variation de leur expression n'a pu être observée tout au long de la période de prélèvement. Cette observation pourrait être le résultat de la surexpression déjà très forte de ces gènes en fin de gavage.

Pour conclure, cette étude est le premier rapport sur l'établissement d'un profil d'expression des gènes des métabolismes glucidique et lipidique. Globalement, l'expression des gènes du métabolisme glucidique précède celle des gènes du métabolisme lipidique. Notamment les transporteurs de glucose s'expriment très précocement dans le jejunum (<1h) avant de s'exprimer dans le foie (2h) puis dans le muscle (5h). Les gènes des enzymes du métabolisme glucidique présentent des pics concomitants ou postérieurs à ces derniers. Enfin, les gènes du métabolisme lipidique sont régulés aux mêmes temps que les gènes du métabolisme glucidique suggérant que ces deux métabolismes travaillent de concert pour faire face à la surcharge alimentaire apportée par le gavage.

Conclusions et perspectives

Les objectifs de ces travaux étaient multiples. Tout d'abord, apporter des données sur l'expression des gènes des métabolismes lipidique et glucidique et ce, dans les trois types génétiques de canard : Barbarie, Pékin et mulard. De plus, nous nous sommes particulièrement intéressées à mettre en lumière le recaptage hépatique des lipides et notamment des lipoprotéines. Enfin, le second objectif était d'établir un profil d'expression des différents gènes d'intérêt après un repas de gavage, ceci dans le but d'évaluer les mécanismes post prandiaux dans la mise en place de la stéatose. Ces résultats serviront également aux futures expérimentations afin de mieux cibler les points de prélèvement en fonction du métabolisme étudié.

De nombreuses études se sont intéressées à la comparaison des paramètres zootechniques ou encore plasmatiques des trois génotypes de canard et peu sur l'expression des gènes impliqués dans la survenue de la stéatose. Nous avons donc commencé par faire l'inventaire des variations d'expression des gènes d'intérêt dans les trois types génétiques de canard : Barbarie, Pékin et leur hybride le mulard aussi bien au niveau hépatique que périphérique.

Cette première partie a fait ressortir la surexpression des enzymes de la lipogenèse, telles que FAS et DGAT2, chez le canard Pékin, et ce, assez précocement dans la période de gavage. Au regard du poids de foie ainsi que la teneur en lipides plus importants chez les canards mulard et Barbarie, cette observation peut sembler assez surprenante et l'on pourrait penser que le canard mulard devrait présenter une lipogenèse plus régulée et plus importante que les deux autres types génétiques. Cependant, cette régulation plus importante des gènes de la lipogenèse chez le canard Pékin est associée à une surexpression de l'export et du captage des TG en périphérie. L'ensemble de ces résultats amène plusieurs questionnements. En effet, il serait intéressant d'étudier le protéome afin d'évaluer la quantité des enzymes d'intérêt chez les différents canards mais aussi d'évaluer leur activité afin de confirmer les résultats de mesures d'expressions relatives présentés. Il est vrai que des modifications post transcriptionnelles ainsi que post traductionnelles peuvent intervenir dans l'activité effective des enzymes. De plus, une autre hypothèse possible serait que les canards mulard et Barbarie surexpriment d'ores et déjà ces gènes avant la période de gavage voir pendant le prégavage. En effet, en regard du potentiel lipogénique et du pourcentage de lipides augmenté à mi-gavage, on pourrait se demander si ces enzymes ne sont pas déjà exprimées en grande quantité plus précocement que chez le canard Pékin.

Cette première partie a également fait l'objet d'un résultat marquant et jusqu'alors non démontré chez le palmipède gavé. En effet, nous avons réussi à mettre en avant la surexpression hépatique importante en fin de gavage des récepteurs aux VLDL ainsi que du transporteur d'acides gras FABP4 chez le canard mulard. Cette observation lève le voile sur le mécanisme de recaptage des lipides par le foie et place ce phénomène comme clé dans la mise en place de la stéatose chez le canard mulard. Néanmoins, là aussi, une étude sur la quantité de récepteurs ou de transporteur est nécessaire afin de confirmer l'analyse d'expression. Il serait également intéressant de regarder si ces gènes pourraient s'exprimer plus précocement chez certains individus et ainsi sélectionner des types parentaux qui fourniraient une descendance plus performante en regard de leur capacité à mieux réintégrer les lipides circulants dans le foie. Il serait également informatif de voir si des changements environnementaux facilement applicables, comme des variations de température lors de l'embryogenèse, pourraient influencer l'expression et l'activité de ces gènes afin d'influer positivement sur le développement de la stéatose hépatique. En effet, des études de programmation environnementale ont déjà mis en évidence l'impact d'un stimulus environnemental tel que la température ($\pm 1^\circ$ pendant quelques jours) sur la lipogenèse hépatique (Wang et al., 2014). De même, il serait intéressant d'étudier l'impact des acides aminés dans l'alimentation, pouvant alors jouer un rôle signal au même titre que l'insuline sur la voie de signalisation AKT/mTOR qui, une fois activée, peut participer à la régulation de nombreux processus biologiques notamment la lipogenèse.

Les hormones jouent un rôle prépondérant chez le mammifère dans la régulation de la balance énergétique. Chez l'oiseau, la présence de la leptine, hormone produite par le tissu adipeux, est encore controversée bien que son récepteur existe et témoigne de la particularité du métabolisme de ces derniers. Cependant, d'autres hormones comme l'adiponectine ou la ghréline ont déjà été retrouvées chez l'oiseau. Notre étude pourrait être complétée par une mesure de la quantité de ces hormones dans le plasma jouant un rôle dans la régulation du métabolisme énergétique et possiblement dans la différence génotypique de réponse au gavage. L'étude de l'expression des récepteurs de ces hormones pourraient être également informative. Notamment, l'expression des récepteurs à l'insuline ou à la leptine apporterait un élément sur la régulation du métabolisme lors de la mise en place de la stéatose. Une autre piste d'investigation pourrait résider dans la régulation de la balance énergétique au niveau central.

En effet, des peptides comme le NeuroPeptide Y ou la Pro-opiomélanocortine, produits par l'hypophyse, régulent la balance énergétique et il serait intéressant d'étudier leur expression centrale dans nos conditions.

Enfin, concernant le métabolisme glucidique, nous avons, pour la première fois, récolté des résultats sur l'expression des transporteurs de glucose dans le jejunum des trois types génétiques de canards. Il serait intéressant de vérifier l'immunodétection de ces transporteurs sur des coupes histologiques d'intestin, de même que l'anatomie générale de la muqueuse. En effet, des modifications morphologiques, comme l'augmentation de la hauteur des villosités, peuvent intervenir dans l'absorption des nutriments et pourraient être une nouvelle piste d'investigation des différences intergénomiques en gavage. Il serait aussi intéressant d'étudier les propriétés de transport de l'épithélium intestinal en chambre de Ussing et ainsi pouvoir détecter le flux de nutriments tel que le glucose au travers du jejunum.

La seconde partie de cette thèse s'est construite autour de la volonté d'établir un profil postprandial d'expression des gènes des métabolismes glucidique et lipidique. En effet, les expériences préliminaires ont démontré un très faible nombre de données exploitables pour le métabolisme glucidique lorsque les prélèvements étaient effectués 3 heures après le repas. Nous nous sommes donc demandé si ce phénomène n'était pas dû à un prélèvement trop éloigné de la prise alimentaire. C'est ainsi que nous avons construit la seconde expérimentation. Cette cinétique postprandiale avait deux objectifs : déterminer les moments optimaux d'expression de chaque gène d'intérêt aussi bien au niveau hépatique que périphérique mais aussi connaître les mécanismes postprandiaux à l'origine de la stéatose.

Nous avons ainsi démontré l'expression précoce des transporteurs de glucose dans le jejunum en particulier, et notamment, SGLT1 qui semble être le principal responsable de l'incorporation du glucose issu de la digestion dans la première heure suivant le repas. Les autres transporteurs de glucose étant exprimés plus tardivement dans le foie puis le muscle. Les gènes du métabolisme lipidique étaient exprimés de façon concomitante aux gènes du métabolisme glucidique. Cependant, nous n'avons pas réussi à mettre en avant des variations postprandiales dans l'expression des gènes FABP4 et VLDLR pourtant décrits dans notre première étude comme porteurs d'un mécanisme clé dans le développement de la stéatose hépatique. Ces gènes, étant déjà fortement régulés en fin de gavage, pourraient être à leur potentiel maximum d'expression.

Il serait donc intéressant de construire une nouvelle cinétique tout au long du gavage ; des prélèvements pourraient être effectués jusqu'à 12 heures après plusieurs repas durant les deux semaines de gavage.

Cette étude permettrait de cibler au mieux le point critique où les gènes commenceraient à être régulés et de mettre en avant l'adaptation au cours du temps des métabolismes glucidique et lipidique dans la mise en place de la stéatose hépatique.

Enfin, nous avons éprouvé des difficultés à mettre au point des amorces PCR efficaces et spécifiques pour les gènes SREBP1 et GK dans nos deux études. Il serait primordial de continuer nos recherches d'amorces afin de confronter leurs expressions à nos conditions expérimentales.

Pour conclure, les travaux de cette thèse contribuent à une meilleure connaissance des différences de réponse chez un animal en surcharge nutritionnelle et fournissent, entre autres, de nombreuses perspectives d'études dans la compréhension des mécanismes liés au développement de la stéatose hépatique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abbas, Anania, Ferenci, Ghafoor Khan, Goh, Hamid, Isakov, Lizarzabal, Sarin, Mojica, P., Rivera, R., Gonvers, LeMair, Stimac, Thomson, Umar, Krabshuis, 2012. Stéatose hépatique non alcoolique et stéato-hépatite non alcoolique. *World Gastroenterol. Organ. Glob. Guidel.*
- Abumrad, N., Harmon, C., Ibrahimi, A., 1998. Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *J. Lipid Res.* 39, 2309–2318.
- Ahmadian, M., Suh, J.M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A.R., Downes, M., Evans, R.M., 2013. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 19, 557–566. doi:10.1038/nm.3159
- André, J.M., Guy, G., Gontier-Lattonelle, K., Bernadet, M.D., Davail, B., Hoo-Paris, R., Davail, S., 2007. Influence of lipoprotein-lipase activity on plasma triacylglycerol concentration and lipid storage in three genotypes of ducks. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 148, 899–902. doi:10.1016/j.cbpa.2007.09.006
- Auguet, T., Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Martinez, S., Porrás, J.A., Aragón, G., Sabench, F., Hernandez, M., Aguilar, C., Sirvent, J.J., Del Castillo, D., Richart, C., 2014. Altered fatty acid metabolism-related gene expression in liver from morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 22173–22187. doi:10.3390/ijms151222173
- Augustin, R., Carayannopoulos, M.O., Dowd, L.O., Phay, J.E., Moley, J.F., Moley, K.H., 2004. Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): Alternative splicing alters trafficking. *J. Biol. Chem.* 279, 16229–16236. doi:10.1074/jbc.M312226200
- Awad, W.A., Aschenbach, J.R., Ghareeb, K., Khayal, B., Hess, C., Hess, M., 2014. *Campylobacter jejuni* influences the expression of nutrient transporter genes in the intestine of chickens. *Vet. Microbiol.* 172, 195–201. doi:10.1016/j.vetmic.2014.04.001
- Bado, a, Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Bortoluzzi, M.N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y., Lewin, M.J., 1998. The stomach is a source of leptin. *Nature* 394, 790–793.
- Baeza, E., Rideau, N., Chartrin, P., Davail, S., Mourot, J., Guy, G., Bernadet, M.D., Juin, H., Météau, K., Hermier, D., Avicoles, S.D.R., 2005. Canards de Barbarie , Pékin et leurs

hybrides : aptitude à l'engraissement.

- Banerjee, D., Redman, C.M., 1983. Biosynthesis of high density lipoprotein by chicken liver:nature of nascent intracellular high density lipoprotein. *J Cell Biol* 96, 651–660.
- Baudonnet Lenfant, C., 1993. Facteurs de variation de la composition biochimique et de la qualité technologique des foies gras de canards. *European Association for the Study of the Liver*. doi:10.1016/j.jhep.2011.08.025
- Bax, M.L., Chambon, C., Marty-Gasset, N., Remignon, H., Fernandez, X., Molette, C., 2012. Proteomic profile evolution during steatosis development in ducks. *Poult. Sci.* 91, 112–20. doi:10.3382/ps.2011-01663
- Bedu, E., Chainier, F., Sibille, B., Meister, R., Dallevet, G., Garin, D., Duchamp, C., 2002. Increased lipogenesis in isolated hepatocytes from cold-acclimated ducklings. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283, R1245–R1253. doi:10.1152/ajpregu.00681.2001
- Belo, P., Romsos, D., Leveille, G., 1976. Blood metabolites and glucose metabolism in the fed and fasted chicken. *J. Nutr.* 106, 1135–1143.
- Bensadoun, A., Rothfield, A., 1972. The Form of Absorption of Lipids in the Chicken, *Gallus domesticus*. *Proc. Soc. experimental Biol. Med.* 141, 814–817. doi:10.1016/j.domaniend.2006.06.002
- Berradi, H., Guy, G., Rideau, N., 2004. A glucokinase-like enzyme induced in Mule duck livers by overfeeding. *Poult. Sci.* 83, 161–8.
- Berradi, H., Taouis, M., Cassy, S., Rideau, N., 2005. Glucokinase in chicken (*Gallus gallus*). Partial cDNA cloning, immunodetection and activity determination. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 141, 129–139. doi:10.1016/j.cbpc.2005.02.006
- Bibert, S., Hess, S.K., Firsov, D., Thorens, B., Geering, K., Horisberger, J.-D., Bonny, O., 2009. Mouse GLUT9: evidences for a urate uniporter. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 297, F612-9. doi:10.1152/ajprenal.00139.2009
- Blum, J.C., Labie, C., Raynaud, P., 1990. Influence du poids et de la composition chimique du foie gras d'oie sur la fonte mesurée après stérilisation à 104°C. *Sci. des Aliment.* 10, 543–554. doi:10.1038/nm788

- Brown, A.M., Gibbons, G.F., 2001. Insulin inhibits the maturation phase of VLDL assembly via a phosphoinositide 3-kinase-mediated event. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1656–61. doi:10.1161/hq1001.096640
- Buyse, J., Janssen, S., Geelissen, S., Swennen, Q., Kaiya, H., Darras, V.M., Dridi, S., 2009. Ghrelin modulates fatty acid synthase and related transcription factor mRNA levels in a tissue-specific manner in neonatal broiler chicks. *Peptides* 30, 1342–1347. doi:10.1016/j.peptides.2009.04.015
- Carayannopoulos, M.O., Chi, M.M., Cui, Y., Pingsterhaus, J.M., McKnight, R.A., Mueckler, M., Devaskar, S.U., Moley, K.H., 2000. GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7313–8. doi:10.1073/pnas.97.13.7313
- Caulfield, M.J., Munroe, P.B., O'Neill, D., Witkowska, K., Charchar, F.J., Doblado, M., Evans, S., Eyheramendy, S., Onipinla, A., Howard, P., Shaw-Hawkins, S., Dobson, R.J., Wallace, C., Newhouse, S.J., Brown, M., Connell, J.M., Dominiczak, A., Farrall, M., Lathrop, G.M., Samani, N.J., Kumari, M., Marmot, M., Brunner, E., Chambers, J., Elliott, P., Kooner, J., Laan, M., Org, E., Veldre, G., Viigimaa, M., Cappuccio, F.P., Ji, C., Iacone, R., Strazzullo, P., Moley, K.H., Cheeseman, C., 2008. SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans. *PLoS Med.* 5, 1509–1523. doi:10.1371/journal.pmed.0050197
- Chartrin, P., Bernadet, M.-D., Guy, G., Mourot, J., Hocquette, J.-F., Rideau, N., Duclos, M.J., Baéza, E., 2006a. Does overfeeding enhance genotype effects on energy metabolism and lipid deposition in breast muscle of ducks? *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 145, 413–8. doi:10.1016/j.cbpa.2006.07.024
- Chartrin, P., Bernadet, M.-D., Guy, G., Mourot, J., Hocquette, J.-F., Rideau, N., Duclos, M.J., Baéza, E., 2006b. Does overfeeding enhance genotype effects on liver ability for lipogenesis and lipid secretion in ducks? *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 145, 390–6. doi:10.1016/j.cbpa.2006.07.014
- Chartrin, P., Schiavone, A., Bernadet, M.D., Guy, G., Rard, Mourot, J., Duclos, M.J., Baéza, E., 2005. Effect of genotype and overfeeding on lipid deposition in myofibres and intramuscular adipocytes of breast and thigh muscles of ducks. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 87–99. doi:10.1051/rnd:2005006

- Cheol, S.C., Savage, D.B., Kulkarni, A., Xing, X.Y., Liu, Z.X., Morino, K., Kim, S., Distefano, A., Samuel, V.T., Neschen, S., Zhang, D., Wang, A., Zhang, X.M., Kahn, M., Cline, G.W., Pandey, S.K., Geisler, J.G., Bhanot, S., Monia, B.P., Shulman, G.I., 2007. Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 282, 22678–22688. doi:10.1074/jbc.M704213200
- Chida, Y., Ohtsu, H., Takahashi, K., Sato, K., Toyomizu, M., Akiba, Y., 2000. Carbohydrate metabolism in temporal and persistent hypoglycemic chickens induced by insulin infusion. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 126, 187–193. doi:10.1016/S0742-8413(00)00111-0
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering *Nucleic Acids Res.* 16, 10881–10890.
- Coudert, E., Pascal, G., Dupont, J., Simon, J., Cailleau-Audouin, E., Crochet, S., Duclos, M.J., Tesseraud, S., Métayer-Coustard, S., 2015. Phylogenesis and biological characterization of a new glucose transporter in the chicken (*Gallus gallus*), GLUT12. *PLoS One* 10, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0139517
- Davail, S., Rideau, N., Guy, G., André, J.-M., Hermier, D., Hoo-Paris, R., 2003. Hormonal and metabolic responses to overfeeding in three genotypes of ducks. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 134, 707–715. doi:10.1016/S1095-6433(02)00365-3
- Day, C.P., James, O.F., 1998. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 114, 842–5. doi:10.1016/S0016-5085(98)70599-2
- Dentin, R., Benhamed, F., Pignatelli, J.P., Fougère, F., Viollet, B., Vaulont, S., Girard, J., Postic, C., 2005. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J. Clin. Invest.* 115, 2843–2854. doi:10.1172/JCI25256
- Doerge, H., Schürmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, A., Joost, H.G., 2000. GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J. Biol. Chem.* 275, 16275–16280. doi:10.1074/jbc.275.21.16275
- Dolnik, V.R., Blyumental, T.I., 1967. Autumnal premigratory and migratory periods in the

Références bibliographiques

- Chaffinch (*Fringilla Coelebs Coelebs*) and some other temperate-zone passerine birds. *Condor* 69, 435–468.
- Dombret, H., 1996. Utilisation des facteurs de croissance hématopoiétiques: guide pratique, John Libbey Eurotext.
- Dong, X.Y., Wang, Y.M., Yuan, C., Zou, X.T., 2012. The ontogeny of nutrient transporter and digestive enzyme gene expression in domestic pigeon (*Columba livia*) intestine and yolk sac membrane during pre- and posthatch development. *Poult. Sci.* 91, 1974–1982. doi:10.3382/ps.2012-02164
- Dunn, I.C., Boswell, T., Friedman-Einat, M., Eshdat, Y., Burt, D.W., Paton, I.R., 2000. Mapping of the leptin receptor gene (LEPR) to chicken chromosome 8. *Anim. Genet.* 31, 290.
- Eaton, S., 2002. Control of mitochondrial B-oxidation flux. *Prog. Lipid Res.* 41, 197–239. doi:10.1016/S0163-7827(01)00024-8
- Farese, R. V., Yost, T.J., Eckel, R.H., 1991. Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by Insulin/Glucose in normal-weight humans. *Metabolism* 40, 214–216.
- Farhat, A., Chavez, E.R., 2000. Comparative Performance , Blood Chemistry , and Carcass Composition of Two Lines of Pekin Ducks Reared Mixed or Separated by Sex. *Poult. Sci.* 79, 460–465.
- Farooqi, S., Jebb, S., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C., Prentice, A., Hughes, I., McCamish, M., Stephen, O., 1999. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N. Engl. J. Med.* 341, 879–884. doi:10.1016/j.jmpt.2009.12.004
- Fernandez, X., Bouillier-Oudot, M., Molette, C., Bernadet, M.D., 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, 2360–9. doi:10.3382/ps.2011-01483
- Ferrer, R., Gil, M., Moret, M., Oliveras, M., Planas, J.M., 1994. Hexose transport across the apical and basolateral membrane of enterocytes from different regions of the chicken intestine " 83–88.

- FOLCH, 1959. A rapid method of total lipid extraction. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37.
- Fon Tacer, K., Rozman, D., 2011. Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation. *J. Lipids* 2011, 783976. doi:10.1155/2011/783976
- Franceagrimer, ARVALIS, 2016. Qualité des céréales pour l'alimentation animale : maïs grain. *Qualit@lim* 35.
- Fruebis, J., Tsao, T.-S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M.R.S., Yen, F.T., Bihain, B.E., Lodish, H.F., 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Pnas* 98, 2005–2010. doi:10.1073/pnas.98.4.2005
- Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K., Miura, T., 2014. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clin. Med. Insights. Cardiol.* 8, 23–33. doi:10.4137/CMC.S17067.RECEIVED
- Furuse, M., Tachibana, T., Ohgushi, A., Ando, R., Yoshimatsu, T., Denbow, D.M., 2001. Intracerebroventricular injection of ghrelin and growth hormone releasing factor inhibits food intake in neonatal chicks. *Neurosci. Lett.* 301, 123–126. doi:10.1016/S0304-3940(01)01621-4
- Gal-garber, O., Mabjeesh, S.J., Sklan, D., Uni, Z., 2000. Nutrient-Gene Expression Partial Sequence and Expression of the Gene for and Activity of the Sodium Glucose Transporter in the Small Intestine of Fed , Starved and Refed Chickens 2174–2179.
- Garriga, C., Moreto, M., Planas, J.M., 1997. Hexose transport across the basolateral membrane of the chicken jejunum. *Am. J. Physiol.* 272, R1330-1335.
- Garriga, C., Moretó, M., Planas, J.M., 1999. Hexose transport in the apical and basolateral membranes of enterocytes in chickens adapted to high and low NaCl intakes. *J. Physiol.* 514, 189–199. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.189af.x
- Gaster, M., Handberg, A., Schürmann, A., Joost, H.G., Beck-Nielsen, H., Schrøder, H.D., 2004. GLUT11, but not GLUT8 or GLUT12, is expressed in human skeletal muscle in a fibre type-specific pattern. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 448, 105–113. doi:10.1007/s00424-003-1219-4

- Gavrilova, O., Haluzik, M., Matsusue, K., Cutson, J.J., Johnson, L., Dietz, K.R., Nicol, C.J., Vinson, C., Gonzalez, F.J., Reitman, M.L., 2003. Liver Peroxisome Proliferator-activated Receptor?? Contributes to Hepatic Steatosis, Triglyceride Clearance, and Regulation of Body Fat Mass. *J. Biol. Chem.* 278, 34268–34276. doi:10.1074/jbc.M300043200
- Gerich, J.E., Lorenzi, M., Bier, D.M., Tsalikian, E.V.A., Schneider, V., Kamu, J.H., Forsham, P.H., 1976. Effects of Physiologic Levels of Glucagon and Growth Hormone on Human Carbohydrate and Lipid Metabolism. *J. Clin. Invest.* 57, 875–884.
- Gilbert, E.R., Li, H., Emmerson, D. a, Webb, K.E., Wong, E. a, 2008. Dietary protein quality and feed restriction influence abundance of nutrient transporter mRNA in the small intestine of broiler chicks. *J. Nutr.* 138, 262–71.
- Gilbert, E.R., Li, H., Emmerson, D. a, Webb, K.E., Wong, E. a, 2007. Developmental regulation of nutrient transporter and enzyme mRNA abundance in the small intestine of broilers. *Poult. Sci.* 86, 1739–1753. doi:86/8/1739 [pii]
- Gontier, K., André, J.-M., Bernadet, M.-D., Ricaud, K., Davail, S., 2013. Insulin effect on lipogenesis and fat distribution in three genotypes of ducks during overfeeding. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 164, 499–505. doi:10.1016/j.cbpa.2012.12.019
- Gonzalez, J., Düttmann, H., Wink, M., 2009. Phylogenetic relationships based on two mitochondrial genes and hybridization patterns in Anatidae. *J. Zool.* 279, 310–318. doi:10.1111/j.1469-7998.2009.00622.x
- Goodridge, A.G., Back, D.W., Wilson, S.B., Goldman, M.J., 1986. Regulation of genes for enzymes involved in fatty acid synthesis. *Ann N Y Acad Sci* 478, 46–62.
- Grant, K.I., Marais, M.P., Dhansay, M.A., 1994. Sucrose in a lipid-rich meal amplifies the postprandial excursion of serum and lipoprotein triglyceride and cholesterol concentrations by decreasing triglyceride clearance. *Am. J. Clin. Nutr.* 59, 853–860.
- Greco, D., Kotronen, A., Westerbacka, J., Puig, O., Arkkila, P., Kiviluoto, T., Laitinen, S., Kolak, M., Fisher, R.M., Hamsten, A., Auvinen, P., Yki-ja, H., Laitinen, S., Kolak, M., Rm, F., Hamsten, A., Auvinen, P., 2008. Gene expression in human NAFLD 1281–1287. doi:10.1152/ajpgi.00074.2008.

- Griffin, H., Grant, G., Perry, M., 1982. Hydrolysis of plasma triacylglycerol-rich lipoproteins from immature and laying hens (*Gallus domesticus*) by lipoprotein lipase in vitro. *Biochem. J.* 206, 647–654.
- Gruffat, D., Durand, D., Graulet, B., Bauchart, D., 1996. Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. *Reprod. Nutr. Dev.* 36, 375–389. doi:10.1051/rnd:19960404
- Guerre-Millo, M., 1995. Les transporteurs d'hexoses. *Médecine/sciences* 11, 1111–1119.
- Guillam, M., Dupraz, P., Thorens, B., 2000. Glucose Uptake, Utilization, and Signaling in GLUT2-Null Islets. *Diabetes* 49, 1485–1491.
- Guillam, M.T., Hümmeler, E., Schaerer, E., Yeh, J.I., Birnbaum, M.J., Beermann, F., Schmidt, a, Dériaz, N., Thorens, B., Wu, J.Y., 1997. Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat. Genet.* 17, 327–30. doi:10.1038/ng1197-327
- Guo, J., Shu, G., Zhou, L., Zhu, X., Liao, W., Wang, S., Yang, J., Zhou, G., Xi, Q., Gao, P., Zhang, Y., Zhang, S., Yuan, L., Jiang, Q., 2013. Selective transport of long-chain fatty acids by FAT/CD36 in skeletal muscle of broilers. *Animal* 7, 422–429. doi:S1751731112001619 [pii]\r10.1017/S1751731112001619
- Guy, G., Bénard, G., Fernandez, X., 2014. Natural induction of spontaneous liver steatosis in Greylag Landaise geese (*Anser anser*) 1 455–464. doi:10.2527/jas2012-5492
- Guy, G., Rousselot-Pailley, D., Gourichon, D., 1995. Comparaison des performances de l'oie, du canard mulard et du canard de Barbarie soumis au gavage. *Ann. Zootech.* 44, 297–305. doi:10.1016/0003-424X(96)89755-2
- Haas, M.E., Attie, A.D., Biddinger, S.B., 2013. The regulation of ApoB metabolism by insulin. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 391–397. doi:10.1016/j.tem.2013.04.001
- Han, C., Wei, S., He, F., Liu, D., Wan, H., Liu, H., Li, L., Xu, H., Du, X., Xu, F., 2015. The Regulation of Lipid Deposition by Insulin in Goose Liver Cells Is Mediated by the PI3K-AKT-mTOR Signaling Pathway. *PLoS One* 10, e0098759. doi:10.1371/journal.pone.0098759
- Hanson, R.W., Ballard, F.J., 1967. The relative significance of acetate and glucose as precursors for lipid synthesis in liver and adipose tissue from ruminants. *Biochem. J.*

105, 529–36. doi:10.1042/bj1050529

Hashimoto, T., Cook, W.S., Qi, C., Yeldandi, A. V., Reddy, J.K., Rao, M.S., 2000. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor α -inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J. Biol. Chem.* 275, 28918–28928. doi:10.1074/jbc.M910350199

Hazelwood, R.L., Lorenz, W., 1959. Effects of fasting and insulin on carbohydrate metabolism of the domestic fowl. *Am. J. Physiol.* 197, 47–51.

He, J., Tian, Y., Li, J., Shen, J., Tao, Z., Fu, Y., Niu, D., 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, 189–95. doi:10.1007/s11033-012-2048-3

Hérault, F., Saez, G., Robert, E., Al Mohammad, a, Davail, S., Chartrin, P., Baéza, E., Diot, C., 2010. Liver gene expression in relation to hepatic steatosis and lipid secretion in two duck species. *Anim. Genet.* 41, 12–20. doi:10.1111/j.1365-2052.2009.01959.x

Hermier, D., Guy, G., Guillaumin, S., Davail, S., André, J.-M., Hoo-Paris, R., 2003. Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 135, 663–675. doi:10.1016/S1096-4959(03)00146-5

Hermier, D., Rousselot-Pailley, D., Peresson, R., Sellier, N., 1994. Influence of orotic acid and estrogen on hepatic lipid storage and secretion in the goose susceptible to liver steatosis. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 1211, 97–106. doi:10.1016/0005-2760(94)90143-0

Hermier, D., Saadounb, A., Salichonb, M., Sellierc, N., Rousselot-, D., 1991. Plasma Lipoproteins and Liver Lipids in Two Breeds of Geese with Different Susceptibility to Hepatic Steatosis : Changes Induced by Development and Force-Feeding 26, 331–339.

Hermier, D., Salichon, M., Guy, G., Peresson, R., Mourot, J., Lagarrigue, S., 1999. La stéatose hépatique des palmipèdes gavés : bases métaboliques et sensibilité génétique. *INRA Prod. Anim.* 12, 265–271.

Humphrey, B.D., Stephensen, C.B., Calvert, C.C., Klasing, K.C., 2004. Glucose and cationic amino acid transporter expression in growing chickens (*Gallus gallus domesticus*).

- Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 138, 515–25.
doi:10.1016/j.cbpb.2004.06.016
- IGP Canard à foie gras du Sud Ouest, n.d.
- Iizuka, K., Bruick, R.K., Liang, G., Horton, J.D., Uyeda, K., 2004. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7281–6. doi:10.1073/pnas.0401516101
- Ishii, S., Iizuka, K., Miller, B.C., Uyeda, K., 2004. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15597–602. doi:10.1073/pnas.0405238101
- ITAVI, 2015. Situation De La Production Et Des Marches Avicoles 2013, 1–15.
- Jéquier, E., 2002. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 967, 379–88. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04293.x
- Kabashima, T., Kawaguchi, T., Wadzinski, B.E., Uyeda, K., 2003. Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5107–5112. doi:10.1073/pnas.0730817100
- Karim, S., Adams, D.H., Lalor, P.F., 2012. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World J Gastroenterol* 18, 6771–6781. doi:10.3748/wjg.v18.i46.6771
- Katz, E.B., Stenbit, a E., Hatton, K., DePinho, R., Charron, M.J., 1995. Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature.* doi:10.1038/377151a0
- Kersten, S., Desvergne, B., Wahli, W., 2000. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405, 421–424. doi:10.1038/35013000
- Kono, T., Nishida, M., Nishiki, Y., Seki, Y., Sato, K., Akiba, Y., 2005. Characterisation of glucose transporter (GLUT) gene expression in broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 46, 510–515. doi:10.1080/00071660500181289
- Koonen, D.P.Y., Jacobs, R.L., Febbraio, M., Young, M.E., Soltys, C.L.M., Ong, H., Vance,

- D.E., Dyck, J.R.B., 2007. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes* 56, 2863–2871. doi:10.2337/db07-0907
- Koressaar, T., Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23, 1289–1291. doi:10.1093/bioinformatics/btm091
- Kotani, K., Peroni, O.D., Minokoshi, Y., Boss, O., Kahn, B.B., 2004. GLUT4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral lipid utilization. *J. Clin. Invest.* 114, 1666–1675. doi:10.1172/JCI200421341
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27, 95–125. doi:10.1016/j.mam.2005.12.007
- Kwon, O., Eck, P., Chen, S., Corpe, C.P., Lee, J.-H., Kruhlak, M., Levine, M., 2007. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J.* 21, 366–377. doi:10.1096/fj.06-6620com
- Larzul, C., Imbert, B., Bernadet, M.D., Guy, G., Remignon, H., 2006. Meat quality in an intergeneric factorial crossbreeding between muscovy (*Cairina moschata*) and Pekin (*Anas platyrhynchos*) ducks. *Anim. Res.* 55, 219–230. doi:10.1051/animres:2006010
- Le Foie Gras - Magazine officiel du Foie Gras, n.d.
- Lee, S.S., 1995. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators 15, 3012-3022 PB-.
- Léveille, G.A., Romsos, D.R., Yeh, Y.Y., O’Hea, E.K., 1975. Lipid biosynthesis in the chick. A consideration of the site of synthesis, influence of diet and possible regulatory mechanisms. *Poult. Sci.* 54, 1075–1093. doi:10.1002/jez.1402320333
- Li, Y., Cai, H.Y., Liu, G.H., Dong, X.L., Chang, W.H., Zhang, S., Zheng, a J., Chen, G.L., 2009. Effects of stress simulated by dexamethasone on jejunal glucose transport in broilers. *Poult. Sci.* 88, 330–7. doi:10.3382/ps.2008-00257
- Liu, R.Z., Li, X., Godbout, R., 2008. A novel fatty acid-binding protein (FABP) gene resulting from tandem gene duplication in mammals: transcription in rat retina and testis.

- Genomics 92, 436–445. doi:10.1016/j.ygeno.2008.08.003
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lu, L., Chen, Y., Wang, Z., Li, X., Chen, W., Tao, Z., Shen, J., Tian, Y., Wang, D., Li, G., Chen, L., Chen, F., Fang, D., Yu, L., Sun, Y., Ma, Y., Li, J., Wang, J., 2015. The goose genome sequence leads to insights into the evolution of waterfowl and susceptibility to fatty liver. *Genome Biol.* 16, 1–11. doi:10.1186/s13059-015-0652-y
- Maddineni, S., Metzger, S., Ocón, O., Hendricks, G., Ramachandran, R., 2005. Adiponectin gene is expressed in multiple tissues in the chicken: food deprivation influences adiponectin messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 146, 4250–6. doi:10.1210/en.2005-0254
- Maher, F., Vannucci, S.J., Simpson, I.A., 1994. Glucose transporter proteins in brain. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 8, 1003–11.
- Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, A.M., Bianchi, G., Bugianesi, E., McCullough, A.J., Forlani, G., Melchionda, N., 1999. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am. J. Med.* 107, 450–5. doi:10.1016/S0002-9343(99)00271-5
- McFarlan, J.T., Bonen, A., Guglielmo, C.G., 2009. Seasonal upregulation of fatty acid transporters in flight muscles of migratory white-throated sparrows (*Zonotrichia albicollis*). *J. Exp. Biol.* 212, 2934–40. doi:10.1242/jeb.031682
- McGarry, J.D., Brown, N.F., 1997. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 244, 1–14. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00001.x
- Memon, R.A., Tecott, L.H., Nonogaki, K., Beigneux, A., Moser, A.H., Grunfeld, C., Feingold, R., Feingold, K.R., 2000. Up-Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Acid Expression in the Liver in Murine Obesity: Troglitazone Induces Expression of PPAR γ -Responsive Adipose Tissue-Specific Genes in the Liver of Obese Diabetic Mice *. *Endocrinology* 141, 4021–4031. doi:10.1210/en.141.11.4021
- Ministère de l'agriculture, 2015. Après une année 2013 en léger repli, la production de foie

- gras s'est accrue en 2014. *Agriste Conjonct. Avic. -Foie gras* 272, 2013–2017.
- Monetti, M., Levin, M.C., Watt, M.J., Sajan, M.P., Marmor, S., Hubbard, B.K., Stevens, R.D., Bain, J.R., Newgard, C.B., Farese, R. V., Hevener, A.L., Farese, R. V., 2007. Dissociation of Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice Overexpressing DGAT in the Liver. *Cell Metab.* 6, 69–78. doi:10.1016/j.cmet.2007.05.005
- Morris, S.M., Winberry, L.K., Fisch, J.E., Back, D.W., Goodridge, A.G., 1984. Developmental and nutritional regulation of the messenger RNAs for fatty acid synthase, malic enzyme and albumin in the livers of embryonic and newly-hatched chicks. *Mol. Cell. Biochem.* 64, 63–68. doi:10.1007/BF00420929
- Mourot, J., Kouba, M., 1999. Development of intra- and intermuscular adipose tissue in growing Large White and Meishan pigs. *Reprod. Nutr. Dev.* 39, 125–132. doi:S0926528799800410 [pii]
- Mueckler, M., 1994. Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* 219, 713–725. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb18550.x
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Allard, W.J., Lienhard, G.E., Lodish, H.F., 1985. Sequence and Structure of a Human Glucose Transporter 1–5.
- Mueckler, M., Thorens, B., 2013. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 121–138. doi:10.1016/j.mam.2012.07.001
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* doi:10.1101/SQB.1986.051.01.032
- Nakamuta, M., Fujino, T., Yada, R., Yada, M., Yasutake, K., Yoshimoto, T., Harada, N., Higuchi, N., Kato, M., Kohjima, M., Taketomi, A., Maehara, Y., Nakashima, M., Kotoh, K., Enjoji, M., 2010. Impact of cholesterol metabolism and the LXR-·SREBP-1c pathway on nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Med.* 26, 837–843. doi:10.3892/ijmm
- Niemeyer, H., Ureta, T., Clark-Turri, L., 1975. Adaptive character of liver glucokinase. *Mol. Cell. Biochem.* 6, 109–126. doi:10.1007/BF01732005
- Nystrom, F.H., Quon, M., 1999. Insulin signalling: Metabolic pathways and mechanisms for

- specificity. *Cell. Signal.* 11, 563–574. doi:10.1016/S0898-6568(99)00025-X
- Paglialunga, S., Julien, P., Tahiri, Y., Cadelis, F., Bergeron, J., Gaudet, D., Cianflone, K., 2009. Lipoprotein lipase deficiency is associated with elevated acylation stimulating protein plasma levels. *J. Lipid Res.* 50, 1109–19. doi:10.1194/jlr.M800430-JLR200
- Parkes, H.A., Preston, E., Wilks, D., Ballesteros, M., Carpenter, L., Wood, L., Kraegen, E.W., Furler, S.M., Cooney, G.J., 2006. Overexpression of acyl-CoA synthetase-1 increases lipid deposition in hepatic (HepG2) cells and rodent liver in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E737-44. doi:10.1152/ajpendo.00112.2006
- Paulauskis, J.D., Sul, H.S., 1988. Cloning and expression of mouse fatty acid synthase and other specific mRNAs. Developmental and hormonal regulation in 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* 263, 7049–7054.
- Péterfy, M., Ben-Zeev, O., Mao, H.Z., Weissglas-Volkov, D., Aouizerat, B.E., Pullinger, C.R., Frost, P.H., Kane, J.P., Malloy, M.J., Reue, K., Pajukanta, P., Doolittle, M.H., 2007. Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat. Genet.* 39, 1483–1487. doi:10.1038/ng.2007.24
- Phay, J.E., Hussain, H.B., Moley, J.F., 2000. Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* 66, 217–20. doi:10.1006/geno.2000.6195
- Pieprzyk, M., High, H., 2009. Fluidigm Dynamic Arrays provide a platform for single- cell gene expression analysis. *Nat. Publ. Gr.* 6, iii–iv. doi:10.1038/nmeth.f.259
- Pitel, F., Faraut, T., Bruneau, G., Monget, P., 2010. Is there a leptin gene in the chicken genome? Lessons from phylogenetics, bioinformatics and genomics. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167, 1–5. doi:10.1016/j.ygcen.2009.10.006
- Poulsen, L. la C., Siersbæk, M., Mandrup, S., 2012. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 631–639. doi:10.1016/j.semcdb.2012.01.003
- Printz, R.L., Koch, S., Potter, L.R., O’Doherty, R.M., Tiesinga, J.J., Moritz, S., Granner, D.K., 1993. Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution. *J. Biol. Chem.* 268, 5209–5219.
- Raabe, M., Véniant, M.M., Sullivan, M.A., Zlot, C.H., Björkegren, J., Nielsen, L.B., Wong,

Références bibliographiques

- J.S., Hamilton, R.L., Young, S.G., 1999. Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J. Clin. Invest.* 103, 1287–98. doi:10.1172/JCI6576
- Rideau, N., 2012. Utilisation périphérique du glucose chez le poulet et le canard : implications pour la croissance et la qualité de la viande 25, 337–350.
- Roblin, X., Pofelski, J., Zarski, J., 2011. Rôle de l'homocystéine au cours de la stéatose hépatique et de l'hépatite chronique C 415–420.
- Rogers, S., Macheda, M.L., Docherty, S.E., Carty, M.D., Henderson, M.A., Soeller, W.C., Gibbs, E.M., James, D.E., Best, J.D., Macheda, M.L., Do-, S.E., Carty, M.D., Henderson, M.A., Soeller, W.C., Gibbs, E.M., James, D.E., 2002. rapid communication 733–738.
- Rogue, A., Spire, C., Brun, M., Claude, N., Guillouzo, A., 2010. Gene Expression Changes Induced by PPAR Gamma Agonists in Animal and Human Liver. *PPAR Res.* 2010, 325183. doi:10.1155/2010/325183
- Ruhnke, I., R??he, I., Goodarzi Boroojeni, F., Knorr, F., Mader, A., Hafeez, A., Zentek, J., 2015. Feed supplemented with organic acids does not affect starch digestibility, nor intestinal absorptive or secretory function in broiler chickens. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 99, 29–35. doi:10.1111/jpn.12313
- Saadoun, A., Leclercq, B., 1986. In Vivo Lipogenesis of Genetically Lean and Fat Chickens : Effects of Nutritional State and Dietary Fat. *J. Nutr.* 428–435.
- Saez, G., Baéza, E., Davail, S., Durand, D., Bauchart, D., Gruffat, D., 2009. Hepatic metabolism of glucose and linoleic acid varies in relation to susceptibility to fatty liver in ad libitum-fed Muscovy and Pekin ducks. *Br. J. Nutr.* 101, 510–7. doi:10.1017/S0007114508019892
- Saez, G., Davail, S., Gentès, G., Hocquette, J.F., Jourdan, T., Degrace, P., Baéza, E., 2009. Gene expression and protein content in relation to intramuscular fat content in Muscovy and Pekin ducks. *Poult. Sci.* 88, 2382–91. doi:10.3382/ps.2009-00208
- Salichon, M.R., Guy, G., Rousselot, D., Blum, J.C., 1994. Composition des 3 types de foie gras: oie, canard mulard et canard de Barbarie 43, 213–220.

- Salichon, Y., 1991. Elevage et gavage des palmipèdes pour la production de foie gras, Armand Col. ed.
- Saltiel, A.R., Kahn, C.R., 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799–806. doi:10.1038/414799a
- Sanches, S.C.L., Ramalho, L.N.Z., Augusto, M.J., Da Silva, D.M., Ramalho, F.S., 2015. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models. *Biomed Res. Int.* 2015. doi:10.1155/2015/574832
- Schettler, T., 2003. Corn and Corn-Derived Products: Sources of Endocrine Disruptors. *Environ. Health Perspect.* 111, 691.
- Seilliez, I., Médale, F., Aguirre, P., Larquier, M., Lanneretonne, L., Alami-Durante, H., Panserat, S., Skiba-Cassy, S., 2013. Postprandial regulation of growth- and metabolism-related factors in zebrafish. *Zebrafish* 10, 237–48. doi:10.1089/zeb.2012.0835
- Seki, Y., Sato, K., Kono, T., Abe, H., Akiba, Y., 2003. Broiler chickens (Ross strain) lack insulin-responsive glucose transporter GLUT4 and have GLUT8 cDNA. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133, 80–87. doi:10.1016/S0016-6480(03)00145-X
- Seppälä-Lindroos, A., Vehkavaara, S., Häkkinen, A.M., Goto, T., Westerbacka, J., Sovijärvi, A., Halavaara, J., Yki-Järvinen, H., 2002. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 3023–3028. doi:10.1210/jc.87.7.3023
- Sharp, P.J., Dunn, I.C., Waddington, D., Boswell, T., 2008. Chicken leptin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 158, 2–4. doi:10.1016/j.ygcen.2008.05.018
- Shepherd, E.J., Helliwell, P. a, Mace, O.J., Morgan, E.L., Patel, N., Kellett, G.L., 2004. Stress and glucocorticoid inhibit apical GLUT2-trafficking and intestinal glucose absorption in rat small intestine. *J. Physiol.* 560, 281–290. doi:10.1113/jphysiol.2004.072447
- Simon, J., Rideau, N., Taouis, M., Dupont, J., 2011. Plasma insulin levels are rather similar in chicken and rat. *Gen. Comp. Endocrinol.* 171, 267–268. doi:10.1016/j.ygcen.2011.02.025
- Siuta-Mangano, P., Janero, D.R., Lane, M.D., 1982. Association and assembly of triglyceride

- and phospholipid with glycosylated and unglycosylated apoproteins of very low density lipoprotein in the intact liver cell. *J. Biol. Chem.* 257, 11463–11467.
- Stahl, A., 2004. A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 447, 722–727. doi:10.1007/s00424-003-1106-z
- Strandholm, J.J., Cardenas, J.M., Dyson, R.D., 1943. Pyruvate Kinase Isozymes in Adult and Fetal Tissues of Chicken ?
- Stremmel, W., Strohmeyer, G., Borchard, F., Kochwa, S., Berk, P.D., 1985. Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4–8.
- Stuart, C.A., Howell, M.E.A., Zhang, Y., Yin, D., 2009. Insulin-stimulated translocation of glucose transporter (GLUT) 12 parallels that of GLUT4 in normal muscle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 3535–3542. doi:10.1210/jc.2009-0162
- Sun, X., Zhang, H., Sheikahmadi, A., Wang, Y., Jiao, H., Lin, H., Song, Z., 2014. Effects of heat stress on the gene expression of nutrient transporters in the jejunum of broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Int. J. Biometeorol.* 127–135. doi:10.1007/s00484-014-0829-1
- Sweazea, K.L., Braun, E.J., 2006. Glucose transporter expression in English sparrows (*Passer domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 144, 263–70. doi:10.1016/j.cbpb.2005.12.027
- Taouis, M., Chen, J.W., Daviaud, C., Dupont, J., Derouet, M., Simon, J., 1998. Cloning the chicken leptin gene. *Gene* 208, 239–42.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K.J., Smutko, J.S., Mays, G.G., Wool, E.A., Monroe, C.A., Tepper, R.I., 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263–1271. doi:10.1016/0092-8674(95)90151-5
- Teff, K.L., Elliott, S.S., Tschöp, M., Kieffer, T.J., Rader, D., Heiman, M., Townsend, R.R., Keim, N.L., D'Alessio, D., Havel, P.J., 2004. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in

- women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2963–2972. doi:10.1210/jc.2003-031855
- Théron, L., Bouillier-Oudot, M., Marie-Etancelin, C., Bonnefont, C., Fernandez, X., Molette, C., 2013. La fonte lipidique du foie gras à la cuisson. *Prod. Anim.* 26, 415–424.
- Theron, L., Fernandez, X., Marty-Gasset, N., Pichereaux, C., Rossignol, M., Chambon, C., Viala, D., Astruc, T., 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. doi:10.1021/jf203058x
- Thorens, B., Charron, M.J., Lodish, H.F., 1990. Molecular physiology of glucose transporters. *Diabetes Care* 13, 209–18.
- Thorens, B., Cheng, Z.-Q., Brown, D., Lodish, F.H., 1990. Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *Am. J. Physiol.* 259, C279-285.
- Thumser, A.E., Moore, J.B., Plant, N.J., 2014. Fatty acid binding proteins: tissue-specific functions in health and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 17, 124–129. doi:10.1097/MCO.0000000000000031
- Tokushima, Y., Takahashi, K., Sato, K., Akiba, Y., 2005. Glucose uptake in vivo in skeletal muscles of insulin-injected chicks. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 141, 43–48. doi:10.1016/j.cbpc.2005.01.008
- Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B.M., 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ , a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147–1156. doi:10.1016/0092-8674(94)90006-X
- Uldry, M., Thorens, B., 2004. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 447, 480–489. doi:10.1007/s00424-003-1085-0
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, 1–12. doi:10.1093/nar/gks596
- Wagstaff, P., Kang, H.Y., Mylott, D., Robbins, P.J., White, M.K., 1995. Characterization of the avian GLUT1 glucose transporter: differential regulation of GLUT1 and GLUT3 in chicken embryo fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 6, 1575–89.

- Wakil, S.J., Stoops, J.K., Joshi, V.C., 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 537–79. doi:10.1146/annurev.bi.52.070183.002541
- Wang, D., Xu, C., Wang, T., Li, H., Li, Y., Ren, J., Tian, Y., Li, Z., Jiao, Y., Kang, X., Liu, X., 2016. Discovery and functional characterization of leptin and its receptors in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 225, 1–12. doi:10.1016/j.ygcen.2015.09.003
- Wang, G., Liu, J., Xiang, S., Yan, X., Li, Q., Cui, C., Li, L., Liu, H., 2014. Influence of in ovo thermal manipulation on lipid metabolism in embryonic duck liver. *J. Therm. Biol.* 43, 40–5. doi:10.1016/j.jtherbio.2014.05.001
- Wang, H., Eckel, R.H., 2009. Lipoprotein lipase: from gene to obesity 80045. doi:10.1152/ajpendo.90920.2008.
- Wang, Y., Mu, Y., Li, H., Ding, N., Wang, Q., Wang, S., Wang, N., 2008. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Gene: A Key Regulator of Adipocyte Differentiation in Chickens. *Poult. Sci.* 87, 226–232. doi:10.3382/ps.2007-00329
- Weber, J.-M., 2009. The physiology of long-distance migration: extending the limits of endurance metabolism. *J. Exp. Biol.* 212, 593–7. doi:10.1242/jeb.015024
- Welch, K.C., Allalou, A., Sehgal, P., Cheng, J., Ashok, A., 2013. Glucose Transporter Expression in an Avian Nectarivore: The Ruby-Throated Hummingbird (*Archilochus colubris*). *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0077003
- Wren, am, Small, C., Ward, H., Murphy, K., Dakin, C., Taheri, S., Kennedy, A., Gh, R., Morgan, D., Ghatei, M., Bloom, S., 2000. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141, 4325–4328. doi:10.1210/en.2002-220612
- Wright, E.M., Turk, E., 2004. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 447, 510–518. doi:10.1007/s00424-003-1063-6
- Yan, J., Yang, H., Gan, L., Sun, C., 2014. Adiponectin-impaired adipocyte differentiation negatively regulates fat deposition in chicken. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 98, 530–537. doi:10.1111/jpn.12107
- Zhang, W., Sumners, L.H., Siegel, P.B., Cline, M. a, Gilbert, E.R., 2013. Quantity of glucose

Références bibliographiques

transporter and appetite-associated factor mRNA in various tissues after insulin injection in chickens selected for low or high body weight. *Physiol. Genomics* 1084–1094. doi:10.1152/physiolgenomics.00102.2013

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. doi:10.1038/372425a0

Zhu, L.H., Meng, H., Duan, X.J., Xu, G.Q., Zhang, J., Gong, D.Q., 2011. Gene expression profile in the liver tissue of geese after overfeeding. *Poult. Sci.* 90, 107–117. doi:10.3382/ps.2009-00616

Annexes

Liste des Annexes

Article et poster pour les Onzièmes journées de la recherche avicoles et palmipèdes à foie gras (Tours les 25 et 26 Mars 2014) :

Etude des mécanismes de régulation des captages lipidiques et glucidique hépatique et périphérique chez les palmipèdes à foie gras. **Tavernier Annabelle**, Gontier Karine, Jaglin Mathilde, Rey Mickael, Ricaud Karine, Bernadet Marie-Dominique, Davail Stéphane.

Résumés pour les réunions du « Groupe Palmipèdes » :

Étude de l'expression des gènes du métabolisme lipidique chez les palmipèdes à foie gras au cours du gavage. **Tavernier Annabelle**. 2015 (INRA Castanet Tolosan)

Mécanismes de régulation impliqués dans le captage des lipides au niveau hépatique et périphérique chez le palmipède à foie gras. **Tavernier Annabelle**, Ricaud Karine, Bernadet Marie-Dominique, Gontier Karine, Davail Stéphane. 2016 (INRA Villenave d'Ornon)

Poster présenté lors des journées de l'école doctorale 2015 :

Regulatory mechanisms involved in lipid and glucose absorption at peripheral and hepatic level in overfed waterfowl. **Tavernier Annabelle**, Gontier Karine, Davail Stéphane.

ETUDE DES MECANISMES DE REGULATION DES CAPTAGES LIPIDIQUE ET GLUCIDIQUE HEPATIQUE ET PERIPHERIQUE CHEZ LES PALMIPEDES A FOIE GRAS

Tavernier Annabelle¹ ; Gontier Karine¹ ; Jaglin Mathilde¹ ; Rey Mickael¹ ; Ricaud Karine¹ ; Bernadet Marie-Dominique² ; Davail Stéphane¹

¹IPREM EEM UMR CNRS 5254, 371 Rue du Ruisseau 40000 Mont de Marsan ; ²INRA UEFG, 1076 Route de Haut Maucq 40280 Benquet

annabelle.tavernier@univ-pau.fr

RESUME

L'objectif de notre étude est d'identifier les mécanismes de régulation du captage lipidique et glucidique, périphérique et hépatique, chez divers types génétiques de palmipèdes, à savoir deux types parentaux Pékin et Barbarie et leur hybride le mulard, soumis à deux modalités d'alimentation. Afin de répondre à l'objectif, nous avons étudié les palmipèdes en situation de gavage en comparaison avec les groupes de canards restés en alimentation *ad libitum*. La composition corporelle met en avant un effet du gavage sur le poids du foie et du muscle rapportés au poids vif chez tous les types génétiques. Cependant, le mulard se rapproche du Barbarie pour ce qui est du foie mais se rapproche du Pékin concernant le muscle. Un effet gavage et génotype sont également à observer sur la glycémie et la triglycéridémie. Enfin, l'étude de l'expression des gènes GLUT2, FAS et FABP4 démontre un effet du gavage modéré à mettre en relation avec la nécessité de poursuivre une analyse en cinétique post prandiale, mais également d'étudier d'autres gènes des métabolismes glucidique et lipidiques.

ABSTRACT

Regulatory mechanisms involved in lipids and glucose absorption at peripheral and hepatic level in overfeed palmipeds The objective of our study is to identify the regulatory mechanisms of lipid and glucose absorption at peripheral and hepatic level among various genetic types of palmipeds, namely two parental types ; Pekin and Muscovy and the hybrid mule. We have studied overfed palmipeds with groups remained *ad libitum*. Body composition shows an effect of overfeeding on the weight of liver and muscle reported on total weight for all genetic types. However, the mule is closed to the Muscovy in terms of the liver but is closed to the Pekin for muscle. An overfeeding effect and genotype effect are also observed on blood glucose and triglyceride plasma levels. Finally, the study of the expression of GLUT2, FAS and FABP4 demonstrates an effect of overfeeding. This effect need further analysis like postprandial kinetics, but also analysis of other genes of metabolism.

INTRODUCTION

Chez les palmipèdes, la stéatose hépatique (ou foie gras) est induite par surcharge alimentaire ou gavage. L'apparition du foie gras résulte d'une forte activité de lipogenèse hépatique (Saadoun et Leclercq 1986), les lipides néosynthétisés sous forme de triglycérides (TG) s'accumulent et entraînent ainsi une forte stéatose hépatique (Hermier et al., 1991). Cependant, en fonction des espèces utilisées, on observe une sensibilité métabolique différente au gavage, supposant un déterminisme génétique. En effet, le Pékin, en plus d'une lipogenèse hépatique, présente une forte exportation périphérique des lipides par rapport au Barbarie et au mulard (hybride stérile issu du croisement entre un mâle Barbarie et une femelle Pékin) qui présentent des poids de foie gras élevés (Baeza et al. 2005; Davail et al. 2003). Cette différence de performance en réponse au gavage pourrait être le résultat d'une différence de régulation de la balance synthèse/exportation des TG au niveau des tissus. Chez le Barbarie et le mulard, la majorité des TG hépatiques ne seraient pas exportés et favoriseraient la formation du foie gras (Hermier et al., 2003). Chez le Pékin, l'exportation des TG via la formation des VLDL (Very Low Density Lipoprotein) est plus active ; ainsi que l'expression de protéines de transport des acides gras (AG) telles que la A-FABP (Adipocyte Fatty Acid Binding Protein) ceci permettant un engraissement périphérique augmenté (G Saez et al., 2009). De plus, l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme catabolisant la dégradation des TG au niveau périphérique, est augmentée chez le Pékin en fin de gavage, permettant un stockage périphérique des lipides accru (André et al., 2007). Les transporteurs de glucose peuvent également jouer un rôle non négligeable dans la mise en place de la stéatose hépatique. Le maïs, principal aliment de la pâtée de gavage, va être dégradé en glucose lors de la digestion, l'internalisation de ce dernier va alors se faire via des transporteurs spécifiques localisés sur la membrane des entérocytes. Transporté vers les organes cibles, le glucose pourra être métabolisé. Une internalisation différentielle du glucose peut également être une piste quant aux différences génotypiques de réponse au gavage. Notre étude se propose donc d'étudier les taux d'expression des transporteurs de glucose et d'acides gras dans les tissus d'intérêt ainsi que l'expression d'une enzyme de la lipogenèse, la Fatty Acid Synthase (FAS).

I MATERIELS ET METHODES

Animaux

Eleveage. Six lots de 48 canards mâles Pékin (*Anas platyrhynchos*), Barbarie (*Cairina moschata*), et mulard issus du couvoir Grimaud (Roussay, France) ont été élevés dans des conditions naturelles de température et de lumière à l'unité expérimentale (UEPFG) de l'INRA Artiguères, Benquet, France. Chaque lot a été réparti en 6 loges. Tous les animaux ont été nourris avec le même régime de démarrage (EM : 2752 kcal/kg ; protéines brutes : 17,5%) et de croissance (EM : 2803kcal/kg ; protéines brutes : 15%). La moitié des lots (lots témoins) a été nourrie *ad libitum* depuis l'éclosion jusqu'à la quatorzième semaine. L'autre moitié, destinée au gavage, a été nourrie *ad libitum* de l'éclosion à la huitième semaine, puis a suivi un rationnement horaire (préparation au gavage). Le gavage (26% maïs sec grain entier, 36% farine de maïs, 38% eau), 2 repas par jour, s'est étalé sur 14 jours à partir de la douzième semaine pour les lots concernés. *Croissance.* La croissance des canards a été suivie par des pesées les 4, 6, 8, 10, 12, 13 et 14 semaines. *Prises de sang.* Des prises de sang ont été effectuées 3h après le repas les semaines 9, 10, 11 et 12. Ainsi que les jours correspondants aux 4, 12, 18 et 24^{ème} repas de gavage. *Prélèvements et abattage.* Les canards des différentes modalités ont été abattus 3H après le repas par électronarcose et exsanguination à la station expérimentale (UEPFG INRA Artiguères, Benquet, France) aux semaines 12 et 14 correspondant aux points avant (Point 1) et fin gavage (Point 3). Après dissection anatomique, le foie, le *pectoralis major* et le gras sous cutané ont été pesés puis un échantillon a été prélevé. Enfin, les muqueuses jéjunales ont été grattées et récupérées. L'ensemble des échantillons a été conservé à -80°C jusqu'à l'analyse.

Analyses

Dosages biochimiques. Les dosages plasmatiques (glycémie, triglycéridémie) ont été réalisés à l'aide de kits enzymatiques (Kit triglycérides LDB, Biodirect ; Kit Glucose RTU, Biomérieux). *Isolation des ARNs et PCR quantitative.* Les ARNs totaux ont été isolés à partir des tissus congelés suivant la méthode du TRIZOL (Invitrogen/Life technologies) et les indications du fournisseur. Après dosage au Nanovue® Plus (GE Healthcare). Les ADNc ont été synthétisés par reverse transcription en utilisant la Superscript III (Life technologies). Les ADNc ont ensuite été quantifiés au StepOne (Applied

Biosystems/Life technologies) et avec l'utilisation de primers spécifiques synthétisés par Life Technologies. Le gène de référence utilisé est le gène de l'ARN Polymérase II. Les gènes d'intérêt pour le métabolisme lipidique sont la Fatty Acid Binding Protein (FABP4) et la Fatty Acid Synthase (FAS). Pour le métabolisme glucidique, l'expression du transporteur de glucose GLUT2 dans les muqueuses jéjunales a été étudiée. L'expression des gènes a été rapportée au gène de référence par le calcul de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001). *Analyse statistique.* Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test de Tukey a été réalisée grâce au logiciel Prism (GraphPad Prism software). Les valeurs de $P < 0,05$ étaient considérées comme statistiquement significatives.

II RESULTATS ET DISCUSSION

Données zootechniques

Composition corporelle. Aucune différence significative n'a été observée entre l'entrée en gavage et le point 3 dans la composition corporelle des différents types génétiques. Les poids de foie des individus non gavés sont semblables à l'entrée en gavage quel que soit le type génétique (de 67,7 à 91,7g). Des différences significatives apparaissent au niveau de la répartition périphérique avec un poids de magret et des gras sous-cutané rapportés au poids vif plus élevé chez le Pékin comparé aux canards mulards et Barbarie. Après 2 semaines de gavage, le pourcentage de foie rapporté au poids vif a été multiplié par 4 chez les canards Barbarie et mulards, et par 3 chez le Pékin. Les mulards présentent le poids de foie le plus élevé (481,75g), suivis des Barbarie (429,74g) puis des Pékins (263,86g) (différences significatives $p \leq 0,05$). Le poids du magret reste constant sur la durée du gavage, quel que soit le type génétique, mais présente une diminution significative rapporté au poids vif. On observe un effet du gavage sur le développement du gras sous-cutané, avec une augmentation significative du poids des mulards et Pékins gavés (respectivement 177g et 198g) comparés aux individus du même âge nourris ad-libitum (99g et 137g). Seuls les Barbarie présentent un poids de gras sous-cutané constant ce qui peut être expliqué du fait de leur maturité plus tardive que celle des mulards et des Pékins. La courbe de croissance obtenue lors de cette étude (non montrée ici) montre clairement que les Barbarie poursuivent encore leur croissance alors

que les Pékins et les mulards ont atteint leur poids matures à 10 semaines et stockeraient donc davantage au lieu de transformer.

Tableau 1 – Composition corporelle des trois types génétiques.

	Pourcentage / Poids Vif	
	Point 3 Non Gavés (NG)	Point 3 Gavés (G)
Foie		
Barbarie	1,66 \pm 0,05	6,50 \pm 0,27 ^{*,a}
mulard	1,61 \pm 0,04	7,23 \pm 0,30 ^{*,c}
Pékin	1,40 \pm 0,04	4,14 \pm 0,16 ^{*,a,c}
Muscle		
Barbarie	7,33 \pm 0,09 ^a	6,17 \pm 0,09 ^{*,a,b}
mulard	7,16 \pm 0,12 ^c	4,74 \pm 0,06 ^{*,b}
Pékin	5,95 \pm 0,21 ^{a,c}	4,76 \pm 0,16 ^{*,a}
GSC		
Barbarie	1,87 \pm 0,06 ^a	1,83 \pm 0,05 ^{a,b}
mulard	2,11 \pm 0,08 ^c	2,65 \pm 0,08 ^{*,b,c}
Pékin	2,94 \pm 0,09 ^{a,c}	3,12 \pm 0,08 ^{a,c}

Effet gavage : $* < 0,05$; effet type génétique : a : Barbarie vs Pékin pour un point donné, $p < 0,05$; b : Barbarie vs mulard pour un point donné, $p < 0,05$; c : Pékin vs mulard pour un point donné, $p < 0,05$.

Dosages biochimiques

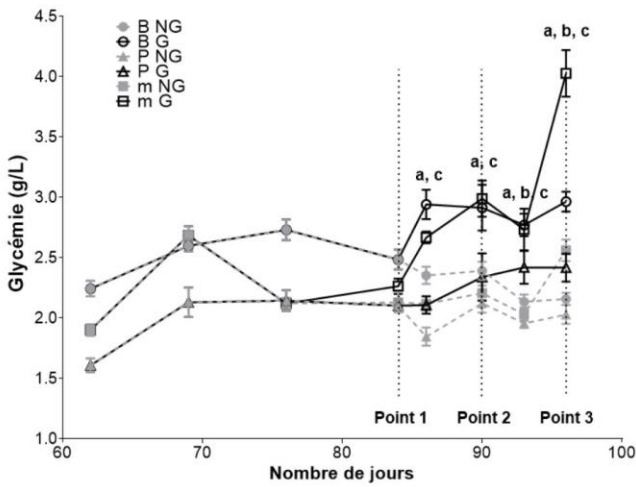
Glycémie. Les trois génotypes de canards présentent une évolution de la glycémie différente lors du gavage (figure 1). La glycémie, chez le Pékin (P) et le Barbarie (B), augmente de façon relativement constante sur toute la durée du gavage. Chez le mulard (m), la glycémie augmente fortement au dernier point. Au point 3, la glycémie est significativement différente entre les trois types génétiques ; le Pékin présentant une glycémie toujours plus faible que les deux autres types génétiques (en moyenne 3 à 3,5g/L pour le mulard et le Barbarie contre 2,3g/L chez le Pékin). On remarque un effet gavage sur la glycémie dès le 4ème repas pour le Barbarie et le mulard, le Pékin ne présentant cette différence qu'à partir du 18ème repas. Ce retard dans l'augmentation de la glycémie peut être expliqué par une différence d'expression des gènes des transporteurs de glucides méritant de plus amples investigations.

Triglycéridémie. L'effet du gavage est significatif sur la triglycéridémie avec une augmentation du taux de TG circulants sur toute la durée du gavage comparé aux individus non gavés (Figure 2).

On peut noter un effet génotype avec un taux de TG circulants significativement plus élevé à mi-gavage chez le Pékin ($p < 0,001$) ; ainsi que des valeurs distinctes pour chaque type génétique à fin gavage avec les mulards présentant un taux plus élevé suivi

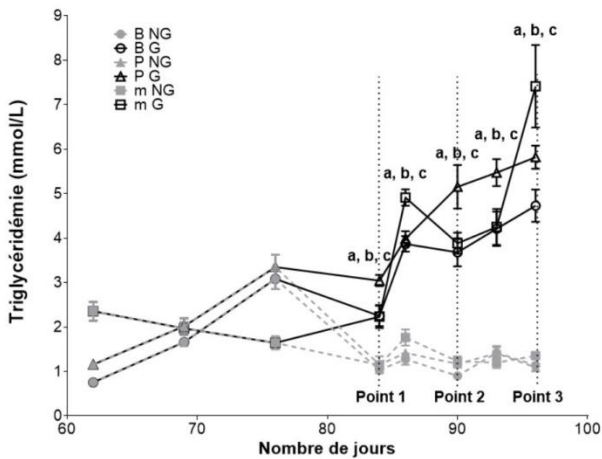
des Pékins puis des Barbarie (respectivement 7,41 ; 5,82 et 4,73mmol/L).

Figure 1- Evolution de la glycémie



Effet gavage : a : Barbarie G vs NG, $p < 0,01$; b : Pékin G vs NG, $p < 0,05$; c : mulard G vs NG, $p < 0,001$.

Figure 2- Evolution de la triglycéridémie



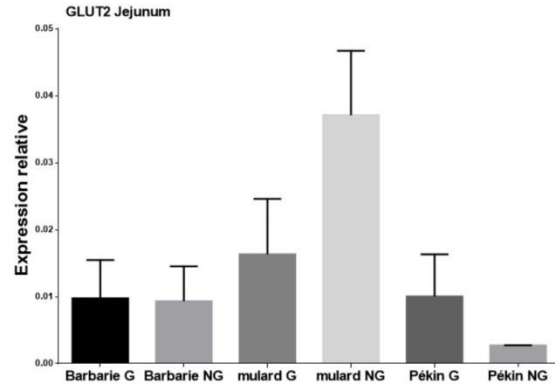
Effet gavage : a : Barbarie G vs NG, $p < 0,01$; b : Pékin G vs NG, $p < 0,001$; c : mulard G vs NG, $p < 0,05$.

Expression des gènes d'intérêt

GLUT2. Les différences d'efficacité de réponse au gavage entre les différentes espèces pourraient être expliquées par un défaut de captage du glucose au niveau intestinal après hydrolyse de l'amidon. L'expression relative quantifiée du transporteur GLUT2 (Figure 3) ne montre pas de différences significatives entre les individus gavés et non gavés, et ce, quel que soit le type génétique. Cependant, les prélèvements ayant été réalisés 3h après le repas, l'expression transitoire de GLUT2 a pu être dépassée. Il serait donc intéressant de faire une étude de cinétique en étudiant l'expression de ce transporteur à

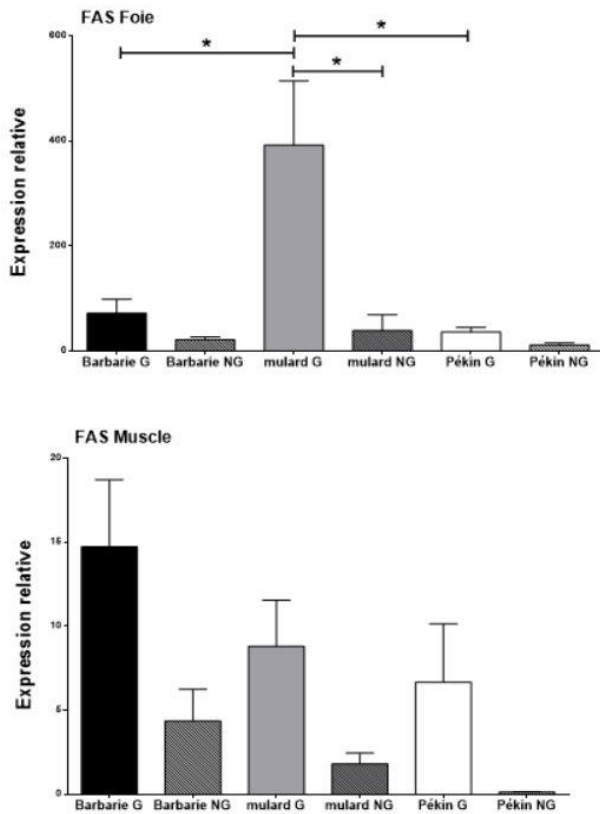
différents temps après le repas. De plus, l'étude de l'expression d'autres transporteurs de glucose (GLUT1 ou SGLT1) pourrait être envisagée. Cependant, une expression de ce transporteur est pour la première fois mise en évidence dans les muqueuses jéjunales du canard.

Figure 3- Expression relative de GLUT2



Fatty Acid Synthase. Dans la figure 4, nous pouvons observer l'expression de la FAS dans le foie et le muscle. Bien qu'il n'y ait pas de différence significative dans le muscle, nous observons une tendance à l'augmentation de l'expression du gène induite par le gavage. Nous observons que la lipogenèse reste majoritairement au niveau hépatique avec des différences significatives inter-génotype en gavage. Le mulard présentant le plus fort taux d'expression. Ces observations sont à relier avec le fort taux de triglycérides circulants au même point pour l'hybride ainsi qu'un poids de foie/poids vif important. Cependant, il conviendrait là aussi de poursuivre les analyses en déterminant par une cinétique post prandiale, le temps correspondant au pic d'expression de la FAS, puisque le Barbarie est sensé surexprimer cette enzyme (Baeza et al., 2005). **FABP4.** Le transporteur d'acide gras FABP4, apparaît exprimé dans le foie, dans l'ordre décroissant, chez le mulard, le Barbarie et enfin le Pékin ; avec une expression augmentée chez le mulard et Barbarie gavés (Figure 5A). Dans le muscle, l'expression de FABP4 est quant à elle augmentée chez le Pékin gavé en comparaison avec les deux autres types génétiques. Ce qui concorde avec les données de Saez et al. 2009. Ce transporteur apparaît surexprimé dans le GSC chez le Barbarie et dans une moindre mesure dans le GSC des mulards et Pékins (Figure 5B). Aucun effet de gavage n'est observé sur son expression.

Figure 4- Expression relative de FAS



* : p<0,05

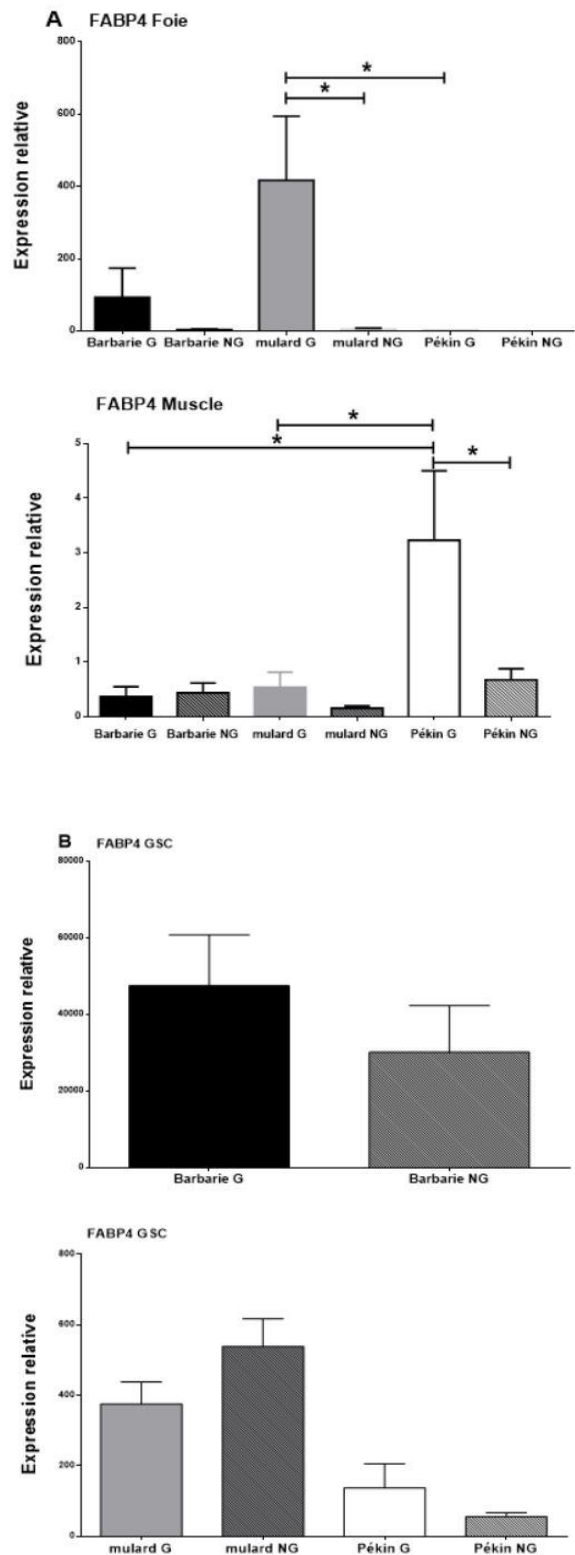
Perspectives

Des analyses complémentaires sont en cours afin de mesurer le recaptage des TG circulants par le biais des VLDL-R dans les différents tissus ainsi que le taux d'expression des GLUT dans le muscle et le foie. De plus, il est également prévu d'étudier la teneur en lipide des tissus d'intérêt par la technique de Folch. Enfin, une étude en cinétique post prandiale apparaît indispensable dans la détermination d'un point optimal pour l'expression des différents gènes d'intérêt.

Remerciements

Cette étude a reçu le soutien financier du Conseil Général des Landes et du Comité Interprofessionnel des palmipèdes à Foie Gras.

Figure 5- Expression relative de FABP



*: p < 0,05

Annexes

André, J. M. et al. 2007. "Influence of Lipoprotein-Lipase Activity on Plasma Triacylglycerol Concentration and Lipid Storage in Three Genotypes of Ducks." *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 148(4):899–902. Retrieved December 4, 2014.

Baeza, E. et al. 2005. *Canards de Barbarie, Pékin et Leurs Hybrides : Aptitude À L'Engraissement*.

Davail, Stéphane et al. 2003. "Hormonal and Metabolic Responses to Overfeeding in Three Genotypes of Ducks." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 134(4):707–15. Retrieved November 28, 2013.

Hermier, Dominique et al. 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(4):663–75. Retrieved November 28, 2013.

Hermier, Dominique, All Saadounb, Marie-rose Salichonb, Nadine Sellierc, and Daniel Rousselot-. 1991. "Plasma Lipoproteins and Liver Lipids in Two Breeds of Geese with Different Susceptibility to Hepatic Steatosis : Changes Induced by Development and Force-Feeding." 26(5):331–39.

Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods (San Diego, Calif.)* 25(4):402–8. Retrieved July 9, 2014.

Saadoun, A. L. I. 1986. "In Vivo Lipogenesis of Genetically Lean and Fat Chickens : Effects of Nutritional State and Dietary Fat." (February):428–35.

Saez, G. et al. 2009. "Gene Expression and Protein Content in Relation to Intramuscular Fat Content in Muscovy and Pekin Ducks." *Poultry science* 88(11):2382–91. Retrieved December 2, 2013.

Étude de l'expression des gènes du métabolisme lipidique chez les palmipèdes à foie gras au cours du gavage

Annabelle Tavernier ; PhD student IPREM EEM UMR CNRS 5254, IUT De Mont de Marsan

Notre objectif est d'évaluer l'expression des gènes responsables du captage lipidique périphérique et hépatique, chez divers types génétiques de palmipèdes, à savoir deux types parentaux Pékin et Barbarie et leur hybride le mulard, soumis à deux modalités d'alimentation. Il a été démontré des divergences de capacité à développer une stéatose hépatique lors du gavage chez ces trois types génétiques. En effet, bien que la lipogenèse soit essentiellement hépatique, le Pékin présente un stockage périphérique plus important que le Barbarie. Afin de répondre à l'objectif, nous avons étudié les palmipèdes en situation de gavage sur deux points d'étude : 13 (mi gavage) et 14 semaines (fin gavage) en comparaison avec les groupes de canards restés en alimentation ad libitum. Nous avons effectué des prélèvements sanguins hebdomadaires de la 9^{ème} à la 14^{ème} semaine afin d'effectuer les mesures de triglycéridémie. A l'abattage, nous avons prélevé des échantillons de foie, muscle et gras sous cutané afin de réaliser les mesures d'expression de gènes. La triglycéridémie augmente de façon significative au cours du gavage en comparaison des individus non gavés. De plus, un effet génotype est observé avec des valeurs distinctes pour chaque palmipède à fin gavage, le mulard présentant une triglycéridémie plus élevée que celle de ses parents. Concernant l'expression des gènes, on note une tendance à l'augmentation de l'expression relative de la Fatty Acid Synthase (FAS) dans le foie et le muscle chez les individus gavés, augmentation d'autant plus forte chez le Barbarie à mi gavage (Foie uniquement) et le mulard en fin gavage dans une moindre mesure. L'expression du transporteur d'acides gras FABP4 (Fatty Acid Binding Protein 4) en fin gavage est augmentée dans le foie chez le mulard et dans le muscle chez le Pékin. Ces observations concordent avec les observations de Saez et al. (2009), et vont dans le sens d'un stockage périphérique plus important chez le Pékin. A mi gavage, FABP4 est surexprimé dans le foie des Barbaries et mulards gavés, l'étude sur le muscle et le gras sous cutané est cependant encore en cours et nous permettra une comparaison plus complète avec le point 3. Concernant l'expression de FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase Cluster of Differentiation 36), aucune différence significative n'est mise en avant dans le foie des individus gavés et non gavés quel que soit le type génétique et le point ; des analyses sont encore en cours, quoiqu'il en soit une plus forte expression est à noter chez le mulard. Enfin, l'expression d'ApoB (Apolipoprotéine B) semble augmentée à mi gavage chez les Barbaries, quel que soit le régime. Cette différence est également observée à fin gavage chez les mulards. L'intérêt scientifique de ce travail permettra d'identifier les potentialités de chaque type génétique dans l'internalisation des lipides circulants afin de mieux comprendre les mécanismes liés à l'engraissement. Cependant, il pointe aussi la nécessité de poursuivre les investigations notamment dans la recherche du pic d'expression de chaque gène étudié. Pour cela, l'expérimentation en cinétique post prandiale en projet sera présentée et permettra d'étudier à quelle distance du repas chaque gène est surexprimé en comparaison d'individus non gavés. Biblio : Saez, G., Davail, S., Gentès, G., Hocquette, J. F., Jourdan, T., Degraze, P., & Baéza, E. (2009). Gene expression and protein content in relation to intramuscular fat content in Muscovy and Pekin ducks. *Poultry Science*, 88(11), 2382–91. doi:10.3382/ps.2009-00208

Mécanismes de régulation impliqués dans le captage des lipides au niveau hépatique et périphérique chez le palmipède à foie gras

Tavernier Annabelle¹ ; Ricaud Karine¹ ; Bernadet Marie-Dominique² ; Gontier Karine¹ ; Davail Stéphane¹

¹UMR 1419 INRA UPPA NuMÉA, 371 Rue du Ruisseau 40000 Mont de Marsan FRANCE;

²INRA UEFG, 1076 Route de Haut Mauco 40280 Benquet France

L'objectif de notre étude est d'identifier les mécanismes de régulation du captage lipidique périphérique et hépatique chez divers types génétiques de palmipèdes, à savoir deux types parentaux Pékin et Barbarie et leur hybride le mulard, soumis à deux modalités d'alimentation. Afin de répondre à l'objectif, nous avons étudié les palmipèdes en situation de gavage en comparaison avec des groupes de canards restés en alimentation ad libitum. Nous nous sommes principalement intéressés à l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et plus particulièrement ceux impliquant un retour des lipides au foie (transporteurs d'acides gras et récepteurs aux lipoprotéines). Nous avons démontré une surexpression des enzymes de la lipogenèse (FAS et DGAT2) dans le foie des individus gavés, DGAT2 semblant plus régulée, associée à une diminution d'expression de l'Apolipoprotéine B et de MTTP. L'expression de cette dernière étant augmentée uniquement chez le Pékin confirme l'exportation accrue des lipides hépatiques chez cette espèce à l'inverse des autres types génétiques. Dans le muscle, la lipogenèse est également augmentée quel que soit le type génétique en gavage. Concernant l'incorporation des acides gras, nous avons montré une augmentation hépatique de l'expression de FABP4 chez les trois types génétiques en fin gavage, augmentation nettement plus élevée chez le mulard suggérant un retour au foie des acides gras accru. L'étude des récepteurs aux lipoprotéines démontre une augmentation importante de l'expression pour le récepteur aux VLDL dans le foie des canards mulard gavés supposant un retour au foie plus important. Enfin, l'expression du facteur de transcription PPAR γ , connu pour augmenter le stockage hépatique des lipides, est augmentée chez tous les individus gavés. Ces résultats, pris dans leur ensemble, confirment la variabilité de réponse au gavage observée sur la zootechnie et les capacités des différents types génétiques à stocker les lipides dans le foie. L'accumulation des triglycérides dans le foie est grandement amplifiée chez le canard mulard en diminuant les acteurs de la formation des lipoprotéines, en augmentant les enzymes de la lipogenèse mais aussi, et surtout, en favorisant le retour des lipides au foie.

ETUDE DES MECANISMES DE REGULATION DES CAPTAGES LIPIDIQUE ET GLUCIDIQUE PERIPHERIQUE ET HEPATIQUE CHEZ LE PALMPEDE A FOIE GRAS

Tavernier Annabelle¹, Gontier Karine¹, Jaglin Mathilde¹, Rey Mickaël¹, Ricaud Karine¹, Bernadet Marie-Dominique², Davail Stéphane¹

¹ IPREM EEM UMR CNRS 5254, 371 Rue du Ruisseau 40000 Mont de Marsan

² INRA UEFG, 1076 Route de Haut Maucq 40280 Benquet

annabelle.tavernier@univ-pau.fr

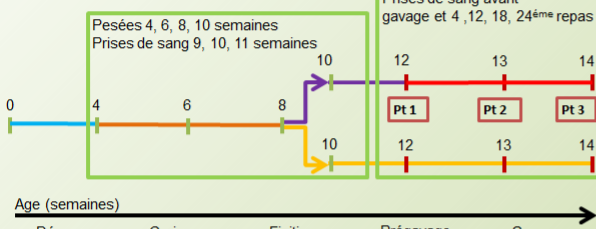
Objectifs:

Etudier en fonction du régime (gavé / ad libitum) et du type génétique (Barbarie / Pékin / mulard):

- La mise en place des profils d'expression des marqueurs moléculaires impliqués dans les métabolisme glucidique et lipidique
- La régulation de la balance synthèse/exportation/captage/recaptage des acides gras (AG), triglycérides (TG) et glucose au niveau des tissus d'intérêt
- Identification de la période de surexpression et de l'âge optimum de mise en gavage

Matériels et méthodes:

Schéma expérimental pour les trois types génétiques (6x48)



Extraction ARN totaux et quantification après RT qPCR, expression relative calculée sur ARN Polymérase II. Résultats exprimés en moyenne ± SEM. ANOVA et test de Tukey réalisés grâce au logiciel Prism. Valeurs de p<0,05 significatives.

Résultats : Zootechnie

Poids foie
Proportion du foie
→ m = B < P

Poids muscle →

Proportion du muscle
→ m = P < B

Poids GSC: P / m
B

Proportion GSC: m
B / P
→ B < m < P

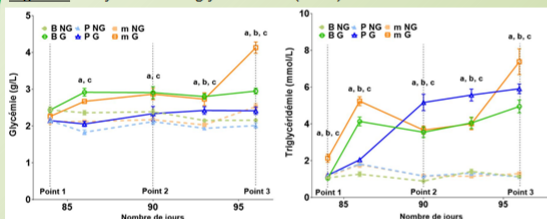
Tableau 1: Composition corporelle en fin de gavage (n=16)

	Pourcentage / poids vif	
	Non Gavés	Gavés
Foie		
Barbarie	1,66±0,05	6,50±0,27 ^a
mulard	1,61±0,04	7,23±0,30 ^{a,c}
Pékin	1,40±0,04	4,14±0,16 ^{a,c}
Muscle		
Barbarie	7,33±0,09 ^a	6,17±0,09 ^{a,b}
mulard	7,16±0,12 ^c	4,74±0,06 ^b
Pékin	5,95±0,21 ^{a,c}	4,76±0,16 ^a
GSC		
Barbarie	1,87±0,06 ^a	1,83±0,05 ^{a,b}
mulard	2,11±0,08 ^c	2,65±0,08 ^{a,b,c}
Pékin	2,94±0,09 ^{a,c}	3,12±0,08 ^{a,c}

* : effet du gavage avec P < 0,05, a-c : effet du type génétique avec p < 0,05 ; a : Barbarie vs Pékin ; b : Barbarie vs mulard ; c : Pékin vs mulard.

Résultats : Dosages biochimiques

Figure 1 : Glycémie et triglycéridémie (n=16)



effet du gavage avec p<0,05 : a : Barbarie G vs NG ; b : Pékin G vs NG ; c : mulard G vs NG.

Glycémie : - Effet gavage plus tardif chez le Pékin (18^{ème} repas)
- m > B > P au point 3

Triglycéridémie : - Augmentation significative des TG tout au long du gavage vs non gavés (NG) (p<0,05)
- Point 2 : P > m = B avec p<0,001
- Point 3 : m > P > B avec p<0,05

Conclusion et perspectives :

- Peu d'effet du gavage observé sur l'expression des gènes du métabolisme lipidique; mais effet inter-génotype marqué
- Nécessité de poursuivre l'étude d'expression en augmentant le nombre d'individus
- Etude d'expression d'autres gènes d'intérêt (VLDLR, InsR...)
- Lien entre l'expression de FAS et ApoB plus précoce chez le Barbarie (Pt2) que chez le mulard (Pt3)
- Faible expression du transporteur de glucose GLUT2 (résultats non montrés)
- Etude d'expression sur GLUT1/3/8 et SGLT1
- Etude en cinétique post-prandiale à venir

→ Etablissement d'un historique d'expression pour chaque gène dans chaque tissu sur toute la durée du gavage



Résultats : Etude d'expression des gènes du métabolisme lipidique

Tableau 2 : Effets du gavage et du génotype sur l'expression des gènes du métabolisme lipidique (n=4)

	FAS		ApoB		FAT/CD36		FABP4	
	Point 2	Point 3	Point 2	Point 3	Point 2	Point 3	Point 2	Point 3
Foie								
Barbarie	+++	+	+++	+	+	+		
mulard	+	+++	+	+++	+++	+++	TPE	↗
Pékin	+	+	+	+	+	+		
Muscle								
Barbarie			+++	+++	+++	+++		+
mulard	NS	NS	+	+	+	+	NS	+
Pékin			↗	+	+	+		+++
GSC								
Barbarie	X		Trop Peu exprimé		+++	+++	+++	+++
mulard					NS	+	NS	+
Pékin						+		+

↗ : effet du gavage avec p<0,05 ; +++/+ : Effet génotype avec surexpression représentée par +++ (p<0,05) ; NS: effet non significatif du gavage ET du type génétique ; X : non étudié ; Trop peu exprimé/TPE : gène trop peu amplifié en qPCR., Comparaisons réalisées uniquement point par point.

FAS : surexpression hépatique en point 2 chez le Barbarie et en point 3 chez le mulard à relier avec TG circulants augmentés et poids de foie/poids vif supérieur aux canards Pékin.

ApoB : surexprimé dans le foie en point 2 chez le Barbarie et en point 3 chez le mulard supposant une formation accrue de lipoprotéines, surexpression observée également dans le muscle pour le Barbarie.

Lien entre expression de la FAS et de l'ApoB en point 2 chez le Barbarie et en point 3 chez le mulard.

FAT/CD36 : surexpression dans le foie pour le mulard ; dans le muscle (Pt2) et GSC (Pt3) chez le Barbarie.

FABP4 : expression augmentée chez le canard Pékin gavé dans le muscle

REGULATORY MECHANISMS INVOLVED IN LIPID AND GLUCOSE ABSORPTION AT PERIPHERAL AND HEPATIC LEVEL IN OVERFED WATERFOWL

TAVERNIER ANNABELLE

IPREM EEM UMR CNRS 5254, 371 Rue du Ruisseau 40000 Mont de Marsan

PhD Advisers: KARINE GONTIER, STEPHANE DAVAIL

Main objectives:

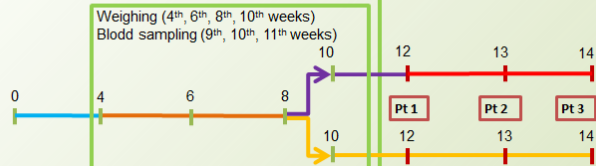
According to diet (overfed duck or not) and genetic types (Muscovy / Pekin / mule) we want to:

- Identify the different expression profile of genes involved in lipid and carbohydrate metabolisms
- Study the regulation of fatty acid and triglyceride synthesis/exportation/absorption/excretion in tissues
- Identify of the optimal period to start the overfeeding



First year experimentation:

Experimental design for the three genotypes.
Muscovy=M, Pekin=P, mule=m.
Lean=L and Fat=F.



Glycaemia and triglyceridaemia were analyzed in blood sample.
Total RNA were extracted and quantified after RT qPCR.
Relative expression was calculated on RNA polymerase II.
Data are expressed as means \pm SEM $p < 0,05$ were statistically significant.

First year results: Relative expression of gene involved in lipid metabolism
Overfeeding and genotype effects on gene expression (n=4)

	FAS		ApoB		FAT/CD36		FABP4	
	Point 2	Point 3	Point 2	Point 3	Point 2	Point 3	Point 2	Point 3
Liver								
Muscovy	+++ ↗	+	+++	+	+	+		
mule	+	+++ ↗	+	+++	+++	+++	+++	PE ↗
Pekin	+	+	+	+	+	+		

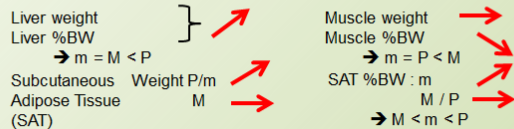
↗ : Overfeeding effect $p < 0,05$; +++/+ : Genotype effect with surexpression represented by +++ ($p < 0,05$); NS: Non significant overfeeding AND genotype effect; X : not analyzed; Poor expression/PE: low amplification in qPCR. Comparison made only point by point.

Link between FAS and ApoB expressions at point 2 in Muscovy ducks and at point 3 in mule ducks.

FAT/CD36 : overexpressed in liver for mule ducks; in muscle (Pt2) and SAT (Pt3) for the Muscovy ducks.

FABP4 : overexpressed in muscle of overfed Pekin ducks.

First year results: Carcass composition at the end of the overfeeding period (n=16)

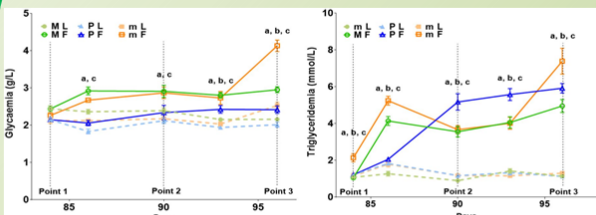


Results first year : Conclusion

- Small overfeeding effect on expression of lipid gene but marked inter genotype effect
- Increase of number of individuals and pursuit of study of expression with others gene
- Study in kinetic after meal (second year)

First year results : Biochemical assays

Glycaemia and triglyceridaemia (n=16)



Overfeeding effect $p < 0,05$: a : Muscovy F vs L ; b : Pekin F vs L ; c : mule F vs L.

Glycaemia : - Late overfeeding effect in Pekin (18th repas)
- m > B > P at point 3

Triglyceridaemia : - Significant increase of TG during overfeeding period for fat duck (F) vs lean ducks (L) ($p < 0,05$)
- Point 2 : P > m = M, $p < 0,001$
- Point 3 : m > P > M, $p < 0,05$

Second year results and activities :

- Design and validation of 32 primers for interest genes (Lipid and carbohydrate metabolisms, transcription factors and reference genes) for RT qPCR in the laboratory.

- Design of the second year experimentation : kinetic of expression of interest genes after the 24th meal of overfeeding

Experimental design for mule ducks lean (n=7) and fat (n=10).



- Reverse transcription for each tissue and modality for the second year experiment and increase of number of individuals for

- Teaching in chemistry and animal physiology in 1st and 2nd year in Biological Engineering (IUT of Mont de Marsan, 64h eq. TD)

- Responsive of tutored projects

- Coaching of student in 2nd year for his internship graduation (10 weeks).
Subject: Kinetic of the regulatory mechanisms involved in lipids and glucose metabolisms in mule duck after the last meal of overfeeding period

Third year : Outlook

- End of analysis on gene expression for the two experiments by Fluidigm, passing on the platform of Genopôle, Toulouse.
- Analysis of lipid composition in various tissues, collaboration with research team GenPhySe, Toulouse
- Classical histology collaboration with BIC, Bordeaux
- Biochemical assays on plasmas of the second experiment.
- Redaction of article and manuscript



Publication/conference:

Poster and article for JRA 2015 congress, tours

Training

- Bibliographic research
- Cambridge test : First Certificate in English
- « Doctoriales » 2014, Arantzazu



- Week of science 2013 (Exposition/demonstration with Dr. Brugirard-Ricaud)