



**HAL**  
open science

# La stéatose hépatique chez le canard mulard : étude cinétique du métabolisme intermédiaire, stress cellulaire, autophagie et nouvelle approche par les microARNs

Tracy Pioche

## ► To cite this version:

Tracy Pioche. La stéatose hépatique chez le canard mulard : étude cinétique du métabolisme intermédiaire, stress cellulaire, autophagie et nouvelle approche par les microARNs. Sciences agricoles. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2019. Français. NNT : 2019PAUU3043 . tel-02881956

**HAL Id: tel-02881956**

**<https://theses.hal.science/tel-02881956>**

Submitted on 26 Jun 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.

# THÈSE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

École doctorale 211 - SCIENCES EXACTES ET LEURS APPLICATIONS

Présentée et soutenue le 18 Décembre 2019 par

**Tracy Pioche**

pour obtenir le grade de docteur

de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour

**Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

La stéatose hépatique chez le canard mulard : étude cinétique  
du métabolisme intermédiaire, stress cellulaire, autophagie et  
nouvelle approche par les microARNs

## MEMBRES DU JURY

### RAPPORTEURS

Bertrand PAIN  
Hervé GUILLOU

Directeur de Recherche, UMRS 1208 INSERM, UCBL, INRA  
Directeur de Recherche, UMR 1331 TOXALIM INRA

### EXAMINATEURS

Fabien SKIBA  
Hervé REMIGNON

Responsable R&D Nutrition, NUTRICIA  
Professeur des Universités, UMR 1388 GenPhySE, INRA, INP-  
ENSAT, ENVT

### PRESIDENT

Jean-Marc ANDRE

UMR CNRS 5218, ENSC

### DIRECTEURS

Sandrine SKIBA-CASSY  
Karine GONTIER

Directeur de recherche, UMR 1419 INRA  
Maître de conférences, UMR 1419 INRA





## Résumé

L'objectif principal de cette thèse était de poursuivre les investigations menées sur les mécanismes sous-jacents au développement du foie gras chez le canard mulard. Ce processus appelé stéatose hépatique et induit par le gavage nécessite d'être davantage étudié afin de contribuer à l'optimisation du gavage.

Une étude cinétique de l'expression des gènes en lien avec la stéatose hépatique, le métabolisme intermédiaire et le stress cellulaire chez le canard mulard a permis de mettre en évidence, outre la forte mobilisation des métabolismes glucidique et lipidique, une induction significative de la voie de signalisation de l'insuline mTOR et l'activation de mécanismes de protection cellulaire au sein des hépatocytes leur permettant de lutter contre l'apport accru d'amidon apporté par le gavage. Parmi ces différents mécanismes protecteurs, l'autophagie a fait l'objet d'une étude poussée chez des canards gavés dont la stéatose a été à peine induite comparés à des canards non gavés. Les mesures de flux autophagique (LC3-II) ont montré que le gavage induisait une inhibition du processus autophagique dans les hépatocytes de canards mulards dès la phase précoce du développement de la stéatose hépatique. Cette même étude a permis de constater que les mécanismes associés au stress cellulaires tels que le stress oxydant, le stress du réticulum endoplasmique ou encore l'apoptose ne se sont pas induits dès le début du développement de la stéatose hépatique mais bien plus tardivement. Il en est de même pour l'impact du gavage sur la voie mTOR.

Par ailleurs, l'étude cinétique a également permis de mettre en évidence l'induction significative du métabolisme du cholestérol corrélé au gain de poids de foie des canards au cours du gavage. Ces résultats ont suscité l'intérêt de rechercher des biomarqueurs plasmatiques du développement de la stéatose hépatique en lien avec le métabolisme du cholestérol parmi les microARNs. Ainsi, le miRNome plasmatique du canard a été séquencé et a permis de définir les microARNs les plus différentiellement exprimés dans le plasma des canards mulards mais également de déceler des microARNs (miR-122, miR-107 et miR-194) candidats comme potentiels biomarqueurs utilisables pour le suivi du développement du foie gras.

L'ensemble de ces travaux contribue à l'avancée de la recherche sur la compréhension des mécanismes de l'établissement de la stéatose hépatique chez le canard mulard.

Mots clés : *stéatose hépatique, canard mulard, gavage, métabolismes, autophagie, microARNs*

## **Abstract**

The main objective of this thesis was to continue the investigations carried out on the mechanisms underlying the development of foie gras in mule ducks. This process, known as hepatic steatosis and induced by overfeeding, needs to be further studied in order to contribute to overfeeding optimization.

A kinetic study of the expression of genes related to hepatic steatosis, intermediate metabolism and cellular stress in mule ducks highlighted firstly the strong mobilization of carbohydrate and lipid metabolisms. Secondly a significant induction of the insulin / mTOR signalling pathway and the activation of various cellular protection mechanisms in hepatocytes were observed allowing them to fight against the increased intake of starch brought by the overfeeding. Among these are various protective mechanisms, autophagy has been the subject of extensive study in overfed ducks whose steatosis has been barely induced compared to non-overfed ducks. Autophagic flux measurements (LC3-II) showed that overfeeding induced inhibition of the autophagic process in mule ducks' hepatocytes from the early stage of hepatic steatosis. This same study found that the mechanisms associated with cellular stress such as oxidative stress, endoplasmic reticulum stress or apoptosis did not occur early in the development of hepatic steatosis but much later. The same is true for the impact of overfeeding on mTOR signalling pathway.

In addition, the kinetic study also revealed the significant induction of cholesterol metabolism correlated with the liver weight gain of ducks during overfeeding. These results aroused the interest of investigating plasma biomarkers for the development of hepatic steatosis related to cholesterol metabolism among microRNAs. Thus, duck's plasmatic miRNome was sequenced and it allowed to define the most differentially expressed microRNAs in the plasma of mule ducks but also to detect microRNAs (miR-122, miR-107 and mi-R194) as potential biomarkers that could be used for monitoring the development of fatty liver.

All of this work contributes to the advancement of research on understanding the mechanisms of establishment of hepatic steatosis in mule ducks.

*Key words: hepatic steatosis, mule duck, overfeeding, metabolism, autophagy, microRNAs*

# Sommaire

Travaux issus de la thèse.....	7
Abréviations.....	9
Figures.....	13
Tableaux.....	15
Introduction générale.....	16
Etude bibliographique.....	20
1. Modèle d'étude : le canard mulard .....	22
2. Le gavage .....	23
3. Le métabolisme des oiseaux .....	25
3.1 Métabolisme glucidique .....	27
3.1.1 Digestion, absorption du glucose .....	27
3.1.2 Utilisation du glucose.....	27
3.2 Métabolisme lipidique .....	30
3.2.1 Lipogenèse de novo.....	30
3.2.2 Devenir des acides gras néo-synthétisés .....	32
3.2.3 Transport et exportation .....	32
3.2.4 Captage.....	34
3.2.5 La $\beta$ -oxydation .....	36
3.2.6 Métabolisme du cholestérol .....	37
3.3 Régulation des métabolismes intermédiaires.....	40
3.3.1 L'insuline .....	40
3.3.2 La protéine Akt.....	43
3.3.3 La voie TOR et ses effecteurs .....	45
3.3.4 Les acides aminés.....	47
4. La stéatose hépatique .....	50
4.1 Chez les mammifères.....	50
4.2 Chez les palmipèdes .....	52
5. Le foie gras .....	54
5.1 Caractéristiques et qualités .....	54
5.2 Composition structurale.....	55
5.3 Composition biochimique.....	56
5.4 Paramètres plasmatiques.....	56

6.	Quelques mécanismes de protection cellulaires.....	58
6.1	Le stress oxydant .....	58
6.2	Autophagie.....	59
6.3	Stress du réticulum endoplasmique .....	67
6.4	Apoptose .....	70
7.	Micro-ARNs .....	72
7.1	Définition.....	72
7.2	Gènes codant les miARNs .....	73
7.3	Biosynthèse des miARNs .....	74
7.4	miARNs circulants .....	76
7.5	Rôles dans la régulation post-transcriptionnelle.....	78
7.6	miARNs : biomarqueurs et rôle thérapeutique .....	82
7.7	Les miARNs chez le canard .....	85
	Matériels et méthodes.....	86
1.	Conditions d'élevage .....	87
2.	Gavage et effectifs .....	88
3.	Abattage des canards et prélèvements .....	91
4.	Tests de pasteurisation .....	91
5.	Analyses biochimiques .....	91
6.	Biologie moléculaire .....	92
6.1	Extraction des ARN totaux tissulaires .....	92
6.2	Extraction des ARN totaux plasmatiques .....	92
6.3	Transcription inverse .....	93
6.4	Conception et validation des amorces .....	95
6.5	qPCR : méthode Fluidigm .....	97
6.6	qPCR : méthode SyBr Green.....	97
6.7	RT-qPCR : méthode TaqMan (FRET) .....	100
6.8	Analyses protéiques : Western blot .....	100
7.	Analyse et traitements statistiques des résultats .....	102
	Résultats.....	104
	Expérimentation 1 .....	105
	Article 1 : EXP1 cinétique.....	107
	Article 2 : EXP1 microARNs.....	143
	Expérimentation 2.....	173

Article 3 : EXP2 chloroquine/rapamycine.....	175
Résultats complémentaires.....	201
Discussion générale .....	202
Conclusions et perspectives.....	213
Références bibliographiques.....	217
Annexes.....	237



## Travaux issus de la thèse

✚ Publications dans des journaux à comité de lecture :

Article 1

**Tracy Pioche**, Fabien Skiba, Marie-Dominique Bernadet, Iban Seiliez, William Massimino, Marianne Houssier, Annabelle Tavernier, Karine Ricaud, Stéphane Davail, Sandrine Skiba-Cassy, Karine Gontier. *Kinetic study of the expression of genes related to hepatic steatosis, glucose and lipid metabolism and cellular stress during overfeeding in mule ducks*. American Journal of physiology (en révision mineure)

Article 2

**Tracy Pioche**, Marie Laval, Fabien Skiba, Marie-Dominique Bernadet, William Massimino, Marianne Houssier, Annabelle Tavernier, Karine Ricaud, Stéphane Davail, Sandrine Skiba-Cassy, Karine Gontier. *Kinetic analysis of miRNAs in overfed mule ducks: research of potential biomarkers of hepatic steatosis development* (en preparation)

Article 3

**Tracy Pioche**, Fabien Skiba, Marie-Dominique Bernadet, Iban Seiliez, William Massimino, Marianne Houssier, Annabelle Tavernier, Karine Ricaud, Sandra Biasutti Stéphane Davail, Sandrine Skiba-Cassy, Karine Gontier. *Autophagic mechanisms and involvement of mTOR pathways in the first steps of hepatic steatosis development in mule ducks* (en preparation)

✚ Communication orale lors de congrès :

**Tracy Pioche**, Fabien Skiba, Marie-Dominique Bernadet, William Massimino, Marianne Houssier, Karine Ricaud, Stéphane Davail, Sandrine Skiba-Cassy, Karine Gontier. *Recherche de biomarqueurs de l'établissement de la stéatose hépatique chez le canard mulard : étude cinétique de l'expression de gènes en lien avec le métabolisme du cholestérol et l'autophagie* Treizièmes journées de la recherche avicole (2014), Tours, France.

 Posters :

**Tracy Pioche**, Fabien Skiba, Marie-Dominique Bernadet Sandrine Skiba-Cassy, Karine Gontier. *Interest of amino acids to stimulate hepatic steatosis in mule ducks*. Journées de l'école doctorale 211 (2019), Pau, France.

**Tracy Pioche**, Fabien Skiba, Marie-Dominique Bernadet Sandrine Skiba-Cassy, Karine Gontier. *Interest in food proteins to stimulate the synthesis of foie gras in overfed mule ducks* Doctoriales (2017), Arantzazu, Espagne.

## Abréviations

<b>4EBP1</b>	Eucaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1
<b>6PF1K</b>	6-Phosphofructose-1-Kinase
<b>AA</b>	Acides Aminés
<b>AARE</b>	Amino Acids Response Element
<b>ACAD</b>	Acyl-CoA Déshydrogénase
<b>ACC</b>	Acetyl CoA Carboxylase
<b>ACLY</b>	ATP Citrate Lyase
<b>ADP</b>	Adénosine Di-Phosphate
<b>AG</b>	Acides Gras
<b>AGMI</b>	Acides Gras Monoinsaturés
<b>AGPAT</b>	Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransférase
<b>AKT</b>	Protéine Kinase B (PKB)
<b>AMPK</b>	cAMP activated protein kinase
<b>APAF-1</b>	Apoptotic Peptide Activating Factor-1
<b>Apo</b>	Apolipoprotéine
<b>Argo</b>	Argonaute
<b>ATF4</b>	Activating Transcription Factor 4
<b>ATF6</b>	Activating Transcription Factor 6
<b>ATP</b>	Adénosine Tri-Phosphate
<b>Bcl</b>	Beclin
<b>CACT</b>	Carnitine Acyl-Carnitine Translocase
<b>Casp</b>	Caspase
<b>CD95</b>	Cluster of Differentiation 95
<b>CHOP</b>	C/EBP Homologous Protein
<b>CMA</b>	Chaperone Mediated Autohagy
<b>CoA</b>	Coenzyme A
<b>CPT1</b>	Carnitine Palmitoyl Transferase 1
<b>CPT2</b>	Carnitine Palmitoyl Transferase 2
<b>CYP51</b>	Lanostérol 14 $\alpha$ -déméthylase
<b>DGAT2</b>	DiacylGlycérol O-Acyl Transférase 2
<b>DGCR8</b>	DiGeorge syndrome critical region-8

<b>DHCR7</b>	7- Désydrocholestérol reductase
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	Eukaryotic translation Initiation Factor 2, subunit $\alpha$
<b>eIF4</b>	Eukaryotic translation Initiation Factor 4
<b>ELOVL6</b>	Fatty Acyl-CoA Elongase
<b>ERAD</b>	ER-Associated Degradation
<b>FAPB</b>	Fatty Acid Binding Protein
<b>FAS</b>	Fatty Acid Synthase
<b>FAT/CD36</b>	Fatty Acid Translocase homologue de l'antigène CD36
<b>FOX</b>	Forkhead
<b>G6P</b>	Glucose-6-Phosphate
<b>GCN2</b>	General Control Non-repressible 2
<b>GK</b>	Glucokinase
<b>GLUT</b>	Glucose Transporter
<b>GPAT</b>	Glycérol-3-Phosphate Acyl Transférase
<b>GSK3</b>	Glycogen Synthase Kinase 3
<b>HK</b>	Hexokinase
<b>HMG</b>	$\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Méthylglutaryl
<b>HMGCS</b>	HMG CoA synthase
<b>HMGCR</b>	HMC CoA reductase
<b>HNF6</b>	Hepatocyte Nuclear Factor 6
<b>HPO</b>	Hydrogène Phosphate
<b>Hsc70</b>	Heat Shock Cognate protein of 70 KDa
<b>HSPG</b>	Héparane Sulfate Protéoglycanes
<b>IGF1</b>	Insulin-like Growth Factor 1
<b>IGP</b>	Indication Géographique Protégée
<b>INRA</b>	Institut National de Recherche Agronomique
<b>InsR</b>	Insulin Receptor
<b>IRE1</b>	Inositol-Requiring Enzyme 1
<b>IRS</b>	Insulin Receptor Substrate
<b>KFERQ</b>	K:lysine, F : phénylalanine, E: acide glutamique, R: arginine, Q: glutamine
<b>Lamp2A</b>	Lysosomal-Associated Membrane Protein
<b>LPL</b>	Lipoprotéine lipase

<b>LC3</b>	Microtubule-associated protein light chain 3
<b>LXR</b>	Liver X Receptor
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MS</b>	Matière sèche
<b>miRs</b>	microARNs ou miARNs
<b>mTOR</b>	mammalian Target of Rapamycin
<b>MTTP</b>	Protéine Microsomale de Transfert des TG
<b>NAD</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
<b>NAFLD</b>	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
<b>NASH</b>	Non-Alcoholic Steatohepatitis
<b>BP</b>	brut protein (PB: protéines brutes)
<b>PERK</b>	Pancreatic ER Kinase (PKR)-like ER Kinase
<b>PDH</b>	Pyruvate déshydrogénase
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3 Kinase
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol-3-Phosphate
<b>PK</b>	Pyruvate kinase
<b>PL</b>	Phospholipides
<b>PLIN</b>	Perilipin
<b>Pol II</b>	Polymérase II
<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>RISC</b>	RNA-induced silencing complex
<b>S6K1</b>	p70 ribosomal S6 kinase 1
<b>Ser</b>	Sérine
<b>SCD1</b>	Stéaroyl CoA Désaturase 1
<b>SLGT1</b>	Sodium Glucose Like Transporter 1
<b>SREBP1c</b>	Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c
<b>TG</b>	Triglycérides
<b>Thr</b>	Thréonine
<b>TNFR1</b>	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
<b>TRAILR</b>	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor
<b>TSC</b>	Tuberous Sclerosis Complex

<b>TOR</b>	Target of Rapamycin
<b>TORC</b>	Target of Rapamycin Complex
<b>UNG</b>	Uracil DNA Glucosidase
<b>uORF</b>	Upstream Open Reading Frame
<b>UPR</b>	Unfolded Protein Response
<b>UTR</b>	Untranslated Transcribed Region
<b>VLDL</b>	Very Low Density Lipoprotein
<b>XBP1</b>	X Box-Binding Protein 1

## Figures

<b>Figure 1</b>	Le canard mulard.....	21
<b>Figure 2</b>	Comparaison courbes de gavage de trois types génétiques Barbarie, Pékin et mulard.....	23
<b>Figure 3</b>	Voie de dégradation du glucose : la glycolyse.....	28
<b>Figure 4</b>	Le cycle de Krebs.....	31
<b>Figure 5</b>	Métabolisme glucidique et lipidique.....	33
<b>Figure 6</b>	Devenir des acides gras et $\beta$ -oxydation.....	35
<b>Figure 7</b>	Formation des lipoprotéines pour le transport des acides gras vers les tissus périphériques. ....	35
<b>Figure 8</b>	Schéma simplifié de la synthèse du cholestérol. ....	39
<b>Figure 9</b>	La régulation du métabolisme par l'insuline.....	42
<b>Figure 10</b>	Voies de signalisation de l'insuline et des acides aminés.....	44
<b>Figure 11</b>	Les acides aminés : origine et devenir.....	47
<b>Figure 12</b>	Voie de réponse au déficit en acide aminé.....	49
<b>Figure 13</b>	Spectre de la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD).....	51
<b>Figure 14</b>	La stéatose hépatique induite par le gavage.....	53
<b>Figure 15</b>	Coupe histologiques de foie de canard.....	55
<b>Figure 16</b>	Evolution de la composition chimique du foie au cours du gavage de canards de Barbarie.....	57
<b>Figure 17</b>	Les différentes formes d'autophagie chez les mammifères.....	61
<b>Figure 18</b>	Les différentes étapes de la macroautophagie.....	62
<b>Figure 19</b>	Lipolyse des gouttelettes lipidiques.....	64
<b>Figure 20</b>	Les différentes voies de signalisation impliquées dans le stress du réticulum endoplasmique.....	69

<b>Figure 21</b>	L'apoptose et ses voies de signalisations.....	71
<b>Figure 22</b>	Localisation génomique des miARNs.....	73
<b>Figure 23</b>	Régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes par les miARNs.....	75
<b>Figure 24</b>	Relation entre miARNs circulants et miARNs sécrétés.....	77
<b>Figure 25</b>	Courbe de gavage des canards mulards ( <i>EXP1</i> et <i>EXP2</i> ).....	88
<b>Figure 26</b>	Protocole expérimental de l' <i>EXP1</i> cinétique et <i>microARNs</i> .....	89
<b>Figure 27</b>	Protocole expérimental <i>EXP2 rapamycine</i> .....	90
<b>Figure 28</b>	Protocole expérimental <i>EXP2 chloroquine</i> .....	90
<b>Figure 29</b>	Plaque d'analyse avec la technologie Fluidigm BioMark.....	98
<b>Figure 30</b>	Transcription inverse par méthode TaqMan Advanced MicroRNA Assays ( <i>EXP1 microARNs</i> ).....	101



## Tableaux

<b>Tableau 1</b>	Différentes classes de GLUT chez les Mammifères. ....	26
<b>Tableau 2</b>	Effet du gavage sur les lipides circulants (mmol/L), l'insulinémie ( $\mu$ U/mL) et la glycémie (g/L) des canards mulard, plus de 12 heures après leur dernier repas.....	58
<b>Tableau 3</b>	Caractérisation des miARNs présents dans 12 fluides biologiques. ....	79
<b>Tableau 4</b>	Liste non exhaustive des miARNs présents dans les différents tissus. ....	81
<b>Tableau 5</b>	Liste des miARNs qui régulent le métabolisme des lipides et des lipoprotéines.....	83
<b>Tableau 6</b>	Composition des mix pour la rétrotranscription des ARN totaux en ADNc (EXP1). ....	94
<b>Tableau 7</b>	Composition des mix pour la rétrotranscription des ARN totaux en ADNc (EXP2). ....	94
<b>Tableau 8</b>	Séquences des primers validés. ....	96
<b>Tableau 9</b>	Mix réactionnels des étapes de pré-amplification et d'exonucléase. ....	99
<b>Tableau 10</b>	Mix réactionnel de l'étape de qPCR, plaque « sample inlets ». ....	99
<b>Tableau 11</b>	Programme amplification BioMark. ....	99
<b>Tableau 12</b>	Mix réactionnels pour RT-qPCR TaqMan. ....	103
<b>Tableau 13</b>	Liste des anticorps utilisés. ....	103



# **Introduction générale**

Le foie gras, mets d'exception et produit de luxe, fait partie des spécificités culinaires françaises. Jugé comme produit incontournable des fêtes de fin d'années par les français, ce produit est fortement valorisé de par ses qualités organoleptiques. Il est d'ailleurs inscrit au patrimoine culturel et gastronomique français depuis 2006 (Loi n° 2006-11 du 5 janvier 2006 d'orientation agricole ajoutée à l'article L654-27-1 au code rural français).

La France domine le marché international du foie gras avec une production de 16 398 tonnes en 2018 soit 66% de la production, suivi de la Hongrie (3550 tonnes) et de la Bulgarie (2800 tonnes) (selon le Comité Interprofessionnel du Foie Gras, 2019). La France, la Hongrie et l'Espagne sont les principaux exportateurs de foie gras crus ou de préparations à base de foie gras vers le Japon, l'Israël et la Suisse (Eurostat). 97% de la production de foie gras est faite à partir de canard, les 3 % restant à partir d'oie. Le foie gras de canard est à 95% issu du gavage de canards mulards, un hybride stérile issu du croisement entre une femelle Pékin (utilisée pour la production de magret) et un mâle de Barbarie (utilisé également en production de foie gras). La dénomination Foie Gras ainsi que l'IGP incombe au foie gras de peser au minimum 350g, de provenir d'un canard mâle (mulard ou de Barbarie) gavé un minimum de 10 jours soit 20 repas composés à 95% de maïs issu de l'agriculture locale (selon le 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 filière foie gras est constamment soumise à des contraintes, premièrement, d'ordre économique lié au coût des matières premières (principalement le maïs) qui ne cessent de fluctuer, et deuxièmement, sociétales vis-à-vis du gavage décrié comme allant à l'encontre du bien-être animal par une partie de la société.

Dans un souci d'amélioration des conditions d'élevage et plus particulièrement d'optimisation du gavage des animaux, de nouvelles stratégies doivent être développées dans le but de réduire les coûts de production (en réduisant notamment le nombre de repas, soit la durée du gavage, ou la quantité d'aliments distribuée), afin, globalement, d'optimiser la production de foie gras (à savoir, fournir un foie gras de taille et de qualités sensorielles, organoleptiques, et technologiques qui correspondent aux attentes du marché). C'est dans cette optique que s'inscrit le travail de cette thèse. En effet, l'un des moyens que possède la recherche pour participer à l'optimisation du gavage est de tenter de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents qui participent au développement du foie gras, autrement appelé stéatose hépatique (Hermier *et al.*, 1999; Saadoun et Leclercq, 1987).

La stéatose hépatique est le résultat d'une forte accumulation de triglycérides dans les hépatocytes résultant d'une forte activité de lipogenèse (Davail *et al.*, 2003; Hermier *et al.*, 1999; Saadoun et

Leclercq, 1987). Ce phénomène est à l'origine une adaptation physiologique des animaux aux besoins énergétiques dans des situations bien particulières telles que la migration ou l'hibernation qui est aujourd'hui très largement exploitée pour la production de foie gras (Hermier et al., 2003).

Diverses études menées chez différents types génétiques de canards ont démontré que le mulard possède la meilleure capacité d'ingestion et produit le plus gros foie gras (Guy et al., 1995; Tavernier et al., 2016). En effet, le canard mulard bénéficie d'un effet d'hétérosis couplant les caractères génétiques favorables à la production de foie gras de ses deux parents.

Les mécanismes impliqués dans le développement de la stéatose hépatique chez le canard mulard tels que les métabolismes lipidiques et glucidiques ont déjà fait l'objet de nombreuses études. Le régime très riche en glucides apportés par l'amidon du maïs que constitue l'aliment de gavage entraîne la surexpression hépatique de gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* tels que la Fatty Acid Synthase (*fas*), la Stearoyl CoA Desaturase (*scd1*) et la Diacyl Glycerol Acyl Transferase (*dgat2*) (Auvergne et al., 1995; Chartrin et al., 2006a; Gabarrou et al., 1996; Hérault et al., 2009; Hermier et al., 2003). De plus, la combinaison de trois mécanismes clés ont été mis en évidence comme contribuant à l'accumulation exponentielle de lipides dans le foie au cours du gavage. Il s'agit d'un défaut d'exportation des lipides du foie vers les tissus périphériques associé à une absence de captage des lipides par les tissus périphériques et d'un retour de ce fait important des lipides vers le foie (Hermier *et al.*, 1991; Tavernier *et al.*, 2016, 2018).

Cependant, d'autres mécanismes peu ou pas étudiés dans le cadre de la mise en place de la stéatose hépatique chez le canard mulard sont soupçonnés d'être impliqués/impactés dans/par le développement du foie gras. Par exemple, la lipophagie, un processus de dégradation cellulaire permettant le recyclage de lipides (une variante de l'autophagie) induit une accumulation de triglycérides dans les foies de mammifères lorsqu'elle est inhibée (Schulze *et al.*, 2017). De même, des études ont montré que des activités apoptotiques (Rémignon *et al.*, 2018) ainsi que du stress oxydant (François et al., 2014a; Theron et al., 2011) étaient induits dans les hépatocytes de canards en fin de gavage. Ces mécanismes de protections cellulaires semblent être nécessaires au développement du foie gras mais également au maintien du foie gras dans un état dit non pathologique.

Par ailleurs, dans la perspective de trouver de nouveaux biomarqueurs du développement de la stéatose hépatique, notre intérêt s'est porté sur les microARNs circulants. Ces petits ARNs non codant régulateurs post-transcriptionnels de l'expression des gènes (Baulande *et al.*, 2014) sont

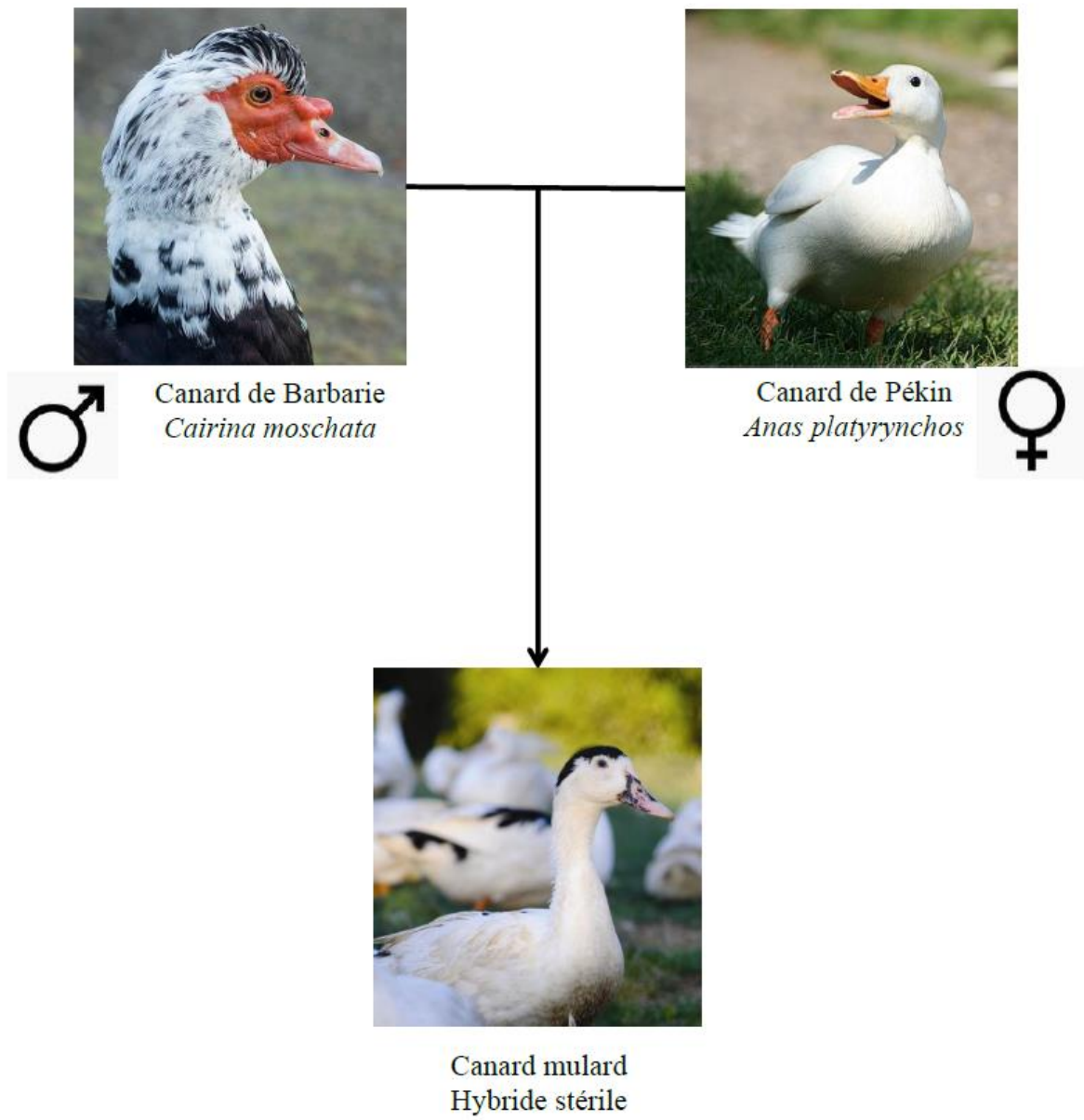
bien connus aujourd'hui pour leur potentiel prédictif de maladies tels que les cancers ou les maladies du foie (Arrese *et al.*, 2015; Mitchell *et al.*, 2008). Le miR-122 est connu pour sa spécificité au foie et son implication dans son développement (Hu *et al.*, 2012) ainsi que la régulation du métabolisme des lipides dans le foie (Esau *et al.*, 2006) ce qui représente un fort intérêt dans l'étude du développement de la stéatose hépatique chez le canard. Le séquençage du miRNome plasmatique du canard mulard n'a pas encore été réalisé. Cependant des études déjà menées chez l'oie landaise (*Anser anser*) (Chen *et al.*, 2017) ont permis de mettre en avant certains microARNs dont l'expression augmente significativement au cours du gavage. C'est le cas du miR-222 connu pour être impliqué dans le métabolisme des glucides et régulé positivement chez les patients atteints de NASH (Cheung *et al.*, 2008) et du miR-221 connu pour être régulé positivement dans les tissus des patients obèses (Meerson *et al.*, 2013).

Ainsi, cette thèse s'inscrit premièrement dans la poursuite de l'étude des divers métabolismes et mécanismes mis en place dans les hépatocytes des canards mulards permettant d'améliorer la compréhension du développement de la stéatose hépatique. Et secondement dans une nouvelle approche du développement du foie gras par l'étude des microARNs en tant que potentiels biomarqueurs non invasifs.

Ce manuscrit se compose d'une étude bibliographique complète abordant les différents aspects étudiés au cours de la thèse évoquant les travaux précédents. Dans une seconde partie, l'ensemble des matériels et méthodes employés pour l'obtention des résultats ont été présentés. L'ensemble des résultats sont présentés sous forme d'articles suivis d'une discussion générale et des perspectives de travail.



## **Etude bibliographique**



**Figure 1. Le canard mulard (Brun *et al.*, 2005)**

## 1. Modèle d'étude : le canard mulard

Le modèle d'étude pour l'ensemble de cette thèse est le canard mulard. Cet animal est un hybride intergénérique issu du croisement entre deux genres de canards : le *Cairina moschata* (canard de Barbarie) et l'*Anas platyrhynchos* (cane Pékin) (Figure 1).

Le canard de Barbarie, originaire d'Amérique centrale, est utilisé pour la production de foie gras et possède l'appellation IGP (Indication Géographique Protégée) « canard à foie gras du sud-ouest » au même titre que le canard mulard. En effet, il présente une forte aptitude au gavage avec des rendements de poids de foie élevés (soit supérieur à 500 grammes) obtenus en deux semaines de gavage (Baéza *et al.*, 2005).

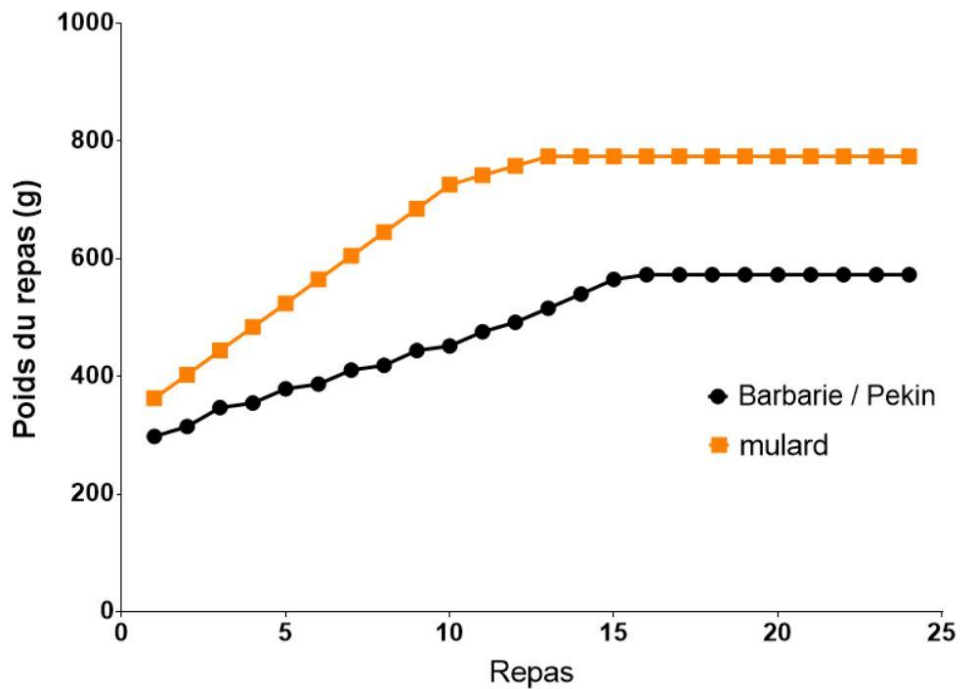
Le canard Pékin, ou canard commun, provient quant à lui de Chine où il est mieux connu pour sa croissance rapide et son rendement en viande. Contrairement au canard de Barbarie et au canard mulard, le canard Pékin présente une plus faible aptitude au gavage avec un stockage des lipides néo-synthétisés plus important dans les tissus périphériques tels que le gras sous-cutané (Chartrin *et al.*, 2006b; Davail *et al.*, 2003b). De plus, les canes Pékin sont particulièrement appréciées pour leur côté bon reproducteur (haut rendement d'œufs) pour la production des canards mulards.

Du fait de la grande divergence phylogénétique existante entre ses deux parents, le canard mulard est un hybride stérile (Gonzalez *et al.*, 2009). Son maintien nécessite donc celui des deux espèces parentales. Il bénéficie d'un effet d'hétérosis qui couple les caractères génétiques favorables de ses deux parents à la production de foie gras, avec une meilleure capacité d'ingestion faisant de lui le meilleur producteur de foie gras avec le poids de foie le plus gros en fin de gavage (Brun *et al.*, 2005; Guy *et al.*, 1995). Seuls les canards mulards mâles sont utilisés pour la production de foie gras en France. Il s'agit d'un critère requis pour l'obtention de l'IGP. La carcasse est valorisée en magret et confit. Les femelles mulards sont quant à elles utilisées pour leur chair.

Le croisement inverse, à savoir entre un canard mâle Pékin et une cane de Barbarie, aboutit à la production d'un canard appelé Henny. Beaucoup moins répandu que le mulard, ce canard est apte à produire du foie gras mais ses performances sont plus proches de celles du canard de



Barbarie que celle du canard mulard (Larzul *et al.*, 2006). De plus, les capacités de reproduction de la cane de Barbarie sont beaucoup plus faibles que celles de la cane commune Pékin.



**Figure 2. Comparaison courbes de gavage de trois types génétiques Barbarie, Pékin et mulard** (thèse Tavernier, 2016)

## 2. Le gavage

Le gavage est une pratique qui remonte à l’Egypte antique. Il est né de l’observation du comportement alimentaire des oies et des canards en prévision de leur migration (CIFOG, 2019) et de la dégustation de leur foie jugé délicieux par les égyptiens. C’est ainsi que les égyptiens se sont mis à engraisser les oiseaux de toute sorte pour en consommer leur foie et nourrir toute la population. Cette pratique s’est par la suite exportée en France *via* les Romains et l’élevage des palmipèdes s’y est développé au XVIème siècle, grâce à l’introduction de la culture du maïs. En 2018, la France est le principal pays producteur de foie gras avec plus de 16 000 tonnes (CIFOG, 2019) plus précisément dans le Sud-Ouest (72%). Avec 8 millions de palmipèdes en gavage, le département des Landes est le premier producteur en France avec un quart des volumes nationaux.

Les palmipèdes ne possèdent pas tous l'aptitude à produire du foie gras. Des études de comparaison de cette capacité entre les différents génotypes (Barbarie, Pékin, mulard) ont permis de définir le canard mulard comme le meilleur producteur de foie gras, suivi de près par le canard de Barbarie (Baéza *et al.*, 2005). Ces études ont également mis en avant le fait que le canard Pékin présentait un engraissement périphérique plus important que le Barbarie et le mulard (Davail *et al.*, 2003b).

Le gavage est basé sur un processus de stockage naturel des oiseaux migrateurs en exploitant les mécanismes physiologiques mis en place au cours de la production du foie gras, un phénomène appelé la stéatose hépatique.

Traditionnellement, le gavage dure en moyenne deux semaines (avec un minimum de 10 jours) à raison de deux repas par jour. Il est réalisé majoritairement sur des canards mulards (males exclusivement) dès l'âge de 12 semaines environ, soit 80 jours en moyenne. Les repas de gavage sont composés quasi exclusivement de glucides apportés par le maïs qui est en grain entier ou sous forme de farine. En début de gavage, les repas pèsent environ 300 g puis sont augmentés progressivement au cours du gavage (600-700 g) et cela en fonction de la courbe de croissance des canards. Celle-ci est définie et ajustée en fonction du poids des canards au cours du gavage et de leur capacité d'ingestion (celle des canards Pékin et Barbarie étant plus faible que celle des canards mulards) (Figure 2).

La production de foie gras est confrontée à des contraintes économiques et réglementaires importantes. En effet, elle est très coûteuse en aliments (plus de 55% du coût de production) avec 8 kg de maïs nécessaires pour produire un foie gras de canard de 550 g, et un coût des matières premières en constante fluctuation. À cela s'ajoutent d'autres problématiques notamment sociétales vis-à-vis du questionnement de l'impact du gavage sur le bien-être animal souvent mis en opposition à la pratique du gavage. Le gavage doit être rapide et intense afin d'obtenir un foie gras de taille commercialisable et de bonne qualité sanitaire, sensorielle et technologique correspondant aux attentes du marché, tout en se devant de respecter le bien-être des animaux. La maîtrise de ces différents paramètres nécessite d'optimiser les conditions d'élevage et de gavage et en particulier d'alimentation. Ces nombreuses contraintes contribuent à la recherche et au développement de nouvelles stratégies nutritionnelles capables de stimuler la synthèse du foie gras chez le canard et ainsi de limiter la durée ou de diminuer la quantité de repas distribué aux canards cours du gavage. Si des composés (protéiques...) sont capables de stimuler et d'accélérer la synthèse du foie gras chez le canard et d'inhiber l'apparition de stéatose hépatique pathologique, de nouveaux aliments plus performants pourront être formulés

et utilisés par les éleveurs pendant la période de gavage pour produire un foie gras de qualité. Ces nouvelles stratégies alimentaires ont pour but d'améliorer le gavage voire de le substituer (alternatives au gavage) tout en essayant d'obtenir des foies gras qui respectent les qualités sensorielles et technologiques attendues par le consommateur. C'est ainsi que des recherches ont mené à des tentatives d'engraissement spontané. Des études menées chez l'oie (*Anser anser*) ont montré qu'il était possible d'induire chez cette espèce une hyperphagie spontanée ainsi qu'une stéatose hépatique sans gavage mais sous certaines conditions expérimentales (combinaison d'une photopériode décroissante et d'une restriction alimentaire suivie d'une alimentation *ad libitum* (Fernandez *et al.*, 2016; Guy *et al.*, 2013). Cependant, l'intensité de la stéatose hépatique obtenue dans ces conditions est faible et est associée à une grande variabilité de poids de foie ce qui pour le moment ne permet pas de remplacer le gavage traditionnel sur du long terme (Knudsen *et al.*, 2018).

Aujourd'hui encore, de nombreuses études sont menées dans le but de mieux comprendre la forte variabilité de réponse au gavage ainsi que les mécanismes physiologiques mis en place au cours du gavage afin de trouver les meilleures alternatives au gavage traditionnel qui reste sujet à de nombreuses controverses.

### **3. Le métabolisme des oiseaux**

Les voies métaboliques observées chez les canards ou les oiseaux en général sont très proches de celles des mammifères. Il existe cependant quelques différences essentielles. En effet, chez les oiseaux, le site de la lipogenèse est essentiellement le foie tandis que chez les mammifères, la synthèse des lipides a lieu dans le foie et dans les tissus adipeux. De plus, les oiseaux ont la particularité d'avoir une glycémie basale plus élevée que celle des mammifères.

Tableau 1. Différentes classes de GLUT recensées chez l'homme et chez le poulet (Byers et al., 2017)

Gene	Orthologs	Human	Chicken
<i>glut1/slc2a1</i>	Conserved in human, chicken, chimpanzee, cow, mouse, rat, Rhesus monkey, zebrafish, <i>Eremothecium gossypii</i> . 122 organisms contain orthologs with <i>slc2a1</i> [46].	Blood-brain barrier [15]. Receptor for T-cell leukemia virus I and II [46]. Microcephaly, childhood epilepsy [18,19], hypoglycorrhachia [20,21], cryohydrocytosis [22], choreathetosis [23], ataxia [22], migraines [24,25], spasticity, dyskinesia [26], indicator for cancer [27], thymic carcinoma [28].	Hypothalamus, basal glucose uptake, ubiquitous [31,34].
<i>glut2/slc2a2</i>	Conserved in human, chicken, dog, chimpanzee, cow, Rhesus monkey, rat, frog and zebrafish. 168 organisms have orthologs of <i>slc2a2</i> [46].	Glycoprotein, bidirectional transport in liver, islet beta cells, intestine, kidney, glucose sensor, gene mutations associated with susceptibility to disease, noninsulin-dependent diabetes, Fanconi-Bickel syndrome. Alternative splicing results in multiple transcript variants of this gene [33,34].	Fructose, galactose, liver, pancreas, small intestine, kidneys [1,33,57], insulin dependent [33].
<i>glut3/slc2a3</i>	Conserved in dog, cow, frog, chimpanzee, Rhesus monkey, mouse, rat, chicken, zebrafish, fruit fly, mosquito, <i>Caenorhabditis elegans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Magnaporthe oryzae</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> and rice. 70 organisms have orthologs of <i>slc2a3</i> [46].	Mediates uptake of glucose, 2-deoxyglucose, galactose, mannose, xylose, fucose and other monosaccharides across the cell membrane. Gene mutation associated with Huntington's disease [39,40].	Neurons [1,30], insulin dependent [33].
<i>glut4/slc2a4</i>	Conserved in chimpanzee, Rhesus monkey, dog, cow, mouse and rat. 114 organisms have orthologs of <i>slc2a4</i> [46].	Insulin-regulated. Upon insulin stimulation, GLUT4 translocates to cell surface to transport glucose across the cell membrane. Gene mutations are associated with noninsulin-dependent diabetes mellitus [41].	Not exist in chickens [2,80].
<i>glut5/slc2a5</i>	Conserved in chicken, dog, mouse, rat, chimpanzee, Rhesus monkey, cow and frog. 123 organisms have orthologs of <i>slc2a5</i> [46].	Thought to be cytochalasin $\beta$ -sensitive carrier, expression in small intestine [49], adipose tissue, skeletal muscle [50], duodenum, bone marrow, kidney [51], renal cell carcinoma [52].	Fructose, small intestine [55,57].
<i>glut6/slc2a6</i>	Conserved in chicken, dog, cow, chimpanzee, mouse, Rhesus monkey, zebrafish, fruit fly, mosquito and frog. 169 organisms have orthologs of <i>slc2a6</i> [46].	GLUT6/GLUT9 [46], hexose transport [63], endometrial cancer [64].	Uncharacterized protein [78].
<i>glut7/slc2a7</i>	Conserved in mouse, rat, chimpanzee and Rhesus monkey. Orthologs found in 55 organisms [46].	Glucose, fructose transport, expression in small intestine and colon, lower levels in testis and prostate [55].	Not found in chickens.
<i>glut8/slc2a8</i>	Conserved in chicken, dog, mouse, rat, chimpanzee, Rhesus monkey, cow, zebrafish, fruit fly, rice, <i>A. thaliana</i> and frog. Orthologs found in 156 organisms [46].	Insulin-regulated, binds cytochalasin $\beta$ in glucose-inhibitable manner, may be dual-specific, as it is inhibitable by fructose [69].	Ubiquitous, especially in adipose tissue, kidneys, insulin response [1,2].
<i>glut9/slc2a9</i>	Conserved in chicken, dog, cow, chimpanzee, mouse, rat and frog. Orthologs found in 153 organisms [46].	Fructose, urate transport, and glucose at a low rate, urate reabsorption by proximal tubules, regulatory role in development and survival of chondrocytes [59].	Liver [33].
<i>glut10/slc2a10</i>	Conserved in chicken, dog, mouse, rat, chimpanzee, Rhesus monkey, cow, frog and zebrafish. Orthologs found in 166 organisms [46].	Liver and pancreas [66], glucose regulation, gene mutations are associated with arterial tortuosity syndrome [46].	Uncharacterized [78].
<i>glut11/slc2a11</i>	Conserved in chicken, dog, cow, chimpanzee, frog, Rhesus monkey and zebrafish and frog. Orthologs found in 111 organisms [46].	Glucose, fructose. 11-A: skeletal muscle, heart, kidney. 11-B: adipose tissue, kidney, placenta. 11-C: skeletal muscle, heart, adipose tissue, pancreas [62], 11-D [46].	Uncharacterized [78].
<i>glut12/slc2a12</i>	Conserved in chicken, dog, mouse, rat, chimpanzee, Rhesus monkey, cow, frog, zebrafish, rice and <i>A. thaliana</i> . Orthologs found in 177 organisms [46].	GLUT8/GLUT12 [46], skeletal muscle, heart, prostate, lower levels in brain, placenta, kidneys [69], wide variety of hexoses [68], Alzheimer's, hypertension, diabetic neuropathy [71].	Insulin-sensitive. May act as GLUT4 in skeletal and cardiac muscle [72].
<i>glut13/slc2a13</i>	Conserved in chicken, dog, cow, chimpanzee, rice, Rhesus monkey, mouse, rat, frog, zebrafish, <i>C. elegans</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>K. lactis</i> , <i>E. gossypii</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> and <i>A. thaliana</i> . Orthologs found in 151 organisms [46].	Glial cells and neurons [73], myo-inositol and related stereoisomers [74], non-small-cell lung cancer [75], Parkinson's [76].	Uncharacterized.
<i>glut14/slc2a14</i>	2 organisms have orthologs of human <i>slc2a14</i> [46].	Spermatogenesis [46], Alzheimer's disease [47], gastric adenocarcinoma [48].	N/A

## 3.1 Métabolisme glucidique

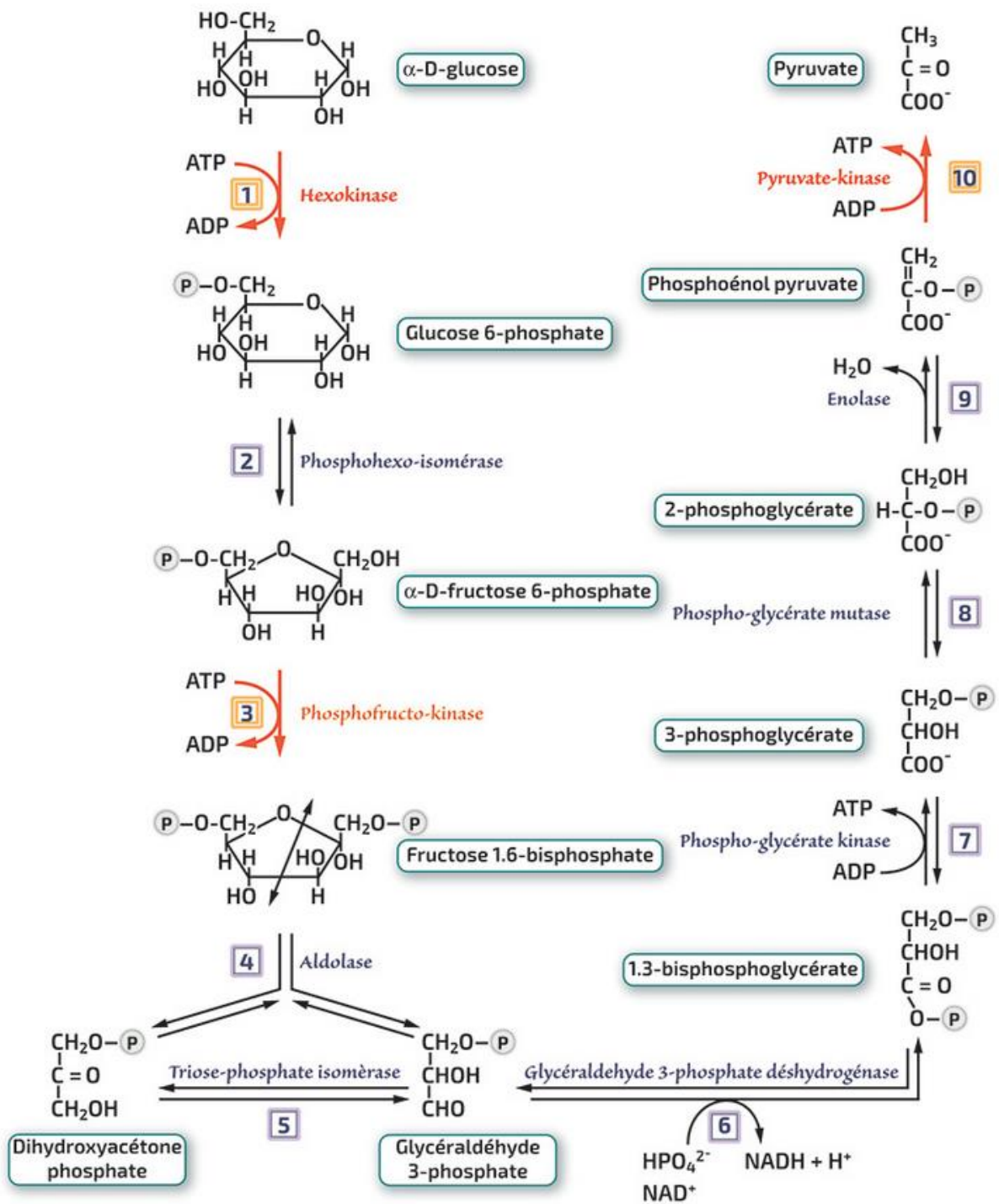
### 3.1.1 Digestion, absorption du glucose

L'étude du métabolisme glucidique chez le canard est essentielle. En effet, l'aliment de gavage est composé à plus de 90% de maïs qui contient, quant à lui, une teneur moyenne en amidon de 75,5 % de matière sèche (MS), pour 8,2 % MS de protéines et 4% MS de lipides (FranceAgriMer). Une fois ingéré, cet amidon est hydrolysé en molécule de glucose au cours de la digestion grâce aux enzymes pancréatiques et intestinales (amylases, maltases, isomaltases).

Ce glucose est ensuite absorbé au niveau apical des cellules intestinales par le co-transporteur SGLT1 (Sodium Glucose Like Transporter 1), principal transporteur de glucose. Le transfert se poursuit par l'intermédiaire d'autres transporteurs de glucose, sodium-indépendants, situés du côté basolatéral des entérocytes, qui assurent le transport du glucose depuis la cellule intestinale vers la circulation sanguine. Ce sont les GLUT (Glucose Transporter) qui possèdent différentes formes dont les isoformes -1, -2, -3, -8, -9 et -12 caractérisées chez le poulet (Coudert *et al.*, 2015a; Kono *et al.*, 2005) et également identifiées chez le canard (Annabelle *et al.*, 2017) (Tableau 1). Dans le foie, ce sont majoritairement les GLUT-2 qui facilitent l'entrée du glucose. Chez le canard, GLUT-2 prédomine dans le foie (Annabelle *et al.*, 2017) ainsi que dans le jéjunum (Humphrey *et al.*, 2004). Dans le muscle en revanche, seuls les GLUT-1, -3 et -8 ont jusque-là été identifiées chez le poulet (Kono *et al.*, 2005; Seki *et al.*, 2003) et chez le canard (Annabelle *et al.*, 2017). Tandis que chez les mammifères l'entrée du glucose dans les muscles est régulée par le transporteur GLUT-4 insulino-dépendant, cette isoforme n'existe pas ou n'a pas été caractérisée chez le poulet (Seki *et al.*, 2003). Son rôle pourrait être en partie joué par le transporteur GLUT-12. Ce transporteur présente la particularité d'être transloqué vers la membrane plasmique lors d'une stimulation insulinique ou suite à un repas rendant ainsi le métabolisme glucidique de l'oiseau si particulier (Coudert *et al.*, 2015b).

### 3.1.2 Utilisation du glucose

Une fois que le glucose entre dans les cellules *via* les transporteurs GLUT, il est utilisé comme source d'énergie par le biais d'une série de réactions enzymatiques : la glycolyse (Figure 3).



**Figure 3. Voie de dégradation du glucose : la glycolyse**

[https://rnbio.upmc.fr/Biochimie\\_metabolisme\\_glycolyse4](https://rnbio.upmc.fr/Biochimie_metabolisme_glycolyse4)

ADP : Adénosine Di-Phosphate, ATP : Adénosine Tri-Phosphate, NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide, HPO : Hydrogène Phosphate

Elle a lieu dans le cytoplasme et permet de produire deux molécules de pyruvates à partir d'une molécule de glucose et cela grâce à l'activité de trois enzymes clés : le glucokinase (GK), la 6-phosphofructose-1-kinase (6PF1K) et la pyruvate kinase (PK). Les molécules de pyruvates obtenues sont ensuite métabolisées dans le cycle de Krebs (Figure 4) et permettent la production d'énergie sous forme d'ATP (Adénosine Triphosphate).

La glycolyse est l'unique voie du catabolisme du glucose chez l'ensemble des organismes y compris chez les canards (Fleming, 1919). Elle s'effectue en plusieurs étapes dont la première est la phosphorylation du glucose en G6P (Glucose-6-Phosphate) par l'enzyme hexokinase (HK) (Wilson, 2003). Chez les vertébrés, quatre isoenzymes (HK -I à -IV) sont connues et sont codées par des gènes différents. HK -I, -II et -III présentent une forte affinité pour le glucose et sont inhibées par leur produit (G6P). En revanche, seule la HK-IV, aussi appelée GK, possède une faible affinité pour le glucose et une activité non inhibée par le G6P. Cela est dû au fait qu'elle possède bien un domaine catalytique mais pas de domaine régulateur contrairement aux autres isoformes (Printz *et al.*, 1993).

La GK est principalement exprimée dans les hépatocytes et les cellules  $\beta$  du pancréas où elle joue un rôle de senseur du glucose circulant (Printz *et al.*, 1993) en contrôlant sa phosphorylation et ainsi la première étape du métabolisme intracellulaire du glucose. Cependant, son existence est controversée chez les oiseaux. Une activité enzymatique de type « GK-like » induite par le gavage chez le canard mulard aurait été détectée par Berradi *et al.* (2004). Ils auraient réussi à détecter un fragment d'ADNc présentant une forte homologie de séquence avec la GK humaine (80%) malgré le fait qu'à l'époque le génome du poulet n'ait pas été totalement séquencé.

La poursuite de la glycolyse se fait avec la phosphoglucoisomérase qui catalyse la transformation du G6P en fructose-6-phosphate, lui-même phosphorylé en fructose-1,6-bisphosphate par la 6PF1K.

Enfin, la PK catalyse la dernière étape de la glycolyse, c'est-à-dire la transformation du phosphoénolpyruvate en pyruvate. Si la PK musculaire a été détectée chez le poulet, ce n'est malheureusement pas le cas de la PK hépatique (Strandholm *et al.*, 1975).

Dans la matrice mitochondriale, le pyruvate produit par la glycolyse est ensuite transformé par le pyruvate déshydrogénase (PDH) en Acétyle Coenzyme A (CoA). Ce dernier pourra être utilisé en tant que substrat pour la synthèse d'acides gras (AG) au cours de la lipogenèse *de*

*novo* ou bien pourra entrer dans le cycle de Krebs afin de produire de l'énergie par la chaîne respiratoire.

Le glucose qui ne subit pas la glycolyse est directement stocké sous forme de glycogène dans le foie principalement mais également dans le muscle. Cela se produit lorsque la glycémie est élevée. Lorsque la synthèse hépatique de glycogène atteint un niveau maximal, le glucose en excès est alors mis en réserve sous forme de lipides par la voie de la lipogenèse dite *de novo* et est stocké dans le foie et dans le tissu adipeux.

## 3.2 Métabolisme lipidique

### 3.2.1 Lipogenèse *de novo*

La lipogenèse *de novo* est un processus cytoplasmique hormono-dépendant stimulé lors d'un apport massif de glucose par l'alimentation. Chez les oiseaux, la lipogenèse *de novo* s'effectue principalement dans les cellules du foie (Saadoun et Leclercq, 1986) tandis que chez les mammifères elle a lieu dans le foie mais également dans le tissu adipeux (Mourot et Kouba, 1999). Lors d'un apport calorique riche tel qu'un repas de gavage, l'apport en glucose augmente la glycémie qui est régulée par l'insuline. Cela entraîne une stimulation de la lipogenèse *de novo* : le surplus de glucose est alors stocké sous la forme de triglycérides (TG).

La lipogenèse *de novo* permet la synthèse d'AG soit à partir de l'Acétyl CoA directement issu de la glycolyse, ou alors par la transformation du citrate par l'ATP citrate Lyase (ACLY) à la sortie du cycle de Krebs (Figure 5).

L'Acétyl CoA est le métabolite clé de la lipogenèse. Il est utilisé pour la synthèse de Malonyl CoA par l'Acétyl CoA Carboxylase (ACC ou ACX). Lors du gavage, l'activité de ACC augmente (Baeza *et al.*, 2013) et est proportionnelle à l'ampleur de la stéatose hépatique. De même, Chartrin *et al.*, ont montré que l'activité de l'ACC était plus importante chez le canard de Barbarie, qui est plus apte à la production de foie gras, que chez le canard Pékin (Chartrin *et al.*, 2006a).

La synthèse des AG a lieu grâce à la prise en charge du Malonyl Coa par la Fatty Acid Synthase (FAS). Tout comme l'ACC, l'activité de la FAS augmente lors du gavage, plus chez le canard de Barbarie que chez le canard Pékin (Baéza *et al.*, 2005). De même, le niveau d'expression du



gène *fas* est connu pour augmenter au cours du gavage, témoin d'une activité lipogénique intense des foies au cours du gavage (Héroult *et al.*, 2009).

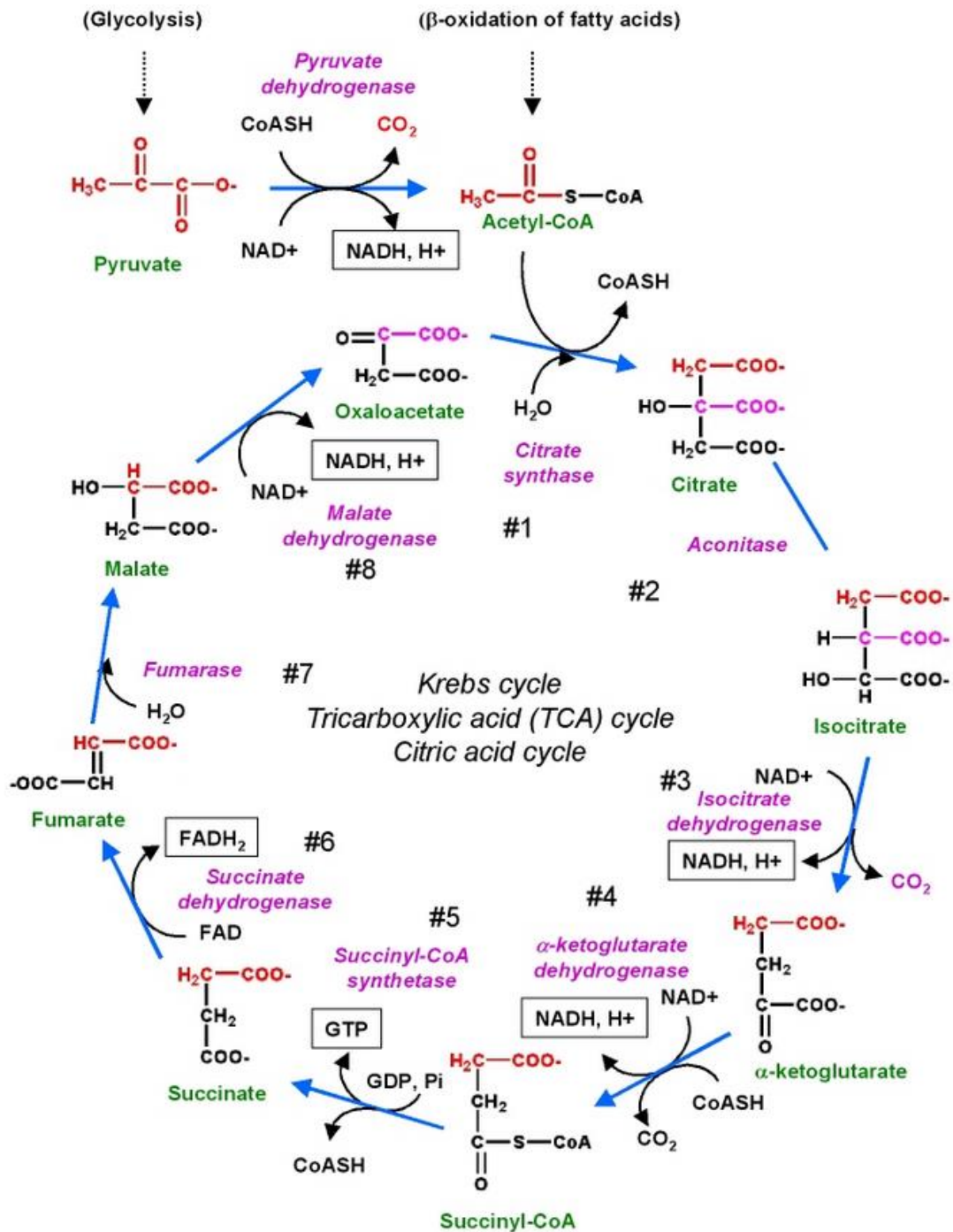


Figure 4. Le cycle de Krebs

[https://rnbio.upmc.fr/Biochimie\\_metabolisme\\_reactions-krebs](https://rnbio.upmc.fr/Biochimie_metabolisme_reactions-krebs)

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide ; GDP : Guanosine Di-Phosphate ; GTP : Guanosine Tri-Phosphate ; NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

### 3.2.2 *Devenir des acides gras néo-synthétisés*

Les AG néo-synthétisés peuvent servir de substrat énergétique à la cellule, être estérifiés et transportés vers d'autres tissus.

Au niveau du réticulum endoplasmique, la Stéaroyl CoA Désaturase 1 (SCD1) catalyse les AG en AG mono-insaturés (AGMI) qui servent ensuite à la synthèse de TG dont ils sont les composants principaux (Figure 6). Des études ont montré que l'expression de *scd1* était liée à la capacité d'engraissement étant surexprimé dans le foie des poulets « gras » par rapport à des poulets « maigres » (Bourneuf *et al.*, 2006). De plus, il est également surexprimé chez des canards et oies gavés (Hérault *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2011).

Les AG peuvent également être estérifiés en TG grâce à l'action successive d'enzymes : la Glycérol-3-Phosphate Acyl Transférase (GPAT), la 1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransférase (AGPAT) et la Diacylglycérol O-Acyl Transférase 2 (DGAT2). Ces réactions permettent de créer une liaison ester entre une fonction alcool du glycérol et un AG ce qui aboutit à un TG, principal lipide stocké lors de la stéatose (> 95%) (Fernandez *et al.*, 2011) (Figure 5).

### 3.2.3 *Transport et exportation*

Si une partie des TG synthétisés par la lipogenèse hépatique sont stockés au sein même du foie, l'autre partie est exportée vers les tissus périphériques (muscle et tissu adipeux). Pour cela, les TG sont intégrés dans des lipoprotéines afin d'être transportés (Figure 7). Chez les oiseaux, contrairement aux Mammifères, le transport des lipides se fait préférentiellement sous forme de lipoprotéines au lieu d'AG libres (Weber, 2009).

Il existe différentes formes de lipoprotéines classées en fonction de leur teneur en TG : Very Low Density Protein (VLDL), Low DL (LDL), Intermediate DL (IDL) et les High DL (HDL). Seules les VLDL (en majorité) et les HDL sont synthétisés et sécrétés par le foie.

Dans le cadre de cette synthèse, les TG sont d'abord pris en charge par la Protéine Microsomale de Transfert des TG (MTTP) au sein du réticulum endoplasmique (RE). Sa fonction est primordiale : transporter les TG jusqu'au site d'assemblage des lipoprotéines. Une déficience en MTTP a pour conséquence une augmentation significative de la concentration en TG et



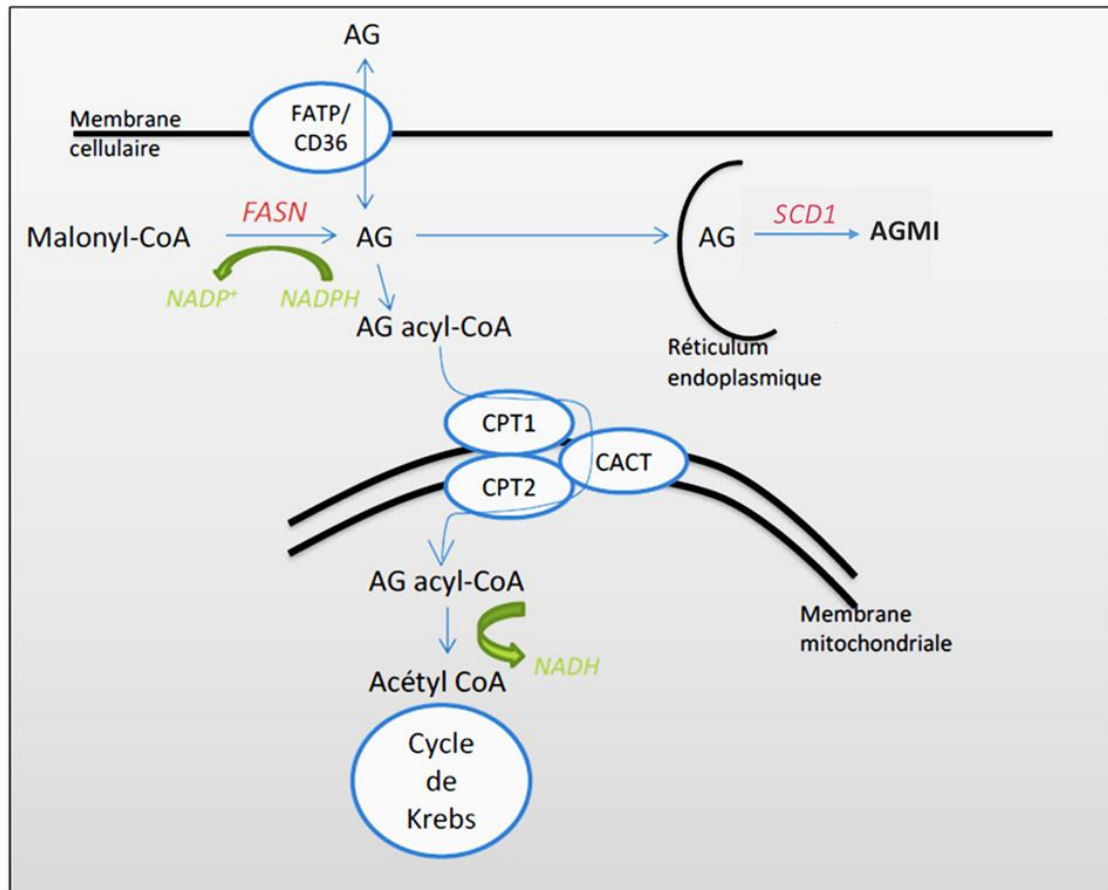
cholestérol dans le foie (Hussain *et al.*, 2012). Une fois sur le site d'assemblage, les TG se lient à la fraction protéique de ces lipoprotéines : l'Apolipoprotéine AI (ApoAI) ou l'ApoB pour former des HDL ou VLDL respectivement chez le poulet (Banerjee et Redman, 1983; Siuta-Mangano *et al.*, 1982). La synthèse d'ApoB pour la formation de VLDL dépendrait de l'insuline qui favoriserait sa dégradation lorsque la quantité de TG apportée par MTTP serait trop faible (Haas *et al.*, 2013).

Ainsi constituées, les lipoprotéines permettent l'exportation des lipides *via* la circulation sanguine vers d'autres tissus que le foie.

#### 3.2.4 Captage

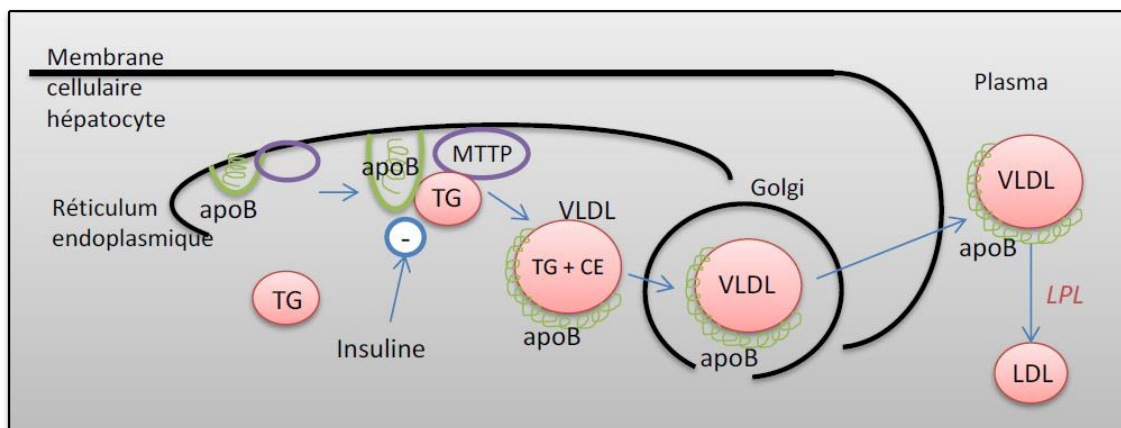
Les lipoprotéines formées au sein du RE (majoritairement des VLDL) sont exportées et libérées dans la circulation sanguine. Exprimés dans les endothéliums des capillaires des tissus AG actifs (cœur, muscle, tissus adipeux...), les récepteurs aux VLDL (VLDLR) vont assurer l'internalisation et la dégradation des lipoprotéines en facilitant l'hydrolyse des TG par une coopération protéique avec la Lipoprotéine Lipase (LPL), assurant ainsi l'entrée des AG dans les tissus sous-jacents. Une fois hydrolysées par la LPL, les lipoprotéines évoluent en LDL ou IDL (Figure 7). La LPL est ancrée à la surface des cellules endothéliales des capillaires des tissus périphériques (adipeux et musculaires) par des groupements Héparane Sulfate Protéoglycanes (HSPG) (Wang et Eckel, 2009). Son action lipolytique hormone dépendante conduit à l'hydrolyse des TG des lipoprotéines en AG libres et glycérol. Les résidus de lipoprotéines sont alors captés par des récepteurs hépatiques spécifiques pour une internalisation par endocytose et dégradation dans les vésicules lysosomales. Les AG libres quant à eux peuvent être pris en charge par différents transporteurs favorisant leur captage dans les tissus sous-jacents hépatiques et/ou périphériques (muscles et tissus adipeux) : les Fatty Acid Binding Protein (FABP) et la Fatty Acid Translocase homologue de l'antigène CD36 (FAT/CD36) (Stahl, 2004). Les acides gras libres sont ensuite soit stockés dans les tissus adipeux, soit utilisés comme source d'énergie après oxydation, soit de nouveau réutilisés pour la synthèse des VLDL s'ils sont captés par le foie.

FABP lie les AG pour les transporter au sein de la cellule entre les différents compartiments cellulaires. Une étude a montré que l'isoforme 4 de FABP est surexprimée dans le muscle du



**Figure 6. Devenir des acides gras et  $\beta$ -oxydation**

AG : Acide Gras ; AGMI : Acide Gras MonoInsaturé ; CACT : Carnitine Acyl-Carnitine Translocase ; CPT : Carnitine Palmitoyl Transferase ; FASN : Fatty Acid Synthase ; FATP : Fatty Acid Transport Protein ; SCD1 : Stéaroyl-CoA Desaturase isoforme 1.



**Figure 7. Formation des lipoprotéines pour le transport des acides gras vers les tissus périphériques**

ApoB : Apolipoprotéine B représentée en vert ; CE : Ester de Cholestérol ; LPL : Lipoprotéine Lipase ; MTP : Protéine de Transfert des TG ; TG : Triglycéride ; VLDL : Very Low Density lipoprotein.

canard Pékin gavé (favorable à l'engraissement périphérique) en comparaison au canard de Barbarie (Saez *et al.*, 2009). La forme hépatique de FABP s'exprime également dans le tissu adipeux (He *et al.*, 2013). Tavernier *et al.* (2017) ont démontré l'apport important du recaptage des lipides au niveau hépatique et son implication dans le développement exacerbé de la stéatose hépatique chez le canard mulard par une surexpression des gènes *fabp4* et *vldlr* dans le foie à la fin de la période de gavage conduisant ainsi à une stéatose hépatique plus intense au détriment des tissus périphériques.

Parallèlement, FAT/CD36 est un transporteur membranaire qui semblerait permettre la diffusion des AG à l'intérieur et hors de la cellule (Hajri et Abumrad, 2002). Il contribuerait chez l'oiseau au dépôt de lipides dans le muscle grâce au transport de l'acide linoléique (Guo *et al.*, 2013).

Ces deux transporteurs (FABP4 et FAT/CD36) semblent fortement impliqués dans le captage des lipides chez les oiseaux avec une surexpression et une abondance protéique augmentée en période migratoire favorisant ainsi le stockage de lipides au niveau des muscles.

### 3.2.5 La $\beta$ -oxydation

L'oxydation des AG a lieu principalement dans la matrice mitochondriale afin de produire de l'énergie. Il s'agit de la bêta-oxydation ( $\beta$ -oxydation), principale voie de dégradation des AG qui s'active en situation de jeûne, lorsque la lipolyse (correspondant à l'hydrolyse des TG en AG et glycérol à partir du tissu adipeux) est intense et libère de grandes quantités d'AG dans le sang.

Durant la  $\beta$ -oxydation, les AG sont découpés en molécules d'Acétyl CoA grâce à la succession de plusieurs réactions. Elle débute dans le cytoplasme, au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. La première partie de la  $\beta$ -oxydation est l'activation des AG dans le cytoplasme par formation d'une liaison thioester entre le groupement carboxyle de l'acide gras et le groupe thiol du coenzyme A. Les acides gras deviennent alors des Acyl CoA. Alors que les Acyl CoA à courtes chaînes carbonées peuvent diffuser passivement dans la mitochondrie au travers des membranes internes et externes, les Acyl CoA à chaînes longues (supérieures à 20 carbones) nécessitent une prise en charge par un système de transport particulier. Il s'agit d'un complexe enzymatique composé de trois protéines : la Carnitine Palmitoyl Transferase 1 (CPT1), la Carnitine Acyl-Carnitine Translocase (CACT) et la Carnitine Palmitoyl Transferase 2 (CPT2)

(Figure 6). Située sur la membrane externe de la mitochondrie, la CPT1 catalyse le transfert du groupement Acyl des Acyl CoA vers la Carnitine pour former des molécules d'Acyl-carnitine, leur permettant ainsi de franchir les membranes mitochondriales. Ces molécules sont ensuite conduites vers la membrane interne de la mitochondrie par la CACT où elles sont ensuite reconverties en Acyl CoA par la CPT2 (McGarry et Brown, 1997), leur permettant ainsi de rejoindre la  $\beta$ -oxydation dans la matrice mitochondriale.

La CPT1 est estimée comme enzyme limitante de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des AG dans le foie (Eaton, 2002). Chez les Mammifères, trois isoformes (-A, -B et -C) ont été décrites. CPT1-A est exprimée très largement dans le foie et les reins tandis que CPT1-B est majoritairement exprimée dans les muscles et le tissu adipeux chez le rat (Esser 1993 et 1996). Des isoformes, L-CPT1 dans le foie et M-CPT1 dans le muscle, étudiées chez des poulets ont démontré que le jeûne avait pour effet d'augmenter la L-CPT1 mais pas la M-CPT1 suggérant, qu'en situation de jeûne, les muscles de poulet utilisaient préférentiellement les corps cétoniques comme carburant à court terme (Skiba-Cassy *et al.*, 2007). Cela suggère aussi que les gènes codant pour CPT1 sont soumis à un contrôle nutritionnel hormonal.

Quatre étapes vont être nécessaires pour transformer l'Acyl CoA d'acide gras mitochondrial en Acétyl CoA. Parmi celles-ci, la  $\beta$ -oxydation implique l'action de diverses enzymes comme l'Acyl-CoA Déshydrogénase (ACAD). Elle permet de générer des cofacteurs comme NADH utilisables par la chaîne respiratoire dans la production d'énergie (Figure 5).

### 3.2.6 Métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est le principal stérol chez les vertébrés. Élément constitutif essentiel des membranes cellulaires, le cholestérol joue un rôle important dans la modulation de la fluidité et la perméabilité membranaire (Cazeils et al., 1999; Solsona-Vilarrasa et al., 2019). C'est également le précurseur de nombreux composés biologiques actifs tels que les acides biliaires, les hormones stéroïdiennes et la vitamine D (Goedeke et Fernández-Hernando, 2012).

La synthèse du cholestérol est une voie complexe qui se fait à partir d'Acétyl CoA et qui implique plus de 20 réactions successives. L'ensemble des cellules de l'organisme sont impliquées par cette synthèse. Cependant, pour la plupart des animaux, c'est dans le foie que s'effectue le plus de synthèse de cholestérol dite *de novo* (Dietschy *et al.*, 1993).

La synthèse du cholestérol peut se découper en quatre grandes étapes. La première est la condensation de trois molécules d'Acétyl CoA pour former du Mévalonate. Deux molécules d'Acétyl CoA sont condensées en Acétoacétyl CoA par la Thiolase. La condensation de cet Acétoacétyl CoA va former du  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Méthylglutaryl CoA (HMG CoA) tandis que la troisième molécule d'Acétyl CoA est condensée par la HMG CoA synthase (HMGC). Enfin, l'HMG CoA est réduit en Mévalonate par la HMG CoA réductase (HMGCr), enzyme limitant la vitesse de synthèse du cholestérol et la protéine HMGCr est incorporée dans les membranes du RE. La seconde étape est la conversion du Mévalonate en deux isoprènes activés, l'Isopentényl pyrophosphate et le Diméthylallyl phosphate. Durant la troisième étape, six unités d'isoprènes activés sont condensées pour former du squalène. Enfin, lors de la quatrième et dernière étape de synthèse du cholestérol, le squalène est converti en noyau stéroïde. Pour cela, le squalène est oxydé pour former une structure cyclique appelée Lanostérol. Le cholestérol est synthétisé à partir de ce Lanostérol par une série de 20 réactions incluant la déméthylation du Lanostérol par le Lanostérol 14 $\alpha$ -déméthylase (CYP51) (Lepesheva *et al.*, 2007) et la réduction du 7-Désydrocholestérol en cholestérol par la 7- Désydrocholestérol réductase (DHCR7), précurseur ultime de la synthèse du cholestérol (Shefer *et al.*, 1998; Waterham et Wanders, 2000) (Figure 8).

Le cholestérol, une fois formé (majoritairement dans le foie), est stocké sous forme d'esters de cholestérol dans les vacuoles lipidiques ou transporté vers les tissus périphériques. L'estérification est réalisée soit par l'enzyme Acyl CoA Cholesterol Acyl Transférase (ACAT) au niveau hépatique, soit par la Lécithine Cholestérol Acyl Transférase (LCAT), une enzyme plasmatique, qui agit sur les HDL qui ont capté le cholestérol issu des tissus périphérique lors du transport inverse de celui-ci.

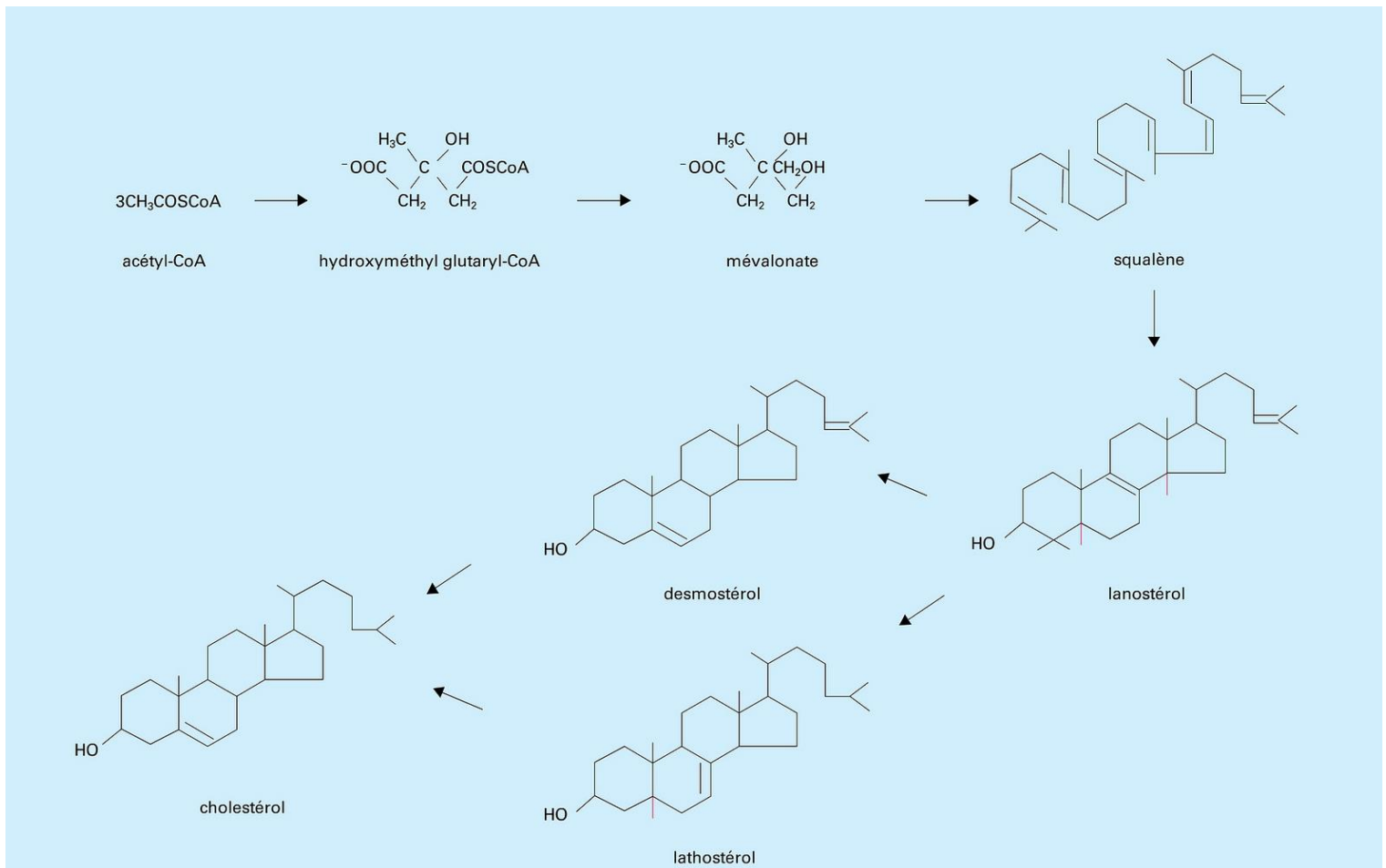
Le transport du cholestérol du foie vers les tissus périphériques est assuré par les VLDL qui migrent jusqu'à la membrane des hépatocytes où ils sont exportés dans l'espace périsinusoïdal également appelé Espace de Disse. Les VLDL sont ensuite hydrolysés par la LPL ce qui entraîne la perte d'apolipoprotéines de surface et donc à la conversion des VLDL en LDL (Goldberg, 1996). Les LDL sont ensuite prises en charge par les LDL récepteurs intégrés dans la membrane des tissus périphériques permettant ainsi la libération du cholestérol (Goldstein et Brown, 2009).

Le transport inverse du cholestérol, c'est-à-dire des tissus périphériques vers le foie ou vers les tissus stéroïdogènes, permet d'éliminer l'excès de cholestérol ou de synthétiser des lipoprotéines, des acides biliaires, des hormones stéroïdiennes ou de la vitamine D (Nofer *et*



*al.*, 2002). Ce transport est principalement assuré par les HDL qui se forment à partir des tissus périphériques et de l'ApoA1. Les HDL sont captées par les récepteurs de ApoA1 ou les Scavenger Receptor B1 (SRB1) au niveau des hépatocytes ou des cellules stéroïdogènes permettant ainsi la libération du cholestérol (Shen *et al.*, 2018).

L'étude du métabolisme du cholestérol chez le canard est intéressante. En effet, l'implication du cholestérol dans la fluidité des membranes (Fantini *et al.*, 2019) pourrait influencer le taux de fonte des foies gras. Il s'agit du pourcentage de graisse perdu pendant la cuisson du foie, un rendement technologique généralement utilisé pour estimer la qualité du foie gras en fonction de l'intégrité des membranes des cellules hépatiques. De plus, des études ont montré le potentiel intéressant des canards mulard à produire une abondante teneur en cholestérol libre en fin de gavage (Hermier *et al.*, 2003; Salichon *et al.*, 1994).



**Figure 8. Schéma simplifié de la synthèse du cholestérol**

<https://www.universalis.fr/encyclopedie/cholesterol/>

### 3.3 Régulation des métabolismes intermédiaires

Le métabolisme intermédiaire constitue l'ensemble des phénomènes de dégradation des nutriments en molécules plus petites (catabolisme) et de synthèse (anabolisme) qui assurent un cycle continu d'échanges entre la cellule et les substrats apportés de façon discontinue par l'alimentation (glucides, lipides et protéines). Parmi les organes, le foie joue un rôle majeur dans la régulation du métabolisme intermédiaire. En effet, situé entre la voie digestive (qui apporte les nutriments par le système porte) et l'ensemble des organes par la circulation générale, il occupe une place stratégique pour la transformation des aliments en composés utilisables par l'organisme et pour assurer la régularité de l'apport des métabolites aux organes alors que les nutriments arrivent de manière discontinue. Il est donc le siège de nombreuses voies métaboliques (métabolisme du glucose, des lipides et des protéines) fortement régulées par le statut nutritionnel par l'intermédiaire d'hormones, notamment les hormones pancréatiques. Parmi celles-ci, l'insuline joue un rôle primordial intervenant notamment dans la voie de signalisation TOR.

La signalisation cellulaire constitue l'ensemble des processus biochimiques qui se déroulent à l'intérieur même de la cellule depuis la fixation d'une molécule « signale » sur son récepteur. Cette fixation conduit à la propagation d'un signal par l'intermédiaire d'une cascade de réactions entre plusieurs protéines de signalisation qui interagiront sur la protéine cible responsable de différentes fonctions telles que la régulation de la transcription d'un gène...etc.

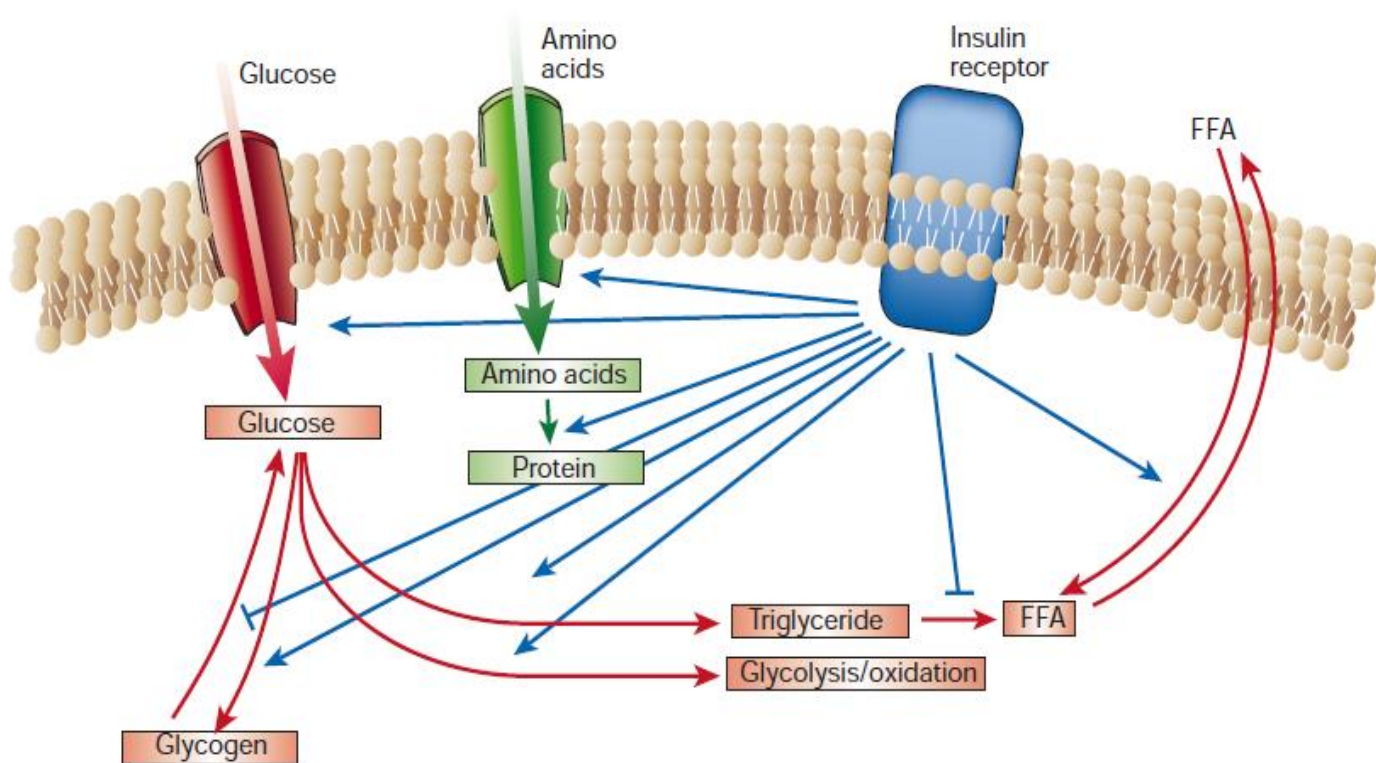
#### 3.3.1 L'insuline

L'insuline fait partie de ces molécules « signales » intervenant dans la régulation du métabolisme intermédiaire. C'est une hormone sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas lors de l'arrivée de glucose dans la circulation porte (Goodridge *et al.*, 1986). Ainsi, son rôle le plus connu reste son implication dans la régulation de la glycémie (maintien de l'homéostasie glucidique). Cependant, l'insuline est l'hormone anabolique la plus puissante et agit sur une grande majorité des tissus de l'organisme favorisant la synthèse et le stockage de glucides, des lipides et des protéines tout en inhibant leur dégradation et leur libération dans la circulation. Ses effets, sur les métabolismes glucidiques, lipidiques et protéiques, s'exercent principalement dans le foie (majoritairement), le tissu adipeux et les

muscles (Capeau, 2003). Elle régule la transcription des gènes en contrôlant la fixation et l'activité de nombreux facteurs de transcription qui se fixent sur des éléments de réponse à l'insuline (ERI) situés pour beaucoup d'entre eux dans les régions promotrices des gènes cibles de l'insuline. Elle stimule l'absorption du glucose (il s'agit de la seule hormone hypoglycémisante), des acides aminés (AA) et des AG libres dans les cellules. Elle augmente également l'expression ou l'activité d'enzymes qui catalysent la synthèse du glycogène (glycogénogénèse), des lipides (lipogenèse *de novo*) et des protéines, tout en inhibant l'activité ou l'expression de celles qui catalysent leur dégradation (glycogénolyse, néoglucogénèse, protéolyse) (Figure 9). Par exemple, des enzymes clés des métabolismes glucidique et lipidique tels que l'ACC ou encore la FAS sont stimulés par l'insuline qui prend ainsi part à la glycolyse et à la formation des AG (Niemeyer *et al.*, 1975 ; Saltiel et Kahn, 2001). Dans le foie, pour agir, l'insuline se fixe sur son récepteur et induit un signal qui active la translocation nucléaire du facteur de transcription Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c (SREBP1c) activant ainsi des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse (Dentin *et al.*, 2005). L'insuline jouerait également un rôle dans la sécrétion des lipoprotéines en diminuant la clairance d'ApoB et en diminuant l'expression d'*apob* (Haas *et al.*, 2013). L'insuline inhiberait également l'expression du gène *cpt1* codant pour une enzyme clé de la  $\beta$ -oxydation (Park *et al.*, 1995).

Comparés aux mammifères, les poulets et les canards, malgré un taux d'insuline circulant normal (3 à 4 ng/mL) (Berradi *et al.*, 2004 ; Chartrin *et al.*, 2006), la glycémie reste très élevée (2 g/L) (Davail *et al.* 2003 ; Simon *et al.* 2011), bien qu'aucune résistance à l'insuline n'ait été démontrée (Gontier *et al.* 2013).

L'insuline possède un récepteur transmembranaire spécifique InsR (Insulin Receptor) appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Cette famille comprend également les récepteurs de différents facteurs de croissance tel que l'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1). Le récepteur à l'insuline est un hétérodimère composé de deux sous-unités  $\alpha$  extracellulaires reliées par des ponts disulfures à deux sous-unités  $\beta$  transmembranaires qui possèdent le domaine tyrosine kinase (White, 1997). Pour activer son récepteur, l'insuline se fixe sur l'une des deux sous-unités  $\alpha$ . Cela induit des modifications de conformation du récepteur et une activation du domaine tyrosine kinase de l'une des deux sous-unités  $\beta$ . S'en suit une série d'autophosphorylations de résidus tyrosine présents dans la sous-unité  $\beta$ .



**Figure 9. La régulation du métabolisme par l'insuline** (Saltiel et Kahn, 2001)

FFA : acides gras libres.

L'une des principales voies de signalisation de l'insuline est celle de la Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) (Avruch, 1998) (Figure 10). Elle régule en particulier l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire et de la synthèse protéique. Elle joue également un rôle important dans le transport du glucose. Une autre voie importante de la signalisation insulinique est la voie Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) (Avruch, 1998). Cette voie est commune à de nombreux facteurs de croissance et est impliquée dans la régulation de la croissance, de la différenciation et de la prolifération cellulaire. Les voies PI3K-Akt et MAPK sont interconnectées entre elles et participent à l'activation l'une de l'autre. Mon travail de thèse ayant porté principalement sur l'étude du métabolisme intermédiaire chez le canard mulard, la voie MAPK ne sera pas étudiée davantage dans cette étude bibliographique.

Une fois la liaison insuline-récepteur réalisée, le récepteur débute la transmission du signal insulinique en phosphorylant plusieurs substrats intracellulaires sur des résidus tyrosine. Au moins 9 substrats intracellulaires communs aux récepteurs de l'insuline et de l'IGF1 ont été identifiés. Parmi eux, les Insulin Receptor Substrates (IRS), dont les principaux représentants sont IRS-1 et -2, jouent des rôles complémentaires dans la signalisation de l'insuline (White, 2002). Lorsque le substrat IRS-1 est phosphorylé, celui-ci va recruter et activer l'enzyme PI3K qui va former du Phosphatidilinositol-3-Phosphate (PIP3). Au niveau de la membrane plasmique, PIP3 va recruter des protéines telles que la protéine Akt auquel il va se lier pour l'activer (Figure 10).

La fin du signal insulinique implique la dégradation de l'hormone après internalisation des récepteurs dans les endosomes. Ceux-ci sont soit recyclés au niveau de la membrane soit dégradés. En conditions physiologiques, des récepteurs sont alors nouvellement synthétisés afin de restaurer le nombre de récepteurs nécessaires à la cellule pour une bonne homéostasie. On parle de résistance à l'insuline lorsque les cycles d'internalisation / recyclage des récepteurs aboutissent à une diminution du nombre de récepteurs disponibles en surface (Capeau, 2003). Une résistance ou une déficience insulinique entraîne des problèmes importants de régulation du métabolisme (Saltiel et Kahn, 2001). Chez le canard gavé, on observe une hyperinsulinémie associée à une hyperglycémie bien qu'aucune résistance à l'insuline n'ait été mise en évidence (Gontier *et al.*, 2013).

### 3.3.2 La protéine Akt

La protéine Akt ou protéine kinase B représente un nœud essentiel de la signalisation de l'insuline. A partir de cet élément, les voies de signalisation vont bifurquer pour permettre à l'insuline d'assurer ses différentes fonctions. Lorsqu'elle est inactivée, la protéine Akt se trouve principalement dans le cytosol. Lors d'une stimulation insulinique (activation de PI3K et recrutement par PIP3), Akt est mobilisée vers la membrane plasmique (Vanhaesebroeck et Alessi, 2000) (Figure 10).

Une fois activée, la protéine Akt peut participer à la régulation de nombreux processus biologiques tels que le transport du glucose, la synthèse de glycogène, la synthèse protéique ou encore l'expression des gènes en phosphorylant différents substrats tels que la protéine kinase TOR (Target of Rapamycin). Akt joue notamment un rôle clé dans le transport du glucose

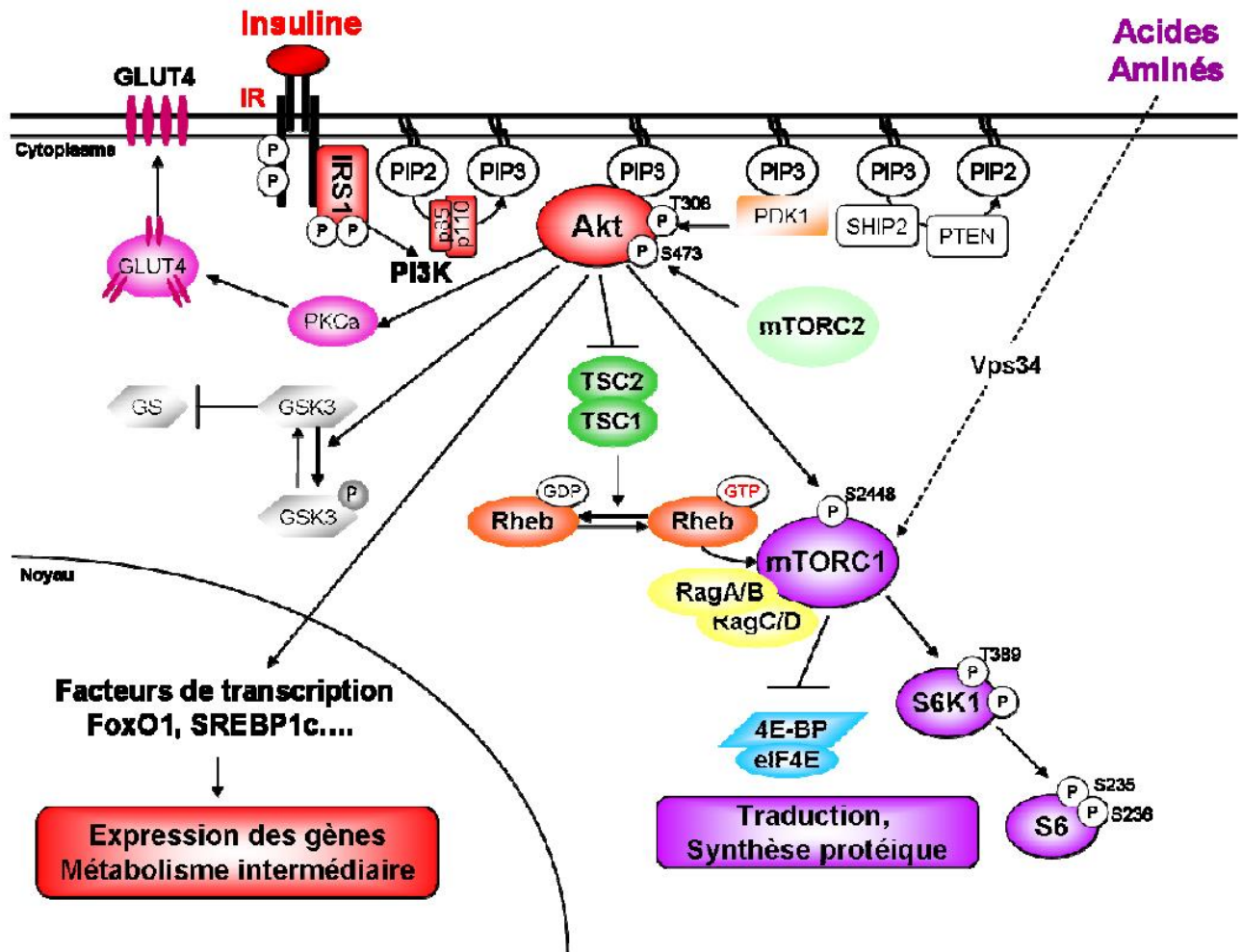


Figure 10. Voies de signalisation de l'insuline et des acides aminés

Akt : Protéine kinase B ; FoxO1 : Forkhead box protein O1 ; GLUT : Glucose Transporter ; GS : glycogène synthase ; GSK3 : GS kinase-3 ; IR : récepteur à l'insuline ; IRS : substrat de IR ; MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase ; mTORC1 : mammalian target of rapamycin complex 1 ; PI3K : Phosphatidylinositol 3 Kinase ; PIP : Phosphatidylinositol-3-Phosphate ; Rheb : Ras homologue enriched brain ; SREBP1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c ; TSC : tuberous sclerosis complex.

puisqu'elle est à l'origine de la translocation des transporteurs de glucose GLUT4 vers la membrane plasmique permettant ainsi la captation du glucose extracellulaire par les cellules musculaires et les adipocytes (Sano *et al.*, 2003). De même, sous stimulation insulinique, Akt contribue à augmenter la synthèse de glycogène lorsqu'il phosphoryle la protéine Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) dont le rôle est d'inhiber la glycogène synthase (Frame et Cohen, 2001).

La régulation de l'expression de gènes comme ceux de la lipogenèse dépendent également de Akt qui contrôle l'activité de différents facteurs de transcription et notamment ceux de la classe des Forkhead (FOX) (Taniguchi *et al.*, 2006). En effet, Akt activée par l'insuline va phosphoryler FoxO1 sur la sérine 256 ce qui va entraîner l'exclusion nucléaire de ce facteur et sa séquestration dans le cytoplasme (Taniguchi *et al.*, 2006). L'inactivation de FoxO1 conduit ensuite à une diminution de l'expression de ses gènes cibles.

### 3.3.3 La voie TOR et ses effecteurs

Parmi les cibles de l'insuline, on peut citer la voie TOR (Target of Rapamycin) qui joue un rôle essentiel dans la régulation de la croissance cellulaire et de la synthèse protéique. Son activation dépend de Akt qui, sous stimulation de l'insuline, phosphoryle et inactive le Tuberous Sclerosis Complex (TSC1/TSC2) (Taniguchi *et al.*, 2006). TSC2 exerçant une inhibition du complexe TOR, l'intervention d'Akt directement sur TSC2 induit une perturbation du complexe TSC1/TSC2 puis une inactivation levant ainsi l'inhibition sur le complexe TOR.

La protéine kinase TOR est une sérine/thréonine kinase. Elle a été initialement identifiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* lors d'un criblage pour la résistance à la rapamycine, une drogue isolée de la bactérie du sol *Streptomyces hygroscopicus*, qui possède des propriétés immunosuppressives. Des mutations présentes sur les gènes TOR1 et TOR2 de cette levure confèrent une résistance aux effets toxiques de la rapamycine ce qui a permis d'identifier les protéines TOR comme cibles potentielles de la rapamycine (Lorenz et Heitman, 1995). Chez les mammifères, la protéine mTOR (mammalian Target of Rapamycin) est responsable de l'activité catalytique de deux complexes protéiques : mTORC1 (sensible à la Rapamycine) et mTORC2.

La protéine TOR peut être phosphorylée par Akt sur différents sites tels que le résidu sérine 2448 (Ser2448) et le résidu thréonine 2446 (Thr2446) (Bai et Jiang, 2010). La phosphorylation

sur Ser2448 est induite par la protéine Akt en réponse à l'insuline (Nave *et al.*, 1999) mais également par la protéine S6 kinase 1 (S6K1). Cela se produit au sein du complexe mTORC1 pour son activation (Copp *et al.*, 2009). La Thr2446 quant à elle est phosphorylée par la protéine cAMP activated protein kinase (AMPK) à la hausse en situation de jeûne ou à la baisse lors d'une stimulation d'insuline (Cheng *et al.*, 2004).

Lorsque le complexe mTORC1 est activé, il démarre la synthèse protéique en phosphorylant deux effecteurs majeurs impliqués dans la régulation de la traduction protéique : Eucaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1) et S6 kinase 1 (S6K1). L'état de phosphorylation de ces effecteurs est considéré comme un bon indicateur de l'état d'activité du complexe mTORC1.

La protéine 4EBP1 est un régulateur de l'initiation de la traduction. Il s'agit d'une protéine inhibitrice de l'initiation de la traduction. Son activité est régulée par son état de phosphorylation induit par la protéine mTOR. Plus l'activité de mTOR est élevée et plus 4EBP1 est phosphorylée ce qui l'empêche de créer des liaisons avec Eukaryotic translation Initiation Factor 4 (eIF4), facteur impliqué dans la phase d'initiation de la traduction des protéines (Hay et Sonenberg, 2004).

La protéine S6K1 est une sérine/thréonine kinase. Elle est impliquée dans la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 de la sous-unité 40S du ribosome. Elle peut être activée par mTOR en réponse à une stimulation par l'insuline ou en présence d'acides aminés. Ainsi, un traitement à la Rapamycine (qui va se lier à mTORC1 et inhiber son activité kinase) peut abolir son activité tout comme une privation en acides aminés (Dufner et Thomas, 1999). L'activation de S6K1 implique son changement de conformation. Pour cela, elle subit des phosphorylations au niveau de ses résidus sérine et thréonine puis est phosphorylée par mTORC1 en Thr389. Il s'agit d'une des étapes critiques pour l'activation de la fonction kinase de S6K1 (Saitoh *et al.*, 2002). Une fois activée, S6K1 peut ensuite phosphoryler la protéine ribosomale S6 qui participera à la traduction des ARNm qui codent entre autres pour des facteurs d'élongation ou encore des protéines ribosomales (Jefferies *et al.*, 1997) (Figure 10).



### 3.3.4 Les acides aminés

Les acides aminés (AA) sont des macronutriments dont l'équilibre dans l'organisme dépend des apports nutritionnels. En effet, on distingue les AA non essentiels qui peuvent être synthétisés *de novo* par l'organisme des AA essentiels, non synthétisés par l'organisme et qui doivent être apportés par l'alimentation. De plus, les AA libres ne peuvent être stockés dans les tissus contrairement au glucose (sous forme de glycogène) ou aux AG (sous forme de TG) rendant indispensable l'ingestion régulière d'un apport protéique équilibré en AA.

Les AA sont des substrats de la synthèse protéique. Ils stimulent la synthèse protéique *in vitro* et *in vivo* (Kimball et Jefferson, 2002). Ils sont d'autant plus importants qu'ils sont impliqués dans le métabolisme intermédiaire. En effet, leur dégradation peut servir à la synthèse d'AG ou de glucose mais aussi à la formation de composés azotés. Les AA à chaînes ramifiées (valine, isoleucine et leucine plus particulièrement) sont impliqués dans la régulation de la synthèse protéique (Crozier *et al.*, 2005) et l'initiation de la traduction (Figure 11).

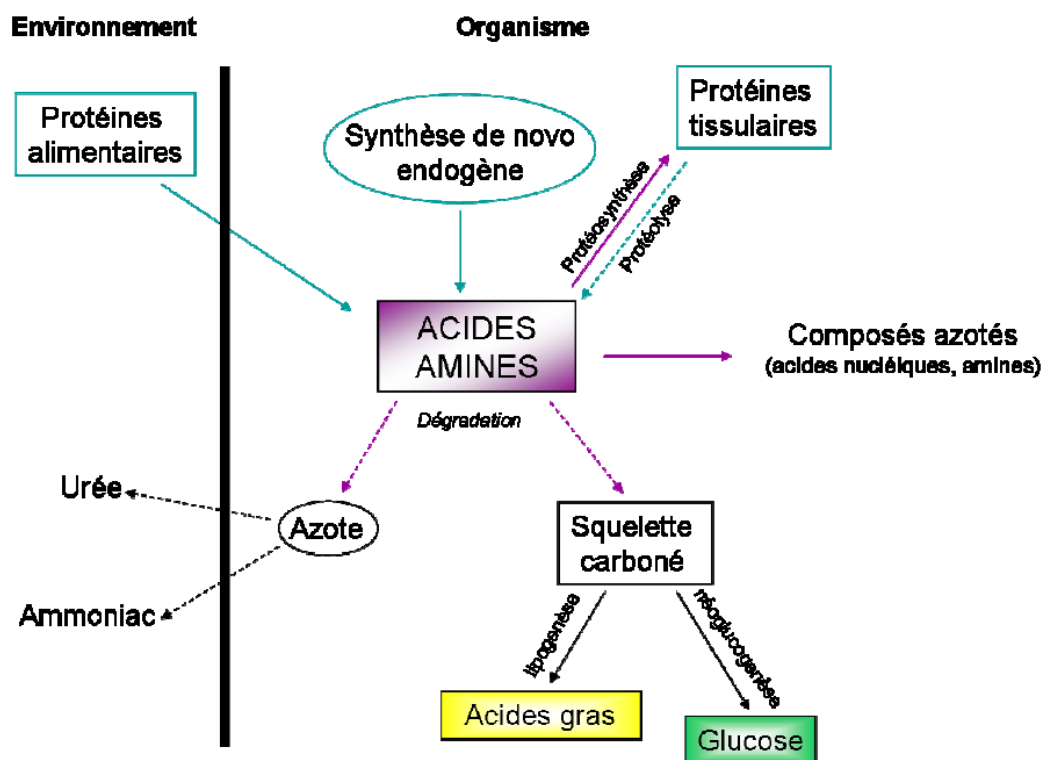


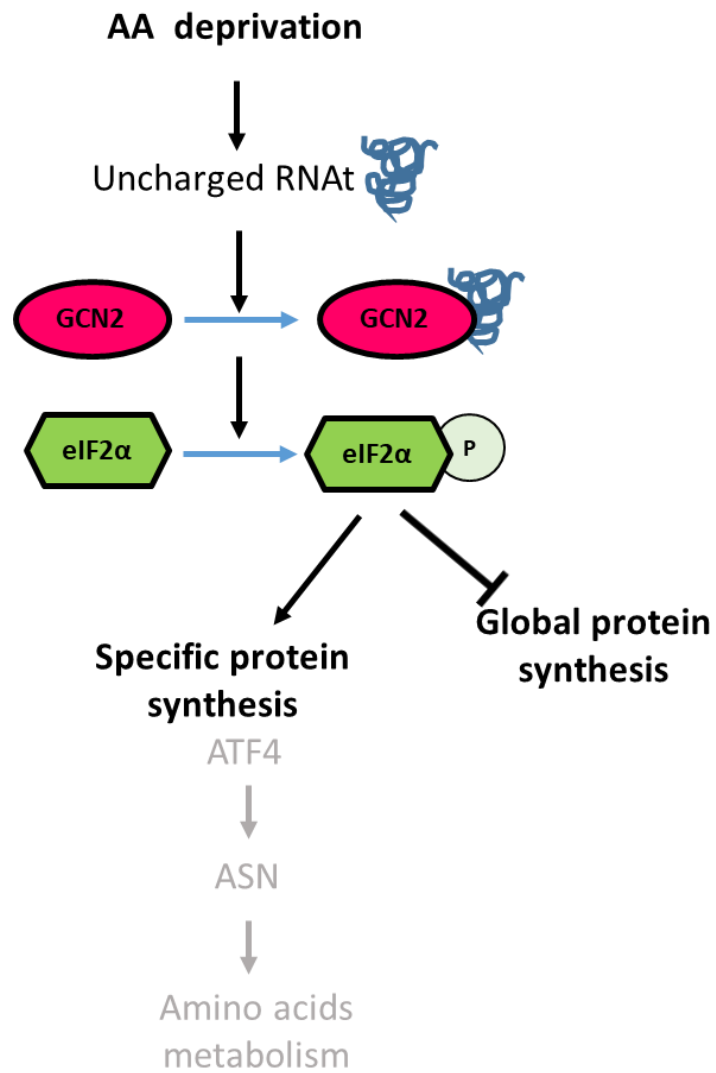
Figure 11. Les acides aminés : origine et devenir (Lansard *et al.*, 2010)

Afin de répondre aux variations de l'apport alimentaire en AA, deux principales voies de signalisation sont mises à contribution et régulent la synthèse des protéines de façon opposées. La première est la voie mTOR (vue précédemment, commune à l'insuline) qui s'active lorsque les AA sont en quantité suffisante et qu'ils contrôlent positivement la phase d'initiation de la traduction des ARNm (Laplante et Sabatini, 2009). Dans ce cas, les AA régulent la synthèse protéique par un effet signal participant à l'activation du complexe mTORC1 et de ses effecteurs 4EBP1 et S6K1. Contrairement à l'activation par l'insuline, celle-ci est indépendante du complexe TSC1/TSC2.

La seconde voie implique la protéine kinase GCN2 (General Control Non-repressible 2) définie comme le senseur du déficit en AA qui stimule la voie de réponse aux AA (AAR) lorsqu'un déséquilibre en AA essentiels est détecté (Kilberg *et al.*, 2009). En effet, lors d'un déficit en AA, la concentration d'ARN de transfert non chargés à l'intérieur de la cellule augmente. La kinase GCN2 possède un domaine homologue à l'histidyl-tRNA synthétase qui lui permet de se lier à ces ARN de transfert non chargés et de s'activer faisant d'elle un véritable senseur de la disponibilité en AA impliquée dans la régulation de l'expression des gènes lors d'une carence en AA (Dong *et al.*, 2000). Une fois activée, GCN2 va phosphoryler son unique substrat connu : la sous-unité  $\alpha$  du facteur d'initiation de la traduction eIF2 (Eukaryotic initiation factor 2) sur la Ser51 (Zhang *et al.*, 2002). Cette action aura pour conséquence une inhibition de la formation du complexe d'initiation de la traduction soit une forte diminution de la synthèse protéique. Cependant, parallèlement, la traduction d'ARN messagers spécifiques tel que ATF4 (Activating Transcription Factor 4) va augmenter. Cela est possible grâce à deux uORFs (Upstream Open Reading Frame) présents au niveau de la région non traduite 5' (5'UTR) de l'ARNm de ATF4. L'induction de la synthèse de ATF4 permet la transcription de certains gènes cibles qui possèdent dans leur promoteur des éléments de réponses aux AA (AARE ou Amino Acids Response Element) afin de promouvoir la survie cellulaire (Averous *et al.*, 2004; Kilberg *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2004) (Figure 12).

Ainsi, la voie GCN2 ne régule pas seulement le taux de synthèse protéique mais contrôle également l'expression de gènes spécifiques qui sont impliqués dans l'adaptation des cellules à cette situation de stress lors d'une carence en AA. On peut ainsi citer le gène qui code pour l'enzyme asparagine synthétase (AS). Cette enzyme catalyse la synthèse d'asparagine à partir de l'aspartate et de la glutamine. De plus, la voie GCN2 jouerait un rôle dans la régulation du métabolisme lipidique en situation de déficit en AA essentiels et plus particulièrement en déficit

prolongé en leucine induisant une répression de l'expression et de l'activité d'enzymes de la lipogenèse (Guo et Cavener, 2007).



**Figure 12. Voie de réponse au déficit en acide aminé**

ASN : Asparagine Synthétase ; ATF4 : Activating Transcription factor 4 ; eIF2α : Eukaryotic initiation factor 2; GCN2 : General Control Non-repressible 2.

## 4. La stéatose hépatique

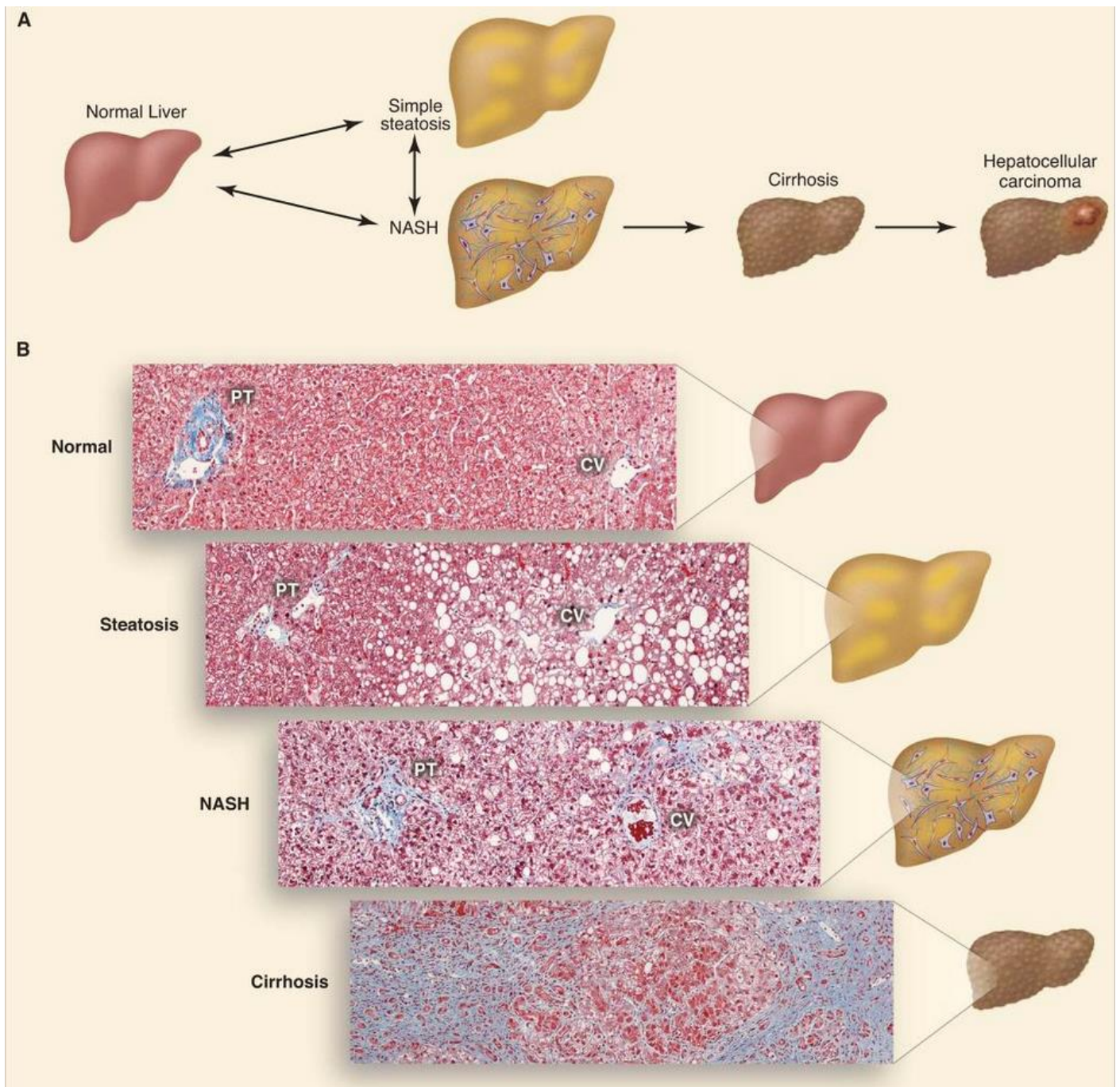
La stéatose hépatique se caractérise par une accumulation de lipides dans le foie sous forme de TG. Chez les animaux migrateurs, cet état physiologique est un moyen naturel de stockage d'énergie (Dolnik et Blyumental, 1967) tandis que chez l'homme et autres mammifères, il s'agit d'une situation pathologique. Chez les palmipèdes, la stéatose hépatique est volontairement induite par gavage pour la production de foie gras.

### 4.1 Chez les mammifères

La stéatose hépatique chez les mammifères et plus particulièrement chez l'homme est appelée NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease). Cette maladie est le dernier pallier d'un spectre de maladies. Cela part d'une stéatose hépatique simple en passant par des étapes d'inflammation et de fibrose jusqu'à atteindre la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire souvent accompagné d'insuffisance hépatique menant à la mort (Ray, 2013).

La NAFLD se caractérise par une accumulation excessive de lipides dans les hépatocytes ( $\geq$  5% du poids du foie) (Byrne et Targher, 2015). La NASH (Non-Alcoholic Steatohepatitis, aussi communément appelée maladie du soda ou maladie du foie gras humain) est la forme progressive de la NAFLD qui se définit par une stéatose accompagnée d'une inflammation lobulaire et de ballonnisation (Brunt, 2010) (Figure 13).

La NAFLD est devenue la principale cause de maladie hépatique chronique dans de nombreuses régions du monde (Masuoka et Chalasani, 2013). Elle est considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique (Smith et Adams, 2011). Dans la majorité des cas, chez le patient adulte, la NAFLD ou la NASH sont associées à une insulino-résistance (Marchesini *et al.*, 1999) et à des complications phénotypiques du type : diabète de type 2, obésité, hypertension artérielle, hyperglycémie ou hyperlipidémie (Adams, 2005).



**Figure 13. Spectre de la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) (Cohen *et al.*, 2011)**

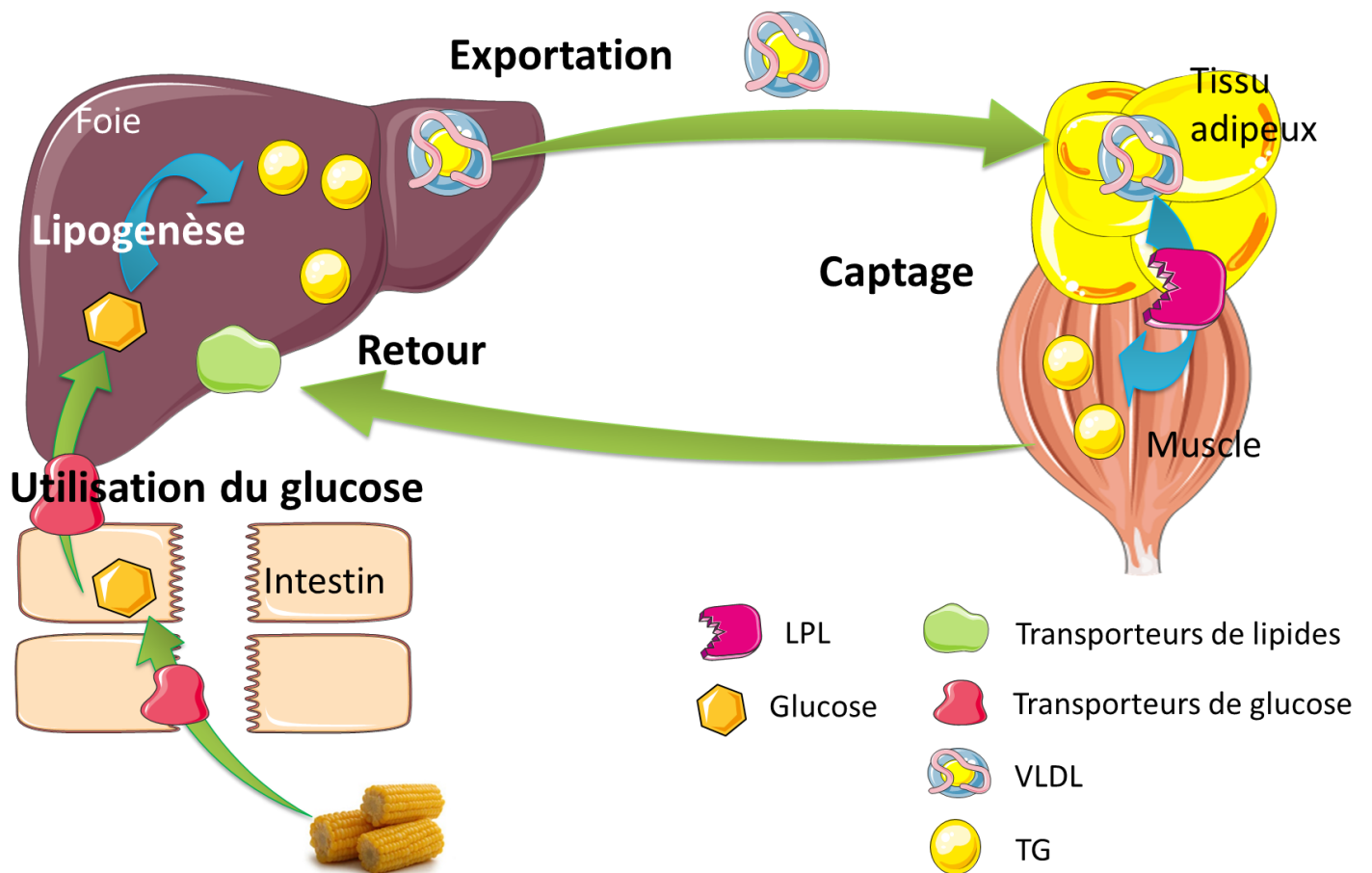
(A) Schéma de progression de NAFLD, (B) Coupes histologiques illustrant le foie normal, la stéatose, la stéatohépatite non alcoolique (NASH) et la cirrhose. PT : triade portale ; CV : veine centrale.

## 4.2 Chez les palmipèdes

Contrairement à la stéatose hépatique chez l'homme, celle induite chez les palmipèdes est considérée comme non pathologique et en grande partie réversible (Babile *et al.*, 1998; Bénard *et al.*, 1998). Notion néanmoins controversée aujourd'hui...

La stéatose hépatique chez le canard, dans le cadre de la production du foie gras, est un état physiologique stimulé par le gavage. En effet, la pâtée de gavage est un aliment composé quasi exclusivement de maïs. C'est donc un aliment riche en glucides apportés par l'amidon (>85%), très énergétique et pauvre en facteurs lipotropes assurant l'exportation des lipides ce qui entraîne une forte synthèse des AG et donc une activité hépatique intense de la lipogenèse *de novo*. De plus, le choix du maïs, connu pour être faiblement pourvu en choline, acide folique, méthionine et vitamine B12, est primordial pour assurer ce développement. En effet, des études menées sur des rats soumis à des régimes carencés en choline ou un autre de ces différents éléments ont montré un développement des stéatoses hépatiques dues à un apport insuffisant en donneurs de méthyle qui a conduit à une augmentation de la teneur du foie en homocystéine permettant la surexpression de SREBP-1 qui a activé secondairement la lipogenèse (Kumar *et al.*, 2013; McNeil *et al.*, 2008, 2009; Roblin *et al.*, 2007). L'accumulation exacerbée de lipides dans le foie (principalement de TG) (Fernandez *et al.*, 2011) chez le canard est le résultat de 4 mécanismes : 1- l'intensité de la lipogenèse hépatique, 2- le dysfonctionnement du système d'exportation des lipides issus de la lipogenèse vers les tissus périphériques, 3- un défaut de captage des lipides par les tissus périphériques (notamment sous l'action de la LPL), 4- une clairance hépatique élevée des lipides circulants (Figure 14).

Ainsi, chez l'oie, la stéatose hépatique peut multiplier le poids du foie par 10 en deux semaines de gavage, passant de 100g à 1Kg (Hermier *et al.*, 1999) et par 7 pour le canard (de 80g à 550g). Il existe cependant une forte variabilité de la réponse au gavage en fonction de l'animal (canard ou oie) ou du génotype utilisé. Le canard mulard est considéré comme le meilleur producteur de foie gras chez les canards (Chartrin *et al.*, 2006a; Hermier *et al.*, 2003).



**Figure 14. La stéatose hépatique induite par le gavage**

LPL: lipoprotéine lipase ; TG : triglycérides ; VLDL : Very Low Density lipoprotein

## 5. Le foie gras

### 5.1 Caractéristiques et qualités

Le canard mulard est très largement apprécié pour la qualité de son foie gras. L'effet d'hétérosis qu'il bénéficie de ses parents lui permet de produire un foie de poids supérieur aux types parentaux. De plus, le canard mulard présente une capacité d'ingestion jusqu'à 25% supérieure (Baéza *et al.*, 2005). Un foie gras cru de canard pèse le plus souvent entre 450 et 600g. Toutefois, pour avoir la dénomination Foie Gras, un poids minimum de 300g est à respecter.

D'autres paramètres ou caractéristiques incombent au foie gras afin d'être commercialisé. Tout d'abord l'espèce utilisée : le foie doit provenir exclusivement d'oies (*Anser anser*) ou de canards mâles (canard de Barbarie ou canard mulard) spécialement gavés pour la production de foie gras.

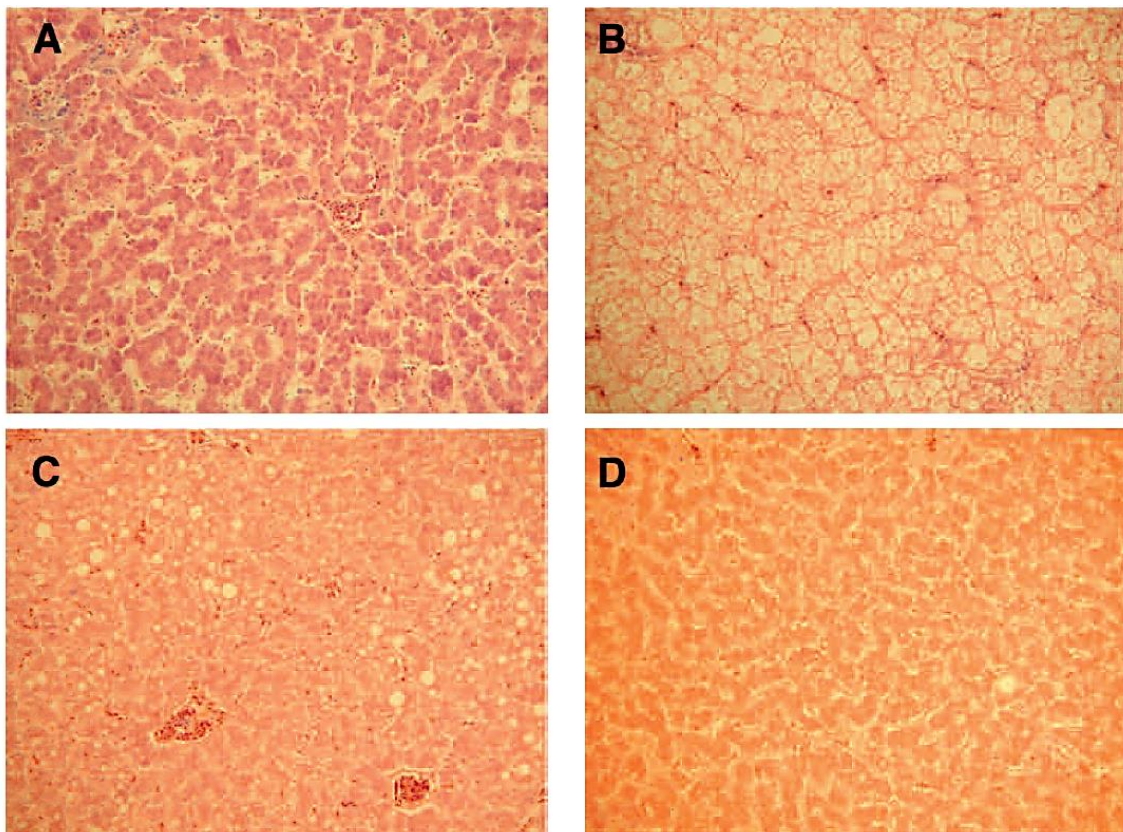
Ensuite, la texture du foie doit être lisse, ferme et onctueuse. Sa couleur, quant à elle, est fonction de la variété de maïs utilisé. Elle doit être uniforme, sans tâche, de l'ocre clair au blanc rosé. Le foie ne doit également présenter aucune anomalie d'origine pathologique telles que des scléroses, parasitoses ou nécroses.

Enfin, un paramètre essentiel dans la production de foie gras est le taux de fonte. En effet, la capacité à retenir les lipides lors de la cuisson constitue la principale qualité technologique du foie gras. La fonte est l'exsudation lipidique qui a lieu lors des traitements thermiques de conservation par pasteurisation ou stérilisation (Théron *et al.*, 2011). Du point de vue du consommateur, une fonte excessive du foie gras à la cuisson cause une dépréciation visuelle pouvant influencer directement la décision d'achat. La conformité réglementaire implique un niveau de taux de fonte du foie inférieur à 30% de sa masse initiale selon le décret n° 93-999 du 9 août 1993. Cependant, une variabilité de 43% du taux de fonte du foie gras à la cuisson existe et cause une hétérogénéité des produits finis. Un modèle de prédiction du taux de fonte mettant en jeu la matière sèche, le taux de protéines et le poids de foie a été proposé par Théron *et al.*, (2011) mais ne permet pas d'expliquer cette si grande variabilité.



## 5.2 Composition structurale

L'aspect cellulaire du foie est modifié au cours du gavage. L'infiltration lipidique débute en zone péri-portale pour gagner progressivement l'espace centro-lobulaire (Benard et Labie, 1998 ; Labie et Tournut, 1970). En début de gavage, les lipides stockés dans le cytoplasme des hépatocytes forment des micro-vacuoles qui grossissent progressivement sur la durée du gavage pour former des macro-vacuoles occupant tout l'espace en fin de gavage (Locsmándi *et al.*, 2007). Ces modifications structurales observées dans le foie au cours du gavage sont réversibles. En effet, un retour des hépatocytes à des structures identiques à celles d'animaux non gavés a été observé lors d'études histologiques (Babile *et al.*, 1998; Benard *et al.*, 2006) (Figure 15) et par tomographie (Locsmándi *et al.*, 2005).



**Figure 15 : Coupe histologiques de foie de canard, coloration Lillie Pasternak (Gx250)**  
(Benard *et al.*, 2006)

(A) Canard témoin (non gavé) ; (B) Canard gavé durant 2 semaines. On remarque le maintien de l'architecture cellulaire ainsi que la présence de nombreuses vacuoles lipidiques de type micro- et macrovacuolaire ; (C) Canard sacrifié à l'issue de deux cycles de gavage. On remarque la présence de cellules maigres en zone centro-lobulaire et de cellules contenant quelques vésicules lipidiques au voisinage des espaces portes ; (D) Canard sacrifié à l'issue de 3 cycles successifs gavage-alimentation libre. La plus grande partie des hépatocytes ne présentent plus de surcharge graisseuse.

### 5.3 Composition biochimique

La composition biochimique du foie au cours du gavage a été étudiée notamment chez le canard de Barbarie (Figure 16 et Tableau 2). Dès les premiers jours de gavage, le poids de foie augmente significativement. Cela est dû principalement à l'accumulation de lipides (principalement de TG), signe d'une intense lipogenèse hépatique (Baudonnet-Lenfant, 1993).

Au cours du gavage, la teneur en TG augmente considérablement et passe de 1 à 53 %. En fin de gavage, les TG représentent la fraction majoritaire des lipides totaux (90%) du foie (Baéza *et al.*, 2013). Les TG du foie sont composés majoritairement d'AG mono-insaturés (AGMI), en particulier l'acide oléique (45% en fin de gavage) et les acides palmitique et palmitoléique qui diminuent au cours du gavage (Baudonnet-Lenfant, 1993).

La forte augmentation des TG dans le foie au cours du gavage se fait au détriment de la teneur en protéines qui passe de 16 à 6% et de la teneur en eau qui décroît de 68 à 32% en 12 jours de gavage (Baeza *et al.*, 2013). Une augmentation de la quantité d'eau est cependant observée dans la première phase de gavage et explique l'augmentation pondérale du foie observée. Cette teneur en eau se stabilise en cours de gavage puis augmente faiblement en fin de gavage (Baudonnet-Lenfant, 1993).

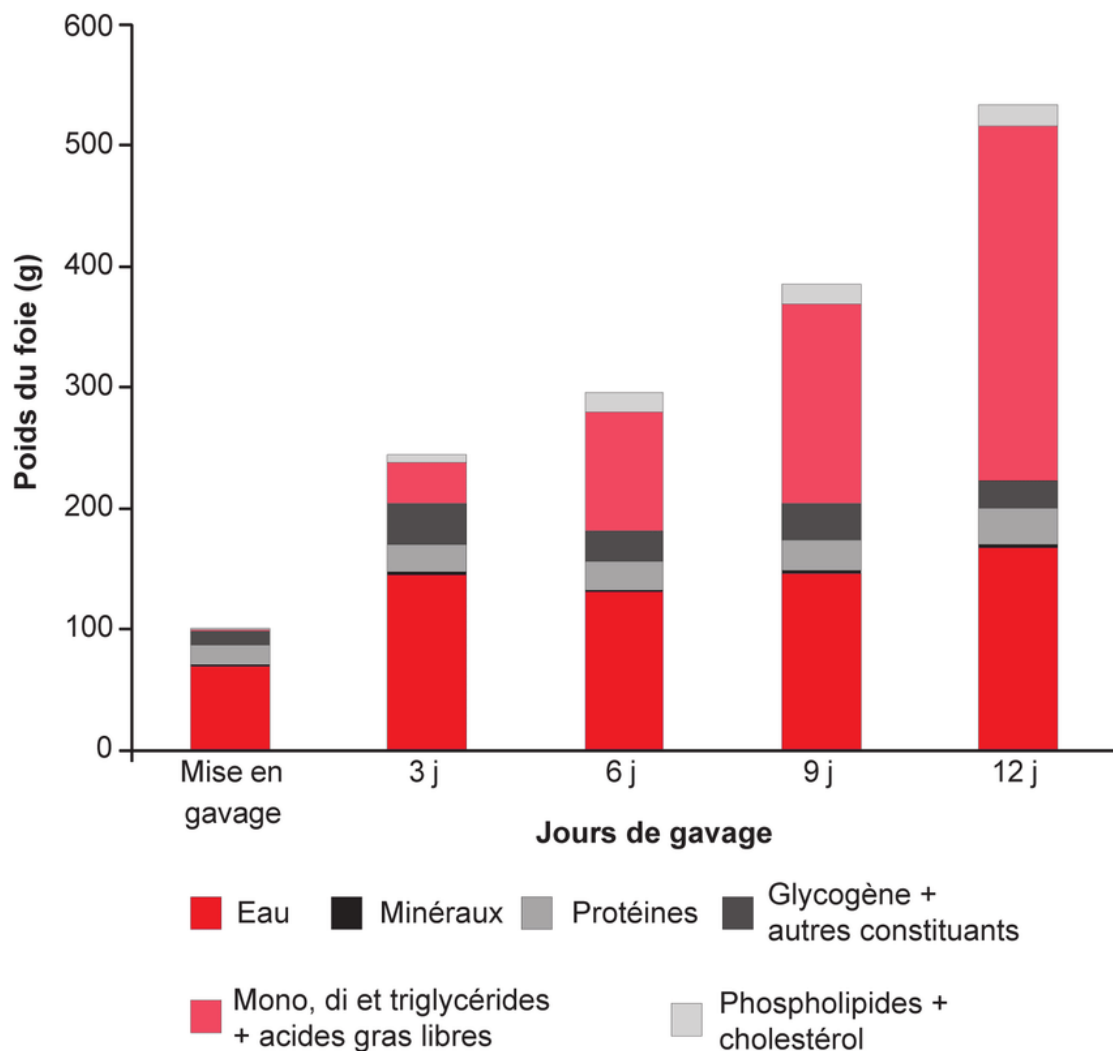
Le gavage induit également des modifications de la composition des lipides membranaires des hépatocytes. Les phospholipides (PL) et cholestérol membranaires augmentent tout au long du gavage (Baudonnet-Lenfant, 1993; Leclercq *et al.*, 1975). Leurs teneurs sont multiplié par 1,5 mais le ratio cholestérol/PL n'est pas affecté (Molee *et al.*, 2005). En effet, une accumulation d'AG néo-synthétisés et plus particulièrement d'acide oléique au niveau des PL membranaires a été observée (Cazeils *et al.*, 1999). De plus, la teneur en phosphatidyléthanolamine est significativement augmentée en fin de gavage au niveau des membranes des hépatocytes au détriment de la teneur en phosphatidylcholine ce qui pourrait modifier la fluidité membranaire (Molee *et al.*, 2005).

### 5.4 Paramètres plasmatiques

La glycémie des canards est deux fois plus élevée que celle des mammifères même après un jeûne de courte durée (Hazelwood et Lorenz, 1959). Chez le canard gavé, la glycémie peut varier en fonction du temps de prélèvement et peut aller jusqu'à 4g/L après le dernier repas

(Farhat et Chavez, 2000). Cependant, aucune insulino-résistance n'a été démontrée chez les canards. En effet, des canards ayant reçu des injections d'insuline sur toute la durée du gavage ont conservé une glycémie faible (Gontier *et al.*, 2013).

Les concentrations en triglycérides, cholestérol et AG plasmatiques sont connues pour augmenter au cours du gavage des canards avec des variations dépendantes du type génétique (Baéza *et al.*, 2005; Gontier *et al.*, 2013; Tavernier *et al.*, 2017).



**Figure 16. Evolution de la composition chimique du foie au cours du gavage de canards de Barbarie (Baudonnet-Lenfant, 1993)**

**Tableau 2. Effet du gavage sur les lipides circulants (mmol/L), l'insulinémie ( $\mu\text{U}/\text{mL}$ ) et la glycémie (g/L) des canards mulard, plus de 12 heures après leur dernier repas (Baéza *et al.*, 2013)**

(moyenne  $\pm$  écart type, n=8)

	Mulard	
	Maigre	Gavé
Phospholipides	4,12 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>	5,15 $\pm$ 1,15 <sup>a</sup>
Triglycérides	1,37 $\pm$ 0,39 <sup>b</sup>	2,98 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>
Cholestérol total	5,18 $\pm$ 0,66 <sup>b</sup>	6,23 $\pm$ 1,51 <sup>a</sup>
Insulinémie	6,5 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	14,4 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>
Glycémie	1,56 $\pm$ 0,14	1,62 $\pm$ 0,14

<sup>a, b</sup> : effet significatif du gavage à  $P < 0,001$ .

## 6. Quelques mécanismes de protection cellulaires

Il semble intéressant d'étudier certains mécanismes de protection cellulaires afin de mieux comprendre comment les canards gavés peuvent gérer une telle accumulation de lipides dans le foie sans lipotoxicité apparente. Il a déjà été démontré que le stress oxydatif et l'inflammation (mécanisme non développé dans cette introduction) jouent un rôle clé dans la progression de la NAFLD ou la NASH) (Yang *et al.*, 2019). Mais d'autres mécanismes de protections tels que l'autophagie, la réponse UPR ou l'apoptose sont certainement mis à contribution afin de prévenir une évolution pathologique de la stéatose hépatique.

### 6.1 Le stress oxydant

Le stress oxydant ou stress oxydatif se définit par un déséquilibre entre la production d'espèces radicalaires de l'oxygène (ERO) et les capacités cellulaires antioxydantes. En effet, la concentration basale des ERO est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants (Halliwell, 1989). Cependant cette homéostasie peut être modifiée par une production excessive d'ERO (vieillesse, athérosclérose...) ou par une diminution des capacités antioxydantes (comme chez les personnes souffrant d'obésité, les fumeurs...). On parle alors de stress oxydant. Un tel

déséquilibre peut être provoqué de façon régulée par l'activation de systèmes de production d'ERO. La réponse antioxydante est alors efficace pour compenser cette production et le déséquilibre est transitoire. En revanche, dans certaines situations pathologiques (cancer), la production d'ERO est plus importante et prolongée, et la réponse antioxydante insuffisante. Le déséquilibre est durable. Cette rupture de l'homéostasie rédox peut avoir plusieurs origines : stress d'origine exogène (agents environnementaux pro-oxydants), intoxication aux métaux lourds, irradiations, carence en antioxydants apportés par l'alimentation ou anomalies génétiques (Migdal et Serres, 2011).

Le stress oxydant est connu pour être induit dans le foie des patients atteint de NAFLD (Videla *et al.*, 2004) et pour jouer un rôle dans la progression de la NAFLD en NASH (Yang *et al.*, 2019). De plus, les patients atteints de NAFLD présentent des niveaux hépatiques élevés de CYP2E1 (Weltman *et al.*, 1998), marqueur de la peroxydation lipidique. Une étude a également mis en avant le fait que la NAFLD était associée à une augmentation des paramètres sérologiques du stress oxydatif et à une diminution de la capacité antioxydante du plasma (Loguercio *et al.*, 2001). Chez les canards, l'induction de la stéatose hépatique est associée au développement du stress oxydatif (François *et al.*, 2014a; Theron *et al.*, 2011).

## 6.2 Autophagie

Le terme d'autophagie provient du grec '*autos*' (soi-même) et '*phagein*' (manger) qui signifie se manger soi-même. Ce terme a été proposé pour la première fois en 1963 par Christian de Duve et ses collaborateurs (Duve et Wattiaux, 1966). L'autophagie est une fonction cellulaire très conservée tout au long de l'évolution au cours du temps, de la levure à l'homme (Klionsky, 2005). C'est un processus au cours duquel une partie du cytoplasme est séquestrée puis transmise à un lysosome afin d'y être dégradée. Les produits issus de la dégradation sont ensuite relargués dans le cytoplasme afin d'être réutilisés, autrement dit recyclés (Cuervo, 2004; Mizushima et Komatsu, 2011).

L'autophagie a longtemps été considérée comme un processus ne permettant que la dégradation de constituants obsolètes ou d'agrégats protéiques de la cellule. Cependant, quelques années plus tard, les recherches ont permis de découvrir que l'autophagie était également une réponse adaptative de la cellule aux situations de stress telles que des carences alimentaires ou du stress oxydant. En effet, l'autophagie permet de fournir des nutriments et de l'énergie à l'organisme

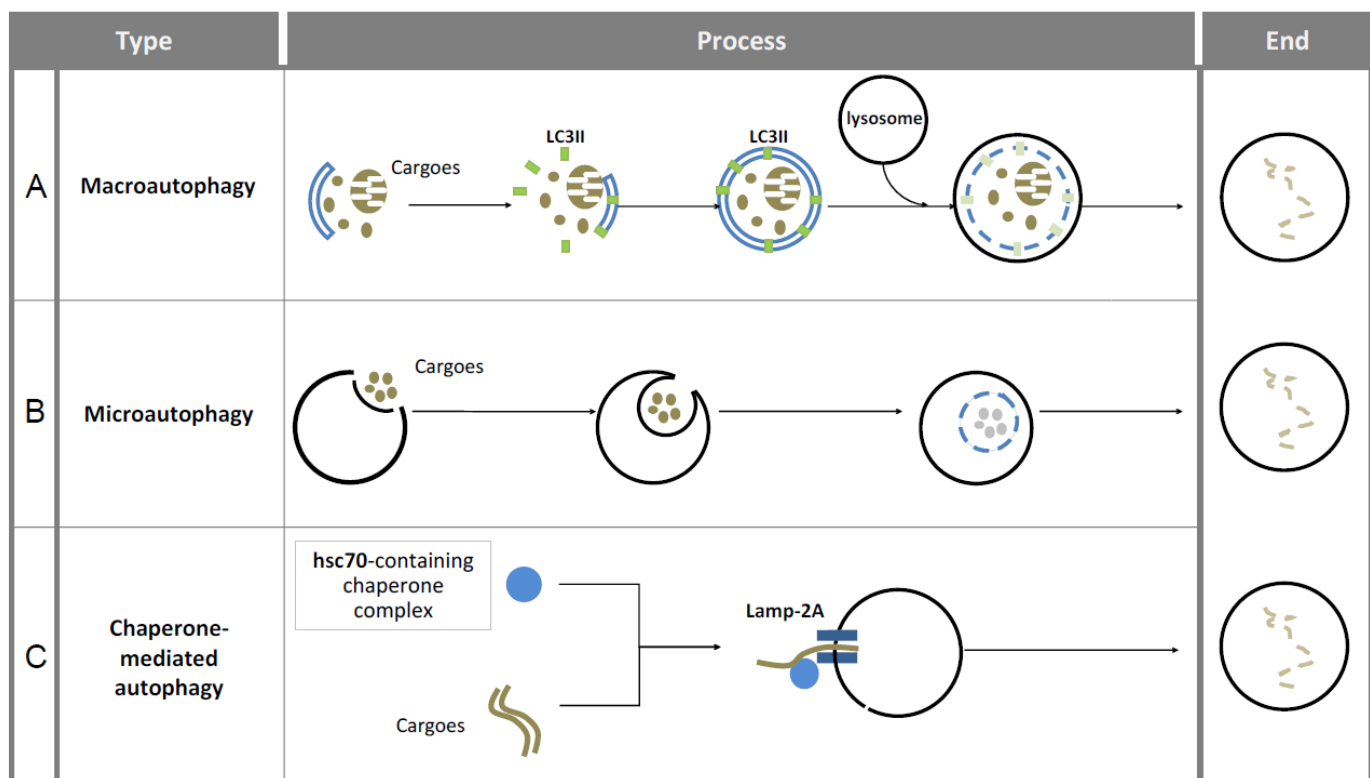
en dégradant les principales réserves énergétiques de la cellule comme le glycogène, les gouttelettes lipidiques ou encore les protéines (Komatsu *et al.*, 2005; Yang et Klionsky, 2010). Il est donc clairement établi aujourd'hui que l'autophagie remplit deux fonctions générales en tant que processus catabolique pour générer les substrats nécessaires au maintien de l'homéostasie énergétique cellulaire en période de nutriments limités et en tant que mécanisme d'élimination des constituants cellulaires usés ou endommagés (Finn et Dice, 2006; Iwata *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007).

Selon les mécanismes impliqués pour délivrer le matériel à dégrader aux lysosomes, on distingue trois types d'autophagie : la microautophagie, l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes (Chaperone Mediated Autophagy, CMA) et la macroautophagie.

La **microautophagie** est un processus de dégradation non sélectif, qui n'est pas inductible, au cours duquel les substrats à dégrader sont directement internalisés dans le lysosome par invagination ou déformation de la membrane lysosomale. Elle est essentiellement étudiée chez les levures (Boya *et al.*, 2013) (Figure 17B). On sait peu de choses sur la régulation ou la fonction de cette forme d'autophagie.

La **CMA** est un mécanisme protéolytique sélectif qui concerne environ 30% des protéines solubles cytosoliques. Son action ne nécessite pas la formation de vésicules intermédiaires contrairement à la microautophagie ou la macroautophagie. Les protéines solubles qui possèdent un domaine pentapeptidique KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) sont liées à une protéine chaperonne Hsc70 (Heat Shock Cognate protein of 70 KDa) puis sont adressées à la membrane lysosomale *via* une interaction avec la protéine lysosomale (récepteur) Lamp2A (Lysosomal-Associated Membrane Protein). Les substrats sont ensuite internalisés dans le lysosome afin d'y être dégradés (Boya *et al.*, 2013) (Figure 17C).

Enfin, la **macroautophagie** constitue la forme majeure du catabolisme lysosomal et est fortement induite lors d'une privation de nutriments ou d'un stress cellulaire. Elle se différencie des deux autres types d'autophagie par l'implication d'une vésicule à double membrane (autophagosome) qui transporte le matériel à dégrader aux lysosomes (Parzych et Klionsky, 2013) (Figure 17A).

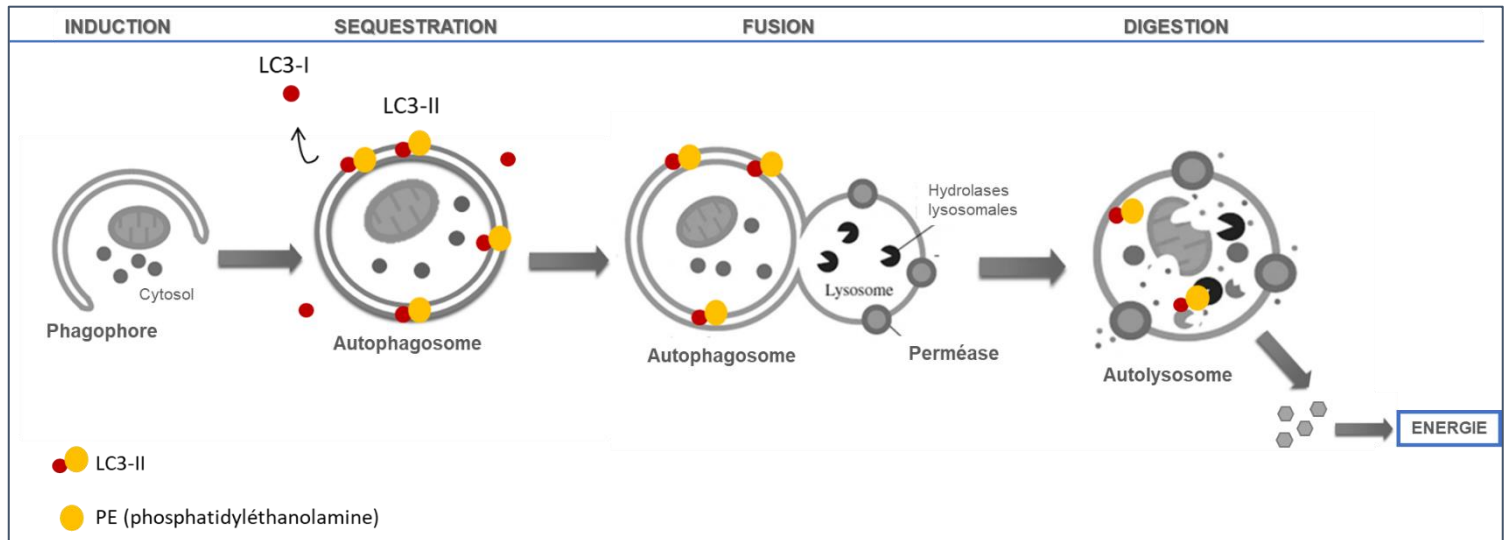


**Figure 17. Les différentes formes d'autophagie chez les mammifères** (Yang *et al.*, 2013)

Hsc-70 : Heat Shock Cognate protein of 70 KDa ; Lamp-2A : Lysosomal-associated membrane protein ; LC3II : Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, Atg8.

Le processus macroautophagique se déroule en quatre étapes importantes dont la première est l'induction (Figure 18). Cela correspond à la formation d'un phagophore, une membrane lipidique formée à partir du RE, de l'appareil de Golgi, de la membrane plasmique et/ou des mitochondries (Geng et Klionsky, 2010), qui va englober une partie du cytoplasme pour former l'autophagosome. La quantité d'autophagosomes formés est proportionnelle à l'intensité de la macroautophagie (Mizushima et Komatsu, 2011). La seconde étape est la séquestration des éléments du cytoplasme dans l'autophagosome par cloisonnement du phagophore. À ce stade, la structure close acquiert une seconde membrane (Parzych et Klionsky, 2013). Le processus se poursuit avec la fusion de la membrane externe de l'autophagosome avec un lysosome qui contient des hydrolases nécessaires à la digestion du contenu de la vésicule. Cette fusion donne naissance à un autolysosome. Pour finir, les enzymes du lysosome se répandent dans l'autolysosome et vont digérer l'ensemble des composés cellulaires présents. Les produits de

l'hydrolyse (peptides, acides aminés...) sont ensuite rejetés dans le cytoplasme, c'est l'étape de la digestion. Ils pourront être recyclés pour la synthèse de macromolécules ou utilisés comme sources d'énergie (Ha *et al.*, 2015; He et Klionsky, 2009) (Figure 18).



**Figure 18. Les différentes étapes de la macroautophagie**

Des substrats autophagiques permettent d'évaluer l'intensité de l'autophagie en mesurant la quantité d'autophagosomes cellulaires formés. C'est le cas de la protéine LC3 (microtubule-associated protein light chain 3), marqueur biochimique de l'autophagie très étudié. En condition basale, la protéine LC3 est majoritairement sous sa forme libre cytosolique LC3-I (Figure 18). A l'induction de l'autophagie, LC3-I se conjugue à la PE (phosphatidyléthanolamine) pour former LC3-II et se fixe à la membrane interne et externe de l'autophagosome (Klionsky et al., 2016a). Cependant, suite à la fusion entre l'autophagosome et le lysosome, LC3-II fixé sur la membrane interne de l'autophagosome est dégradé par les hydrolases lysosomales tandis que celui fixé sur la membrane externe est relâché dans le cytosol retournant ainsi sous sa forme libre LC3-I. Ainsi, au cours du processus macroautophagique, la protéine LC3-II est à la fois produite et dégradée. On parle alors de flux autophagique. En effet, l'augmentation du taux de LC3-II peut représenter soit une induction de la formation des autophagosomes tout comme cela peut évoquer une anomalie des étapes qui suivent cette formation (fusion avec le lysosome ou dégradation du contenu séquestré par les autophagosomes dont LC3-II). Le blocage du flux autophagique par l'emploi d'agents



pharmacologiques agissant après l'étape de formation des autophagosomes (tels que la chloroquine, la bafilomycine ou la colchicine) est une solution efficace pour estimer correctement l'intensité du flux autophagique (Klionsky et al., 2016a).

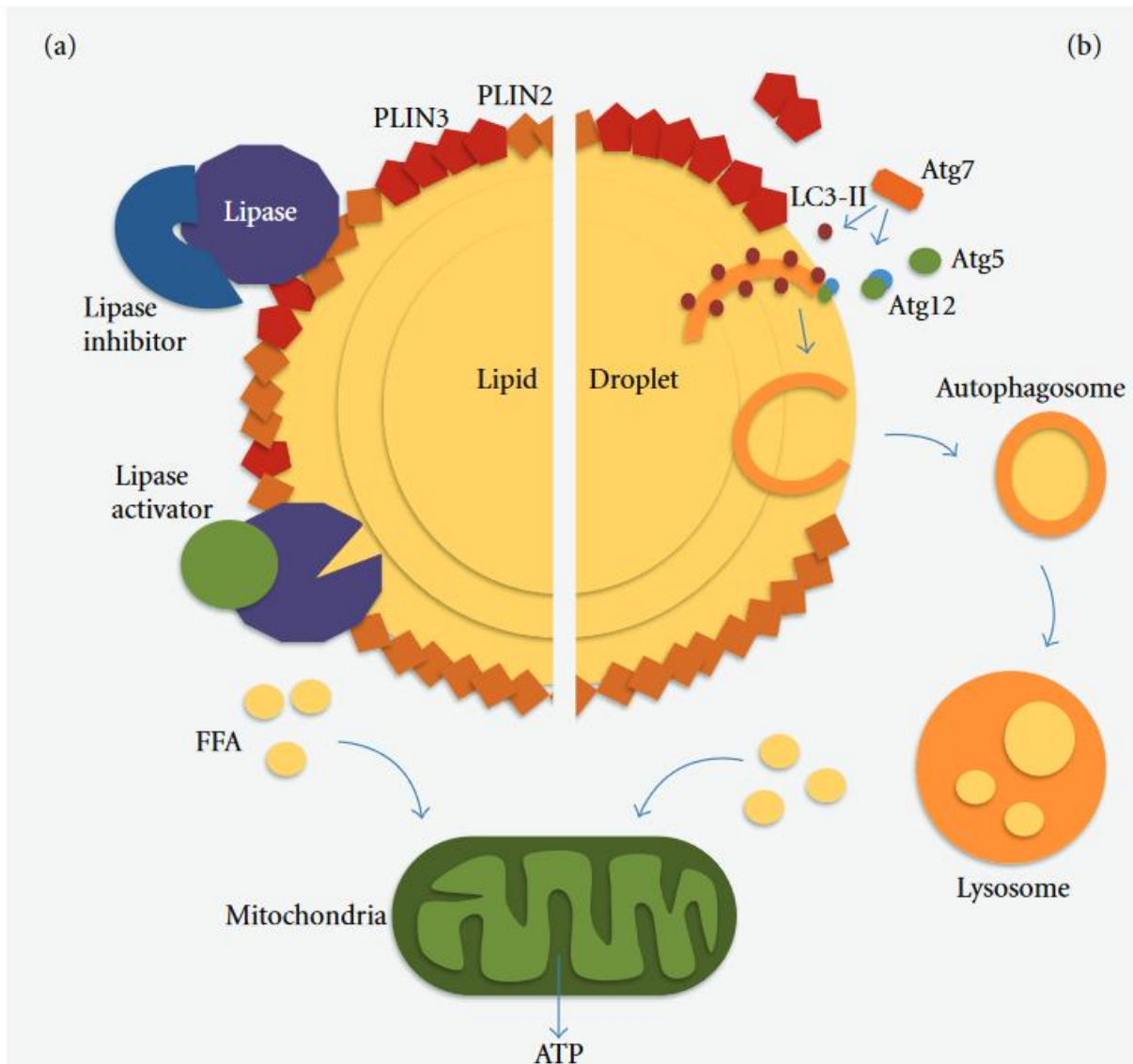
La protéine p62 est un autre substrat autophagique utilisable pour la mesure du nombre d'autophagosomes formés. Son niveau total dans la cellule est inversement proportionnel à l'activité autophagique dans de nombreux modèles d'études. Cependant ce marqueur présente quelques inconvénients. En effet, la protéine p62 est dégradée par l'autophagie mais également par le système ubiquitine protéasome qui, lorsqu'il est inhibé, fait augmenter le niveau de p62 (Bardag-Gorce *et al.*, 2005). De plus, l'expression de p62 est induite sous certaines conditions de stress (B'chir *et al.*, 2013), ce qui rend difficile l'interprétation du niveau de la protéine p62.

La macroautophagie et la CMA augmentent avec certains stress cellulaires, le plus classique étant la privation de nutriments. Ces deux formes d'autophagie diffèrent par le fait que la macroautophagie peut dégrader les organites cellulaires et les agrégats de protéines contrairement à la CMA.

Le contrôle de l'autophagie se fait grâce à deux protéines kinases. La première est **AMPK** (AMP-activated protein kinase) dont l'action est de favoriser l'autophagie. C'est un capteur d'énergie clé dans la régulation du métabolisme cellulaire et le maintien de l'homéostasie. La seconde est la protéine kinase **mTOR** dont l'action est, à l'inverse de l'AMPK, d'inhiber l'autophagie (Kim *et al.*, 2011).

On distingue différentes activités de la macroautophagie comme la lipophagie, la glycophagie ou la protéolyse qui ont pour buts respectifs de fournir des acides gras, du glucose et des acides aminés qui sont les substrats énergétiques majeurs de la cellule. Dans le cadre de la stéatose hépatique chez les canards, l'étude de la lipophagie semble être intéressante puisqu'elle permet la dégradation des lipides stockés sous forme de gouttelettes lipidiques constituées de TG et de cholestérol, grâce à la machinerie autophagique (Figure 19b). Les triglycérides séquestrés par l'autophagosome et libérés dans le lysosome sont hydrolysés par les lipases lysosomales pour former des AG qui seront ensuite utilisés par les mitochondries afin de produire de l'énergie (sous forme d'ATP) grâce à la  $\beta$ -oxydation (Singh et Cuervo, 2011, 2012).

Des études suggèrent des fonctions de l'autophagie dans la régulation des processus cellulaires tels que le métabolisme des lipides, la sensibilité à l'insuline et la réactivité immunitaire. Les rôles potentiels de l'autophagie dans la physiopathologie de la NASH ont fait l'objet de



**Figure 19. Lipolyse des gouttelettes lipidiques (a) Principaux composants lipidiques et protéiques des gouttelettes lipidiques et action des lipases. (b) Lipolyse par la lipophagie (Singh et Cuervo, 2012)**

Atg : autophagy-related protein ; FFA : Acides gras libres ; LC3II : Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, Atg8 ; PLIN : perilipin.

nombreuses études notamment dans la régulation du métabolisme lipidique des hépatocytes par le biais de la lipophagie. En effet, une inhibition de la macroautophagie suite à une suppression du gène *atg5*, *atg7*, ou une inhibition pharmacologique avec la 3-méthyladénine en cultures d'hépatocytes, augmente significativement la quantité de TG et de cholestérol hépatiques. Cette inhibition a conduit à une diminution de la lipolyse ayant pour conséquence un excès de TG et de cholestérol dans les gouttelettes lipidiques ainsi qu'une réduction de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans les cellules où la macroautophagie est inhibée. La lipophagie a été confirmée par microscopie avec une colocalisation des lipides avec des autophagosomes et des lysosomes, ainsi qu'une mise en évidence d'une association de la protéine LC3 avec des gouttelettes lipidiques (Singh *et al.*, 2009a). Des études *in vivo* réalisées sur des souris soumises à un jeûne ont confirmé cette association LC3/gouttelettes lipidiques, ainsi que la présence de lipides dans les autophagosomes et les lysosomes (le jeûne ayant stimulé la macroautophagie a conduit à l'augmentation d'AGL sériques : lipides disponibles pour la production d'énergie sous forme d'ATP). Par conséquent, la macroautophagie apparaît comme un mécanisme central pour la dégradation des TG et du cholestérol stockés dans les gouttelettes lipidiques via la lipophagie. L'autophagie serait également susceptible de réguler le contenu en lipides cellulaires par le biais d'autres mécanismes, tels que la dégradation de facteurs impliqués dans le métabolisme des lipides, tels que ApoB (Pan *et al.*, 2008). L'activation de l'autophagie suite à un jeûne est un mécanisme complexe. Un acteur a été identifié : l'Acétyl-CoA. L'Acétyl-CoA est un intégrateur majeur de l'état nutritionnel situé au carrefour du catabolisme des lipides, des glucides et des protéines. L'Acétyl-CoA cytosolique est un régulateur métabolique central de l'autophagie. La privation de nutriments provoque un épuisement rapide de l'Acétyl-CoA et l'induction de l'autophagie via la réduction de l'activité de l'acétyltransférase EP300, un suppresseur de l'autophagie, par des niveaux élevés d'Acétyl-CoA (Mariño *et al.*, 2014).

Chez les mammifères, avec le vieillissement, la macroautophagie et la CMA déclinent (Cuervo *et al.*, 2005), parallèlement, il apparaît une accumulation accrue de lipides dans divers organes, y compris dans le foie (Ford *et al.*, 2002). Paradoxalement, il semblerait donc que l'autophagie puisse réguler le contenu lipidique, mais il a aussi été démontré que l'accumulation de lipides dans les hépatocytes pourrait diminuer la fonction autophagique. En effet, des souris nourries avec un régime riche en graisses ont présenté une altération de la fonction autophagique hépatique (diminution de la mobilisation des lipides dans le compartiment autophagique) (Singh *et al.*, 2009a). Ainsi, non seulement la diminution de la macroautophagie liée au vieillissement peut favoriser la stéatose hépatique, mais également une accumulation excessive de lipides dans les hépatocytes peut être un mécanisme de diminution de la fonction

autophagique. L'accumulation de lipides modifierait la structure des membranes : il en résulterait une diminution de l'efficacité de la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes ce qui expliquerait l'effet inhibiteur d'un taux de lipides hépatique trop élevé sur la macroautophagie (Koga *et al.*, 2010).

Outre ce lien entre le métabolisme des lipides cellulaires et la fonction autophagique, des modifications de l'autophagie ont récemment été liées à l'hyperinsulinémie et la résistance à l'insuline (Liu *et al.*, 2009). Ces études, sur des souris hyperinsulinémiques, ont confirmé la diminution de l'autophagie, comme en témoignent les diminutions de LC3-II et l'augmentation du taux de p62 (protéine dégradée en partie par la macroautophagie). En outre, l'expression des gènes de l'autophagie, atg5 et atg7, a diminué. Ces changements ont été attribués aux effets de l'hyperinsulinémie, bien que l'accumulation de lipides cellulaires puisse également avoir contribué. Les résultats selon lesquels l'hyperinsulinémie diminue la fonction autophagique ne sont pas surprenants. En effet, l'insuline est connue pour induire la suppression de l'autophagie. Cet effet passerait par la voie de signalisation mTOR et non au niveau de l'expression de Atg. Liu *et al.* (2009) a également démontré que l'inhibition de la transcription induite par FOXO1 par l'insuline induisait la suppression de l'autophagie.

En plus de son lien avec la stéatose hépatique, l'autophagie semble être liée au stress du RE. En effet, des études menées chez le poisson ont montré qu'une inhibition de l'autophagie induite par l'emploi d'une drogue telle que la bafilomycine A1 (dont le rôle est d'empêcher la fusion entre l'autophagosome et le lysosome) induisait une augmentation du stress du RE dans les cellules du foie (Séité *et al.*, 2019). Chez le canard gavé, l'induction de la stéatose hépatique est associée à une diminution de l'autophagie mais également au développement de l'apoptose qui n'apparaît qu'en fin de gavage (Rémignon *et al.*, 2018).

La NASH se caractérise par la présence de lésions, d'inflammation et de fibrose, en plus de la stéatose. Les mécanismes de lésions cellulaires restent flous mais peuvent impliquer des facteurs tels que le stress oxydatif (Chalasani *et al.*, 2004) et les cytokines inflammatoires (Browning et Horton, 2004). L'autophagie est connue pour réguler les voies de la mort cellulaire et peut donc moduler la progression de la stéatose vers la lésion hépatocellulaire. Des études ont démontré des rôles de l'autophagie dans la régulation de l'accumulation de lipides hépatocellulaires et des lésions hépatiques dues au stress oxydatif.

Comme citées précédemment, les fonctions de l'autophagie susceptibles de protéger contre la mort cellulaire comprennent : l'élimination des organites ou des protéines endommagées qui

contribuent au dysfonctionnement cellulaire et la fourniture de substrats permettant le maintien de l'homéostasie énergétique. S'ajoutent à cela des composants de la voie autophagique qui peuvent également jouer un rôle dans la régulation de l'apoptose (Patingre *et al.*, 2005; Yousefi *et al.*, 2006). L'autophagie serait donc une voie menant à la survie cellulaire, bien qu'elle puisse également favoriser la mort cellulaire dans certaines conditions. La NASH est caractérisée par l'accumulation de mitochondries anormales, ceci suggère que des dommages à cet organite, ainsi qu'un possible défaut d'élimination des mitochondries altérées, pourraient jouer un rôle dans cette maladie (Caldwell *et al.*, 1999). La dégradation altérée des mitochondries endommagées, en particulier celles dans lesquelles l'activation de la voie de la mort mitochondriale s'est produite, peut entraîner un stress oxydatif ou la libération de facteurs mitochondriaux qui déclenchent alors l'apoptose (Lemasters, 2005). Une autophagie défectueuse peut favoriser l'activation de la voie de signalisation JNK / c-Jun en réponse au stress oxydatif. L'augmentation de la signalisation de JNK par le stress oxydatif et la diminution de l'autophagie peuvent favoriser le développement et la progression de la NASH (Singh *et al.*, 2009b). Il a été démontré que la CMA élimine les protéines oxydées qui s'accumulent dans le foie au cours du vieillissement. La restauration de la CMA améliore les fonctions hépatiques chez les souris âgées limitant ainsi les dommages cellulaires induits par ces protéines oxydées (Zhang et Cuervo, 2008).

### 6.3 Stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite cellulaire présent uniquement dans les cellules eucaryotes. Il y joue des rôles importants notamment dans la synthèse, la maturation et le repliement des protéines ainsi que leur modification post-traductionnelle. Le RE est également un site de stockage intracellulaire du calcium et contient la plupart des enzymes impliquées dans la synthèse des lipides cellulaires (Rowland et Voeltz, 2012). De nombreuses études montrent que le stress du RE est étroitement lié au métabolisme des lipides et notamment, les différentes voies de réponse au stress du RE contrôleraient l'expression de certains gènes de la lipogenèse et du stockage des TG (Han et Kaufman, 2016).

Lors d'un stress cellulaire, l'altération de la glycosylation ou du repliement des protéines peuvent se produire. Les protéines devenues dysfonctionnelles s'accumulent alors dans le RE afin d'y induire le stress du RE (Iurlaro et Muñoz-Pinedo, 2016). En réponse à ce stress, la

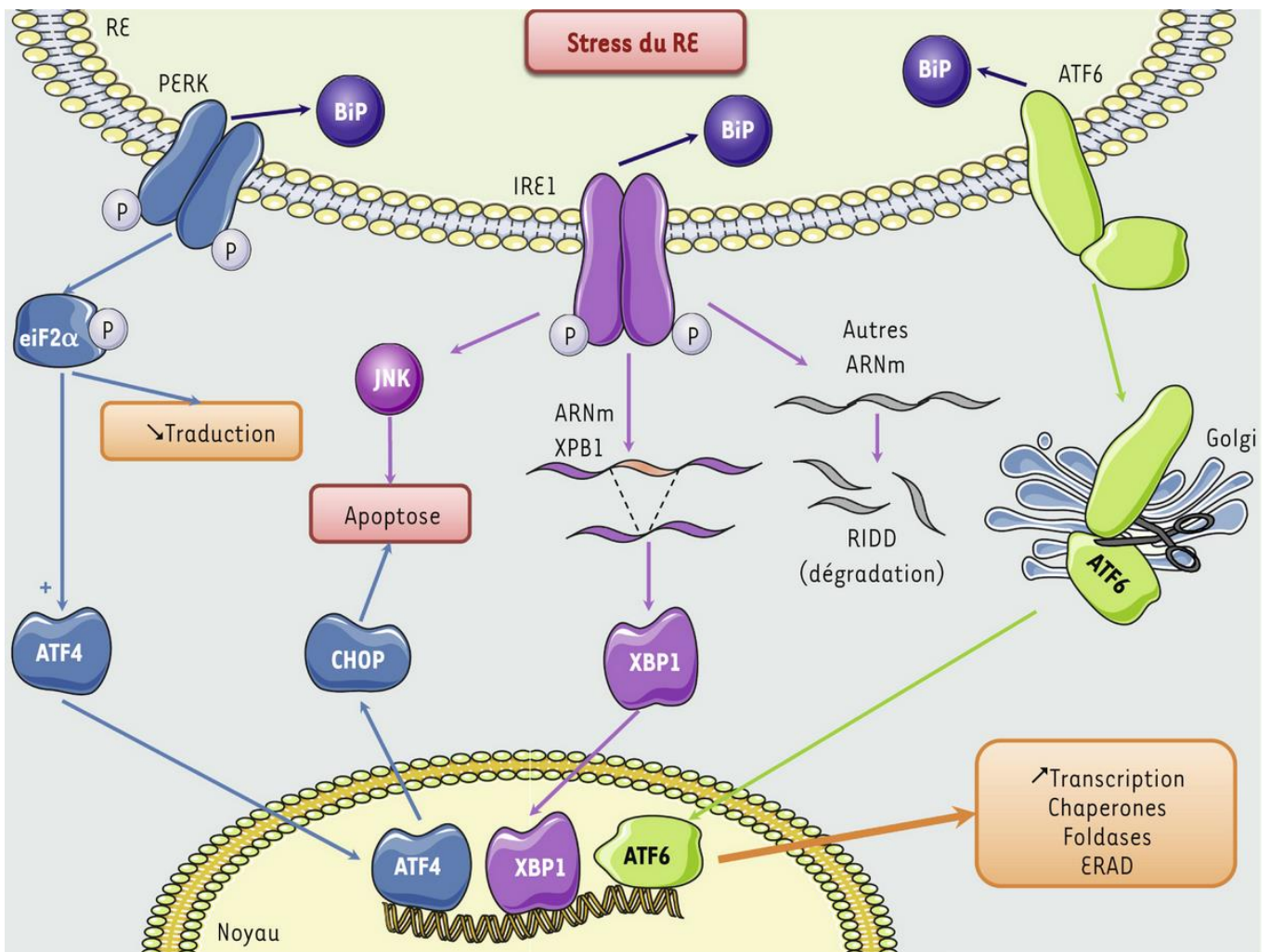
cellule active différents systèmes de signalisation lui permettant soit de restaurer la fonction du RE ainsi que l'homéostasie cellulaire, soit d'induire l'apoptose. Ainsi, plusieurs mécanismes peuvent être induits et collaborer en situation de stress du RE tels que la réponse UPR (Unfolded Protein Response), la voie ERAD (ER-Associated Degradation), l'autophagie ou encore l'apoptose (Senft et Ronai, 2015) (Figure 20).

Le rôle de l'UPR est de diminuer la synthèse protéique tout en stimulant le processus de repliement des protéines altérées. Elle permet également d'activer la voie ERAD, voie de dégradation des protéines *via* le protéasome. En dernier recours, et si l'homéostasie du RE n'est pas rétablie, la voie UPR induit l'apoptose, entre autres par l'activation de la protéine pro-apoptotique CHOP (C/EBP Homologous Protein) par la voie PERK ou l'activation de la kinase JNK par la voie IRE1 (Foufelle et Ferré, 2007).

La réponse UPR est médiée par l'activation des trois protéines : PERK (Pancreatic ER Kinase (PKR)-like ER Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor 6) et IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1) présents sur la membrane du RE après dissociation de la protéine chaperonne Grp78 (Glucose-Regulated Protein 78kDa ou BIP) (Flamment et Foufelle, 2013; Foufelle et Ferré, 2007) (Figure 20).

PERK après dimérisation et autophosphorylation, phosphoryle eIF2 $\alpha$  ce qui conduit à une inhibition globale de la traduction (Figure 20). Paradoxalement, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  s'accompagne d'une augmentation de la traduction du facteur de transcription ATF4. Il a également été démontré chez les rats que la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  activait à son tour les protéines SREBP-1c et SREBP-2, deux facteurs de transcription, qui régulent l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la lipogénèse tel que *fas* (Gosmain *et al.*, 2005). L'activation par autophosphorylation de IRE1 permet de révéler son activité endoribonucléase dont l'action principale est l'épissage de l'ARNm du facteur de transcription XBP1 (X Box-Binding Protein 1). Celui-ci semble également jouer un rôle important dans la modulation de l'expression des gènes du métabolisme intermédiaire. En effet, XBP1 semble être capable d'activer directement et indirectement la transcription de plusieurs gènes clés de la lipogénèse dans le foie et notamment *fas*, *plin2* (Perilipin 2), *scd1*, *dgat2* et *acc2* (Acetyl CoA Carboxylase 2) (Lee *et al.*, 2012).

Enfin, le facteur de transcription ATF6 est activé par clivage protéolytique d'une forme précurseur ancrée dans le RE.



**Figure 20. Les différentes voies de signalisation impliquées dans le stress du réticulum endoplasmique**

ATF4 : Activating Transcription Factor 4 ; ATF6 : Activating Transcription Factor 6 ; BiP : Glucose-Regulated Protein 78kDa (Grp78) ; eiF2 $\alpha$  : Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha ; IRE1: Inositol-Requiring Enzyme 1 ; PERK : Pancreatic ER Kinase (PKR)-like ER Kinase

ATF4, XBP1 et ATF6 contribuent de façon concomitante au retour de l'homéostasie du RE. Si l'ensemble de ces mécanismes n'y parviennent pas, la voie UPR induit l'apoptose, entre autres par l'activation de la protéine pro-apoptotique CHOP (C/EBP Homologous Protein) par la voie PERK ou l'activation de la kinase JNK par la voie IRE1.

Le stress de RE évolue au cours du développement des atteintes hépatiques. Ainsi, des patients atteints de la NASH présentent une augmentation significative du stress de RE (surexpression de *atf4*, CHOP et GRP78 aux niveaux ARNm et protéines) par rapport aux patients atteints de stéatose (González-Rodríguez et al., 2014).

#### 6.4 Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus nécessaire au développement et au maintien du bon fonctionnement de la cellule. Elle peut être déclenchée par deux voies différentes : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Couzinet *et al.*, 2002) (Figure 21).

La **voie intrinsèque** est dépendante des mitochondries qui renferment de nombreuses protéines capables d'induire la mort cellulaire (Desagher et Martinou, 2000). Cette voie est initiée par la protéine p53 dont le taux augmente dans la cellule lors d'un stress cellulaire tels que des dommages à l'ADN ou l'activation d'un oncogène (Cabon *et al.*, 2013; Shen et White, 2001). La protéine p53 induit alors l'apoptose ce qui implique l'activation de différentes caspases. L'apoptose médiée par la protéine p53 peut être bloquée par une inhibition directe de l'activité de la protéine p53 par des membres de la famille Bcl-2 (Beclin-2) régulatrices de la fonction mitochondriale ou par des inhibiteurs de caspases (Estaquier *et al.*, 2012).

La **voie extrinsèque**, quant à elle, implique l'engagement des récepteurs membranaires de mort Fas/CD95 (Cluster of Differentiation 95), TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1) et TRAILR (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor) (Couzinet *et al.*, 2002). La liaison de ces récepteurs à leurs ligands déclenche la signalisation apoptotique.

Peu importe la voie intrinsèque ou extrinsèque, l'induction de l'apoptose passe par l'activation d'une cascade d'enzymes protéolytiques, les caspases (Casp), notamment les Casp8 ou -10 (voie extrinsèque) et Casp9 qui forme l'apoptosome avec APAF-1 (Apoptotic Peptide Activating Factor-1) et le cytochrome c (voie intrinsèque) (Figure 21). Ces caspases initiatrices



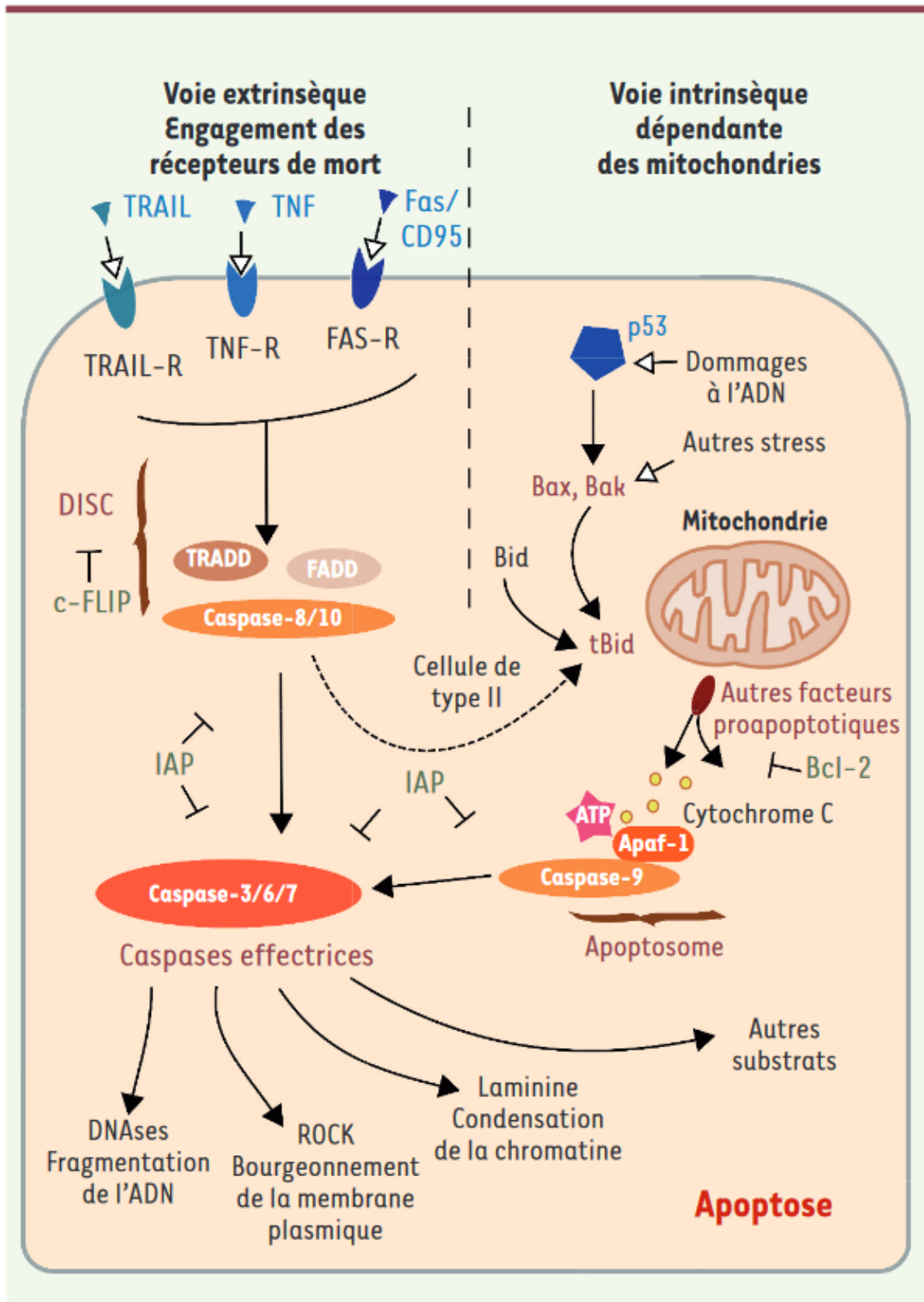


Figure 21. L'apoptose et ses voies de signalisations (Cabon *et al.*, 2013)

activent d'autres caspases exécutrices Casp3, -6 et -7 qui vont cliver des milliers de substrats différents. Cette cascade conduit à la perte de volume de la cellule, au bourgeonnement de la membrane plasmique, à une condensation de la chromatine, à la fragmentation de l'ADN et enfin à la formation des corps apoptotiques (Green, 2011). Ces derniers sont ensuite éliminés par des phagocytes.

Une étude menée chez des canards gavés durant 12 jours a montré une augmentation de l'activité de caspases (-3, -7, -8 et -9) sur les trois derniers jours de gavage. L'induction de cette activité apoptotique correspondrait ainsi à la fin du gavage, c'est-à-dire au moment où l'accumulation de lipides dans le foie des canards est la plus importante (Rémignon *et al.*, 2018). Cette étude suggère également que la variabilité de taux de fonte du foie gras serait en partie liée à l'intensité de l'activité apoptotique.

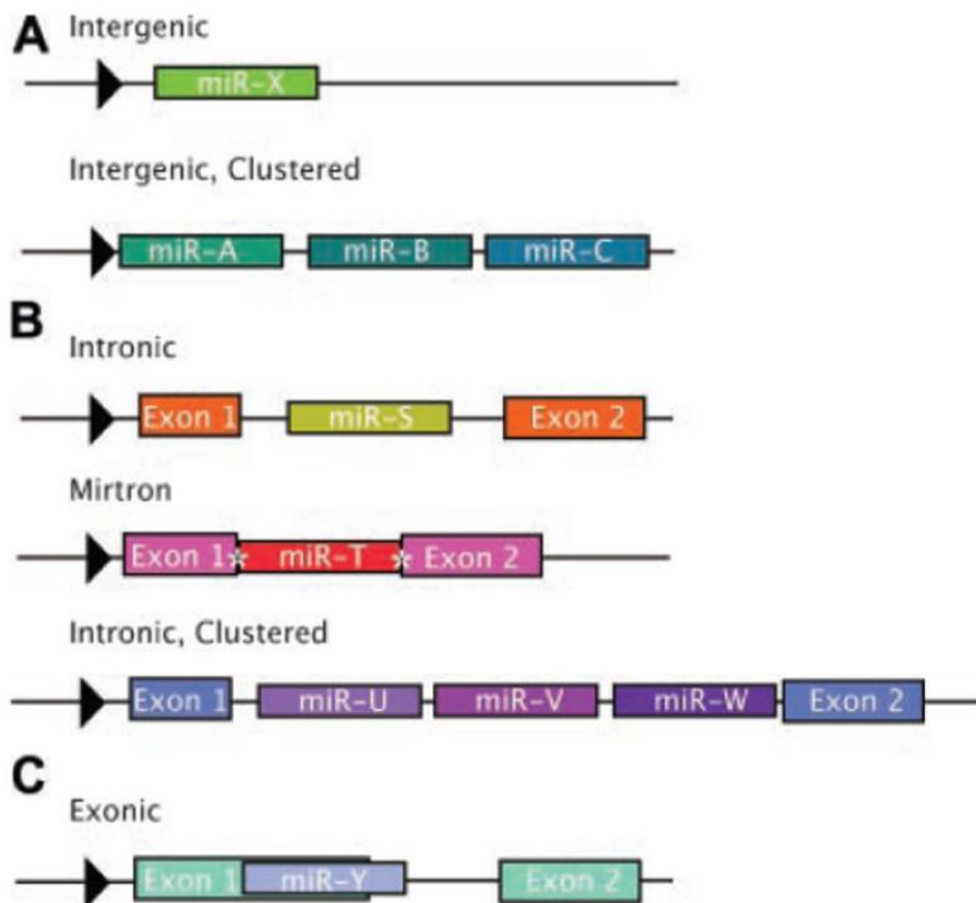
## **7. Micro-ARNs**

### 7.1 Définition

Les microARNs (miARNs ou miRs) constituent une classe de petits ARNs non codants d'une longueur d'environ 22 nucléotides. Ils sont exprimés de manière endogène et servent généralement de régulateurs négatifs post-transcriptionnels de l'expression génique (Bartel, 2004). En effet, leur liaison à la région 3'UTR non traduite des ARNm cibles entraîne une répression de la traduction ou une dégradation de l'ARNm. Une fixation des miARNs à l'extrémité 5'UTR est aussi possible et induit une activation ou une répression de la traduction (Baulande *et al.*, 2014). Environ 4000 miARNs ont été rapportés chez plus de 40 espèces d'animaux, de plantes et de virus après avoir été identifiés pour la première fois en 1993 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993). Les miARNs jouent un rôle fondamental dans de nombreux processus biologiques, notamment le développement animal (Wienholds et Plasterk, 2005), la différenciation cellulaire (Ivey et Srivastava, 2010), le métabolisme (Krützfeldt et Stoffel, 2006), la transduction du signal (Inui *et al.*, 2010), le cancer (Esquela-Kerscher et Slack, 2006), la maladie (Soifer *et al.*, 2007) et le stress cellulaire (Su *et al.*, 2015).

## 7.2 Gènes codant les miARNs

Les gènes codants pour les miARNs peuvent être situés dans les régions non codantes du génome, dans des positions introniques, intergéniques ou dans des exons. Ils sont transcrits à partir de leurs propres promoteurs indépendamment de leurs gènes hôtes. Les miARNs peuvent également être codés dans des régions intergéniques de l'ADN (Rodriguez *et al.*, 2004) (Figure 22). Par ailleurs, des multiples de gènes miARNs superposés ou chevauchants peuvent se localiser dans un unique gène hôte, traité à partir du même transcrite primaire polycistronique, appelé cluster (Rodriguez *et al.*, 2004). Le gène hôte et les miARNs résidents d'un groupe sont considérés comme ayant un effet synergique sur la régulation des gènes (Lutter *et al.*, 2010).



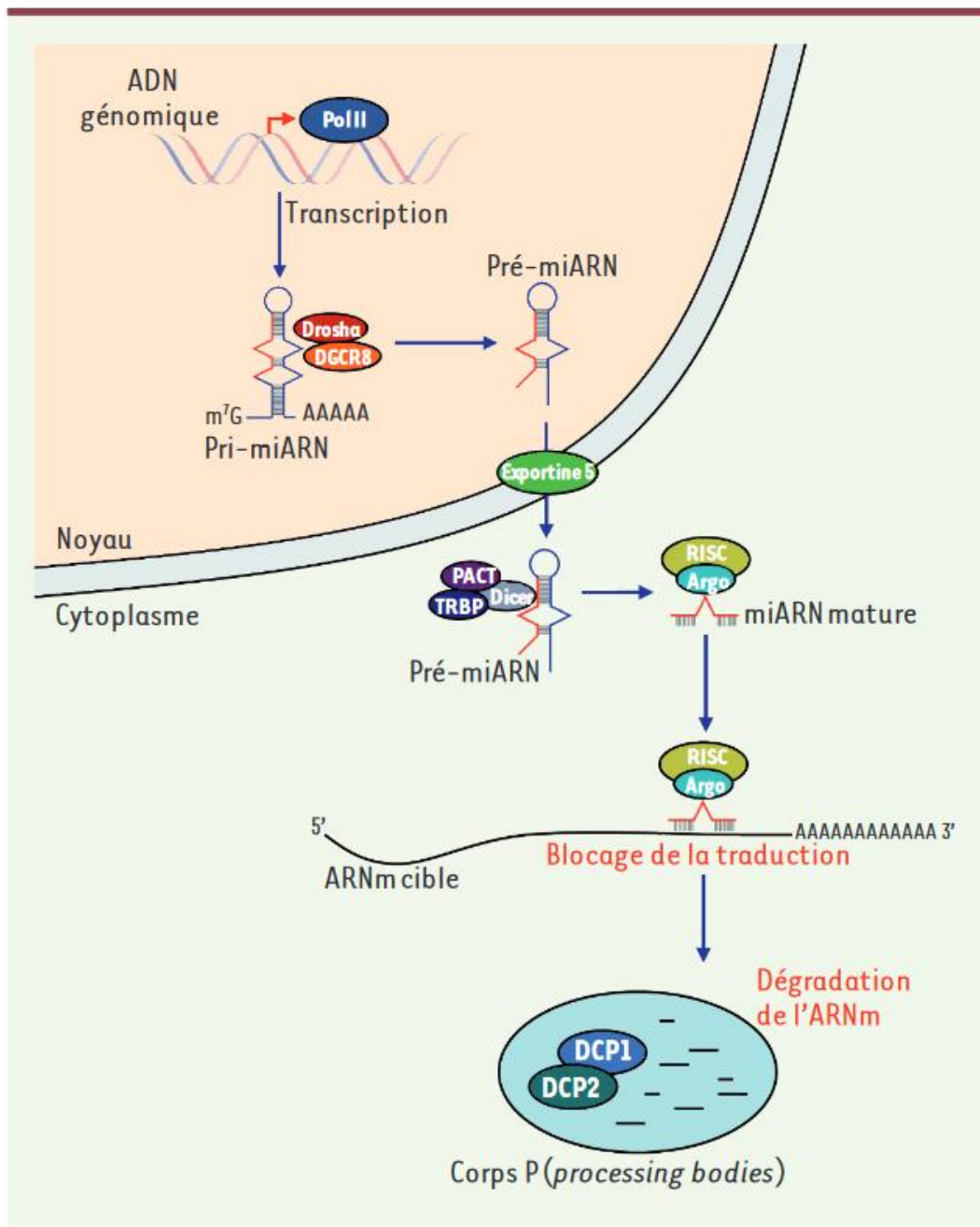
**Figure 22. Localisation génomique des miARNs** (Olena et Patton, 2010)

### 7.3 Biosynthèse des miARNs

Initialement transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II), les gènes miARNs génèrent dans le noyau de longs transcrits dotés de plusieurs structures secondaires en tige/boucle (épingles à cheveux) appelés miARNs primaires (pri-miARNs) (Figure 23). Ces pri-miARNs sont ensuite clivés par l'activité catalytique RNase III du complexe Drosha/DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region-8) en pré-miARNs qui sont ensuite exportés vers le cytoplasme par l'intermédiaire de l'exportine 5. Afin de former les miARNs matures (22 nucléotides environ), les pré-miARNs sont clivés par le complexe DICER (une RNase III cytosolique). Les miARNs matures ainsi formés sont pris en charge par des protéines de la famille des argonautes (Argo) et intégrés au sein d'un complexe protéique appelé le RISC (RNA-induced silencing complex) où ils interagissent avec l'ARNm complémentaire. Le miARN mature dans le RISC se lie essentiellement à la région non traduite en 3'UTR des ARNm cibles (Figure 23). Si l'appariement de complémentarité est complet, l'ARNm est scindé en deux fragments et rapidement dégradé par des exo ribonucléases cytoplasmiques omniprésentes. Si l'appariement de complémentarité est incomplet, ce qui est le cas le plus fréquent, cela entraîne l'inactivation de l'ARNm par des mécanismes distincts : répression traductionnelle, dégradation de l'ARNm et/ou séquestration dans des granules de traitement cytoplasmiques (P-bodies : processing-bodies) (Roberts, 2015). En outre, il a été signalé que l'amélioration de la dégradation de l'ARNm médiée par RISC était la voie principale, représentant 70-90% du niveau total de répression par les miARNs (Baulande *et al.*, 2014).

Le site de liaison entre le miARN et l'ARNm englobe 2 à 7 nucléotides et est appelé « seed region ». La séquence sur un miARN mature est située aux positions 2 à 8 de l'extrémité 5'. Elle est conservée pour toutes les espèces et est utilisée pour classer les familles de miARNs (Brennecke *et al.*, 2005). En outre, les séquences de miARNs montrent un degré élevé de conservation parmi de nombreuses espèces végétales et animales de parentés distantes, ce qui suggère qu'elles jouent un rôle important dans les processus biologiques essentiels (Takane *et al.*, 2010).

Un miARN peut réguler plus de 200 gènes. Chaque ARNm possède à son tour plusieurs sites de liaison pour le même miARN ou pour des miARNs différents, ce qui entraîne une régulation complexe de l'expression des gènes. Plus de 60 % des ARNs messagers de mammifères ont conservé des sites de liaison aux miARN selon estimation (Friedman *et al.*, 2009).



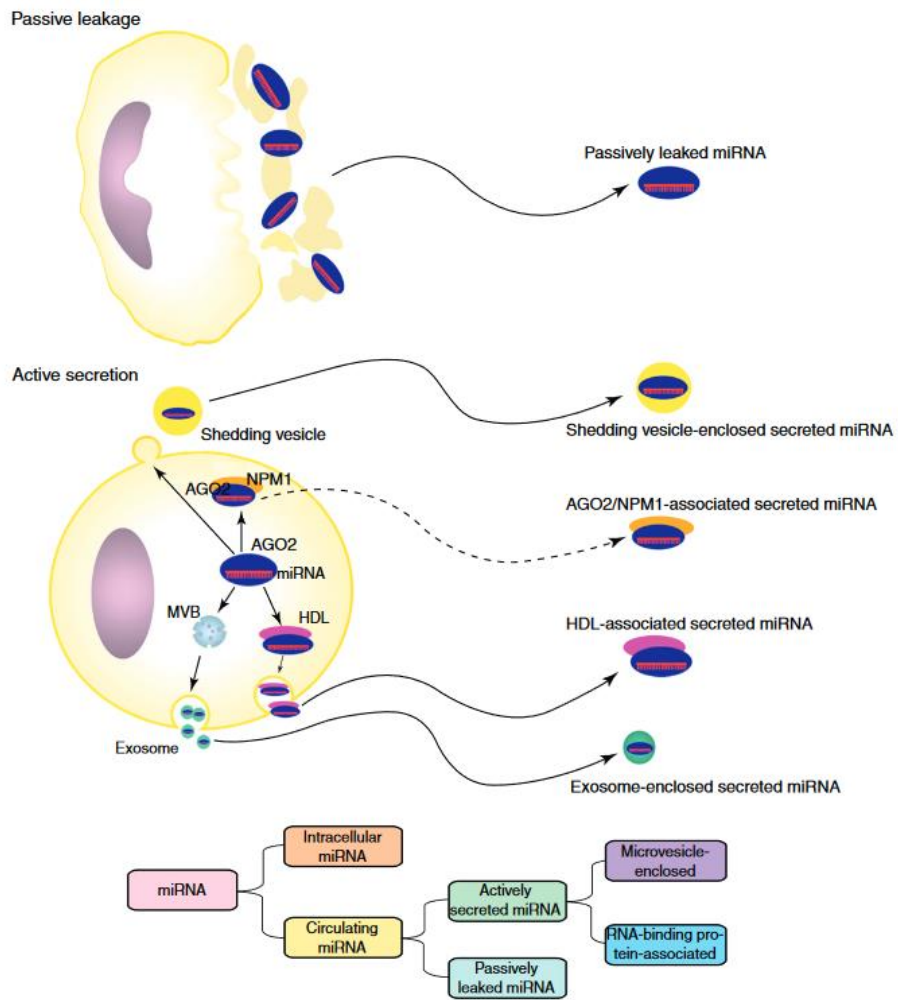
**Figure 23. Régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes par les miARNs**  
(Baulande *et al.*, 2014)

#### 7.4 miARNs circulants

Les miARNs sont dits circulants car leur présence est observée dans les liquides biologiques. Celle-ci a été identifiée pour la première fois dans le plasma sanguin maternel (Chim *et al.*, 2008) (Figure 24). Ils ont ensuite été détectés dans différents types de fluides biologiques tels que la salive, l'urine, le lait maternel, le liquide séminal, les larmes, le liquide amniotique, le colostrum, le lavage bronchique, le liquide céphalo-rachidien, le liquide péritonéal et le liquide pleural (Tableau 3). Selon les fluides biologiques, la distribution et l'abondance des miARNs diffèrent (Weber *et al.*, 2010). Par exemple, les fluides comportant le moins de miARNs différents sont l'urine, le liquide céphalo-rachidien et le liquide pleural tandis que la salive, le liquide séminal et le lait maternel sont dotés d'une très grande diversité de molécules circulantes (Tableau 3). De plus, certains miARNs sont présents spécifiquement dans certains tissus. C'est le cas du miR-122 dans le foie, le miR-133a dans les muscles ou encore le miR-124 dans le cerveau (Baulande *et al.*, 2014). La présence de miARNs spécifiques de certains tissus indique leurs rôles critiques dans la différenciation des tissus ou leurs fonctions spécifiques. C'est ainsi que des études ont suggéré le potentiel des miARNs en tant que biomarqueurs non invasifs pour l'évaluation de l'état pathologique dans le cadre de cancer ou de maladies (Chen *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2008). En effet, les miARNs possèdent les propriétés d'un biomarqueur idéal à savoir : une stabilité dans divers liquides organiques, une séquence unique, une expression tissu-spécifique et une détection facile et non invasive. Ils font partie aujourd'hui des outils de diagnostic de nombreuses maladies.

Les miARNs circulants proviendraient de trois sources. La première, serait les fuites passives de cellules brisées dues à une lésion tissulaire ou à l'apoptose cellulaire. La seconde, de la sécrétion active *via* des microvésicules comprenant des exosomes et des vésicules ; et la troisième, serait la sécrétion active via une voie dépendante de la protéine de liaison à l'ARN, sans microvésicule (Baulande *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2012).

Bien que l'ARN pur soit sujet à une dégradation rapide, les miARNs issus des liquides biologiques présentent une stabilité remarquable (Mitchell *et al.*, 2008). L'explication est que ces miARNs sont encapsulés dans des exosomes, petites vésicules membranaires qui contiennent de l'ADN, des ARNm et des protéines en plus des miARN (Ban *et al.*, 2015). Entourés de telles structures membranaires, les miARNs sont protégés des RNases. Le processus de sécrétion des miARNs dans les exosomes est encore mal connu. La question de savoir si les miARNs sécrétés ont une fonction biologique est une question ouverte. Mais



**Figure 24. Relation entre miARNs circulants et miARNs sécrétés (Chen *et al.*, 2012)**

compte tenu de la faible abondance des miARNs dans les exosomes (un exemplaire par exosome (Chevillet *et al.*, 2014)), une fonction de communication semble peu probable. Parallèlement, les miARNs présents dans les liquides biologiques peuvent également être stabilisés *via* une liaison à Ago2 ou à des lipoprotéines (Arroyo *et al.*, 2011).

Les cellules responsables de la production des miARNs sont difficiles à déterminer. En raison du contact prolongé avec le plasma, les cellules sanguines sont considérées comme la principale source de miARNs plasmatiques (Pritchard *et al.*, 2012). Cependant, d'autres organes comme le foie, les muscles, le cœur et le cerveau pourraient également contribuer à leur sécrétion puisque les miARNs spécifiques de ces organes sont systématiquement détectés dans le plasma (Lewis et Jopling, 2010).

### 7.5 Rôles dans la régulation post-transcriptionnelle

De nombreuses recherches sont menées sur les miARNs notamment pour comprendre leur implication dans le métabolisme et les maladies métaboliques. Bien qu'ils soient présents dans de nombreux tissus, nous ne traiterons que des miARNs du foie.

Outre la régulation transcriptionnelle classique médiée par les facteurs de transcription tels que SREBP (Sterol regulatory element-binding proteins), PPAR $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha) et LXR (Liver X Receptor), il a été prouvé que les miARNs régulaient de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. En ce sens, de nombreuses études sont menées sur les miARNs pour comprendre leur implication dans le métabolisme et les maladies métaboliques. Celles-ci ont notamment révélé le rôle essentiel des miARNs dans le contrôle de l'homéostasie métabolique du foie.

Le miR-122 est le miARN le plus abondant dans le foie. C'est l'un des miARNs les plus étudiés chez les mammifères (Girard *et al.*, 2008). Il est impliqué dans le développement du foie (Hu *et al.*, 2012) et dans la régulation du métabolisme des lipides hépatiques et du cholestérol (Esau *et al.*, 2006; Krützfeldt *et al.*, 2005).

En tant que miARN spécifique du foie, le miR-122 atteint 70% de la population totale des miARN dans le foie adulte. Son expression est d'ailleurs fortement régulée à la hausse dans le foie de souris et humain au cours du développement embryonnaire (Girard *et al.*, 2008). Ces observations suggèrent que le miR-122 pourrait jouer un rôle essentiel dans la régulation de la



**Tableau 3. Caractérisation des miARNs présents dans 12 fluides biologiques.**

Dans chacun des fluides testés, la quantité des miARNs a été estimée, ainsi que le contenu en miARNs. Les miARNs les plus fréquemment retrouvés sont indiqués, ainsi que ceux qui sont spécifiquement retrouvés dans un seul des fluides testés (Baulande *et al.*, 2014; Weber *et al.*, 2010).

Nature du fluide	Liquide amniotique	Lait maternel	Lavage bronchique	Liquide céphalo-rachidien	Colostrom	Liquide péritonéal	Liquide pleural	Salive	Liquide séminal	Larmes	Urine
Concentration (µg/l)	570	47 240	1 128	111	585	775	470	1 945	17 770	564	94
Nombre de miARN détectés *	359	429	260	212	386	397	210	548	436	320	204
Les 10 miARN les plus abondants	miR-518e miR-335 miR-302cb miR-515-3p miR-452b miR-892a miR-671-5p	miR-335 miR-26a-2 miR-181d miR-509-5p miR-524-5p miR-137 miR-26a-1	miR-515-3p miR-335 miR-509-5p miR-616 miR-545 miR-302d miR-223	miR-335 miR-515-3p miR-892a miR-892a miR-873 miR-509-5p miR-223 miR-302d	miR-509-5p miR-181d miR-335 miR-518e miR-518e miR-134 miR-515-5p miR-223 miR-671-5p	miR-515-3p miR-892a miR-518e miR-892a miR-134 miR-509-5p miR-223 miR-515-5p	miR-515-3p miR-892a miR-223 miR-616 miR-873 miR-335 miR-302d	miR-335 miR-892a miR-515-3p miR-892a miR-545 miR-27ab miR-518e miR-518e miR-509-5p	miR-518e miR-590-3p miR-588b miR-588b miR-873 miR-590-5p miR-197b miR-218	miR-335 miR-515-3p miR-137 miR-509-5p miR-590-3p miR-873 miR-892a	miR-515-3p miR-335 miR-515-3p miR-892a miR-509-5p miR-223 miR-873 miR-302d miR-590-5p
miARN spécifiques du type de fluide	miR-636 miR-92a-1 miR-376b miR-26b miR-556-5p miR-593	miR-193b miR-10a miR-28-5p miR-924 miR-150 miR-518c miR-217	miR-515-3p miR-335 miR-509-5p miR-616 miR-545 miR-302d miR-223	miR-577 miR-515-3p miR-892a miR-892a miR-873 miR-509-5p miR-223 miR-302d	miR-18a miR-513a-5p miR-10b miR-192 miR-193b miR-130a	miR-129 miR-583 miR-223 miR-627 miR-29b-1 miR-29b-1	miR-224 miR-483-3p miR-518f miR-508-3p miR-551b miR-182 miR-135a miR-139-3p miR-801 miR-96 miR-369-3p miR-519d miR-299-5p miR-373 miR-330-5p	miR-182 miR-450b-5p miR-622 miR-141 miR-26a miR-145 miR-135b miR-381 miR-96 miR-1228 miR-431	miR-508-5p miR-644 miR-17 miR-380 miR-29b-2 miR-340	miR-637	miR-923

différenciation des hépatocytes et du développement du foie. Une étude a montré que, en tant que stimulateurs de la transcription, HNF6 (Hepatocyte Nuclear Factor 6) favorisait l'expression du miR-122, indispensable à la bonne progression de la différenciation des hépatocytes (Laudadio *et al.*, 2012). Les miARNs peuvent donc, eux aussi, être sous le contrôle de facteurs de transcription, rendant encore plus complexe la compréhension de la régulation des métabolismes.

Plus spécifiquement, concernant le métabolisme des lipides et du cholestérol, de nombreuses études ont été menées. Ainsi, le traitement de souris avec un anti-miR-122 induit une diminution du niveau de cholestérol et TG hépatique et plasmatique ainsi qu'une inhibition de la lipogenèse en réduisant l'expression de *fas* et *acc* (Esau *et al.*, 2006). De même, une étude réalisée sur des cellules HepG2 a montré l'implication du miR-122 dans la lipogenèse hépatique en augmentant indirectement SREBP-1c (Sterol regulatory element binding protein 1c) et la diacylglycérol acyltransférase-2 (DGAT2), entraînant ainsi une surexpression des gènes *fas* et *acc*. D'autre part, l'inhibition indirecte de la  $\beta$ -oxydation des acides gras par le miR-122 s'est également manifestée par l'inhibition de la CPT1 $\alpha$  (Carnitine Palmitoyl Transférase 1 $\alpha$ ) (Iliopoulos *et al.*, 2010).

Le miR-122 semble avoir une incidence sur la biosynthèse du cholestérol en ciblant des gènes codant pour des enzymes de la biosynthèse du cholestérol ou leurs régulateurs. En effet, il a été démontré que HMGCS (HMG-CoA synthase), enzyme clé de la synthèse du cholestérol était indirectement induits par le miR-122 (Tsai *et al.*, 2012). Les taux d'expression de *fas*, *acc* et *scd1* impliqués dans la synthèse des acides gras et *hmgcs* ont été indirectement réduits par le traitement anti-miR-122 (Esau *et al.*, 2006). Ceci suggère que l'inhibition de miR-122 pourrait constituer une cible thérapeutique importante dans le traitement de la stéatose hépatique.

Un autre miARN impliqué dans le métabolisme du cholestérol hépatique est le miR-33, qui provient de deux miARNs introniques (miR-33a et miR-33b). Le miR-33a cible directement les transporteurs de cholestérol *Abca1* et *Abcg1*, responsables du flux de cholestérol, ce qui suggère l'importance de ce miARN dans le métabolisme du cholestérol. Ainsi, l'inhibition du miR-33a conduit à l'augmentation du taux d'HDL plasmatique (Rayner *et al.*, 2010). Le miR-33b, quant à lui, serait davantage impliqué dans la régulation de la  $\beta$ -oxydation des acides gras réduisant lui aussi l'expression de CPT1 $\alpha$ .

D'autres miARNs ont également été identifiés. Le miR-148a, impliqué dans le captage des LDL en agissant sur leurs récepteurs LDLR. Le miR-143, impliqué dans le métabolisme hépatique

**Tableau 4. Liste non exhaustive des miARNs présents dans les différents tissus.**

BAT : tissu adipeux brun ; liver : foie ; sk. Muscle : muscle squeletique ; WAT : tissu adipeux blanc. (Vienberg *et al.*, 2017)

$\beta$ -cells	Liver	Sk. Muscle	Heart	WAT	BAT
miR-375	miR-122	miR-1	miR-25	miR-365	miR-365
miR-200 family	miR-33a/b	miR-206	miR-199a-214	miR-193b	miR-193b
miR-7 family	miR-148a	miR-208b	miR-155	miR-126	miR-155
miR-335	miR-143	miR-133a/b		miR-92a	miR-133a/b
miR-152	miR-103/107	miR-499			miR-196a
miR-29 family	miR-802	miR-30b			miR-455
miR-181b	miR-181a	miR-143			
miR-184					
miR-187					
miR-204					
miR-17-92					
miR-129					
miR-34a					
miR-215					
miR-130a/b					

et l'homéostasie glucidique (Jordan *et al.*, 2011). Le miR-30c qui dégrade les ARNm MTTP, réduisant indirectement la formation des lipoprotéines et donc l'exportation des lipides favorisant une réduction du taux de lipides plasmatiques.

Les miARNs régulent également la lipogenèse *de novo* en ciblant et en modulant les facteurs de transcription SREBP et LXR, ainsi que l'oxydation des acides gras par la modulation des PPAR. Ainsi, miR-33a, miR-33b et miR-122 modulent SREBP1. Des souris KO miR-33 ont une expression hépatique de SREBP1 élevée qui entraîne une synthèse accrue d'acides gras et une accumulation de lipides dans le foie. Les miR-613 et miR-155 répriment LXR afin de réduire les taux d'expression des gènes de la lipogenèse (SREBP1C, FAS, CHREBP, ACC) et ainsi diminuer l'accumulation des gouttelettes lipidiques dans les cellules HepG2 (Zhao *et al.*, 2014). PPAR $\alpha$  est sous le contrôle des miR-27b et miR21 qui réduisent les niveaux de protéines PPAR $\alpha$  lorsqu'ils sont surexprimés.

Les tableaux 4 et 5 résument les miARNs tissus-spécifiques ainsi que leur implication dans le métabolisme lipidique. Ce dernier tableau montre qu'un large éventail de miARNs participe au métabolisme des lipides et des lipoprotéines. Ils peuvent avoir des effets régulateurs positifs ou négatifs sur le métabolisme des lipides ainsi que sur l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines (Sud *et al.*, 2015). Cela implique la modulation de la synthèse des lipides, de la  $\beta$ -oxydation des acides gras et du métabolisme des lipoprotéines en ciblant les enzymes et les protéines impliquées dans ces voies métaboliques.

Toutes ces études montrent que les miARNs jouent un rôle central dans la régulation du métabolisme hépatique. Les miARNs les plus impliqués et les plus importants sur le plan métabolique servent aujourd'hui de cibles pour le traitement des troubles métaboliques.

## 7.6 miARNs : biomarqueurs et rôle thérapeutique

Les avancées sur les miARNs et leurs actions moléculaires donnent lieu à des applications industrielles innovantes. Parmi les perspectives les plus prometteuses figurent l'utilisation des miARNs en thérapie médicale et leur potentiel en tant que nouveaux biomarqueurs (Hayes *et al.*, 2014).

Il est bien décrit que les miARNs présents dans les liquides biologiques évoluent dans des conditions pathologiques telles que l'obésité, les cancers ou des maladies chroniques comme le

**Tableau 5. Liste des miARNs qui régulent le métabolisme des lipides et des lipoprotéines (Sud *et al.*, 2015)**

miRNA	Lipid metabolism gene	Function of gene	Reference
miR-33a/33b	SRBEP HADHB CPT1a CROT AMP $\alpha$ ABCA1 NPC1	Cholesterol biosynthesis, uptake FA oxidation FA oxidation FA oxidation FA oxidation Cholesterol efflux Cholesterol metabolism	[Horie <i>et al.</i> , 2013; Najafi-Shoushtari <i>et al.</i> , 2010] [Davalos <i>et al.</i> , 2011; Gerin <i>et al.</i> , 2010] [Davalos <i>et al.</i> , 2011; Gerin <i>et al.</i> , 2010] [Davalos <i>et al.</i> , 2011; Gerin <i>et al.</i> , 2010] [Davalos <i>et al.</i> , 2011; Gerin <i>et al.</i> , 2010] [Najafi-Shoushtari <i>et al.</i> , 2010] [Rayner <i>et al.</i> , 2010]
miR-122	SREBP-1c FAS ACC-1 ACC-2 HMGCR SCD1 DGAT2	FA synthesis FA biosynthesis FA biosynthesis FA oxidation Cholesterol synthesis Cholesterol synthesis Triglyceride synthesis	[Esau <i>et al.</i> , 2006] [Esau <i>et al.</i> , 2006] [Esau <i>et al.</i> , 2006] [Esau <i>et al.</i> , 2006] [Esau <i>et al.</i> , 2006] [Esau <i>et al.</i> , 2006] [Esau <i>et al.</i> , 2006]
miR 613	LXR $\alpha$	Lipid synthesis	[Zhao <i>et al.</i> , 2014]
miR-155	LXR $\alpha$	Lipid synthesis	[Miller <i>et al.</i> , 2013]
miR-370	Cpt1a	FA oxidation	[Iliopoulos <i>et al.</i> , 2010]
miR-199a	PPAR $\delta$	FA oxidation	[el Azzouzi <i>et al.</i> , 2013; Li <i>et al.</i> , 2014]
miR-27a/b	SR-BI, ABCG1 and ABCA1	Cholesterol metabolism	[Zhang, M <i>et al.</i> , 2014] [Zhang, M <i>et al.</i> , 2014]
miR-24	Insig1	Lipogenesis	[Ng <i>et al.</i> , 2014]
miR-185, miR-96, and miR-223	SR-B1	Cholesterol uptake	[Wang <i>et al.</i> , 2013]
miR-758, miR-26, miR-106b, miR-144, miR-145, miR-19b	ABCA1 ABCA1 ABCA1 ABCA1 ABCA1 ABCA1	Cholesterol efflux	[Ramirez <i>et al.</i> , 2011] [Sun <i>et al.</i> , 2012] [Kim <i>et al.</i> , 2012] [Ramirez <i>et al.</i> , 2013] [Kang <i>et al.</i> , 2013] [Lv <i>et al.</i> , 2015]
MiR-128-2	ABCA1, ABCG1 and RXR $\alpha$	Cholesterol efflux	[Adlakha and Saini, 2013]

diabète de type 2 ou maladies du foie (Arrese *et al.*, 2015; Mitchell *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). Cela fait des miARNs d'excellents candidats en tant que biomarqueurs de certaines maladies. Les avantages de l'utilisation des miARNs comme biomarqueurs incluent à la fois la sensibilité de leur détection et leur spécificité accrue qui font des miARNs des outils de diagnostic très intéressants et prometteurs.

Sur le plan physiopathologique, les miARNs peuvent être manipulés par des analogues de nucléotides complémentaires afin de diminuer leur activité effective : on parle alors d'antagonistes (antagomiRs) (Stenvang *et al.*, 2012). Les antagomiRs se lient aux miARNs ou leurs précurseurs et les éliminent ainsi du pool biologiquement disponible (Elmén *et al.*, 2008). Ainsi, l'utilisation d'un antagomiR ciblant le miR-122 a montré la possibilité d'inhiber son activité et donc son utilisation prometteuse dans un cadre thérapeutique. Par exemple, le miR-122 est nécessaire à la réplication du virus de l'hépatite C : l'administration de l'antagomiR a permis de supprimer l'expression de miR-122 et d'empêcher la réplication du VHC (Krützfeldt *et al.*, 2005; Ottosen *et al.*, 2015). En ce qui concerne le métabolisme, seuls quelques inhibiteurs de miARNs sont en cours de développement, dont un anti-miR-103/107 pour le traitement de la NASH chez des patients atteints du diabète de type 2 (RegulusTherapeutics, 2015). Le traitement repose sur sa capacité à inhiber l'activité du miR-103/107, dont la régulation entraîne une résistance à l'insuline (Trajkovski *et al.*, 2011). Cet effet antagoniste du miR-103/107 chez la souris a été suivi d'une diminution de la teneur en TG hépatiques et d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline (RegulusTherapeutics, 2015). Ainsi, en inhibant les miARNs, le métabolisme et plus précisément l'expression de leurs gènes cibles sont modifiés.

Les miARNs peuvent aussi être directement utilisés dans un rôle thérapeutique et non en tant que cibles thérapeutiques. Les thérapies basées sur les miARNs offrent des avantages : ils peuvent cibler plusieurs ARNm. Cependant, les traitements médiés par les miARNs comportent des défis : les miARNs non modifiés sont rapidement dégradés (Chen *et al.*, 2015), ce qui souligne la nécessité de les modifier ou de les encapsuler. L'administration de médicaments à base de miARNs peut être réalisée sous différente forme : voie intraveineuse, injection locale, administration orale... Les approches thérapeutiques basées sur les miARNs pourraient constituer de nouveaux outils innovants dans le traitement de diverses maladies.

## 7.7 Les miARNs chez le canard

La plupart des rapports sur les rôles régulateurs des miARNs dans le métabolisme lipidique se concentrent sur les mammifères, peu de données ont décrit la régulation du métabolisme lipidique par ces miARNs et leurs mécanismes chez les oiseaux, en particulier chez le canard. Une analyse des miARNs fonctionnels impliqués dans la stéatose hépatique de l'oie landaise gavée a permis d'identifier quelques miARNs présentant des différences significatives d'expression dans le foie (Chen *et al.*, 2017). Ainsi le miR-122 connu pour être impliqué dans le métabolisme des glucides et régulé positivement chez les patients atteints de NASH (Cheung *et al.*, 2008) est surexprimé chez les oies gavées. Il en est de même pour le miR-221 connu pour être régulé positivement dans les tissus des patients atteints d'obésité (Meerson *et al.*, 2013). Le miR-122 a été trouvé comme le plus dominant dans le foie des oies puisqu'il représentait 70% des miRs en présence. Cependant son expression dans le foie n'a montré aucune variation significative (Chen *et al.*, 2017). De plus, une étude par séquençage différentiel a été réalisée chez les canards Cherry-Valley et a permis de montrer que le miR-16020, jusque-là inconnu, associé au miR-144, pouvaient lier la région 3'-UTR du gène FAS afin de contrôler son expression (He *et al.*, 2016). Ces mêmes auteurs ont également observé que le miR-144 était directement lié au métabolisme lipidique et ont identifié un de ses gènes cibles : ELOVL6. Afin de vérifier la possibilité d'influencer ce gène via le miR-144, les auteurs ont transfecté des hépatocytes de canard (avec des imitateurs ou inhibiteurs du miR-144) afin de réguler le niveau de miR-144. Les résultats ont montré que l'expression de ELOVL6 dans les hépatocytes de canard était régulée négativement ou positivement selon que le miR-144 était présent ou inhibé. Les teneurs en acides gras des hépatocytes ont ainsi été modifiées. Lorsque l'expression d'ELOVL6 était supprimée, la teneur en acide palmitique (C16: 0) était augmentée ; les teneurs en acide oléique (C18: 1, n-9), en acide eicosénoïque (C20: 1, n-9) et en acide éicosatriénoïque (C20: 3) étaient réduites. Les teneurs en acide myristique (C14: 0) et en acide palmitique (C16: 0) ont été réduites et la teneur en acide oléique (C18: 1, n-9) était augmentée lorsque ELOVL6 était régulée positivement (inhibiteur de miR-144 transfecté). Il a ainsi été démontré que le miR-144 pouvait réguler les pourcentages d'acides gras dans les hépatocytes de canard en affectant l'expression de ELOVL6 (He *et al.*, 2016, 2017). Ces études réalisées *in vitro* ont montré la possibilité de réguler l'expression de gènes hépatiques par le biais de miARNs. Il apparaît dès lors intéressant d'établir un miRNome chez le canard mulard au cours du gavage afin d'observer et d'identifier les miARNs impliqués dans la mise en place de la stéatose hépatique et dont l'activité pourrait être éventuellement modulée.



## **Matériels et méthodes**



Au cours de ma thèse, deux procédures expérimentales majeures ont été menées.

La première expérimentation (*EXP1*) a été subdivisée en deux études distinctes. La première étude consiste en une analyse cinétique du métabolisme intermédiaire et du stress cellulaire au cours du gavage chez le canard mulard (*EXP1 cinétique*). La seconde est innovante avec une analyse globale des microARNs chez le canard mulard au cours du gavage (*EXP1 microARNs*).

La seconde expérimentation (*EXP2*) a également été réalisée en deux parties complémentaires. La première est une étude très expérimentale et exploratoire visant à observer l'impact de l'alimentation des canards en période de gavage sur les mécanismes autophagiques durant la mise en place de la stéatose hépatique chez le canard mulard (*EXP2 chloroquine*). La seconde étude a traité l'implication de la voie de signalisation mTOR dans le développement de la stéatose hépatique chez le canard mulard gavé (*EXP2 rapamycine*).

L'ensemble des techniques utilisées lors de ces deux expérimentations vont être décrites dans cette partie. Toutes les procédures expérimentales réalisées sur les canards mulards ont été effectuées conformément au comité d'éthique (agrément n° C40-037-1) et aux directives nationales et françaises sur les soins des animaux à des fins de recherche.

## **1. Conditions d'élevage**

Issus du couvoir Grimaud (Roussay, France), les canards mulards sont arrivés à la station expérimentale de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) du Domaine d'Artiguères (Benquet, France) à l'âge de un jour, époinés et vaccinés. Ils ont été élevés dans un bâtiment de type Louisiane de 80 m<sup>2</sup> avec 2,6 canards / m<sup>2</sup> sans accès extérieur. Ils ont bénéficié d'un éclairage naturel et ont été élevés sur une litière de copeaux et abreuvés à l'aide de pipettes pendant les premières semaines.

Dès le premier jour de vie jusqu'à l'âge de 4 semaines, les canards ont été nourris *ad libitum* avec des granulés de 2,5 mm composés de 17,5% de protéines brutes (PB), 2 850 kcal / kg pour la phase de démarrage. De 5 à 8 semaines, les canards ont reçu un aliment de croissance composé de 15,5% de PB, 2 800 kcal / kg. Enfin, de 8 à 12 semaines, les canards ont reçu un rationnement quantitatif avec suivi de leur poids afin de préparer la mise en gavage.

## 2. Gavage et effectifs

Le gavage est réalisé par un gaveur unique et les animaux sont, pendant cette période, placés en stabulation collective à raison de 4 par loge.

L'aliment de gavage est composé de 47% d'eau et 53% de matière sèche (MS) Palma de Maisadour (Haut-Mauco, France) contenant 98% de maïs et 2% de prémix, 3 230 kcal / kg ME (CP : 7,2%, matière grasse : 3,2%, cellulose brute : 2%, cendres brutes : 2,1%, lysine : 0,23%, méthionine : 0,15%, calcium : 0,12%, phosphore : 0,25% et sodium : 0,1%).

Le gavage a été réalisé pendant 11 jours pour l'*EXP1*. Ces deux semaines de gavage ont compris 22 repas (2 / jour) dont la quantité a été définie selon la capacité d'ingestion du canard mulard. La courbe de gavage est présentée sur la Figure 25. Pour l'*EXP2*, les études étant basées sur la mise en place de la stéatose hépatique, le gavage n'a pas dépassé le 4<sup>ème</sup> repas.

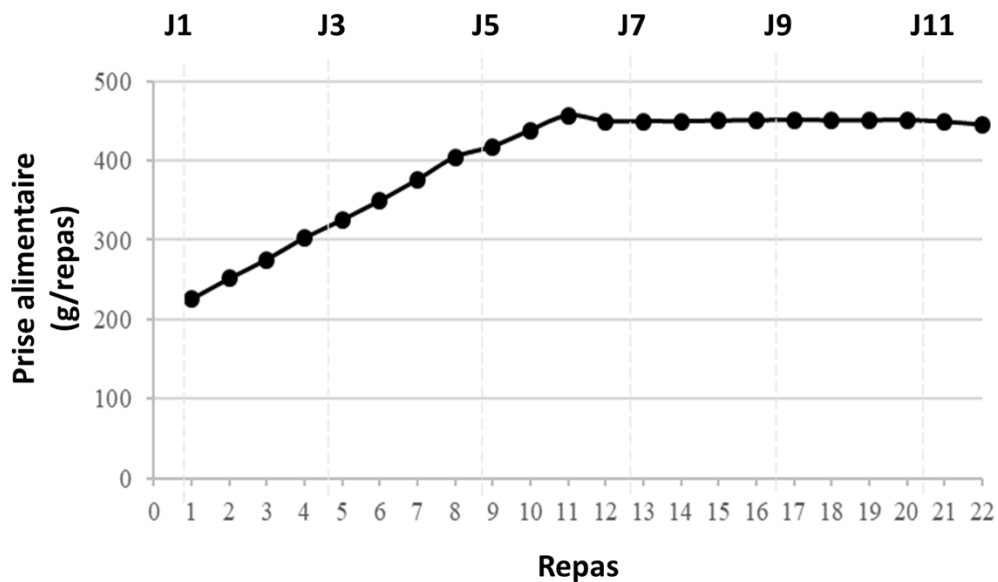
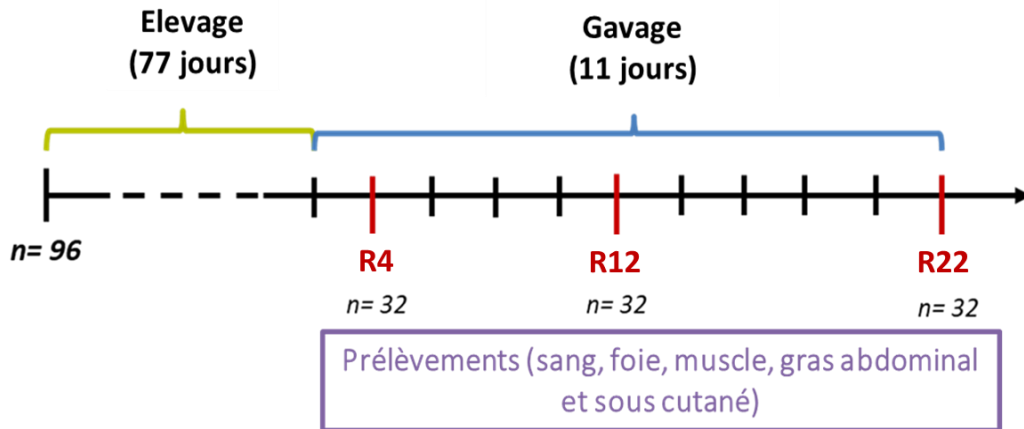


Figure 25. Courbe de gavage des canards mulards (*EXP1* et *EXP2*)

Pour l'**EXP1**, 96 canards ont été mis en phase de gavage à l'âge de 12 semaines. Trois points de prélèvements ont été répartis sur la période de gavage afin d'obtenir une cinétique : début du gavage (4<sup>ème</sup> repas, R4), mi-gavage (12<sup>ème</sup> repas, R12) et fin de gavage (22<sup>ème</sup> repas, R22). À chaque période, 32 canards ont été abattus deux heures après le repas (Figure 26).

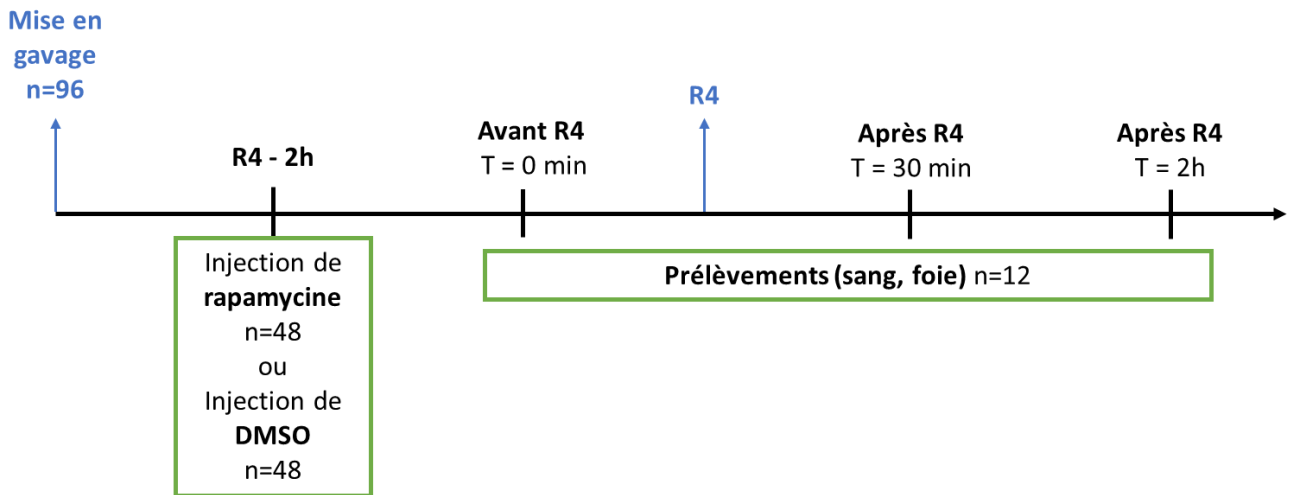


**Figure 26. Protocole expérimental de l'EXP1 cinétique et microARNs**

R : repas

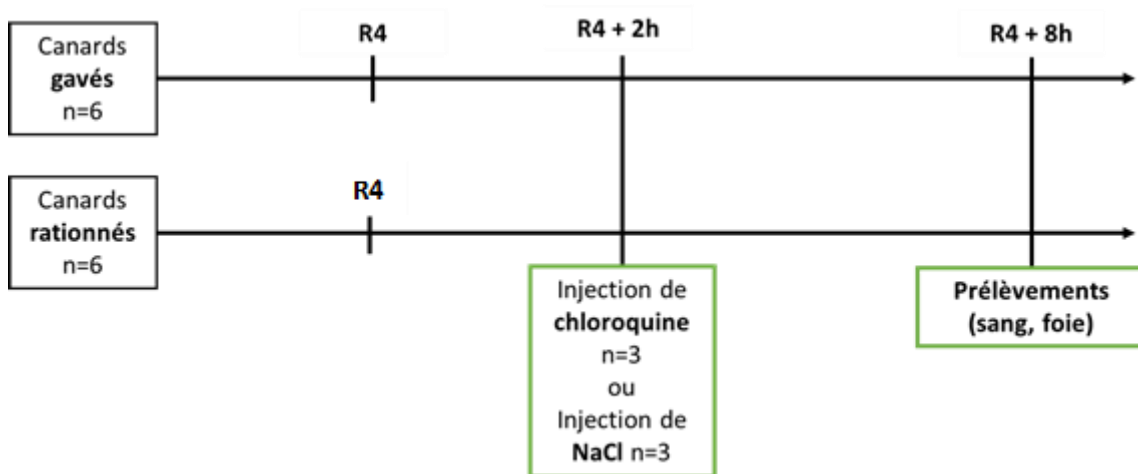
Pour l'**EXP2 rapamycine**, 96 canards, répartis en 2 lots de 48 individus ont débuté le gavage à l'âge de 12 semaines. Deux heures avant le 4<sup>ème</sup> repas, les canards ont reçu une injection intrapéritonéale (500µl/Kg) soit de rapamycine (inhibiteur pharmacologique de la voie mTOR, 0,5 mg/kg, groupe traité, n=48) soit de diméthyl sulfoxyde (DMSO, vecteur, groupe contrôle, n=48). Un échantillon de chaque lot (n=12) a ensuite été abattu à quatre temps : juste avant le 4<sup>ème</sup> repas (T=0), 30 minutes, 2h puis 8h après le 4<sup>ème</sup> repas (Figure 27).

Pour l'**EXP2 chloroquine**, cette étude étant très exploratoire, uniquement 12 canards ont été élevés et répartis-en 2 lots (n=6). Six canards ont été mis en gavage à l'âge de 12 semaines tandis que les 6 autres ont poursuivi le rationnement débuté à l'âge de 8 semaines. Chaque lot de 6 a été séparé en 2 sous lots (traités/témoins). 2 heures après le 4<sup>ème</sup> repas de gavage ou de rationnement, les canards ont reçu une injection intrapéritonéale (500µl/Kg) soit de chloroquine (50 mg/Kg, groupe traité, n=3 par sous lot) soit d'eau physiologique (vecteur, NaCl 0.9%, groupe contrôle, n=3 par sous lot). Ils ont ensuite été abattus 6 heures après injection, soit 8 heures après le 4<sup>ème</sup> repas (Figure 28).



**Figure 27. Protocole expérimental *EXP2 rapamycine***

DMSO : diméthyl sulfoxyde ; R, repas



**Figure 28. Protocole expérimental *EXP2 chloroquine***

NaCl 0,9% : Chlorure de sodium ; R : repas

### 3. Abattage des canards et prélèvements

L'abattage des canards pour l'ensemble des expérimentations a été réalisé de manière conventionnelle à la station expérimentale (INRA, Artiguères), par électronarcose et saignements.

Le sang a été prélevé dans des tubes EDTA et le plasma a été séparé par centrifugation (3000 x G pendant 10 minutes à 4°C) puis stocké à -20°C.

Les tissus (foie, muscle (*pectoralis major*), gras abdominal) ont été pesés, puis échantillonnés soit dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml (environ 100 mg) soit en papillotes (papier aluminium). Ils ont ensuite été congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C.

### 4. Tests de pasteurisation

Les tests de pasteurisation ont été effectués sur les foies en fin de gavage sur l'*EXPI* afin d'estimer le taux de fonte des foies gras. Pour cela, des échantillons de foies (60 g du haut du grand lobe) ont été placés dans des boîtes de conserve 4 heures après l'éviscération. Après sertissage, l'autoclave a été préchauffé à 70°C et les boîtes ont été placées à l'intérieur. Dès que l'autoclave a été fermé, la pression a été fixée à 0,8 bar. Les récipients ont été chauffés pendant 1 heure à 85°C, puis refroidis dans l'autoclave pendant 30 minutes (valeur de pasteurisation : 170 minutes). Les boîtes ont été conservées au froid jusqu'à l'ouverture (8 jours plus tard). Avant l'ouverture, les boîtes de conserve ont été chauffées au bain-marie, puis les échantillons de foies ont été pesés sans leur graisse afin de quantifier le taux de fonte.

### 5. Analyses biochimiques

Des dosages plasmatiques ont été réalisés sur l'*EXPI cinétique* et l'*EXP2*. La glycémie, la triglycéridémie et la cholestérolémie ont été quantifiées par méthode colorimétrique en utilisant les kits enzymatiques provenant de BioMérieux (Marcy-l'Etoile, France) selon les recommandations du fabricant.

## 6. Biologie moléculaire

### 6.1 Extraction des ARN totaux tissulaires

Les ARN totaux ont été extraits à partir des tissus congelés suivant la méthode du Trizol (Invitrogen/Life technologies) pour l'*EXPI cinétique*, du Trizol LS (Invitrogen/Life technologies) pour l'*EXPI microARNs*, et du Ribozol (VWR Life Science) pour l'*EXP2*.

Les échantillons de foie, muscle ou gras abdominal (100 mg) ont été broyés dans 1mL de réactif avec un Ultra-Turrax (IKA) ou un broyeur à billes. Une étape de clarification a ensuite été ajoutée afin de faire culotter les débris non broyés par centrifugation (10 minutes, 7000 x g). La phase aqueuse supérieure a été récupérée, mélangée à 200 µL de chloroforme puis centrifugée à 4°C à 12000 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 12000 x G pendant 20 minutes. Le culot d'ARN a ensuite subi deux lavages à l'éthanol 75% puis a été solubilisé dans un volume approprié d'eau RNase free. Typiquement, le volume de solubilisation était de 100 à 300 µL pour le foie selon l'épaisseur du culot, 100 µL pour le muscle et 30 µL pour le gras abdominal. Les ARN extraits ont ensuite été stockés à -80°C.

La concentration totale des ARN extraits a été déterminée par dosage spectrophotométrique au NanoVue (GE Healthcare) (*EXPI cinétique*) ou au lecteur de microplaque Epoch 2 (BioTek) (*EXPI microARNs et EXP2*). Les ARN totaux ont été normalisés à 500 ng/µL et leur qualité été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

### 6.2 Extraction des ARN totaux plasmatiques

Les ARN plasmatiques ont été extraits à partir des plasmas congelés suivant la méthode du Trizol LS (Invitrogen/Life technologies) (*EXPI microARNs*).

400  $\mu\text{L}$  de plasma ont été utilisés pour 1 mL de Trizol LS en suivant les mêmes étapes que pour les extractions d'ARN totaux tissulaires. Le culot d'ARN obtenu a été solubilisé dans 15  $\mu\text{L}$  d'eau RNase free.

La concentration totale des microARNs extraits a été mesurée grâce à l'emploi du kit Qubit microRNA Assay kit (Thermofisher) et du fluoromètre Qubit® 2.0 (Thermofisher). La quantification des ARNs plasmatiques purs a été possible et réalisée à un seuil de détection de 0,5 ng/ $\mu\text{L}$ .

### 6.3 Transcription inverse

Après un traitement DNase réalisé à l'aide du kit Quanta DNase (Quanta Biosciences, USA), la rétrotranscription des ARN totaux en ADNc a été réalisée sur 3  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux. Des contrôles négatifs ont été réalisés afin de vérifier l'absence de contamination en ADN génomique lors de l'amplification avec un blanc sans ARN de départ permettant de vérifier la contamination éventuelle des réactifs (nommé Blanc RT) et un blanc sans enzyme de rétrotranscription permettant de vérifier la contamination possible de l'échantillon lui-même (Blanc ADN).

Pour l'**EXPI**, la rétrotranscription a été réalisée grâce à l'enzyme Superscript III d'Invitrogen. La réaction se compose en 2 étapes, la dénaturation puis la transcription inverse. Lors de la dénaturation, le mix 1 est distribué dans tous les puits. L'ensemble est placé dans un thermocycleur selon le programme suivant : 65°C / 5 minutes, 4°C  $\infty$ . Lors de la transcription inverse, deux mix sont utilisés afin de réaliser la synthèse des ADN complémentaires (mix 2 avec Superscript III) et le blanc ADN (mix 2 sans Superscript III) (Tableau 6) L'ensemble est placé dans un thermocycleur selon le programme suivant : 25°C / 5 minutes, 55°C / 1 h, 70°C / 15 minutes, 4°C  $\infty$ .

Pour l'**EXP2**, la rétrotranscription a été réalisée grâce à l'IScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad, USA). Deux mix sont utilisés afin de réaliser la synthèse des ADN complémentaires (mix A IScript RT) et le blanc ADN (mix B IScript no RT) (Tableau 7). L'ensemble est placé dans un thermocycleur selon le programme suivant : 25°C / 5 minutes, 46°C / 20 minutes, 95°C / 1 minute, 4°C  $\infty$ .

Au cours de la rétrotranscription, la luciférase, un ARN exogène non présent chez le canard a été ajouté afin de permettre la normalisation des données en tant que gène de référence (Desvignes *et al.*, 2011; Marandel *et al.*, 2013). La luciférase a été utilisée à 100 pg/ $\mu$ L (Promega, USA).

**Tableau 6. Composition des mix pour la rétrotranscription des ARN totaux en ADNc (EXP1)**

	Volume ( $\mu$ L)
<b><u>Mix 1</u></b>	
OligodT	0,5
Random primer	0,5
PCR mix (dNTP)	1
Luciférase (100 pg/ $\mu$ L)	1
H <sub>2</sub> O	3,5
<b><u>Mix 2 avec Superscript III (échantillons + blanc RT)</u></b>	
H <sub>2</sub> O	1,5
Tampon 5X	4
dTT	1
RNase OUT	1
Superscript III	0,5
<b><u>Mix 2 sans Superscript III (blanc ADN)</u></b>	
H <sub>2</sub> O	2
Tampon 5X	4
dTT	1
Rnase OUT	1

**Tableau 7. Composition des mix pour la rétrotranscription des ARN totaux en ADNc (EXP2)**

	Volume ( $\mu$ L)
<b><u>Mix A (échantillons + blanc RT)</u></b>	
Iscrip RT Supermix	4
H <sub>2</sub> O	6
Luciférase (100 pg/ $\mu$ L)	1
<b><u>Mix B (blanc ADN)</u></b>	
Iscrip NO RT	4
H <sub>2</sub> O	6
Luciférase (100 pg/ $\mu$ L)	1



## 6.4 Conception et validation des amorces

Une grande partie des amorces utilisées ont été conçues et testées par A. Tavernier (Tavernier *et al.*, 2016).

La conception de nouvelles amorces (notamment des gènes impliqués dans l'autophagie et le métabolisme du cholestérol) a été réalisée grâce à l'alignement des séquences protéiques de l'homme, de la souris, du canard commun et/ou du poulet sur le logiciel Multalin (INRA, Toulouse, France) (Corpet, 1988) afin d'identifier les exons les plus conservés pour chaque gène étudié. Ces exons sont ensuite traités sur le logiciel Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Rozen et Skaletsky, 1999 ; Koressaar et Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012) afin de construire des amorces spécifiques. La sélection des couples d'amorces a été faite de façon à ce que 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.

Pour la validation des amorces, un pool d'échantillons a été réalisé. A partir de ce pool, une gamme en 5 points a été faite selon les dilutions en cascades suivantes : 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 et 1/320). Un blanc RT et un blanc ADN ont également été dilué au 1/80 (milieu de gamme). Les ADNc ont été amplifiés et quantifiés grâce à un mix réactionnel contenant du SyBr Green Fast Mix (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.

Après amplification, les primers ont été validés s'ils présentaient 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

Les séquences des primers validés sont compilées dans le Tableau 8.

**Tableau 8. Séquences des primers validés**

<b>Gènes (nom et symbole)</b>	<b>Séquence des amorces 5'-3'</b>	
<b><u>Métabolisme des lipides</u></b>		
Cytochrome P450 family 5 <i>cyp51a</i>	Forward	CCTAACGCGGTATTTTTGGA
	Reverse	GGCAATGACTTGCTGTCAA
7-Dehydrocholesterol Reductase <i>dhcr7</i>	Forward	CAAGCATCCTTTTCCTGCTC
	Reverse	CCTGGAAAGCAACCCAAATA
3-ketoacyl-CoA thiolase, isoform alpha <i>hadh</i>	Forward	ACTTCAGCAAAGCGGTAGGA
	Reverse	ATCCAACCCAACGTAGTCCA
Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase <i>hmgcr</i>	Forward	CATTTTGCTCGTGTCTGGA
	Reverse	ATCCATACTGGCCATTCGAG
Perilipin 2 <i>plin2</i>	Forward	CAAACCTTCCTTTGGTGAGC
	Reverse	TTGTCCAGACCCATACATGC
Sterol O-acyltransferase 1 <i>soat1</i>	Forward	GCATTTCCTCAGTTTCGCAAT
	Reverse	TGTGGAGTTCCACCAGTCCT
<b><u>Stress cellulaire</u></b>		
Asparagine Synthetase <i>asns</i>	Forward	GGTGATCACGGAAAAGAAGC
	Reverse	GTACAGCCCTTTTTGGCAGA
Activating Transcription Factor 4 <i>atf4</i>	Forward	CAGGTCCTTTTCCTCTGCTG
	Reverse	CCTGGGATTCCTGGGATACT
Autophagy related gene 4 <i>atg4b</i>	Forward	AAGGGAAGAGGCAGATGGAT
	Reverse	CCGCCTGATTTCTTCCATTA
Autophagy related gene 8 <i>atg8/lc3</i>	Forward	AAATCCCGGTCATCATTGAA
	Reverse	AGGAAGCCATCCTCCTCCTT
Autophagy related gene 9 <i>atg9</i>	Forward	TCTACGACGAAGACGTGCTG
	Reverse	CCGCTTTGTACTGGAAGAGC
Sequestosome 1 <i>sqstm1/p62</i>	Forward	AGTCTCCCCGTGATATGGTG
	Reverse	ACCATGTTGTGCTCCTTGTG
<b><u>Facteurs de transcription</u></b>		
AMP-activated protein kinase <i>ampk</i>	Forward	GCAAGCCTTTTTGATGCTGT
	Reverse	TTCATAAAGGCAGGCTTTGG
		GGAAGAATGGACGAAAGCC
Proteine kinase B <i>akt</i>	Forward	AGTGCCTTTCCCAGTAGCT
	Reverse	
Liver X Receptor Alpha <i>lxra</i>	Forward	CATCTCGACGCTACAATCCA
	Reverse	GTGTGCTGCAGTCTCTCCAC
Mammalian Target of Rapamycin <i>mtor</i>	Forward	ATGGCTTGAAGAGTCGCAGT
	Reverse	AAGGCTTGCAATAGCCAAAA
S6 Protein Kinase 1 <i>s6k1</i>	Forward	ACTTGGCAAAGGTGGCTATG
	Reverse	GGGATGTTTCACTTCCCTCCA

## 6.5 qPCR : méthode Fluidigm

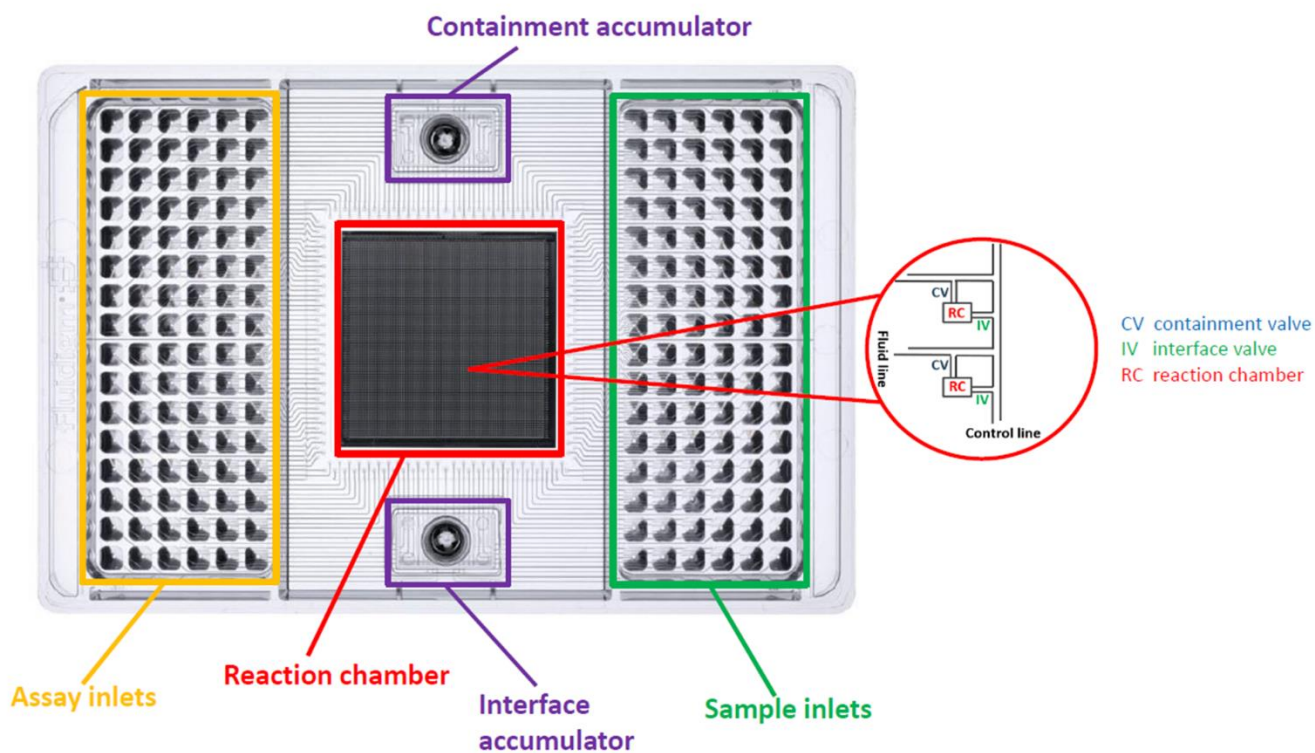
La méthode Fluidigm BioMark a été utilisée pour quantifier l'expression génique de la majorité de nos gènes d'intérêt sur l'*EXPI cinétique*. Cette technologie a permis d'analyser et de traiter en simultané 96 échantillons et 96 couples d'amorces (Figure 29), limitant ainsi les effets « plaques dépendants ». Pour cela, une amplification a été réalisée au préalable à partir de 5 ng /  $\mu$ L d'ADNc mélangé au mix de pré-amplification (Tableau 9) afin de normaliser tous les échantillons et de s'assurer qu'il y avait suffisamment de copies d'ADNc dans chaque puits. La plaque a été mise dans l'appareil (Veriti 96 Fast) suivant le programme suivant : 2 minutes à 95°C, 14 cycles d'amplification comprenant la dénaturation 15 secondes à 95°C et l'hybridation / amplification 4 minutes à 60°C puis  $\infty$  à 10°C. Les échantillons ont ensuite été soumis à une exonucléase (voir mix réactionnel Tableau 9) afin d'éliminer les ADN double brins selon le programme suivant : digestion 30 minutes à 37°C, inactivation 15 minutes à 80°C puis  $\infty$  à 10°C. Enfin, la puce BioMark 96x96 a été préparée d'une part avec les échantillons dans la plaque « sample inlets (Figure 29) mélangé au mix réactionnel qPCR (Tableau 10) tandis que les primers ont été distribués dans la seconde plaque « assay inlets ». La puce a été placée dans le BioMark (Fluidigm) et l'amplification a été lancée selon le programme d'amplification décrit dans le Tableau 11. 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 analysées avec le logiciel d'analyse PCR en temps réel Fluidigm (Fluidigm Corporation v4.1.3). Cette partie du travail a été effectuée sur la plateforme de transcription quantitative GeT-TQ (GenoToul, Toulouse, France).

## 6.6 qPCR : méthode SyBr Green

Pour certains gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol (*EXPI cinétique*), les expressions géniques ont été déterminées par qPCR à partir de 2  $\mu$ L d'ADNc (dilué 80 fois), d'amorces géniques cibles (10  $\mu$ M), de SYBr Green FastMix (Quanta, USA) et d'eau RNase

Figure 29. Plaque d'analyse avec la technologie Fluidigm BioMark



free pour un total de volume de 15  $\mu$ L. Les qPCR ont été réalisées selon le programme suivant : initiation à 95°C / 10 s suivie de 45 cycles d'amplification (60°C / 15 s) sur le thermocycleur CFX (Biorad, USA).

**Tableau 9. Mix réactionnels des étapes de pré-amplification et d'exonucléase**

	<b>Puce 96x96</b>
<b><u>Mix de pré-amplification</u></b>	
Fluidigm PreAmp Master Mix	106
H <sub>2</sub> O	159
Pool de primers à 0,2 $\mu$ M	132,5
<b><u>Mix exonucléase</u></b>	
H <sub>2</sub> O	147
Exonuclease I Reaction Buffer	21
Exonuclease I	42

**Tableau 10. Mix réactionnel de l'étape de qPCR, plaque « sample inlets »**

	<b>Puce 96x96</b>
<b><u>Sample mix</u></b>	
2X TaqMan Gene Expression Master Mix	440
20X DNA Binding Dye Sample Loading Regent	44
20X EvaGreen	44
TE low EDTA	132

**Tableau 11. Programme amplification BioMark**

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

## 6.7 RT-qPCR : méthode TaqMan (FRET)

Cette méthode a été utilisée pour la détection des microARNs dans les plasmas et les foies des canards mulards de l'*EXPI microARNs*. Pour cela, une étape réalisée à partir de 10 ng/ $\mu$ L de microARNs totaux purs permet d'ajouter une queue 3' adénosine aux miARNs par la polymérase A (poly A) (mix poly A, Tableau 12) (Figure 30). Puis les miARNs sont soumis à une ligature d'adaptateur à leur extrémité 5' (mix adaptator ligation). Cet adaptateur agira plus tard comme un site de liaison d'amorce directe pour l'étape d'amplification (miR-Amp). Ensuite, une amorce RT universelle liée à la queue poly A initie la transcription inverse des miARNs afin de produire de l'ADNc (mix RT). Une étape de préamplification est ensuite réalisée, ce qui favorise la détection des miARNs à faible concentration (mix Amp miR). Enfin la qPCR est réalisée à partir de 2  $\mu$ L d'ADNc issu des étapes précédentes que l'on mélange au mix qPCR.

Cette méthode présente des avantages majeurs. Tout d'abord, l'ADNc de tous les miARNs peut être acquis par une amorce universelle en une seule étape RT au lieu d'utiliser une amorce tige-boucle spécifique pour chaque miARN. De plus, cette méthode est applicable à la détection des miARNs dans le plasma. L'ensemble des réactions ont été réalisées sur le thermocycleur CFX (BioRad, USA) selon les recommandations du fournisseur de TaqMan Advanced MicroRNA Assays (Applied Biosystems).

## 6.8 Analyses protéiques : Western blot

Pour l'*EXPI cinétique* et *EXP2*, des analyses Western blot ont été réalisées pour quantifier les protéines d'intérêt dans le foie des canards mulards. Pour cela, les foies congelés (100 mg) ont été broyés au Precellys Cryollys (Bertin Technologies, 3000 x G, 2 cycles / 10 s, pause / 15 s) dans 1 ml de tampon de lyse en présence d'un inhibiteur de protéase. Les homogénats ont été centrifugés (12000 x G, 4°C / 15 minutes). Les surnageants ont été récupérés et centrifugés (12000 x G, 4°C / 15 minutes). Les concentrations de protéines ont été déterminées par dosage Bradford en utilisant de la BSA comme standard. Des lysats (10  $\mu$ g ou 20  $\mu$ g de protéines totales selon la protéine étudiée), ont été soumis à une SDS-PAGE et à un Western Blot en utilisant l'anticorps approprié (Tableau 13). Les membranes ont été lavées puis incubées avec un

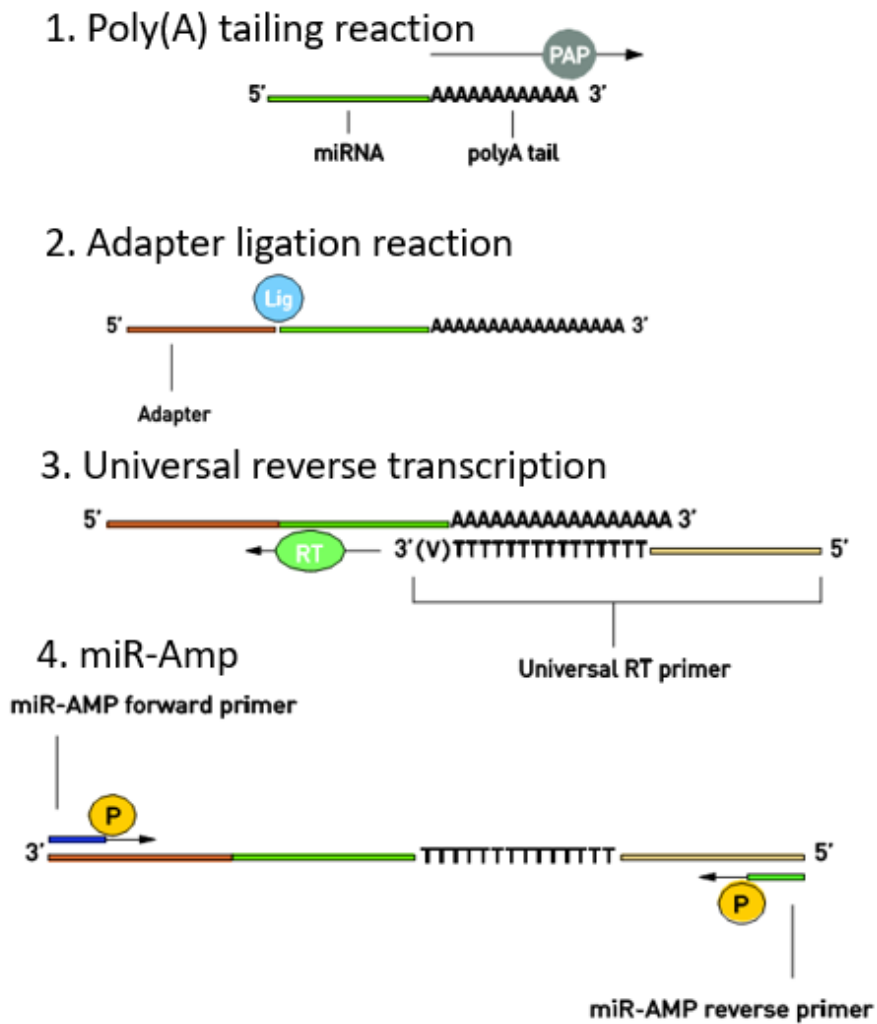


Figure 30. Transcription inverse par méthode TaqMan Advanced MicroRNA Assays (*EXPI microARNs*)

anticorps secondaire IRDye Infrared (Li-COR Biosciences, Lincoln, USA). Les bandes ont été visualisées par fluorescence infrarouge et quantifiées par densitométrie à l'aide du système d'imagerie Odyssey (Li-COR Biosciences).

## 7. Analyse et traitements statistiques des résultats

Pour l'analyse d'expression génique, le gène de référence choisi est la luciférase.

Tous les Cycles Threshold (CT) ont été collectés grâce aux logiciels BioRad CFX Maestro 1.0 (qPCR Sybr Green) et Fluidigm Real-Time PCR Analysis version 2.1 (qPCR méthode Fluidigm). 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 :

$$\Delta\Delta CT = (CT_{\text{cible}} - CT_{\text{ref}})_{\text{ech}} - (CT_{\text{cible}} - CT_{\text{ref}})_{\text{standard}}$$

- $CT_{\text{cible}}$  est le CT du gène d'intérêt
- $CT_{\text{ref}}$  est le CT du gène de référence (Luciférase)
- $(CT_{\text{cible}} - CT_{\text{ref}})_{\text{ech}}$  est le  $\Delta CT$  calculé pour les échantillons
- $(CT_{\text{cible}} - CT_{\text{ref}})_{\text{standard}}$  est le  $\Delta CT$  calculé pour le standard : canards du groupe R4 dans l'*EXPI* ou canards du groupe témoin dans l'*EXP2*.

La normalité des données a été vérifiée puis des analyses de variance (ANOVA) une ou deux voies en fonction du nombre de variables étudiées ont été appliquées, suivies d'un test de comparaison multiple (Tukey). Des tests de Student (t-test) ont été appliqués le cas échéant. Les données ont été analysées avec le logiciel GraphPad Prism v.6.

Les tests de corrélations et analyses en composantes principales ont été réalisés grâce au logiciel R v3.6.1 (Nouvelle-Zélande, États-Unis) (Rcmdr, FactominR) pour évaluer les associations entre le poids ou le taux de fonte du foie et les variables biologiques.

L'analyse des données de microARNs a été réalisé grâce au logiciel Biostatflow v.2.9.2 (INRA 2019).

L'ensemble des résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. La prévalence minimale a été fixée à 0,05% et considérée comme statistiquement significative.



**Tableau 12. Mix réactionnels pour RT-qPCR Taqman**

	Volume (µL)	Programme
<b><u>Mix Poly A</u></b>		
TP 10X	0,5	Polyadénylation 45 min à 37 °C Stop 10 min à 65°C ∞ 4 °C
ATP	0,5	
E poly A	0,3	
H <sub>2</sub> O	0,7	
<b><u>Mix adaptator ligation</u></b>		
Tp 5X ligase	3	Ligation 60 min à 16 °C ∞ 4 °C
50 % PEG 8000	4,5	
25 X ligase adaptator	0,6	
RNA ligase	1,5	
H <sub>2</sub> O	0,4	
<b><u>Mix RT</u></b>		
5X Tp	6	Transcription inverse 15 min à 42 °C Stop 5 min à 85 °C ∞ 4 °C
dNTP	1,2	
20X RTp	1,5	
H <sub>2</sub> O	3,3	
<b><u>Mix Amp miR</u></b>		
2X Master Mix	25	Activation 5 min à 95 °C, 14 cycles (dénaturation 3 sec à 95 °C + anneal 30 sec à 60 °C), Stop 10 min à 99°C, ∞ 4 °C
20X primer	2,5	
H <sub>2</sub> O	17,5	
<b><u>Mix qPCR</u></b>		
Master Mix	5	Activation 20 sec à 95 °C, 40 cycles (dénaturation 3 sec à 95 °C + anneal 30 sec à 60 °C)
Sonde 20X	0,5	
H <sub>2</sub> O	2,5	

**Tableau 13. Liste des anticorps utilisés**

<b><u>Anticorps primaires</u></b>		
p-S6	Ser 235/236, n° 4856	Cell signalling Technology
S6 total	n° 2217	Cell signalling Technology
p-AKT	Ser 473, n° 4060	Cell signalling Technology
AKT total	n° 9272	Cell signalling Technology
p-AMPK	Thr 172, #2531	Cell signalling Technology
AMPK total	n° 2532	Cell signalling Technology
p-4EBP1	Thr37/46, n° 2855	Cell signalling Technology
4EBP1	n° 9644	Cell signalling Technology
LC3b	n° 3868	Cell signalling Technology
β-Tubulin	n° 2146	Cell signalling Technology
<b><u>Anticorps secondaire</u></b>		
Anti-rabbit	680 Conjugated Goat polyconal	LI-COR IRDye Infrared Dyes



## **Résultats**

# Expérimentation 1

## Objectif du travail

La compréhension des mécanismes sous-jacents à la mise en place de la stéatose hépatique chez le canard mulard est nécessaire afin d'optimiser la production de foie gras.

Diverses études ont déjà été menées chez le canard sur les modifications des métabolismes glucidiques et lipidiques qui ont lieu au cours du gavage et majoritairement dans le foie, lieu principal de la lipogenèse *de novo* chez les oiseaux. Certains mécanismes de protections cellulaires ont également été mis en avant comme étant induits en fin de gavage dans les hépatocytes. Cependant, la plupart de ces études sont principalement des comparaisons entre canards gavés et non gavés.

Afin d'avoir des informations supplémentaires sur les métabolismes déjà étudiés et ceux que l'on soupçonne être impactés ou induits par le développement de la stéatose hépatique, une étude cinétique (**EXPI cinétique**) sur toute la période du gavage a été réalisée avec trois points de prélèvements : au début du gavage (4<sup>ème</sup> repas), au milieu du gavage (12<sup>ème</sup> repas) et à la fin du gavage (22<sup>ème</sup> repas). Cette étude a permis l'analyse des métabolismes intermédiaires (lipidique et glucidique) mais également des voies de signalisation de l'insuline/mTOR, du métabolisme du cholestérol et des mécanismes de stress cellulaires tels que l'autophagie, le stress du réticulum endoplasmique et oxydant ainsi que l'apoptose.

L'étude **EXPI cinétique** a permis de mettre en évidence l'intérêt de rechercher des biomarqueurs hépatiques liés aux métabolismes des lipides et du cholestérol. Les microARNs, bien connus aujourd'hui pour leur potentiel prédictif de maladies dont celles liées au foie, ont fait l'objet d'une seconde étude (**EXPI microARNs**). Le miRNome plasmatique du canard mulard gavé a ainsi été séquencé et a permis de détecter les microARNs les plus différenciellement exprimés dans le plasma et dans le foie des canards gavés, impliqués dans les métabolismes des lipidiques et du cholestérol et qui possèdent donc un potentiel en tant que biomarqueurs du développement de la stéatose hépatique. En effet, le développement de biomarqueurs non invasifs robustes du poids du foie et du taux de fonte (les deux principales

caractéristiques qui définissent un bon foie gras) peut être d'un grand intérêt pour le suivi en temps réel de l'évolution de la stéatose hépatique au cours du gavage.

Ces deux expérimentations ont fait l'objet d'un article soumis dans un journal à comité de lecture (Article 1, révision mineure) et d'un article en préparation (Article 2) :

#### **Article 1**

##### **Kinetic study of the expression of genes related to hepatic steatosis, glucose and lipid metabolism and cellular stress during overfeeding in mule ducks**

Tracy Pioche, Fabien Skiba, Marie-Dominique Bernadet, Iban Seiliez, William Massimino, Marianne Houssier, Annabelle Tavernier, Karine Ricaud, Stéphane Davail, Sandrine Skiba-Cassy, Karine Gontier

#### **Article 2**

##### **Kinetic analysis of miRNAs in overfed mule ducks: research of potential biomarkers of hepatic steatosis development**

Tracy Pioche, Marie Laval, Fabien Skiba, Marie-Dominique Bernadet, William Massimino, Marianne Houssier, Annabelle Tavernier, Karine Ricaud, Stéphane Davail, Sandrine Skiba-Cassy, Karine Gontier

## Article 1 (*EXPI cinétique*)

### **Kinetic study of the expression of genes related to hepatic steatosis, glucose and lipid metabolism and cellular stress during overfeeding in mule ducks**

Induite par le gavage, la stéatose hépatique est un procédé exploité pour la production de foie gras chez le canard mulard. Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au développement de la stéatose hépatique, les réponses physiologiques des canards mulards gavés durant 11 jours ont été analysées. Ainsi, une étude cinétique des métabolismes glucidique et lipidique ainsi que des mécanismes de protection cellulaire a été réalisée sur 96 canards mulards mâles durant toute la durée du gavage avec trois temps de prélèvement (après les 4<sup>ème</sup>, 12<sup>ème</sup> et 22<sup>ème</sup> repas). L'analyse de l'expression des gènes et des protéines réalisées sur le foie, le muscle et le gras abdominal, a montré une activation de la voie de biosynthèse du cholestérol durant toute la durée du gavage et principalement dans le foie avec des corrélations significatives entre le poids de foie et le taux de cholestérol plasmatique ( $r = 0,88$ ,  $P < 0,0001$ ) ainsi qu'entre le poids de foie et l'expression relative hépatique de *hmgcr* et *soat1* ( $r = 0,4$ ,  $p < 0,0001$  et  $r = 0,67$ ,  $p < 0,0001$ , respectivement). Les résultats ont également révélé une activation de la voie de signalisation de l'insuline et des acides aminés suggérant une augmentation de la sensibilité à l'insuline pour favoriser l'absorption du glucose et son utilisation *via* la glycolyse et la lipogénèse. L'analyse du stress cellulaire a révélé une augmentation de l'expression de gènes clés liés à l'autophagie : *atg8* et *sqstm1* ( $P < 0,0001$ ) durant toute la durée du gavage et principalement dans le foie. En contradiction, une induction de *cyp2e1* ( $P < 0,0001$ ) a été observée et suggère que l'autophagie pourrait être inhibée pendant le développement de la stéatose hépatique. Ainsi, cette étude a permis de mettre en évidence différents mécanismes permettant au canard mulard de gérer efficacement l'importante surcharge en amidon en maintenant son foie dans un état non pathologique. De plus, l'étude a révélé de potentiels biomarqueurs de la stéatose hépatique en lien avec le cholestérol plasmatique pour le suivi du poids du foie.

Mot clés : *stéatose hépatique, lipogénèse, cholestérol, stress cellulaire, canard mulard*

**Kinetic study of the expression of genes related to hepatic steatosis, glucose and lipid metabolism and cellular stress during overfeeding in mule ducks**

Tracy Pioche<sup>1</sup>, Fabien Skiba<sup>2</sup>, Marie-Dominique Bernadet<sup>3</sup>, Iban Seiliez<sup>1</sup>, William Massimino<sup>1</sup>, Marianne Houssier<sup>1</sup>, Annabelle Tavernier<sup>1</sup>, Karine Ricaud<sup>1</sup>, Stéphane Davail<sup>1</sup>, Sandrine Skiba-Cassy<sup>1</sup>, Karine Gontier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Saint-Pée-sur-Nivelle, F-64310, France

<sup>2</sup>NUTRICIA, Route de Saint-Sever, F-40280 Haut-Mauco, France

<sup>3</sup>UEPFG INRA Bordeaux-Aquitaine, (Unité Expérimentale Palmipèdes à Foie Gras), Domaine d'Artiguères 1076, route de Haut-Mauco, F-40280 Benquet, France

Corresponding author: Gontier Karine

INRA, Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Saint-Pée-sur-Nivelle, F-64310, France

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

**Keywords:**

Hepatic steatosis, lipogenesis, cholesterol, cellular stress, mule ducks

**ABSTRACT**

Induced by overfeeding, hepatic steatosis is a process exploited for the “foie gras” production in mule ducks. To better understand the mechanisms underlying its development, we analysed the physiological responses of mule ducks overfed with corn for a duration of 11 days. A kinetic analysis of glucose and lipid metabolisms and cell protection mechanisms was performed on 96 males mule ducks during overfeeding with three sampling times (after the 4<sup>th</sup>, the 12<sup>th</sup> and the 22<sup>th</sup> meal). Gene expression and protein analysis realised on the liver, muscle and abdominal fat showed an activation of a cholesterol biosynthetic pathway during the complete overfeeding period mainly in livers with significant correlations between its weight and its cholesterolemia ( $r=0.88$ ,  $P<0.0001$ ) and between the liver weight and the *hmgcr* and *soat1* expression ( $r=0.4$ ,

P<0.0001 and r=0.67, P<0.0001 respectively). Results also revealed an activation of insulin and amino acid cells signalling a pathway suggesting that ducks boost insulin sensitivity to raise glucose uptake and use *via* glycolysis and lipogenesis. Cellular stress analysis revealed an upregulation of key autophagy-related genes expression *atg8* and *sqstm1* (P<0.0001) during the complete overfeeding period mainly in the liver, in contrast with an induction of *cyp2e1* (P<0.0001) suggesting that autophagy could be suppressed during steatosis development. This study has permitted to highlight different mechanisms enabling mule ducks to efficiently handle the huge starch overload by keeping its liver in a non-pathological state. Moreover, it has revealed potential biomarker candidates of hepatic steatosis as plasma cholesterol for the liver weight.

## INTRODUCTION

“Foie gras” is one of the most appreciated dishes in French gastronomy. Currently, France is the first world producer with 80 % of the production (75). “Foie gras” is a process that spontaneously occurs in some birds as a consequence of energy storage before migration (50). This state of liver also called hepatic steatosis, is exploited for the “foie gras” production (33) and induced by overfeeding (34). Mule ducks, a sterile hybrid resulting from the crossing between a male Muscovy (*Cairina moschata*) and a female Pekin duck (common duck, *Anas platyrhynchos*), is mostly used for the production of “foie gras” (16, 33). Indeed, it benefits from a heterosis effect and shares qualities specific to each of its parents, in particular a superior ingestion capacity as well as a bigger “foie gras” (26).

The overfeeding period consists in feeding from the age of 12 weeks mule ducks with an increasing quantity of food (from to 300g to 600g) composed mostly of corn/starch and premix for a period of 11 days, twice a day. This feeding program, which represents an unbalanced diet, leads to the obtention of livers that weigh more than 550 g, approximately 8 times its normal weight (33).

Various mechanisms are known to take place during the setting of hepatic steatosis. First, the carbohydrate-rich corn based diet received by the ducks during overfeeding leads to high accumulation of lipids in the liver as a result of high activity of *de novo* lipogenesis (3, 17, 24, 33), but also to a substantial fattening of peripheral tissues such as adipose tissues and muscles (14, 17, 24). Then, to contribute to lipid accumulation in the liver, studies have highlighted a combination of three mechanisms: a defect in lipid exports from the liver to peripheral tissues, a lack of lipid capture by the peripheral tissues and a significant return of lipids to the liver (34, 62, 63).

Other mechanisms and cellular pathways may be involved in the development of fatty liver. Among these, we cannot ignore the insulin pathway which is strongly involved in the storage of carbohydrate and lipid substrates which was little studied during overfeeding. As a well-known anabolic hormone, insulin is involved in the regulation of carbohydrate and lipid metabolisms. Insulin controls the transport of glucose in insulin-dependent tissues (adipose and muscle tissues) and stimulates glycolysis, glyconeogenesis and lipogenesis. It promotes the synthesis and the storage of carbohydrates and lipids participating thus in their homeostasis (9, 56) as observed in fish (43) and duck (25). Insulin also has the ability to stimulate protein



synthesis and inhibits the mechanisms of cell degradation via Akt protein phosphorylation for the activation of the mTOR pathway (28). It seems therefore relevant to evaluate the role of this signalling pathway in the development of hepatic steatosis in mule ducks.

Among other factors, we also wanted to study the metabolism of cholesterol, especially for an important aspect: its involvement in membrane fluidity (15, 22, 61) that could influence the melting rate, which corresponds to the percentage of fat lost during cooking, a technological yield generally used to estimate the quality of “foie gras” depending on the integrity of hepatic cell membranes. In fact, cholesterol, which is essential for cell growth and viability, is known to enter into the constitution of cell membranes and the synthesis of steroid hormones (71). Its synthesis is mainly hepatic and made from hydroxy-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA). Studies highlighted the interesting potential of mule ducks to produce abundant free cholesterol content at the end of the overfeeding (36, 55). We therefore propose to study the metabolic pathway controlling cholesterol homeostasis during the development of hepatic steatosis while overfeeding in mule ducks and evaluate its potential relation with the melting rate.

Finally, it would be interesting to study the mechanisms involved to understand how overfed ducks can manage such accumulation of lipids in the liver without apparent lipotoxicity. In fact, oxidative stress and inflammation have shown to play a key role in the progression of NAFLD to Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) (69). Since hepatic steatosis is non-pathological and reversible in ducks (5, 11), it seemed important to study these structures in order to understand the protective mechanisms put in place when overfeeding ducks, to thus prevent a pathological evolution of the hepatic steatosis. Autophagy is a cellular catabolic process degrading of cytoplasmic components to provide nutrients at critical situations. As part of the autophagic process, lipophagy is defined as the autophagic degradation of intracellular lipid droplets. In overfed ducks, induction of hepatic steatosis is associated to a decrease of autophagy but also to apoptosis development appearing only at the end of overfeeding (51) and to oxidative stress (23, 64). It is necessary to better understand these different mechanisms of defense put in place by the mule duck during the development of hepatic steatosis.

Therefore, the aim of the present study was to better understand the mule duck physiological response to cope with a sustained overload of starch during 22 consecutive meals. This will provide useful information on the mechanisms underlying the development of hepatic steatosis in mule ducks and help to optimize it.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals and experimental procedures*

All experimental procedures were carried out according to the ethic committee (approval No. C40-037-1) and the French National Guidelines for the care of animal for research purposes. Animals used were male mule ducks (genetic line: *Cairina moschata* Mmg × *Anas platyrhynchos* Pkl) (n=96), reared in a Louisiana type building of 80 m<sup>2</sup> with 2.6 ducks/m<sup>2</sup> without outdoor access. They benefited from natural lighting and were raised on chip litter and watered by pipettes at the Experimental Station for Waterfowl Breeding (INRA Artiguères, France). They were fed *ad libitum* with the growing diet (17.5 % Crude Protein [CP], 2 850 kcal/kg Metabolize Energy [ME]) from hatching to the age of 8 weeks then with finishing diet (15.5 % CP, 2 800 kcal/kg ME) distributed by hourly rationing (1 h per day) from 8 to 9 weeks followed by a quantitative rationing from 9 to 12 weeks in order to prepare the overfeeding (2). At 12 weeks of age, ducks were overfed during 22 meals (2 meals a day during 11 days) composed with mash 53% MS Palma from Maisadour (Haut-Mauco, France) (Corn: 98 % and Premix: 2 %, 3 230 kcal/kg ME, with CP: 7.2 %, Fat: 3.2 %, crude cellulose: 2 %, raw ashes: 2.1 %, lysine: 0.23 %, methionine: 0.15 %, calcium: 0.12 %, phosphorus: 0.25 % and sodium: 0.1 %) and 47% of water according to the curve of feed intake presented in Figure 1 (2). Two hours after the 4<sup>th</sup> (M4), the 12<sup>th</sup> (M12) and the 22<sup>th</sup> (M22) meals, ducks were conventionally slaughtered by electronarcosis and bleeding. This slaughtering time between the last meal and duck slaughtering was chosen according to Tavernier *et al.* (1, 63) showing peak expressions of genes of interest for our study. Bloods was taken on Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes and plasma were separated by centrifugation (3000 xG for 10 min at 4°C) and stored at -20°C. After dissection, liver, *major pectoralis* (muscle), abdominal fat (AF) and subcutaneous adipose tissue (SAT) were weighed, sampled in 1,5 ml eppendorf tubes (100 mg of liver, muscle and abdominal fat for gene expression analysis (n=32 at each point time) and 100 mg of liver for protein analysis (n=3 at each point time)), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Pasteurization tests were carried out on livers at the end of the overfeeding (M22, n=32) to estimate melting rate. 4 hours after evisceration, liver samples (60 g of the top of the large lobe) were placed into tins. After performing crimping, autoclave was preheated to 70°C, and the tins were placed inside. As soon as the autoclave was closed, the pressure was fixed to 0.8 bar. The containers were heated for 1 hour at 85°C, and then cooled for 30 min in the autoclave (pasteurize value: 170 min). Then tins were stored cold until opening (8 days later). Before

opening, tins were warmed in a water bath and then livers samples were weighed without their fat.

### ***Biochemical assays***

Plasma glucose (GLU), triglyceride (TG) and total cholesterol (CHO) levels were quantified by colorimetric enzymatic methods using kits provided by BioMérieux (Marcy-l'Etoile, France) according to the manufacturer's recommendations.

### ***Protein extraction and Western Blotting***

Because significant modifications in insulin and glucose metabolisms mainly in liver were observed, we decided to investigate the protein kinase B (Akt)/ target of rapamycin (TOR) signalling pathway during overfeeding only in liver of mule ducks by western blot analysis. Frozen livers (100 mg, n=3 at each sampling time) were crushed with Precellys Cryolllys (Bertin Technologies, 3000 xG, 2 cycles/10 sec, break/15 sec) in 1 mL of lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, pH 7.4), 100 mM sodium fluoride, 4 mM sodium pyrophosphate, 2 mM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.5% IGEPAL® CA-630 (Sigma) and a protease inhibitor cocktail (Sigma). Homogenates were centrifuged (12000 xG, 4°C/15 min.). The supernatants were recovered and centrifuged (12000 xG, 4°C/15 min). Protein concentrations were determined by Bradford assay using BSA as standard. Lysates (10 µg of total protein for Akt and S6) were subjected to SDS-PAGE and western blotting using the appropriate rabbit antibody. Anti-phospho-Akt (Ser 473, No. 4060), anti-Akt (No. 9272), anti-phospho-S6 (Ser 235/236, No. 4856), anti-S6 (No. 2217) were purchased from Cell Signalling Technologies (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). All antibodies successfully cross-reacted with mule duck proteins. Membranes were washed and incubated with an IRDye Infrared secondary antibody (Li-COR Biosciences, Lincoln, USA). Bands were visualized by infrared fluorescence and quantified by densitometry using the Odyssey Imaging System (Li-COR Biosciences).

### ***Ribonucleic acid isolation and reverse transcription***

#### ***RNA extraction***

Total RNA were isolated from frozen tissues (liver, muscle and abdominal fat) (n=32 for each tissue) using TRIzol Reagent (Invitrogen/Life Technologies, California, United states) according to manufacturer's instructions. RNA concentrations were determined by spectrophotometry (optical density at 260 nm) using a NanoVuePlus (GE Healthcare, Illinois,

United States) and normalized at 500 ng/ $\mu$ L. The integrity of total RNA was checked by electrophoresis (agarose gel 1 %).

#### *Reverse transcription*

After a DNase treatment using the Quanta DNase kit (Quanta Biosciences, Gaithersburg, United States), cDNA were obtained by reverse transcription using the Superscript III enzyme (Invitrogen, California, United States) and a mix of oligo dT and random primers (Promega, Wisconsin, United States) according to manufacturer's instructions. 100 pg/ $\mu$ L of luciferase (Promega, Wisconsin, United States), an exogenous RNA not present in duck, was added to each sample during the denaturation step to allow normalization of the data as a reference gene as previously described (20, 45). 3  $\mu$ g of total RNA were used. The reaction was carried out on a T100 thermocycler (Biorad, California, United States) according to this program: 25°C / 5 min, 55°C / 1 h, 70°C / 15 min, 4°C /  $\infty$  until storage at -20°C.

#### ***Determination of mRNA levels using real-time PCR***

##### *qPCR EvaGreen using BioMark*

The Fluidigm method was used to quantify gene expression of the majority of our genes of interest. For this, a specific target amplification (STA) was carried out beforehand with 5 ng/ $\mu$ L of cDNA in order to normalize all the samples and to ensure that there were enough cDNA copies in each well. Then, all samples and target were distributed in a 96x96 chip for Fluidigm Gene Expression. The reaction was carried out using the EvaGreen 20X dye according to the following program: 95°C/10 min (holding step), 35 amplification cycles (95°C/15 s, 60°C/1 min). All data were analysed with <sup>1</sup>Fluidigm real-time PCR analysis software (Fluidigm Corporation v4.1.3). This part of the work was done at the quantitative transcription platform GeT-TQ (GenoToul, Toulouse, France). For some genes involved in cholesterol metabolism, gene expressions were determined by <sup>2</sup>qPCR from 2  $\mu$ L cDNA (diluted 80 fold), target gene primers (10  $\mu$ M), SYBr Green FastMix (Quanta, Gaithersburg, United States) and RNase free water for a total volume of 15  $\mu$ L. qPCR were carried out according to the following program: initiation at 95°C/10 s followed by 45 amplification cycles (60°C/15 s) on the CFX Thermal cycler (Biorad, California, United States). All the primer sequences are presented in Table 1. Most of the selected genes used for this study were designed by Tavernier *et al.* (62, 63). For the others genes wich had not been studied before (as genes involved in cholesterol metabolism), the primers were designed using Ensembl (EMBI-EBI, United Kingdom),

Multalin (INRA, Toulouse, France) and Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Rozen et al.) softwares and customised by Eurogentec (Liège, Belgique).

### ***Gene expression analysis***

For the analysis of all data, the exogenous Luciferase RNA (Promega, Wisconsin, United States) were used as reference gene for normalization as previously described (21, 44). The relative amount of expression of the target genes was determined by the  $\Delta\Delta\text{CT}$  method (66). The efficiency of PCR, as measured by the slope of a standard curve using serial cDNA dilutions, was between 1.85 and 2.

### ***Statistical analysis***

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and analyzed by one-way ANOVA supplemented by a Tukey test after checked the normality of data. Protein and gene expression analysis were executed using GraphPad Prism v6.01 (San Diego, United States) software. Pearson correlation tests and principal component analysis (PCA) were performed with the R v3.6.1 (New Zealand, United States) software (Rcmdr, FactominR) to evaluate associations between liver weight or melting rate and biological variables. Differences were considered statistically significant at  $P \leq 0.05$ .

## **RESULTS**

### ***Tissue weights and plasma metabolite levels***

In order to better understand the mechanisms underlying the development of fatty liver in overfed mule duck, zootechnical data (tissue weights) and plasma data were analysed during overfeeding (n=32 to each sampling points: M4, M12 and M22) (Table 2). A significant increase in liver ( $P < 0.0001$ ), abdominal fat ( $P < 0.0001$ ) and subcutaneous adipose tissue weight ( $P < 0.0001$ ) was observed during all the overfeeding period while muscle weight increased significantly at the beginning of the overfeeding (between meal 4 and meal 12) and then remained stable until the end ( $P = 0.0007$ ).

In addition, analysis of plasma parameters showed a significant increase of glucose ( $P = 0.0052$ ), triglycerides ( $P < 0.0001$ ) and total cholesterol ( $P < 0.0001$ ) levels during overfeeding (Table 2). A significant correlation between tissue weights (liver, abdominal fat and subcutaneous adipose tissue) and plasma total cholesterol levels appeared (Fig. 2A) with a greater significant correlation between liver weights and total cholesterol levels during overfeeding ( $r = 0.88$ ,

P<0.0001) (Fig. 2B). Pearson correlation tests showed that the correlation between liver weight and cholesterolemia was only marked at the end of overfeeding ( $r=-0.17$ , ns,  $r=0.24$ , ns and  $r=0.58$ , P<0.001 for M4, M12 and M22 respectively) (Table 3).

#### ***Liver weight and mRNA expressions*** (Table 3)

To better understand the link between liver weight and plasma cholesterol level observed, a Pearson correlation analysis was performed on expressions of genes related to cholesterol synthesis and liver weights during all the overfeeding.

Only PCA conducted on liver weights and mRNA expressions of *hmgcr*, *soat1* and *apob* showed significant positives correlations ( $r=0.4$ , P<0.0001;  $r=0.67$ , P<0.0001 and  $r=0.69$ , P<0.0001 for *hmgcr*, *soat1* and *apob* respectively). For each gene, the correlation is marked in the middle of the overfeeding period ( $r=0.42$ , P<0.1,  $r=0.6$ , P<0.001 and  $r=0.51$ , P<0.01 for *hmgcr*, *soat1* and *apob* respectively).

#### ***Gene expression and western blot analysis***

##### ***Glucose metabolism*** (Table 4)

As concerned genes involved in glucose metabolism, in liver, a significant increase of the expression of Acetyl CoA Carboxylase (*acox*), Succinate Dehydrogenase Complex - Subunit A (*sdha*), Glucose Transporters (*glut1/2/8*), Insulin Receptor (*insr*), Insulin like Growth Factor 1 (*igf1*) and Carbohydrate Response Element Binding Protein (*chrebp*) is observed during all the overfeeding period (P<0.0001). For genes Hexokinase 1 (*hk1*), Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase (*gapdh*) and *glut3*, their expression significantly increases on the second period of overfeeding (between M12 and M22) (P<0.0001). For Enolase Alpha (*eno1*), a significant increase between M4 and M22 is observed (P=0.0078).

In muscle tissue, the expression of *gapdh* increased significantly at the beginning of the overfeeding between M4 and M12 (P=0.003) and then stabilized, while the expression of *acox* and *glut8* significantly increased between M12 and M22 (P=0.0004 and P<0.0001 respectively). For *sdha* and *glut1*, a significant increase between M4 and M22 (P=0.0273 and P=0.0021 respectively) is observed.

In abdominal fat, only the expression of *sdha*, *insr* and *chrebp* showed a significant increase between M4 and M12 then a stabilization (P=0.0003, P=0.0086 and P=0.018 respectively).

### *Lipid metabolism* (Table 5)

In liver, the expression of Acyl CoA Synthetase Long-chain 1 (*acs11*) and Stéaryl CoA desaturase (*scd1*) significantly increased during all the overfeeding ( $P<0.0001$ ). Others gene expressions, also involved in *de novo* lipogenesis, such as Fatty Acid Synthase (*fas*) and Diglyceride Acyl Transferase 2 (*dgat2*), increased significantly between M4 and M12 and then stabilized until the end of the overfeeding ( $P=0.0011$  and  $P<0.0001$  respectively).

Concerning genes involved in  $\beta$ -oxidation, Acyl CoA Dehydrogenase (*acad*) and Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (*hadh*) evolved in the same way with a significant increase during overfeeding ( $P<0.0001$ ) while Carnitine Palmitoyl Transferase A (*cpt1a*) only increased at the end of the overfeeding between M12 and M22 ( $P<0.0001$ ).

For genes implicated in lipoprotein formation and transport, a significant increase of their expression from the beginning of the overfeeding (between M4 and M12) is observed. While Apolipoprotein A (*apoa*), Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 1 (*gp1t1*) ( $P<0.0001$ ) and Microsomal Triglycerides Transfer Protein (*mttp*) stabilized ( $P=0.0017$ ), a continuous increase can be observed for Apolipoprotein B (*apob*), Carnitine Palmitoyl Transferase A (*cept1*), Perilipin 2 (*plin2*), Lipase Maturation Factor 1 (*lmf1*); and Fatty Acid Translocase/Cluster of Differentiation 36 (*fat/cd36*) expressions until the end of the overfeeding ( $P<0.0001$ ) and an overexpression of Fatty Acid Binding Protein 4 (*fabp4*) only at the end of the overfeeding period (between M12 and M22) ( $P<0.0001$ ). For the lipoprotein receptors Low Density Lipoprotein Receptor (*ldlr*) and Very Low Density Lipoprotein Receptor (*vldlr*), we have an identical variation of their expression with a significant increase during all the overfeeding ( $P<0.0001$ ). For genes implicated in cholesterol synthesis, an increase of the expression of Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase (*hmgcr*) at the end of the overfeeding (between M12 and M22) ( $P=0.0004$ ), a significant increase of Sterol O-acyltransferase 1 (*soat1*) during all the overfeeding and an increase of the expression of Cytochrome P450 family 5 (*cyp51a*) only in the middle of the overfeeding period (M12) ( $P=0.0279$ ) are observed. To finish, the expression of the transcription factors associated with these previous genes, Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha (*ppara*), Gamma (*ppary*) and Liver X Receptor Alpha (*lxra*) significantly increased all during the overfeeding ( $P<0.0001$ ).

In the muscle tissue, as genes involved in lipogenesis *de novo*, only the expression of ATP Citrate Lyase (*acly*) and *acs11* increased; between M12 and M22 for *acly* ( $P=0.0285$ ) and between M4 and M12 for *acs11* ( $P<0.0001$ ). The expression of  $\beta$ -oxidation genes *acad* and *hadh* increased significantly all during the overfeeding ( $P=0.0121$  and  $P=0.0001$  respectively) whereas *cyp51a* expression only increased at the end of the overfeeding (between M12 and

M22) (P<0.0001). For genes involved in lipoprotein formation and transport, the expression of *cept1* and *fat/cd36* increased on the second period of overfeeding (between M12 and M22) (P=0.0342 and P=0.0007 respectively). For *gpat1* and *lmf1*, the expression were significantly different between M4 and M22 (P=0,021 and P<0.0001 respectively).

In abdominal fat, few gene expressions were detected compared to the liver and the muscle tissue. Only a significant increase of the expression of *acs11* during overfeeding between M4 and M22 (P=0.0011) is observed. *Apoa* presents a slight increase between M4 and M12 then return to its basal level (P=0,014).

#### *mTOR pathway* (Figure 3 and Table 6)

A significant increase of phosphorylation of Akt on Ser 473 (P=0.0117) between M4 and M22 and an increase of phosphorylation of S6 on Ser 235/236 (P<0.0001) at the end of the overfeeding (between M12 and M22) are observed.

Gene expression analysis of *akt*, *mtor* and ribosomal protein S6 kinase (*s6k1*) in the liver showed a significant increase of their expression during all the overfeeding (P<0.0001). In the muscle tissue, only *s6k1* expression significantly increased during the overfeeding (P=0.0161). No gene expression variation was observed in abdominal fat.

#### *Cellular stress* (Table 7)

Regarding to gene expression analysis in liver, the expression of Activating Transcription Factor 4 (*atf4*) and Asparagine Synthetase (*asns*), involved in the endoplasmic reticulum stress and also in a lesser extent in amino acid deficiency pathway, significantly increased during all the overfeeding period (P<0.0001). Similarly, the expression of genes involved in macroautophagy [Autophagy related gene 4b/8/9 (*atg4b/8/9*), Sequestosome 1 (*sqstm1*)], in chaperone-mediated autophagy (CMA) [Lysosome-associated membrane protein 2 (*lamp2a*)], in apoptosis [Caspase 3/8/9 (*casp3/8/9*)] and in global cellular stress [Heat Shock Protein beta 1 (*hspb1*)] significantly increased during all the overfeeding period (P<0.0001). Hepatic steatosis would therefore induce endoplasmic reticulum stress, which would then activate the expression of genes of eIF2 $\alpha$ /ATF4 and autophagy pathways.

In the muscle tissue, *asns* increased only at the end of the overfeeding between M12 and M22 (P=0.001). *atg4b*, *hspb1* and *casp8* expressions increased significantly between M4 and M22 (P=0.0157; P=0.0089; P=0.0006 respectively). *Casp9* increased significantly only between M12 and M22 (P=0.0007) while *casp3* increased between M4 and M12 and then stabilized (P=0.0002).



In abdominal fat, only *casp8* seems to be impacted by the overfeeding with a significant increase of its expression during all the overfeeding (P=0.0113).

#### ***Melting rate and mRNA expressions*** (Figure 4)

In order to find a predictive marker of melting rate, a Pearson correlation analysis was performed on all genes overexpressed at M22.

Only PCA conducted on mRNA expression of *fabp4* and melting rate showed a significant negative correlation ( $r=-0,67$ ,  $P<0,05$ ). No significant correlations were observed between melting rate and all others genes.

### **DISCUSSION**

In order to optimize the production of “foie gras”, it is necessary to understand the mechanisms underlying its development to identify new markers of hepatic steatosis and improve rearing and overfeeding conditions (especially reducing quantity of meals distributed by decreasing duration of overfeeding). Furthermore, it would be interesting to better know why this strong lipid accumulation in liver conduced generally to a non-pathological state. For this, the impact of the overfeeding on intermediate metabolism (glucose and lipid) and cellular stress was studied during hepatic steatosis set up in mule duck. This kinetic study was carried out during all the overfeeding period with three sampling points: at the beginning (4<sup>th</sup> meal), at the middle (12<sup>th</sup> meal) and at the end (22<sup>nd</sup> meal). In general, studies in ducks analysed the evolution of livers during the overfeeding period (10, 14, 51) studies that have been conducted on hepatic steatosis in ducks focus more on lipid metabolism (16, 32, 62) or glucose metabolism (62) with a comparison between different duck genotypes or between overfed and non-overfed ducks (31, 32, 63). Our study explored gene expression at the beginning, in the middle and at the end of the overfeeding period and also provided additional information on the development of tissues during the overfeeding, on intermediate metabolism, insulin and mTOR pathway, cholesterol metabolism and global cellular stress known to be activated during the development of hepatic steatosis (4, 64).

As expected, overfeeding resulted in continuous weight gain of liver, abdominal fat and subcutaneous adipose tissue (14). By contrast, muscle weight gain is marked at the beginning of the overfeeding then stabilizes probably due to a storage of intramuscular fat during the first week of overfeeding (17). The increase of tissue weights during the overfeeding was

accompanied by an increase of triglyceridemia and cholesterolemia, as already observed in previous studies (7, 25, 62). But interestingly, this study has revealed a significant positive correlation between liver weight and plasma total cholesterol ( $r=0.88$ ,  $P<0.0001$ ) (Figure 2A and Table 3) supporting the idea that cholesterol metabolism could be impacted during overfeeding in mule ducks and may be used as potential biomarker of hepatic steatosis development. To better understand the involvement of the cholesterol metabolism on hepatic steatosis development, we analysed the expression of genes involved in cholesterol synthesis (*hmgcr*, *cyp51a*) and esterification (*soat1*). The expression of *hmgcr*, involved in the mevalonate pathway that produces cholesterol precursors, increases during the second half of the overfeeding period, in agreement with data observed in NAFLD patients (46). A significant increase of *cyp51a*, responsible of another step of the cholesterol biosynthetic pathway, was also observed during the overfeeding period suggesting that the whole cholesterol biosynthetic pathway is probably activated during the development of the hepatic steatosis induced by overfeeding in mule ducks. Furthermore, the significant increase of *soat1* (also called *acat*) expression during all the overfeeding period suggests the conversion of cholesterol to its storage form, cholesteryl esters, probably in response to the accumulation of free cholesterol as previously indicated by Rogers *et al.* (52). A similar situation is also observed in human with NAFLD, where free cholesterol content increases in the liver and the induction of *soat1* activity results in the esterification of excess synthesized cholesterol (60). *apob* and *mttp* known to be involved in lipids transport from the liver to peripheral tissues were also overexpressed in liver of mule ducks during the development of the steatosis. A correlation analysis performed between liver weights and mRNAs expression of *apob* and *soat1* linked to cholesterol metabolism revealed a significant and positive correlation ( $r=0.6906$   $P<0.0001$  and  $r=0.6696$   $P<0.0001$  respectively). These results indicate that the set-up of hepatic steatosis during overfeeding in mule ducks seems to be closely related to a strong modification of cholesterol metabolism based on the induction of cholesterol synthesis and the storage of free cholesterol as cholesterol esters.

Overfeeding in ducks also deeply modifies glucose metabolism. It first affects glucose transport, as the hepatic expression of *glut1/2/8* continuously increases during overfeeding while that of *glut3* seems to be rather activated during the second half of the overfeeding period. On the contrary, no expression of *glut2* was detected in muscle or abdominal fat confirming previous results obtained by Tavernier *et al.* (62) in ducks and Kono *et al.* (42) in chickens. These different glucose transporters are involved in bidirectional transport of glucose in

hepatocytes (*glut 1/2*) as well as the glucose absorption and reabsorption when they are located in intestinal brush border cells (*glut2*). The action of *glut3 and 8* is principally in brain and testicles (48). Consistently, the hepatic expression of *chrebp*, the transcription factor activated by glucose and involved in the setting up of glucose transporters (38, 39, 65), increases during overfeeding. Therefore, altogether, these results suggest that the liver of mule ducks responds to overfeeding by increasing its glucose uptake capacity concomitant with the evolution of glucose and glycogen contents in the livers during the overfeeding period (6, 14).

*Hk1* and *eno1* that catalyse the first and the last step of the glycolysis reaction, respectively, and *sdha* that helps to produce energy through its implication in the respiratory chain (Krebs cycle) (31) have their expression increased in the liver of mule ducks during overfeeding. During the same time, a significant increase of plasma glucose level occurs at the end of the overfeeding period. Although the blood was sampled only two hours after the feeding i.e. before the end of digestion, this maybe suggesting that mule duck is able to deal with the dietary carbohydrate overload by stimulating glucose uptake and glycolysis. This response seems to be mainly restricted to the liver as relatively small induction of carbohydrate metabolism occurs in muscle and adipose tissue during overfeeding. This is normal as glucose is the substrate of lipogenesis that mainly occurs in the liver in birds. However, despite a strong induction of the expression of genes involved in glucose metabolism, the final slight increase in plasma glucose occurring at the end of the overfeeding period may suggest that the metabolism has reached a limit in the utilization of glucose.

During overfeeding in duck, glucose is converted into glycogen first and then into lipids in the liver (14). A significant increase in the expression of *acox*, a *chrebp* target gene involved in the first step of lipogenesis, occurs in liver, probably stimulated by insulin secretion as observed in mammals (49, 56). Expression of *scd1*, *acs11* and the transcription factors *ppary* and *lxra* rises during the overfeeding period, whereas the expression of *fas* and *dgat2* reached their highest level during the first half of overfeeding period. As previously demonstrated, these genes involved in *de novo* lipogenesis enhance during overfeeding and lead to the development of an important hepatic steatosis in mule ducks (23, 54, 62). The genes encoding *fas*, *scd1* and *dgat2* were previously observed as overexpressed in the liver of overfed Pekin and Muscovy ducks, 12 hours after the last overfeeding meal (32) and *acs11* is known to be up-regulated in liver of overfed geese (73). In mule ducks, a proteomic analysis demonstrated that the enzyme FAS is only detected at the end of the overfeeding period (10). While previous findings proposing

*dgat2* as a key enzyme responsible for the accumulation of lipids in the liver of overfed mule ducks (62, 63), the present study suggest that *scd1*, *acs11*, *ppary* and *lxra* are better markers than *dgat2*.

Even if *acly* expression does not evolve in the liver during overfeeding in our study, it increased in the muscle in the second part of overfeeding period. The role of this enzyme is to convert citrate to acetyl-CoA in the cytosol allowing glucose to serve as substrate for *de novo* lipogenesis. A study on 3 days old overfed chicks demonstrated a significant increase in *acly* expression in the liver (59). Moreover, Hérault *et al.* (32) showed a positive correlation between liver weight and *acly* mRNAs expression during overfeeding in Pekin and muscovy ducks. This kind of regulation was not recorded in the present study. Nevertheless, an increase in the expression of *acly* may have occur at the early beginning of overfeeding, between the first and the fourth meal and remain stable during the whole overfeeding period thus explaining the discrepancy with previous demonstrations. Finally, our results indicate that during overfeeding of mule ducks, dietary carbohydrates are converted into lipids, mainly by the liver, and exported to peripheral tissues as already demonstrated in previous studies done on ducks (6, 14). The adipose tissues (in priority) and probably the muscle (at a lower level) constitute places of storage of the lipids as shown by the evolution of the weights of these tissues during overfeeding (16).

Insulin is considered as a key regulator of glucose and lipid metabolism. In the present experiment, as glucose metabolism modulations were preferentially observed in the liver, we therefore analysed the activation of two proteins involved in the insulin and amino acids cell signalling pathway only in the liver. We found that phosphorylation of Akt (a protein that activates the TOR pathway in response to insulin) and S6 (a direct target protein of the TOR pathway whose phosphorylation is partially controlled by insulin) increases during the overfeeding period. Several studies have shown that most patients with NASH exhibit insulin resistance (18, 57) but our results seem to indicate that no insulin resistance occurs during the development of hepatic steatosis in overfed mule ducks because Akt/mTOR signalling is not inhibited. These observations are concomitant with the increase of *akt*, *mtor* and *s6k1* expressions in the liver all along the overfeeding period. A significant increase in *insr* expression also occurred throughout overfeeding in the liver and during the first half of overfeeding period in the abdominal fat tissue. *Igf1* expression significantly increased in the liver throughout overfeeding and only at the end of overfeeding in muscle. Altogether, these results suggest that, in order to cope with a very important intake of carbohydrates, mule duck

increases the number of hepatic insulin receptors and boost insulin sensitivity to raise glucose uptake and use it *via* glycolysis and lipogenesis.

Beta-oxidation is a predominantly mitochondrial pathway for the degradation of fatty acids. It is carried out under the action of *cpt1a*, enabling the transport of acyl-coA into the mitochondria, and several enzymes including *acad* and *hadh* involved in dehydrogenation of acyl-coA and the production of  $\beta$ -cetoacyl-CoA, respectively. In the liver of mule ducks, the expression of *cpt1a* increased significantly at the end of the overfeeding, whereas that of *acad* and *hadh* rose during the first half of overfeeding, coupled with a significant overexpression of the *ppara* transcription factor throughout the overfeeding period. In muscle, *cpt1a*, *acad* and *hadh* expressions also increased at the end of overfeeding. These results suggest an induction of beta-oxidation in liver and muscle with a more pronounced effect in the liver compared to muscle. Thus, during overfeeding, a concomitant increase in lipogenesis and beta-oxidation is set. The concomitant strong synthesis of lipids and use of lipids as energy substrate suggest that overfed mule ducks may be trying to limit the accumulation of lipids. Our results are also consistent with previous works (62) showing that plasma free fatty acids early increased in overfed mule ducks and remained at high level during all the duration of the overfeeding period.

Concerning genes involved in lipoprotein formation (*apoa*, *apob*, *mttp*), lipid transport (*fabp4*, *fat/cd36*) and receptors (*vldlr*, *ldlr*), we observed an overexpression of all of these genes during overfeeding mostly in liver and very little or not at all in muscle. The high hepatic lipid re-uptake associated with the overexpression of *ldlr*, *vldlr*, *fat/cd36* and *fabp4*, is well-known in mule duck (62) and is confirmed in the present study. These results suggest that during overfeeding newly synthesized lipids are exported by the liver to peripheral tissues as previously observed in duck study (35). However, the lack in lipids uptake at peripheral level leads to a return of the lipids to the liver, which are then re-introduced *via* fatty acid transporters or lipoprotein receptors, leading to a greater lipid accumulation in the liver at the end of the overfeeding. Among these various transporters, we notice the huge overexpression of *fabp4* in the liver at the end of the overfeeding period. We also observed a significant negative correlation between *fabp4* mRNAs expression and the melting rate achieved at the end of the overfeeding. Théron *et al.*, previously did a link between this gene expression and fat loss during cooking (64). Moreover, Gabarrou *et al.* found a significant correlation between melting rate and the liver composition in neutral lipids and free fatty acids. They demonstrated that fat livers which contained low levels of phospholipids and phosphatidylcholine presented higher

melting rate (24). This allows us to suggest that fatty acid composition may be controlled by genes related to lipid synthesis and fatty acid metabolism. Studies performed on cattle demonstrated the relation between the composition of intramuscular fatty acid and genes involved in lipid metabolism such as *fabp4* that contribute to fatty acid deposition (12, 37). In order to find genetic markers associated with fatty acid composition in beef, Hoashi *et al.* (37) found an effect of the polymorphisms of *fabp4* on the fatty acid composition of carcasses making *fabp4*, a promising candidate for beef quality biomarker (flavour and tenderness). Blecha *et al.* (12) suggested too that *fabp4* may participate in the regulation of intramuscular fatty acid metabolism in yaks and could be used as markers to improve yak meat quality. In general, polyunsaturated fatty acid levels are positively correlated with *fabp4*. In our study, we can hypothesize that the hepatic fatty acids resulting from *fabp4* reuptake could be of different nature, i.e. lipids with a higher melting point and therefore less mobile during cooking.

Our results strongly show that mule ducks respond to overfeeding by significant modifications of their intermediate metabolism including activation of the insulin pathway and induction of beta-oxidation. However, what can be said about cellular defence mechanisms put in place by ducks to overcome this state of steatosis induced by overfeeding? What are the necessary mechanisms induced to maintain this steatosis without switching to a pathological state such as fibrosis? To try to answer some of these questions on cellular stress partially addressed by different studies already conducted on ducks (13, 23), we analyzed the expression of several genes linked to cellular stress pathways.

One of these pathways was autophagy that contributes to maintain cellular homeostasis. Activated under conditions of nutrient deficiency or deprivation, or cellular stress (47), autophagy allows the degradation of part of the cytoplasm including damaged proteins, organelles and lipids, leading to the production of amino acids and other nutrients that could be recycled for the synthesis of macromolecules or used as a source of energy (27, 30). Interestingly, autophagy is known to be regulated by mTOR pathway *via* ATG1/ULK phosphorylation (40) but is also mostly linked to ER stress (72). In mammalian models, the inhibition of the autophagic process and more especially the inhibition of lipophagy results in triglyceride accumulation into the liver (58). Consequently, it seemed relevant to study autophagy-related gene expression in mule ducks during overfeeding. We particularly focused our attention on *atg8 (lc3)* and *atg9*, two proteins known to be associated with the number of autophagosomes formed in yeast (74); *sqstm1 (p62)*, an autophagy receptor that links

ubiquitinated proteins to LC3; and *atg4b*, which hydrolyses the bond between *atg8* and phosphatidylethanolamine (PE), making it a specific marker for this organelle (19). Surprisingly, the present study reveals a significant upregulation of the expression of the genes related to autophagy during overfeeding. On the contrary, the induction of the expression of the cytochrome P450 2E1 (*cyp2e1*) observed in our study suggests that autophagy is suppressed by overfeeding of ducks. Indeed, *cyp2e1* has been shown to mediate the upregulation of oxidative stress-suppressed autophagy, thus leading to lipid accumulation in cultured liver cells (68). In mice, it has been proposed that high-fat diets, by reducing LAMP2A, could inhibit the degradation of PLIN2 by the chaperone-mediated autophagy leading to the reduction of lipophagy (70). However, the expression of both *lamp2a* and *plin2* increased during the development of the hepatic steatosis in duck conflicting with the idea of an inhibition of lipophagy promoting triglyceride accumulation into the liver of mule ducks during overfeeding. Therefore, if autophagy is effectively inhibited in overfed mule ducks, it must be strictly demonstrated using autophagic flux analyses.

Another cellular stress pathway is eIF2 $\alpha$ /ATF4. Activated under amino acid deprivation, the eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is before all a target of transmembrane protein PKR-related Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK) activated in ER stress (8, 29, 41, 54). EIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway have the ability to triggers the transcriptional expression of genes involved in amino acid metabolism or resistance to oxidative stress. Throughout the overfeeding period, a significant increase of the expression of *atf4* and its target *asns* was observed in the liver of mule ducks and to a lower level, in the muscle. This strong hepatic induction of *atf4* and *asns* probably reflects the strong nutritional imbalance of the feed used during overfeeding. Mainly composed of corn, this diet exhibits a very low content in protein and amino acid that probably doesn't cover amino acid mule duck requirement.

At the end of the overfeeding period, overexpression of *casp3*, 8 and 9 involved in apoptosis enhanced in liver and in muscle. This result is in accordance with measures of liver activity of these caspases in Rémignon *et al.* study (51). At the same time, the expression of the protein chaperone *hspb1*, involved in stress resistance and known to reduce oxidative stress and suppress some modes of apoptosis or cell death (67) increased. Altogether, these results indicated that mechanisms are implemented during overfeeding to limit cellular stress and apoptosis during the development of the hepatic steatosis.

## **CONCLUSION**

To conclude, the present study contributes to a better understanding of the physiological mechanisms triggered during overfeeding in the mule duck and underlying to the development of hepatic steatosis. In order to cope with an overload of dietary carbohydrates, mule ducks seem to adapt its metabolism by first increasing its capacity of glucose uptake and transformation of glucose into lipids. These mechanisms are probably enabled by an increasing activation of the insulin-signaling pathway throughout the overfeeding period. In addition, a strong lipoprotein synthesis mainly occurs in the liver but exported lipids are taken up again by the liver at the end of the overfeeding period, which strongly contributes to the development of the hepatic steatosis. Nevertheless, beta-oxidation is simultaneously stimulated probably to limit a too important accumulation of lipids. During overfeeding, mule ducks seems to accordingly adapt tissue response to resist to the setup various cellular stress including autophagy, amino acid deficiency, ER and oxidative stress or apoptosis. Altogether, these mechanisms enable mule ducks to efficiently handle this huge starch overload while keeping the liver in a state of steatosis without switching to a pathological condition.

## **PERSPECTIVES AND SIGNIFICANCE**

To summarize, this study permits to bring new understanding on the ‘foie gras’ development in mule ducks, and on glucose, protein and cellular stress mechanisms associated. It would be interesting to complete our kinetic with non-overfed ducks (before overfeeding) to have a bigger idea of early mechanisms put in place by the animal to respond to overfeeding. This study also brings to light potential biomarker candidates of hepatic steatosis for liver weight linked to cholesterol metabolism. The development of robust non-invasive biomarker of liver weight and melting rate could be of great interest to monitor in real-time the development of hepatic steatosis of mule duck during overfeeding. This study opens new perspectives such as the search for circulating biomarkers linked to cholesterol metabolism (miRNA).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank the “Conseil Départemental des Landes (CD40)” and Nutricia from the cooperative group Maisadour for financing this work. We also thank the technical staff of INRA Artiguères



for rearing ducks. We are grateful to Emilie Bonin for performing Fluidigm analysis [Génopole Toulouse/Midi-Pyrénées, Plateau Transcriptomique Quantitative (TQ), Toulouse, France].

## **REFERENCES**

1. **Annabelle T, Karine R, Marie-Dominique B, Stéphane D, Karine G.** Kinetics of expression of genes involved in glucose metabolism after the last meal in overfed mule ducks. *Mol Cell Biochem* 430: 127–137, 2017.
2. **Arroyo J, Molette C, Lavigne F, Margetyal C, Amador O, Dubois J-P, Fortun-Lamothe L.** Effects of dietary protein level during rearing period and age at overfeeding on magret and foie gras quality in male mule ducks. *Anim Sci J* 89: 570–578, 2018.
3. **Auvergne A, Rémignon H, Babilé R, Baudonnet-Lenfant C.** Evolution corporelle au cours du gavage chez le canard de Barbarie. *Arch Für Geflügelkd* 59: 234–240, 1995.
4. **Awde S, Marty-Gasset N, Prahkarnkao K, Rémignon H.** Relationship between Proteolytic Activities and Cooking Loss Variability in Liver Issued from Force-Fed Mule Ducks. *J Agric Food Chem* 62: 3262–3268, 2014.
5. **Babile R, Auvergne A, Dubois JP, Benard G, Manse H.** Reversibilité de la stéatose hépatique chez l'oie. *3emes Journées de la recherche sur les Palmipèdes a Foie "gras". Bordeaux, France.* October, 1998.
6. **Baéza E, Marie-Etancelin C, Davail S, Diot C.** La stéatose hépatique chez les palmipèdes. *INRA Prod Anim* 26: 403–414, 2013.
7. **Baéza E, Rideau N, Chartrin P, Davail S, Hoo-Paris R, Mourot J, Guy G, Bernadet MD, Juin H, Meteau K.** Canards de Barbarie, Pékin et leurs hybrides: aptitude à l'engraissement. *INRA Prod Anim* 18: 131–141, 2005.
8. **Barbosa-Tessmann IP.** Activation of the Human Asparagine Synthetase Gene by the Amino Acid Response and the Endoplasmic Reticulum Stress Response Pathways Occurs by Common Genomic Elements. *J. Biol. Chem.* ( June 15, 2000). doi: 10.1074/jbc.M000004200.
9. **Barthel A, Schmoll D.** Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 285: E685–E692, 2003.
10. **Bax ML, Chambon C, Marty-Gasset N, Rémignon H, Fernandez X, Molette C.** Proteomic profile evolution during steatosis development in ducks. *Poult Sci* 91: 112–120, 2012.
11. **Bénard G, Bénard P, Prehn D, Bengone T, Jouglar JY, Durand S.** Démonstration de la réversibilité de la stéatose hépatique obtenue par gavage de canards mulards. *JRA*, 1998.
12. **Blecha IMZ, Siqueira F, Ferreira ABR, Feijó GLD, Torres Júnior RAA, Medeiros SR, Sousa II, Santiago GG, Ferraz ALJ.** Identification and evaluation of polymorphisms in FABP3 and FABP4 in beef cattle. *Genet Mol Res* 14: 16353–16363, 2015.
13. **Bonnefont CM, Guerra A, Théron L, Molette C, Canlet C, Fernandez X.** Metabolomic study of fatty livers in ducks: Identification by 1H-NMR of metabolic markers associated with technological quality. *Poult Sci* 93: 1542–1552, 2014.
14. **Bonnefont CMD, Molette C, Lavigne F, Manse H, Bravo C, Lo B, Rémignon H, Arroyo J, Bouillier-Oudot M.** Evolution of liver fattening and foie gras technological yield during the overfeeding period in mule duck. *Poult. Sci.* ( July 26, 2019). doi: 10.3382/ps/pez359.
15. **Cazeils JL, Bouillier-Oudot M, Auvergne A, Candau M, Babile R.** Lipid composition of hepatocyte plasma membranes from geese overfed with corn. *Lipids* 34: 937–942, 1999.

16. **Chartrin P, Bernadet M-D, Guy G, Mourot J, Hocquette J-F, Rideau N, Duclos MJ, Baéza E.** Does overfeeding enhance genotype effects on liver ability for lipogenesis and lipid secretion in ducks? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 145: 390–396, 2006.
17. **Chartrin P, Meteau K, Juin H, Bernadet MD, Guy G, Larzul C, Remignon H, Mourot J, Duclos MJ, Baeza E.** Effects of Intramuscular Fat Levels on Sensory Characteristics of Duck Breast Meat. *Poult Sci* 85: 914–922, 2006.
18. **Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J.** NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 35: 373–379, 2002.
19. **Codogno P, Meijer AJ.** Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 12: 1509–1518, 2005.
20. **Desvignes T, Fauvel C, Bobe J.** The nme gene family in zebrafish oogenesis and early development. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 384: 439–449, 2011.
21. **Desvignes T, Fauvel C, Bobe J.** The nme gene family in zebrafish oogenesis and early development. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 384: 439–449, 2011.
22. **Fantini J, Epanand RM, Barrantes FJ.** Cholesterol-Recognition Motifs in Membrane Proteins. In: *Direct Mechanisms in Cholesterol Modulation of Protein Function*, edited by Rosenhouse-Dantsker A, Bukiya AN. Springer International Publishing, p. 3–25.
23. **François Y, Marie-Etancelin C, Vignal A, Viala D, Davail S, Molette C.** Mule Duck “Foie Gras” Shows Different Metabolic States According to Its Quality Phenotype by Using a Proteomic Approach. *J Agric Food Chem* 62: 7140–7150, 2014.
24. **Gabarrou J, Salichon M, Guy G, Blum J.** Hybrid ducks overfed with boiled corn develop an acute hepatic steatosis with decreased choline and polyunsaturated fatty acid level in phospholipids. *Reprod Nutr Dev* 36: 473–484, 1996.
25. **Gontier K, André J-M, Bernadet M-D, Ricaud K, Davail S.** Insulin effect on lipogenesis and fat distribution in three genotypes of ducks during overfeeding. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 164: 499–505, 2013.
26. **Guy G, Rousselot-Pailley D, Gourichon D.** Comparaison des performances de l’oie, du canard mulard et du canard de Barbarie soumis au gavage. In: *Annales de zootechnie*. p. 297–305, 1995.
27. **Ha J, Guan K-L, Kim J.** AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism. *Mol Aspects Med* 46: 46–62, 2015.
28. **Haar EV, Lee S, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim D-H.** Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 9: 316, 2007.
29. **Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D.** An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Mol Cell* 11: 619–633, 2003.
30. **He C, Klionsky DJ.** Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu Rev Genet* 43: 67–93, 2009.
31. **Hérault F, Duby C, Baéza E, Diot C.** Adipogenic genes expression in relation to hepatic steatosis in the liver of two duck species. *Animal* 12: 2571–2577, 2018.
32. **Hérault F, Saez G, Robert E, Mohammad AA, Davail S, Chartrin P, Baéza E, Diot C.** Liver gene expression in relation to hepatic steatosis and lipid secretion in two duck species. *Anim Genet* 41: 12–20, 2009.
33. **Hermier D, Guy G, Guillaumin S, Davail S, André J-M, Hoo-Paris R.** Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 135: 663–675, 2003.

34. **Hermier D, Saadoun A, Salichon M-R, Sellier N, Rousselot-Paillet D, Chapman MJ.** Plasma lipoproteins and liver lipids in two breeds of geese with different susceptibility to hepatic steatosis: Changes induced by development and force-feeding. *Lipids* 26: 331–339, 1991.
35. **Hermier D, Saadoun A, Salichon M-R, Sellier N, Rousselot-Paillet D, Chapman MJ.** Plasma lipoproteins and liver lipids in two breeds of geese with different susceptibility to hepatic steatosis: Changes induced by development and force-feeding. *Lipids* 26: 331–339, 1991.
36. **Hermier D, Salichon MR, Guy G, Peresson R.** Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in the goose. *Poult Sci* 78: 1398–1406, 1999.
37. **Hoashi S, Hinenoya T, Tanaka A, Ohsaki H, Sasazaki S, Taniguchi M, Oyama K, Mukai F, Mannen H.** Association between fatty acid compositions and genotypes of FABP4 and LXR-alpha in Japanese Black cattle. *BMC Genet* 9: 84, 2008.
38. **Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K.** Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci* 101: 7281–7286, 2004.
39. **Ishii S, Iizuka K, Miller BC, Uyeda K.** Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci* 101: 15597–15602, 2004.
40. **Jung CH, Ro S-H, Cao J, Otto NM, Kim D-H.** mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 584: 1287–1295, 2010.
41. **Kilberg MS, Balasubramanian M, Fu L, Shan J.** The Transcription Factor Network Associated With the Amino Acid Response in Mammalian Cells. *Adv Nutr* 3: 295–306, 2012.
42. **Kono T, Nishida M, Nishiki Y, Seki Y, Sato K, Dr YA.** Characterisation of glucose transporter (GLUT) gene expression in broiler chickens. *Br Poult Sci* 46: 510–515, 2005.
43. **Lansard M, Panserat S, Plagnes-Juan E, Seiliez I, Skiba-Cassy S.** Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR. *Amino Acids* 39: 801–810, 2010.
44. **Marandel L, Labbe C, Bobe J, Jammes H, Lareyre J-J, Le Bail P-Y.** Do not put all teleosts in one net: Focus on the sox2 and pou2 genes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 164: 69–79, 2013.
45. **Marandel L, Labbe C, Bobe J, Le Bail P-Y.** nanog 5'-upstream sequence, DNA methylation, and expression in gametes and early embryo reveal striking differences between teleosts and mammals. *Gene* 492: 130–137, 2012.
46. **Min H-K, Kapoor A, Fuchs M, Mirshahi F, Zhou H, Maher J, Kellum J, Warnick R, Contos MJ, Sanyal AJ.** Increased Hepatic Synthesis and Dysregulation of Cholesterol Metabolism Is Associated with the Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab* 15: 665–674, 2012.
47. **Mizushima N, Komatsu M.** Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* 147: 728–741, 2011.
48. **Navale AM, Paranjape AN.** Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophys Rev* 8: 5–9, 2016.
49. **Niemeyer H, Ureta T, Clark-Turri L.** Adaptive character of liver glucokinase. *Mol Cell Biochem* 6: 109–126, 1975.
50. **Pilo B, George JC.** Diurnal and seasonal variation in liver glycogen and fat in relation to metabolic status of liver and m. pectoralis in the migratory starling, *Sturnus roseus*, wintering in India. *Comp Biochem Physiol A* 74: 601–604, 1983.

51. **Rémignon H, Yahia RBH, Marty-Gasset N, Wilkesman J.** Apoptosis during the development of the hepatic steatosis in force-fed ducks and cooking yield implications. *Poult Sci* 97: 2211–2217, 2018.
52. **Rogers MA, Liu J, Song B-L, Li B-L, Chang CCY, Chang T-Y.** Acyl-CoA:cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): Enzymes with multiple sterols as substrates and as activators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 151: 102–107, 2015.
53. **Roybal CN, Hunsaker LA, Barbash O, Jagt DLV, Abcouwer SF.** The Oxidative Stressor Arsenite Activates Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Transcription by an ATF4-dependent Mechanism. *J Biol Chem* 280: 20331–20339, 2005.
54. **Saadoun A, Leclercq B.** In Vivo Lipogenesis of Genetically Lean and Fat Chickens: Effects of Nutritional State and Dietary Fat. *J Nutr* 117: 428–435, 1987.
55. **Salichon MR, Guy G, Rousselot D, Blum JC.** Composition des 3 types de foie gras: oie, canard mulard et canard de Barbarie. In: *Annales de zootechnie.*, p. 213–220, 1994.
56. **Saltiel AR, Kahn CR.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799–806, 2001.
57. **Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN.** Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120: 1183–1192, 2001.
58. **Schulze RJ, Sathyanarayan A, Mashek DG.** Breaking fat: The regulation and mechanisms of lipophagy. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* 1862: 1178–1187, 2017.
59. **Shapira N, Nir I, Budowski P.** Response of lipogenic enzymes to overfeeding in liver and adipose tissue of light and heavy breeds of chicks. *Br J Nutr* 39: 151, 1978.
60. **Simonen P, Kotronen A, Hallikainen M, Sevastianova K, Makkonen J, Hakkarainen A, Lundbom N, Miettinen TA, Gylling H, Yki-Järvinen H.** Cholesterol synthesis is increased and absorption decreased in non-alcoholic fatty liver disease independent of obesity. *J Hepatol* 54: 153–159, 2011.
61. **Solsona-Vilarrasa E, Fucho R, Torres S, Nuñez S, Nuño-Lámbarri N, Enrich C, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC.** Cholesterol enrichment in liver mitochondria impairs oxidative phosphorylation and disrupts the assembly of respiratory supercomplexes. *Redox Biol* 24: 101214, 2019.
62. **Tavernier A, Davail S, Ricaud K, Bernadet M-D, Gontier K.** Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks. *Mol Cell Biochem* 424: 147–161, 2017.
63. **Tavernier A, Karine R, Marie-Dominique B, Karine G, Stéphane D.** Pre- and post-prandial expression of genes involved in lipid metabolism at the end of the overfeeding period of mule ducks. *Mol Cell Biochem* 438: 111–121, 2018.
64. **Theron L, Fernandez X, Marty-Gasset N, Pichereaux C, Rossignol M, Chambon C, Viala D, Astruc T, Molette C.** 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, 2011.
65. **Uyeda K, Repa JJ.** Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 4: 107–110, 2006.
66. **Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: research0034.1, 2002.
67. **Vidyasagar A, Wilson NA, Djamali A.** Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5: 7, 2012.

68. **Wu D, Wang X, Zhou R, Cederbaum A.** CYP2E1 enhances ethanol-induced lipid accumulation but impairs autophagy in HepG2 E47 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 402: 116–122, 2010.
69. **Yang J, Fernández-Galilea M, Martínez-Fernández L, González-Muniesa P, Pérez-Chávez A, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ.** Oxidative Stress and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation. *Nutrients* 11: 872, 2019.
70. **Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS.** Defective Hepatic Autophagy in Obesity Promotes ER Stress and Causes Insulin Resistance. *Cell Metab* 11: 467–478, 2010.
71. **Yoshida Y, Aoyama Y, Noshiro M, Gotoh O.** Sterol 14-Demethylase P450 (CYP51) Provides a Breakthrough for the Discussion on the Evolution of Cytochrome P450 Gene Superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 799–804, 2000.
72. **Yu C-L, Yang S-F, Hung T-W, Lin C-L, Hsieh Y-H, Chiou H-L.** Inhibition of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation accelerates pterostilbene-induced cell death in human hepatocellular carcinoma cells in an ER stress and autophagy-dependent manner. *Cell Death Dis* 10, 2019.
73. **Zhu LH, Meng H, Duan XJ, Xu GQ, Zhang J, Gong DQ.** Gene expression profile in the liver tissue of geese after overfeeding. *Poult Sci* 90: 107–117, 2011.
74. **Zhuang X, Chung KP, Cui Y, Lin W, Gao C, Kang B-H, Jiang L.** ATG9 regulates autophagosome progression from the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* 114: E426–E435, 2017.
75. La production de Foie Gras [Online]. [date unknown]. <https://lefoiegras.fr/le-foie-gras/foie-gras-production> [30 Aug. 2019].

## FIGURES AND TABLES

**Table 1a** Primers used for determination of mRNA levels.

Numbers indicate the analyse method used: <sup>1</sup>Fluidigm or <sup>2</sup>qPCR

Genes (name and symbol)		Primer sequence 5'-3'
<b>Lipid metabolism</b>		
<sup>1</sup> Acyl CoA dehydrogenase 11 <i>acad11</i>	Forward	TGGTTGTACCTCGAGCTGTG
	Reverse	CATCCACATGAGAGGGCTTT
<sup>1</sup> ATP Citrate Lyase <i>acly</i>	Forward	ACCCCACTGTTGGACTATGC
	Reverse	GCTTCAAGCGCTTCTGATCT
<sup>1</sup> Acyl CoA Synthetase Long-chain 1 <i>acsl1</i>	Forward	GGCTGGCTTCATACAGGAGA
	Reverse	CTCTTTTCTTGGCCCATTTG
<sup>1</sup> Apolipoprotein B <i>apob</i>	Forward	TCTCACCGTGACTTGAGTGC
	Reverse	TCCCAGCAGAAGGTGAAGAT
<sup>1</sup> Apolipoprotein A <i>apoa</i>	Forward	CAAACAGCTCGACCTGAAGC
	Reverse	GGTGTCTTCAGCCACATCT
<sup>1</sup> Cholesteryl Ester Transfer Protein <i>cept1</i>	Forward	CTGCTGTGCAGCTCTTTGAA
	Reverse	CGCAGTATCGAAGCAAATCA
<sup>1</sup> Carnitine Palmitoyl Transferase A <i>cpt1a</i>	Forward	GATTTGGACCAGTGGCTGAT
	Reverse	GAAGGTTGCTTTGCACCAAT
<sup>2</sup> Cytochrome P450 family 5 <i>cyp51a</i>	Forward	CCTAACCGGGTATTTTTGGA
	Reverse	GGCAATGACTTGCTGTCAAA
<sup>2</sup> 7-Dehydrocholesterol Reductase <i>dhcr7</i>	Forward	CAAGCATCCTTTTCTGCTC
	Reverse	CCTGGAAAGCAACCCAAATA
<sup>1</sup> Diglyceride Acyl Transferase 2 <i>dgat2</i>	Forward	TGGGGCTTGTTACCGTACTC
	Reverse	TGGAGAAGATGGGCTGAATC
<sup>1</sup> Fatty Acid Binding Protein 4 <i>fabp4</i>	Forward	AATGGCTCACTGAAGCAGGT
	Reverse	TGGCTTCTTCATGCCTTTTC
<sup>1</sup> Fatty Acid Synthase <i>fas</i>	Forward	TGAAGAAGGTCTGGGTGGAG
	Reverse	CTCCAATAAGGTGCGGTGAT
<sup>1</sup> Fatty Acid Translocase/Cluster of Differentiation 36 <i>fat/cd36</i>	Forward	AGTTTGCCAAAAGGCTTCAA
	Reverse	CGAGGAACACCACAGAACCT
<sup>1</sup> Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 1 <i>gpat1</i>	Forward	ACAACCTTCAGCGTCTGTGTT
	Reverse	GCGCTGAGGTAGGAACGTAG
<sup>1</sup> 3-ketoacyl-CoA thiolase, isoform alpha <i>hadh</i>	Forward	ACTTCAGCAAAGCGGTAGGA
	Reverse	ATCCAACCCAACGTAGTCCA
<sup>2</sup> Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase <i>hmgcr</i>	Forward	CATTTTGCTCGTGTCTGGA
	Reverse	ATCCATACTGGCCATTCGAG
<sup>1</sup> Low Density Lipoprotein Receptor <i>ldlr</i>	Forward	TGTGGCCTTCAGAAAGCTCG
	Reverse	ATCTCGTGCTGCATGTAGGG
<sup>1</sup> Lipase Maturation Factor 1 <i>lmfl</i>	Forward	CCTTCCAGACCTACGAGCAG
	Reverse	GCCGATCCTCTTCCGAATCC
<sup>1</sup> Microsomal Triglycerides Transfer Protein <i>mttp</i>	Forward	TGCAGATGGACAGAGTCGAG
	Reverse	GGATGCAGTGCTGAAAACCT
<sup>1</sup> Perilipin 2 <i>plin2</i>	Forward	CAAACCTTCTTTGGTGAGC
	Reverse	TTGTCCAGACCCATACATGC
<sup>1</sup> Stéaryl CoA désaturase <i>scd1</i>	Forward	AGTGCTGCTCACATGTTTGG
	Reverse	TGAAGTGCATGAAGGCTGTG
<sup>1</sup> Sterol O-acyltransferase 1 <i>soat1</i>	Forward	GCATTCTCAGTTTCGCAAT
	Reverse	TGTGGAGTTCCACCAGTCCT
<sup>1</sup> Very Low Density Lipoprotein Receptor <i>vldlr</i>	Forward	CGTAACTGGCAGCACAAAGAA
	Reverse	TGCTGATCCAGTGCTCAAAC

**Table 1b** Primers used for determination of mRNA levelsNumber indicate the analyse method used: <sup>1</sup>Fluidigm

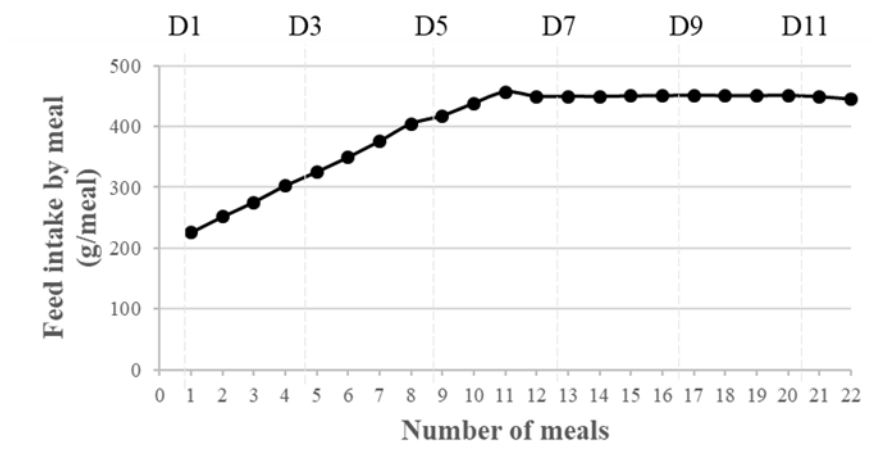
Genes (name and symbol)		Primer sequence 5'-3'
<b>Glucids metabolism</b>		
<sup>1</sup> Acetyl CoA Carboxylase <i>acox</i>	Forward	CATGTTTGAGTGGGCAAAGA
	Reverse	TTTTCAGGGCAGGAAAATTG
<sup>1</sup> Enolase Alpha <i>enol</i>	Forward	CGCTACATGGGGAAAAGTGT
	Reverse	AAGGTCAGCAATGTGACGGT
<sup>1</sup> Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase <i>gapdh</i>	Forward	CAGAGGACCAGGTTGTCTCC
	Reverse	CACCACACGGTTGCTGTATC
<sup>1</sup> Glucose Transporter 1 <i>glut1</i>	Forward	CGGGGATCAATGCGGTTTTTC
	Reverse	GTGAAGGGTCCCTACGTCCAG
<sup>1</sup> Glucose Transporter 2 <i>glut2</i>	Forward	GGAGTTGACCAACCCGTTTA
	Reverse	CCCACCTCGAAGAAGATGAC
<sup>1</sup> Glucose Transporter 3 <i>glut3</i>	Forward	TTCTCCAGAACTCCGTGGC
	Reverse	GGCTCTGTGATACCAGCTCG
<sup>1</sup> Glucose Transporter 8 <i>glut8</i>	Forward	ACTGGGAGGCTATCTTGTGG
	Reverse	CAAGAGCCAAGCATACCACC
<sup>1</sup> Hexokinase 1 <i>hk1</i>	Forward	GAGGGAGCAGACGTTGTGAA
	Reverse	GCCGCATCTCCTCCATGTAA
<sup>1</sup> Insuline like Growth Factor 1 <i>igf1</i>	Forward	TACCAAGGCATGACCAATGA
	Reverse	AGACCTCTTTGAACGCTGGA
<sup>1</sup> Insulin Receptor <i>insr</i>	Forward	TGGAGGATACCTGGATCAGC
	Reverse	GCAAGTCCTCCTTCAGCATC
<sup>1</sup> Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A <i>sdha</i>	Forward	TGGAACACTGACTTGGTGGGA
	Reverse	CCTTGGAGTGGCTTGGGAATA
<b>Transcription factors</b>		
<sup>1</sup> AMP-activated protein kinase <i>ampk</i>	Forward	GCAAGCCTTTTTGATGCTGT
	Reverse	TCATAAAGGCAGGCTTTGG
<sup>1</sup> Proteine kinase B <i>akt</i>	Forward	GGAAGAATGGACGAAAGCC
	Reverse	AGTGCCTTTTCCCAGTAGCT
<sup>1</sup> Liver X Receptor Alpha <i>lxra</i>	Forward	CATCTCGACGCTACAATCCA
	Reverse	GTGTGCTGCAGTCTCTCCAC
<sup>1</sup> Mammalian Target of Rapamycin <i>mtor</i>	Forward	ATGGCTTGAAGAGTCGCAGT
	Reverse	AAGGCTTGCAATAGCCAAAA
<sup>1</sup> S6 Protein Kinase 1 <i>s6k1</i>	Forward	ACTTGGCAAAGGTGGCTATG
	Reverse	GGGATGTTTTCACTTCCCTCCA
<sup>1</sup> Carbohydrate Response Element Binding Protein <i>chrebp</i>	Forward	TCCTCCACACTGCAAAACTG
	Reverse	ACCATGCCGTTGAAAGACTC
<sup>1</sup> Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha <i>ppara</i>	Forward	GGATGCTGGTAGCCTATGGA
	Reverse	ACGTGCACAATGCTCTCTTG
<sup>1</sup> Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma <i>ppary</i>	Forward	CCCAAGTTTGAGTTTCGCTGT
	Reverse	GCTGTGACGACTCTGGATGA
<sup>1</sup> Myocyte Enhancer Factor 2 <i>mef2</i>	Forward	CTGGCAACAGCAACACCTAC
	Reverse	GGTGTGGTGGTACGGTCTCT
<sup>1</sup> Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha <i>hnf4a</i>	Forward	ACCTCAACACCTCCAACAGC
	Reverse	ACGCACTGCCTGTAAACCT

**Table 1c** Primers used for determination of mRNA levelsNumbers indicate the analyse method used: <sup>1</sup>Fluidigm or <sup>2</sup>qPCR

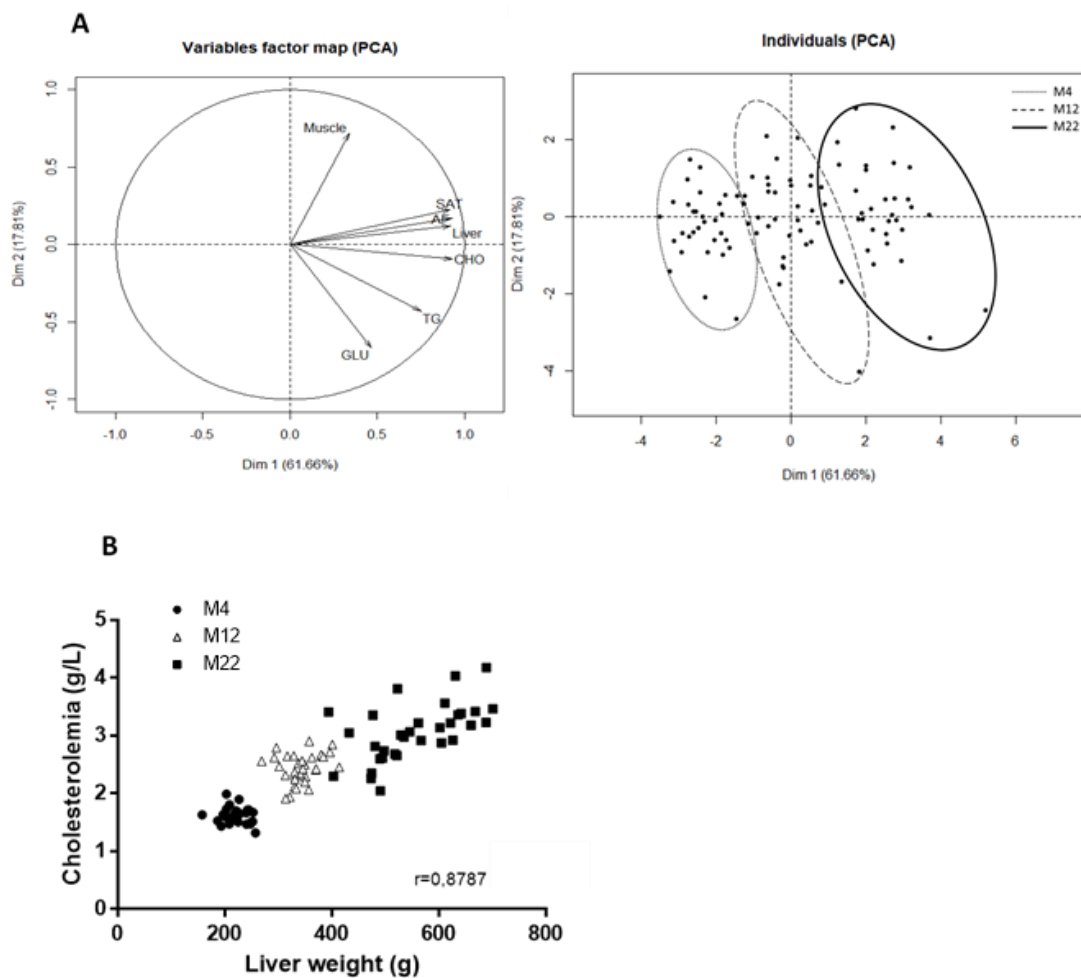
Genes (name and symbol)		Primer sequence 5'-3'
<b>Cellular stress</b>		
<sup>1</sup> Asparagine Synthetase	Forward	GGTGATCACGAAAAGAAGC
<i>asns</i>	Reverse	GTACAGCCCTTTTGGCAGA
<sup>1</sup> Activating Transcription Factor 4	Forward	CAGGTCCTTTTCCTCTGCTG
<i>atf4</i>	Reverse	CCTGGGATTCCTGGGATACT
<sup>1</sup> Autophagy related gene 4	Forward	AAGGGAAGAGGCAGATGGAT
<i>atg4b</i>	Reverse	CCGCCTGATTTCTCCATTA
<sup>1</sup> Autophagy related gene 8	Forward	AAATCCCGGTCATCATTGAA
<i>atg8/lc3</i>	Reverse	AGGAAGCCATCCTCATCCTT
<sup>1</sup> Autophagy related gene 9	Forward	TCTACGACGAAGACGTGCTG
<i>atg9</i>	Reverse	CCGCTTTGTAAGGAGAGC
<sup>1</sup> Caspase 3	Forward	GCAGACAGTGGACCAGATGA
<i>casp3</i>	Reverse	CTTGCATGTTTCCTCAGCAC
<sup>1</sup> Caspase 8	Forward	GGAAAGCAGTGCCAGAACTC
<i>casp8</i>	Reverse	TAAAATGAAGGGTGCCGAAG
<sup>1</sup> Caspase 9	Forward	CACCCGAAGATGAACTTGC
<i>casp9</i>	Reverse	CCATGATCCGCTCGACTTAT
<sup>1</sup> Cytochrome P450 2E1	Forward	GCCAGATGCCCTACACAGAT
<i>cyp2e1</i>	Reverse	GGTACCGTTTGATTCAGGA
<sup>1</sup> Heat Shock Protein beta 1	Forward	ACTGGAAGGCGAGAACAAGA
<i>hspb1</i>	Reverse	TCGGTAATTCCAAGGGACTG
<sup>1</sup> Sequestosome 1	Forward	AGTCTCCCGTGATATGGTG
<i>sqstm1/p62</i>	Reverse	ACCATGTTGTGCTCCTTGTG
<b>Reference gene</b>		
<sup>1,2</sup> <i>luciférase</i>	Forward	CATTCTTCGCCAAAAGCACTCTG
	Reverse	AGCCCATATCCTTGTCGTATCCC



**Figure 1** Curve of feed intake of mule ducks during overfeeding.

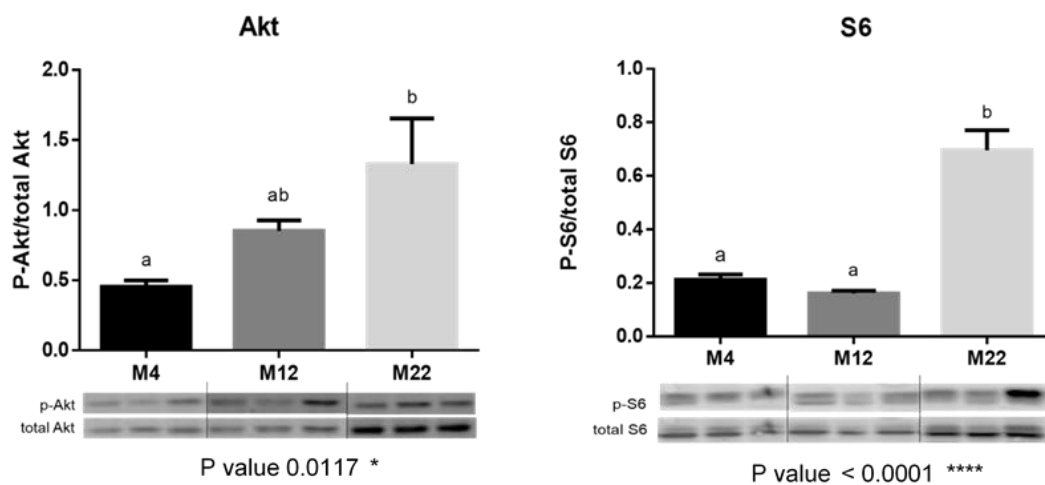


**Figure 2** Multilevel PCA on tissue weights and plasma contents in mule ducks (n=96) (A); Evolution of cholesterolemia in function of liver weight and Pearson correlation (n=32 at each time point) (B). AF: abdominal fat, SAT: subcutaneous adipose tissue, GLU: glucose, TG: triglyceride, CHO: cholesterol.

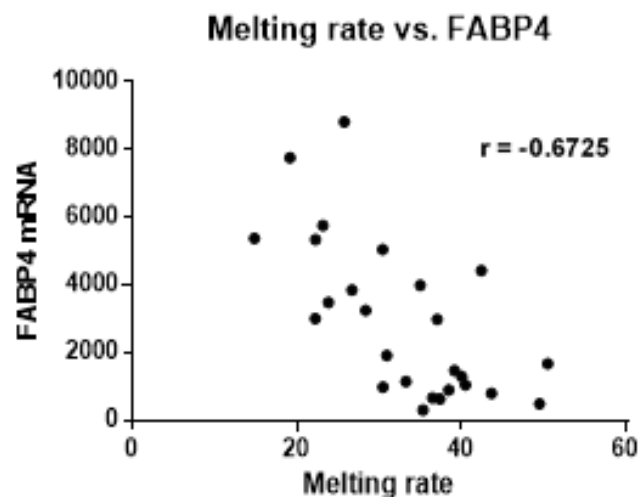


**Figure 3** Western blot analysis of hepatic protein kinase (Akt), ribosomal protein S6 (S6) phosphorylation in mule ducks after 4, 12 and 22 meals.

A representative blot is shown. Graphs represent the ratio between the phosphorylated protein and the total amount of the target protein, n=3 at each time point, mean  $\pm$  SEM, M: meal



**Figure 4** Evolution of hepatic *fabp4* expression in function of the melting rate of the liver at the end of the overfeeding period in mule ducks (n=32).



**Table 2** Evolution of tissue weights and plasma parameters after 4, 12 and 22 meals

n=32 at each time point, one-way Anova followed by Tuckey test, mean  $\pm$  SEM, letters a, b, c means significant differences between sampling points, \*\* P <0.01, \*\*\* P <0.001, \*\*\*\* P <0.0001, M: meal, AF: abdominal fat, SAT: subcutaneous adipose tissue, GLU: glucose, TG: triglyceride, CHO: cholesterol

	Sampling points			P value
	M4	M12	M22	
<b>Tissues (g)</b>				
Liver	220.9 $\pm$ 3.87 <sup>a</sup>	344.1 $\pm$ 5.85 <sup>b</sup>	556.0 $\pm$ 15.12 <sup>c</sup>	****
Muscle	287.4 $\pm$ 4.43 <sup>a</sup>	306.9 $\pm$ 4.36 <sup>b</sup>	314.1 $\pm$ 5.94 <sup>b</sup>	***
AF	38.09 $\pm$ 2.86 <sup>a</sup>	77.08 $\pm$ 4.02 <sup>b</sup>	156.9 $\pm$ 4.25 <sup>c</sup>	****
SAT	69.59 $\pm$ 2.34 <sup>a</sup>	116.7 $\pm$ 2.49 <sup>b</sup>	154.3 $\pm$ 3.05 <sup>c</sup>	****
<b>Melting rate (%)</b>	-	-	30.9 $\pm$ 17.5	-
<b>Plasma (g/L)</b>				
GLU	3.21 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	3.48 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>	3.62 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	**
TG	3.202 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	4.05 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	5.27 $\pm$ 0.29 <sup>c</sup>	****
CHO	1.61 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	2.45 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	3.06 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	****

**Table 3** Pearson correlation coefficients between plasma contents and liver weight or melting rate and between mRNA expression of genes linked to cholesterol synthesis and liver weights

n=32 at each time point, ns: no significant, \*P<0.1; \*\*P < 0.01; \*\*\* P <0.001; \*\*\*\*P < 0.0001, GLU: glucose, TG: triglyceride, CHO: cholesterol

	Liver weight				Melting rate			
	M4	M12	M22	M4/12/22	M4	M12	M22	M4/12/22
<b>Plasma (g/L)</b>								
GLU	-0.175 <sup>ns</sup>	-0.001 <sup>ns</sup>	-0.063 <sup>ns</sup>	0.270 <sup>**</sup>	-	-	-0.242 <sup>ns</sup>	-
TG	0.083 <sup>ns</sup>	0.066 <sup>ns</sup>	0.151 <sup>ns</sup>	0.571 <sup>****</sup>	-	-	-0.153 <sup>ns</sup>	-
CHO	-0.170 <sup>ns</sup>	0.244 <sup>ns</sup>	0.581 <sup>***</sup>	0.878 <sup>****</sup>	-	-	-0.056 <sup>ns</sup>	-
<b>Cholesterol genes</b>								
<i>hmgcr</i>	0.011 <sup>ns</sup>	0.422 <sup>*</sup>	0.030 <sup>ns</sup>	0.400 <sup>****</sup>	-	-	-0.182 <sup>ns</sup>	-
<i>dher7</i>	0.054 <sup>ns</sup>	0.389 <sup>*</sup>	-0.115 <sup>ns</sup>	0.042 <sup>ns</sup>	-	-	-0.012 <sup>ns</sup>	-
<i>cyp51a</i>	-0.002 <sup>ns</sup>	0.477 <sup>*</sup>	-0.170 <sup>ns</sup>	-0.093 <sup>ns</sup>	-	-	-0.269 <sup>ns</sup>	-
<i>soat1</i>	-0.016 <sup>ns</sup>	0.604 <sup>***</sup>	-0.173 <sup>ns</sup>	0.670 <sup>****</sup>	-	-	-0.159 <sup>ns</sup>	-
<i>apob</i>	0.199 <sup>ns</sup>	0.506 <sup>**</sup>	-0.008 <sup>ns</sup>	0.691 <sup>****</sup>	-	-	-0.211 <sup>ns</sup>	-

**Table 4** Relative expression of genes involved in carbohydrate metabolism in liver, muscle and abdominal fat of mule ducks after 4, 12 and 22 meals

n=32 at each time point, one-way Anova followed by Tuckey test, mean  $\pm$  SEM, letters a, b, c means significant differences between sampling points, \*\*P < 0.01, \*\*\*\*P < 0.0001, M: meal

Target genes	Liver				Muscle				Abdominal fat				
	M4	M12	M22	P value	M4	M12	M22	P value	M4	M12	M22	P value	
<b>Glycolysis</b>	<i>hk1</i>	1.80 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	8.34 $\pm$ 1.04 <sup>a</sup>	40.72 $\pm$ 4.92 <sup>b</sup>	****	1.16 $\pm$ 0.12	1.40 $\pm$ 0.16	1.44 $\pm$ 0.11	ns	0.99 $\pm$ 0.09	1.05 $\pm$ 0.08	0.93 $\pm$ 0.10	ns
	<i>acox</i>	1.46 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	4.68 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	7.71 $\pm$ 0.65 <sup>c</sup>	****	1.60 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	1.75 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2.85 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	***	1.10 $\pm$ 0.08	1.06 $\pm$ 0.08	0.86 $\pm$ 0.11	ns
	<i>eno1</i>	1.54 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	1.83 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	2.19 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	**	1.57 $\pm$ 0.14	1.49 $\pm$ 0.15	1.87 $\pm$ 0.17	ns	1.27 $\pm$ 0.10	1.15 $\pm$ 0.10	0.97 $\pm$ 0.18	ns
	<i>sdha</i>	1.37 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	3.07 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	4.43 $\pm$ 0.35 <sup>c</sup>	****	1.17 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.20 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>	1.59 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	*	0.76 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.42 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	***
	<i>gapdh</i>	1.63 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2.77 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	4.49 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup>	****	1.26 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.89 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.88 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	**	1.25 $\pm$ 0.14	1.29 $\pm$ 0.11	1.15 $\pm$ 0.28	ns
<b>Glucose transporters</b>	<i>glut1</i>	1.08 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	2.63 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	6.40 $\pm$ 0.62 <sup>c</sup>	****	1.08 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	1.67 $\pm$ 0.25 <sup>ab</sup>	2.12 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	**	1.28 $\pm$ 0.11	1.34 $\pm$ 0.11	1.12 $\pm$ 0.14	ns
	<i>glut2</i>	1.44 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	2.40 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	3.39 $\pm$ 0.29 <sup>c</sup>	****	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>glut3</i>	1.51 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	2.79 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	7.31 $\pm$ 0.72 <sup>b</sup>	****	1.78 $\pm$ 0.23	1.45 $\pm$ 0.19	1.97 $\pm$ 0.19	ns	1.56 $\pm$ 0.85	0.53 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.10	ns
	<i>glut8</i>	1.27 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	2.25 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	3.75 $\pm$ 0.26 <sup>c</sup>	****	1.18 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.51 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	2.24 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	****	1.15 $\pm$ 0.09	1.02 $\pm$ 0.06	1.03 $\pm$ 0.11	ns
<b>Insulin Receptor</b>	<i>insr</i>	1.37 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	2.26 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	3.44 $\pm$ 0.24 <sup>c</sup>	****	1.63 $\pm$ 0.13	1.75 $\pm$ 0.17	2.03 $\pm$ 0.16	ns	1.33 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	0.84 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.82 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	**
<b>Transcription factors</b>	<i>igf1</i>	2.07 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	6.21 $\pm$ 0.87 <sup>b</sup>	11.39 $\pm$ 1.33 <sup>c</sup>	****	1.71 $\pm$ 0.29 <sup>ab</sup>	1.37 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	2.29 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	*	1.86 $\pm$ 0.39	1.20 $\pm$ 0.18	1.33 $\pm$ 0.33	ns
	<i>chrebp</i>	1.50 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	2.68 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	3.90 $\pm$ 0.36 <sup>c</sup>	****	-	-	-	-	1.78 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	0.78 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	1.62 $\pm$ 0.38 <sup>ab</sup>	*

**Table 5** Relative expression of genes involved in lipid metabolism in liver, muscle and abdominal fat of mule ducks after 4, 12 and 22 meals n=32 at each time point, one-way Anova followed by Tuckey test, mean  $\pm$  SEM, letters a, b, c means significant differences between sampling points, \*\*P < 0.01. \*\*\*\*P < 0.0001. M: meal

Target genes	Liver				Muscle				Abdominal fat				
	M4	M12	M22	P value	M4	M12	M22	P value	M4	M12	M22	P value	
<b>Lipogenesis</b>	<i>fas</i>	1.25 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.85 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	1.73 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	**	1.01 $\pm$ 0.20	1.06 $\pm$ 0.20	1.29 $\pm$ 0.27	ns	-	-	-	-
	<i>acs1l</i>	1.31 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	3.33 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	6.28 $\pm$ 0.68 <sup>c</sup>	****	1.18 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	2.99 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>	3.23 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	****	1.04 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.75 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	0.56 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	**
	<i>dgat2</i>	2.34 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	6.60 $\pm$ 0.77 <sup>b</sup>	9.10 $\pm$ 1.54 <sup>b</sup>	****	1.17 $\pm$ 0.15	1.70 $\pm$ 0.27	1.68 $\pm$ 0.20	ns	-	-	-	-
	<i>scd1</i>	2.45 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	7.93 $\pm$ 1.05 <sup>b</sup>	13.45 $\pm$ 2.12 <sup>c</sup>	****	1.57 $\pm$ 0.35	1.67 $\pm$ 0.30	2.30 $\pm$ 0.61	ns	-	-	-	-
	<i>acly</i>	1.17 $\pm$ 0.12	1.20 $\pm$ 0.11	1.23 $\pm$ 0.10	ns	1.16 $\pm$ 0.20 <sup>ab</sup>	1.03 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.72 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	*	-	-	-	-
<b><math>\beta</math> oxidation</b>	<i>cpt1a</i>	2.10 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	9.52 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	39.35 $\pm$ 4.88 <sup>b</sup>	****	1.64 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	2.37 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	3.82 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	****	-	-	-	-
	<i>acad</i>	2.14 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	12.60 $\pm$ 1.77 <sup>b</sup>	17.49 $\pm$ 3.10 <sup>b</sup>	****	1.65 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	2.21 $\pm$ 0.36 <sup>ab</sup>	3.38 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	*	-	-	-	-
	<i>hadh</i>	1.73 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	4.37 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	5.55 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	****	1.46 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	2.38 $\pm$ 0.31 <sup>ab</sup>	3.28 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	***	-	-	-	-
<b>Lipoprotein formation</b>	<i>apob</i>	2.02 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	4.39 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	10.32 $\pm$ 0.96 <sup>c</sup>	****	2.05 $\pm$ 0.64	1.82 $\pm$ 0.42	2.63 $\pm$ 0.67	ns	-	-	-	-
	<i>apoa</i>	1.36 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	3.11 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	3.63 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	****	1.28 $\pm$ 0.19	0.93 $\pm$ 0.15	1.45 $\pm$ 0.23	ns	0.97 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.99 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	**
	<i>mttp</i>	1.46 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	2.32 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	2.38 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	**	0.72 $\pm$ 0.19	0.61 $\pm$ 0.15	0.81 $\pm$ 0.21	ns	-	-	-	-
	<i>cept1</i>	1.90 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	4.32 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	6.99 $\pm$ 0.67 <sup>c</sup>	****	1.12 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	1.20 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	1.77 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	*	-	-	-	-
	<i>plin2</i>	1.54 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	3.58 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	6.96 $\pm$ 0.56 <sup>c</sup>	****	1.12 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	0.94 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.41 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	**	-	-	-	-
	<i>gpat1</i>	1.38 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	3.65 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	3.60 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	****	1.49 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	2.75 $\pm$ 0.45 <sup>ab</sup>	3.14 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup>	*	-	-	-	-
	<i>lmf1</i>	1.47 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	2.89 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	4.13 $\pm$ 0.43 <sup>c</sup>	****	1.68 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2.31 $\pm$ 0.30 <sup>ab</sup>	3.60 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	****	1.19 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	1.45 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.82 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	*
<b>Fatty acid maturation and transport</b>	<i>fabp4</i>	2.63 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	100.44 $\pm$ 18.55 <sup>a</sup>	2874.26 $\pm$ 395.59 <sup>b</sup>	****	1.03 $\pm$ 0.35	1.04 $\pm$ 0.30	1.52 $\pm$ 0.20	ns	-	-	-	-
	<i>fat/cd36</i>	1.98 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	6.97 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup>	10.51 $\pm$ 0.92 <sup>c</sup>	****	1.64 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	1.64 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	2.68 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	***	-	-	-	-
<b>Lipoprotein receptors</b>	<i>vldlr</i>	1.65 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	5.00 $\pm$ 1.01 <sup>b</sup>	9.15 $\pm$ 0.74 <sup>c</sup>	****	1.43 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.79 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>	1.99 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	**	-	-	-	-
	<i>ldlr</i>	1.43 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	3.07 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	4.67 $\pm$ 0.41 <sup>c</sup>	****	1.17 $\pm$ 0.22	0.93 $\pm$ 0.12	1.10 $\pm$ 0.09	ns	-	-	-	-
<b>Cholesterol synthesis and esterification</b>	<i>hmgcr</i>	4.00 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	5.44 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	7.76 $\pm$ 0.92 <sup>b</sup>	***	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>dhcr7</i>	3.01 $\pm$ 0.35	4.57 $\pm$ 0.58	3.46 $\pm$ 0.54	ns	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>cyp51a</i>	1.89 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	2.68 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>	1.59 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	*	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>soat1</i>	1.53 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	3.63 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	8.50 $\pm$ 0.78 <sup>c</sup>	****	1.59 $\pm$ 0.21	1.27 $\pm$ 0.17	1.91 $\pm$ 0.24	ns	-	-	-	-
<b>Transcription factors</b>	<i>ppara</i>	1.54 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	5.85 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	8.84 $\pm$ 0.79 <sup>c</sup>	****	1.3 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	2.76 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>	3.25 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	****	-	-	-	-
	<i>ppary</i>	1.47 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	5.84 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>	9.94 $\pm$ 1.12 <sup>c</sup>	****	0.97 $\pm$ 0.11	0.65 $\pm$ 0.12	0.79 $\pm$ 0.07	ns	-	-	-	-
	<i>lxra</i>	1.69 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	5.58 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	8.52 $\pm$ 0.72 <sup>c</sup>	****	1.31 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	1.75 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	2.30 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	***	-	-	-	-

**Table 6** Relative expression of genes involved in mTOR pathway in liver, muscle and abdominal fat of mule ducks after 4, 12 and 22 meals n=32 at each time point, one-way Anova followed by Tuckey test, mean  $\pm$  SEM, letters a, b, c means significant differences between sampling points,

\*\*P < 0.01. \*\*\*\*P < 0.0001. M: meal

Target genes	Liver				Muscle				Abdominal fat				
	M4	M12	M22	P value	M4	M12	M22	P value	M4	M12	M22	P value	
<b>mTOR pathway</b>	<i>akt</i>	1.24 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	2.92 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	4.14 $\pm$ 0.26 <sup>c</sup>	****	1.13 $\pm$ 0.11	1.20 $\pm$ 0.11	1.39 $\pm$ 0.09	ns	1.08 $\pm$ 0.08	1.06 $\pm$ 0.07	0.92 $\pm$ 0.11	ns
	<i>mtor</i>	1.43 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	3.27 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	5.16 $\pm$ 0.56 <sup>c</sup>	****	1.07 $\pm$ 0.09	1.12 $\pm$ 0.10	1.12 $\pm$ 0.08	ns	0.91 $\pm$ 0.08	0.71 $\pm$ 0.06	0.70 $\pm$ 0.09	ns
	<i>s6kl</i>	1.40 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	3.71 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	6.34 $\pm$ 0.59 <sup>c</sup>	****	1.22 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	1.50 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup>	1.83 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	*	1.14 $\pm$ 0.09	0.86 $\pm$ 0.06	0.86 $\pm$ 0.11	ns

**Table 7** Relative expression of genes involved in global cellular stress in liver, muscle and abdominal fat of mule ducks after 4, 12 and 22 meals n=32 at each time point, one-way Anova followed by Tuckey test, mean  $\pm$  SEM, letters a, b, c means significant differences between sampling points, \*\*P < 0.01. \*\*\*\*P < 0.0001. M: meal

Target genes	Liver				Muscle				Abdominal fat				
	M4	M12	M22	P value	M4	M12	M22	P value	M4	M12	M22	P value	
<b>Amino acid deficiency</b>	<i>asns</i>	1.83 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	8.13 $\pm$ 0.97 <sup>b</sup>	13.07 $\pm$ 1.52 <sup>c</sup>	****	1.19 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	1.64 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	2.51 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	**	0.96 $\pm$ 0.21	0.69 $\pm$ 0.07	0.69 $\pm$ 0.15	ns
	<i>atf4</i>	1.39 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	4.14 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	7.87 $\pm$ 0.69 <sup>c</sup>	****	4.62 $\pm$ 1.99	7.76 $\pm$ 2.69	8.26 $\pm$ 2.56	ns	1.25 $\pm$ 0.53	0.64 $\pm$ 0.06	0.62 $\pm$ 0.10	ns
<b>Autophagy</b>	<i>atg4b</i>	1.77 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	4.43 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	6.51 $\pm$ 0.54 <sup>c</sup>	****	1.57 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	2.07 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>	2.27 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	*	1.30 $\pm$ 0.17	1.15 $\pm$ 0.10	0.94 $\pm$ 0.17	ns
	<i>atg8 / lc3</i>	3.40 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	9.97 $\pm$ 0.97 <sup>b</sup>	23.08 $\pm$ 2.10 <sup>c</sup>	****	3.75 $\pm$ 1.29	2.56 $\pm$ 0.30	3.60 $\pm$ 0.30	ns	1.43 $\pm$ 0.16	1.44 $\pm$ 0.14	1.51 $\pm$ 0.25	ns
	<i>atg9</i>	1.28 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	4.04 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	6.62 $\pm$ 0.86 <sup>c</sup>	****	2.61 $\pm$ 0.73	2.44 $\pm$ 0.28	2.49 $\pm$ 0.32	ns	2.03 $\pm$ 0.38	1.67 $\pm$ 0.29	1.06 $\pm$ 0.16	ns
	<i>sqstm1 / p62</i>	1.58 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	3.43 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	6.30 $\pm$ 0.57 <sup>c</sup>	****	1.36 $\pm$ 0.15	1.49 $\pm$ 0.12	1.56 $\pm$ 0.12	ns	1.13 $\pm$ 0.33	0.77 $\pm$ 0.08	0.80 $\pm$ 0.11	ns
<b>Cellular stress</b>	<i>lamp2a</i>	1.46 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	4.64 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	6.96 $\pm$ 0.47 <sup>c</sup>	****	1.19 $\pm$ 0.09	1.09 $\pm$ 0.09	1.19 $\pm$ 0.08	ns	1.17 $\pm$ 0.11	1.08 $\pm$ 0.08	1.06 $\pm$ 0.15	ns
	<i>cyp2e1</i>	2.10 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	9.50 $\pm$ 1.53 <sup>b</sup>	11.97 $\pm$ 2.24 <sup>b</sup>	****	1.16 $\pm$ 0.12	1.40 $\pm$ 0.16	1.44 $\pm$ 0.11	ns	1.65 $\pm$ 0.47	5.02 $\pm$ 1.29	8.43 $\pm$ 3.82	ns
	<i>hspb1</i>	1.56 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	5.35 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	9.72 $\pm$ 0.91 <sup>c</sup>	****	1.20 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	1.67 $\pm$ 0.26 <sup>ab</sup>	2.18 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	**	1.18 $\pm$ 0.12	1.30 $\pm$ 0.09	1.32 $\pm$ 0.25	ns
<b>Apoptosis</b>	<i>casp3</i>	1.99 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	5.49 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	12.01 $\pm$ 1.09 <sup>c</sup>	****	1.17 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	2.18 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	2.61 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	***	1.12 $\pm$ 0.09	0.99 $\pm$ 0.07	0.96 $\pm$ 0.17	ns
	<i>casp8</i>	1.38 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	2.93 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	5.14 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup>	****	1.17 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.57 $\pm$ 0.18 <sup>ab</sup>	2.07 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	***	1.15 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.95 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	0.81 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	*
	<i>casp9</i>	1.37 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	4.16 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	7.06 $\pm$ 0.55 <sup>c</sup>	****	1.34 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	1.96 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	2.90 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	***	3.07 $\pm$ 2.59	0.47 $\pm$ 0.05	0.35 $\pm$ 0.06	ns



## Article 2 (*EXPI microARNs*)

### **Kinetic analysis of miRNAs in overfed mule ducks: research of potential biomarkers of hepatic steatosis development**

Induite par le gavage, la stéatose hépatique est un procédé exploité pour la production de foie gras chez le canard mulard. Afin d'optimiser cette production, les producteurs recherchent des biomarqueurs non invasifs permettant de suivre l'évolution de la stéatose hépatique. Parmi les différentes molécules potentielles liées au métabolisme lipidique, notre intérêt s'est concentré sur les microARNs. Ces petits ARN non codants sont connus comme jouant un rôle essentiel dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Leur implication dans la régulation de la stéatose hépatique chez le canard mulard est encore inconnue. Dans cette étude, une analyse cinétique de microARNs exprimés dans le foie et le plasma a été réalisée sur des canards mulards mâles lors d'un gavage avec trois temps de prélèvements (après les 4<sup>ème</sup>, 12<sup>ème</sup> et 22<sup>ème</sup> repas). Avant tout, le miRNome plasmatique du canard mulard a été réalisé par séquençage à haut débit de  $n = 4$  plasmas de canards à chaque temps de prélèvement. Cette analyse a permis d'obtenir une bibliothèque intéressante de microARNs identifiés dans le plasma. Parmi eux, dix étaient différentiellement exprimés dans le plasma. L'expression de ces microARNs a ensuite été analysée par dosage TaqMan dans le plasma et dans le foie des canards mulards ( $n = 10$  et  $n = 20$  à chaque temps de prélèvement respectivement pour le plasma et le foie). Une surexpression du miR-122\_3p, un microARN dit spécifique du foie, a été observée dans le plasma ( $P = 0,03$ ) et le foie ( $P < 0,0001$ ) des canards mulards au cours du gavage. De plus, une corrélation positive a été trouvée entre le poids de foie et l'expression relative de ce microARN dans le foie. Son implication dans la synthèse du cholestérol (connue pour être induite par le gavage) en fait un biomarqueur potentiel du développement du foie gras au même titre que les miR-107 et miR-194 dont les expressions sont également corrélées au poids de foie et à l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. Avant d'être considérés comme des biomarqueurs non invasifs du développement de la stéatose hépatique, des études supplémentaires doivent être menées sur ces microARN spécifiques.

Mots clés : *stéatose hépatique, microARNs, lipogenèse, cholestérol, canard mulard*

## **Kinetic analysis of miRNAs in overfed mule ducks: research of potential biomarkers of hepatic steatosis development**

Tracy Pioche<sup>1</sup>, Marie Laval<sup>1</sup>, Fabien Skiba<sup>2</sup>, Marie-Dominique Bernadet<sup>3</sup>, William Massimino<sup>1</sup>, Marianne Houssier<sup>1</sup>, Annabelle Tavernier<sup>1</sup>, Karine Ricaud<sup>1</sup>, Stéphane Davail<sup>1</sup>, Sandrine Skiba-Cassy<sup>1</sup>, Karine Gontier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Saint-Pée-sur-Nivelle, F-64310, France

<sup>2</sup>NUTRICIA, Route de Saint-Sever, F-40280 Haut-Mauco, France

<sup>3</sup>UEPFG INRA Bordeaux-Aquitaine, (Unité Expérimentale Palmipèdes à Foie Gras), Domaine d'Artiguères 1076, route de Haut-Mauco, F-40280 Benquet, France

Corresponding author: Gontier Karine

INRA, Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Saint-Pée-sur-Nivelle, F-64310, France

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

### **Keywords:**

Hepatic steatosis, miRNAs, lipogenesis, cholesterol, mule ducks

### **ABSTRACT**

Induced by overfeeding, hepatic steatosis is a process exploited for foie gras production in mule ducks. In order to optimize this production, producers look for non-invasive biomarkers to monitor the hepatic steatosis development. Among the different potential molecules in link with the lipid metabolism: our interest focused on microRNAs. These small non-coding RNA are known to play a critical role in the posttranscriptional regulation of gene expression. Their involvement in hepatic steatosis regulation in mule duck is still unknown. In this study, a kinetic analysis of microRNAs expressed in liver and plasma was performed on male ducks during overfeeding with three sampling times (after the 4<sup>th</sup>, the 12<sup>th</sup> and the 22<sup>th</sup> meal). Firstly, a plasmatic miRNome of mule ducks was performed using high-throughput sequencing on n=4

at each sampling point. This analysis permitted to obtain an interesting library of microARNs identified in plasma. Among them, ten were differentially expressed in plasma. The expression of these microRNAs was secondly analysed by TaqMan RNA assay in plasma and livers of mule ducks (n=10 and n=20 at each sampling time respectively for plasma and liver). An overexpression of miR-122\_3p, microRNA known as specific to liver, was observed in plasma (P=0.03) and liver (P<0.0001) of mule ducks during overfeeding. Moreover, a significant positive correlation was found between liver weight and the relative expression of this miR in liver. Its involvement in cholesterol synthesis (known to be induced by overfeeding) make it a potential biomarker of foie gras development just like miR-107 and miR-194 whose expressions are also correlated with liver weight and with the expression of genes involved in cholesterol metabolism. Before considered to be useful as non-invasive biomarkers of hepatic steatosis development, further investigations must be done on these specific microRNAs.

## INTRODUCTION

Hepatic steatosis, also called “foie gras”, is the result of high lipid accumulation in liver of overfed ducks (Hermier *et al.*, 1991a). From 12 weeks of age, ducks are fed with an increasing quantity of food (from 300g to 600g) mostly composed of corn/starch and premix for a period of 11 days, twice a day. Genotype essentially used for foie gras production is mule ducks (Chartrin *et al.*, 2006a; Hermier *et al.*, 2003), a sterile hybrid resulting from the crossing between a male Muscovy (*Cairina moschata*) and a female Pekin duck (common duck, *Anas platyrhynchos*). Indeed, it benefits from a heterosis effect and shares qualities specific to each of its parents, in particular a superior ingestion capacity as well as a bigger foie gras (Guy *et al.*, 1995). Numerous studies were conducted in mechanisms involved in hepatic steatosis development in ducks in order to better understand this non-pathological and reversible state of liver (Babile *et al.*, 1998; Bénard *et al.*, 1998) to improve foie gras production by searching new strategies.

The production of foie gras is very expensive in food (10 kg of corn to produce a foie gras of 550 g in ducks). An optimal overfeeding must provide a foie gras of size and sensory and technological qualities that correspond to the expectations of the market in the shortest possible delay and with the least food possible. For this, the sector must develop new strategies to accelerate the synthesis of foie gras and follow its development. We are therefore mainly interested in two essential criteria: the liver weight and the melting rate (which corresponds to the percentage of fat lost during cooking). The objective is to identify specific biomarkers of these two parameters.

Numerous mechanisms are known to take place during the setting of hepatic steatosis. Indeed, among many others, we can cite the high activity of *de novo* lipogenesis (Auvergne *et al.*, 1995; Chartrin *et al.*, 2006b; Gabarrou *et al.*, 1996; Hermier *et al.*, 2003), the substantial fattening of peripheral tissues such as adipose tissues and muscles (Bonfont *et al.*, 2019; Chartrin *et al.*, 2006b; Gabarrou *et al.*, 1996) as the strong reuptake of circulating lipids by the liver (Tavernier *et al.*, 2017). To this, are added our last observations from a recent kinetic study that reveals the significant impact of hepatic steatosis development on cholesterol synthesis and esterification during foie gras development (Pioche *et al.*, 2019). Even more interesting, significant correlations were found between liver weight and cholesterol synthesis with the expression of Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase (*hmgcr*) as well as plasma cholesterol. Also, a significant negative correlation was observed between the melting rate and the expression of

Fatty Acid Binding Protein 4 (*fabp4*) at the end of the overfeeding (Pioche *et al.*, 2019). Studies highlighted the interesting potential of mule ducks to produce abundant free cholesterol content at the end of the overfeeding (Hermier *et al.*, 1999; Salichon *et al.*, 1994). Synthesized mainly in liver, cholesterol is essential for cell growth and viability and involved in membrane fluidity (Cazeils *et al.*, 1999; Fantini *et al.*, 2019; Solsona-Vilarrasa *et al.*, 2019) that could influence the melting rate of foie gras. Thus, regarding our results obtained in overfed mule ducks, it would be very interesting to continue these investigations to look for potential non-invasive biomarkers in link with the lipid metabolism and these two parameters (liver weight and melting rate): the microRNAs.

MicroRNAs (miRNAs or miRs) are a large class of small non-coding and double-stranded RNAs of approximately 22 nucleotides in length. They were originally identified in the nematode *Caenorhabditis elegans* in 1993. Then, 4000 miRNAs were reported in over 40 species of animals, plants and viruses (Lee *et al.*, 1993). miRNAs were demonstrated to play fundamental role in many biological processes, including animal development (Wienholds and Plasterk, 2005), cell differentiation (Ivey and Srivastava, 2010), metabolism (Krützfeldt and Stoffel, 2006), signal transduction (Inui *et al.*, 2010), cancer (Esquela-Kerscher and Slack, 2006), disease (Soifer *et al.*, 2007) and cellular stress (Su *et al.*, 2015). They are expressed endogenously and generally serve as negative post-transcriptional regulators of gene expression (Bartel, 2004). Indeed, their binding to the untranslated 3'UTR region of the target mRNA results in translation repression or mRNA degradation.

In mammals, several miRNAs involved in the regulation of cholesterol or lipid metabolism were identified, including miR-33 and miR-122. MiR-33a is shown to act in concert with its host gene *srebp-2* to target ATP-binding cassette transporter A1 gene (*abca1*) and to regulate genes involved in cholesterol and lipid metabolism (Najafi-Shoushtari *et al.*, 2010). Concerning miR-122, it is known to be the most abundant miRNA in liver (Girard *et al.*, 2008). It regulates many lipid-metabolism control genes as Acetyl-CoA carboxylase-2 (*acc2*), Fatty Acid Synthase (*fas*), Sterol Regulatory Element Binding Protein 1-c (*srebp1c*), Stearoyl-CoA Desaturase (*scd1*) and 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl CoA Reductase (*hmgcr*) (Esau *et al.*, 2006). The inhibition of miR-122 in mice revealed its role as key regulator of cholesterol and fatty acid metabolisms (Esau *et al.*, 2006). In fish, the miR-122 inhibition resulted in the decrease of cholesterol in plasma and the increase of gene expression involved in cholesterol degradation and excretion (Mennigen *et al.*, 2013). Similarly, silencing miR-122 in chimpanzees and

African green monkey reduced total plasma cholesterol (Elmén *et al.*, 2008). In human, hepatic steatosis is a pathologic disease named Non-Alcoholic Fatty liver disease (NAFLD). It has been reported that in NAFLD patient, serum level of miR-122 increased and it was correlated with the disease stage (Cermelli *et al.*, 2011). In waterfowls developing fatty livers, few data described which miRNAs mediated lipid metabolism and their mechanisms. A study on Cherry-valley ducks treated with oil added in feed during 2 weeks permitted to show the impact of miRNAs on *fas* expression (He *et al.*, 2016). More recently, an analysis of miRNAs expression profile was made in overfed Landes goose (*Anser anser*) but it reveals no impact of overfeeding on miR-122 expression (Chen *et al.*, 2017).

Therefore, the aim of the present study was firstly to define the plasmatic miRNome of mule ducks during overfeeding and then to analyse if the abundance of circulating miRNAs could reflect the level of expression of miRNAs in liver. miRNAs have the properties of an ideal biomarker: stability in plasma, unique sequence, tissue-specific expression, easy detection. Given this, it seems interesting to look among the miRNAs most differentially expressed in plasma and liver of overfed ducks, those related to lipid and particularly cholesterol metabolisms. This will allow a non-invasive and real-time monitoring of the hepatic steatosis development, which will help to optimize foie gras production. Indeed, in addition to being diagnostic tools, pathophysiologically, miRNAs can be manipulated by complementary nucleotide analogues to reduce their activity. In the long term, this could allow to indirectly control the expression of their target genes. Conversely, if their activity is interesting, then the miRNAs could be directly administered. In this sense, miRNAs are now new therapeutic approaches in the treatment of chronic diseases, whether through antagomiRs or miRNAs directly.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Ducks and experimental design***

All experimental procedures were carried out according to the ethic committee (approval No. C40-037-1) and the French National Guidelines for the care of animal for research purposes. Animals used were male mule ducks (genetic line: *Cairina moschata* Mmg × *Anas platyrhynchos* Pkl), reared in a Louisiana type building of 80 m<sup>2</sup> with 2.6 ducks/m<sup>2</sup> without outdoor access. They benefited from natural lighting and were raised on chip litter and watered by pipettes at the Experimental Station for Waterfowl Breeding (INRA Artiguères, France).

They were fed *ad libitum* with the growing diet (17.5 % Crude Protein [CP], 2 850 kcal/kg Metabolize Energy [ME]) from hatching to 8 weeks of age, then with finishing diet (15.5 % CP, 2 800 kcal/kg ME) distributed by hourly rationing (1 h per day) from 8 to 9 weeks followed by a quantitative rationing from 9 to 12 weeks in order to prepare the overfeeding (Arroyo *et al.*, 2018). At 12 weeks of age, ducks were overfed during 22 meals (2 meals a day during 11 days) composed with mash 53% MS Palma from Maisadour (Haut-Mauco, France) (Corn: 98 % and Premix: 2 %, 3 230 kcal/kg ME, with CP: 7.2 %, Fat: 3.2 %, crude cellulose: 2 %, raw ashes: 2.1 %, lysine: 0.23 %, methionine: 0.15 %, calcium: 0.12 %, phosphorus: 0.25 % and sodium: 0.1 %) and 47% of water according to the curve of feed intake presented in Figure 1 (Arroyo *et al.*, 2018). Two hours after the 4<sup>th</sup> (M4), the 12<sup>th</sup> (M12) and the 22<sup>th</sup> (M22) meals, ducks were conventionally slaughtered by electronarcosis and bleeding. This slaughtering time between the last meal and duck slaughtering was chosen according to Tavernier *et al.* (Annabelle *et al.*, 2017; Tavernier *et al.*, 2018) showing peak expressions of genes of interest for our study. Blood was taken on Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes and plasma were separated by centrifugation (3000 xG for 10 min at 4°C) and stored at -20°C (n=10 at each point time). After dissection, liver was weighed, sampled in 1,5 ml Eppendorf tubes (100 mg) for miRNA expression analysis (n=20 at each point time) frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Pasteurization tests were carried out on livers at the end of the overfeeding (M22, n=32) to estimate melting rate. 4 hours after evisceration, liver samples (60 g of the top of the large lobe) were placed into tins. After performing crimping, autoclave was preheated to 70°C, and the tins were placed inside. As soon as the autoclave was closed, the pressure was fixed to 0.8 bar. The containers were heated for 1 hour at 85°C, and then cooled for 30 min in the autoclave (pasteurize value: 170 min). Then tins were stored cold until opening (8 days later). Before opening, tins were warmed in a water bath and then livers samples were weighed without their fat.

### ***RNA isolation***

Total RNA was isolated from liver and plasma using TRIzol® LS Reagent (Invitrogen/Life Technologies, California, USA) according to manufacturer's instructions. For RNAs extracted from the liver, RNA concentrations were determined by spectrophotometry (optical density at 260 nm) using a Biotek EPOCH2 microplate reader (Take3 Plate). For RNAs extracted from plasma, RNA concentrations were determined using Qubit® microRNA Assay kit (Q32881, Applied Biosystems, ThermoFisher) and Qubit®2.0 Fluorometer according to manufacturer's

instructions. The integrity of total RNA was checked by electrophoresis (agarose gel 1 %) and ChemiDoc XRS+ (BioRad).

### ***miRNome***

Most concentrated RNA isolated from plasma (n=4 at each time point) were used for a quantitative and qualitative sequencing analysis of the small RNAs. This analysis includes control and validation of samples by capillary electrophoresis (Fragment Analyzer), construction of banks, generation of clusters and sequencing of libraries. The sequencing was done on a Hiseq (Illumina) by the method of Sequencing by Synthesis (SBS) in single read 50nt from 1ng of total RNA. This analysis was performed on the functional Genomics Institute MGX (Montpellier, France).

### ***miRNA expression analysis***

miRNAs were detected by the TaqMan<sup>®</sup> Advanced miRNA Assays (A25576, Applied Biosystems, ThermoFisher) in plasma (n=10) and in livers (n=20). 100 ng RNA (RNA isolated from plasma and liver) were used to synthesize the cDNA of all miRNAs. Poly(A) tailing, ligation, reverse transcription and miR-amp (pre-amplification of the cDNA) reactions were made according to manufacturer's instructions. The spike miR-39 (*Caenorhabditis elegans*) was used (10 pmol) in Poly(A) tailing reaction as an exogenous control for normalization as previously described (Tay *et al.*, 2017). PCR was performed in a reaction mix of 10  $\mu$ L containing 2  $\mu$ L cDNA (100 times diluted for liver and plasma cDNA), 5  $\mu$ L 2X Fast Advanced Master mix (Applied Biosystems, USA), 0.5  $\mu$ L TaqMan<sup>®</sup> Advanced miRNA Assay (20X) (Applied Biosystems, USA) and 2.5  $\mu$ L RNase free water. The sequences of the probes are listed in Table 1. qPCR were carried out on the CFX Thermal cycler (BioRad, California, USA) according to the following FRET program: initiation at 95°C for 20s for initial denaturation of the cDNA and the enzyme activation followed by 40 cycles of a 2 steps amplification program (3 sec at 95 °C for denaturation and 30 sec at 60 °C for annealing). Each PCR assay include replicates for each sample and negative controls. Relative amount of expression of the target miRNA was determined using  $\Delta\Delta$ CT method (Vandesompele *et al.*, 2002). Efficiency of PCR measured by the slope of a standard curve using serial cDNA dilutions was between 1.85 and 2.



### ***Statistical analysis***

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and analyzed by one-way ANOVA supplemented by a Tukey test for post hoc analysis after checked the normality of data with GraphPad Prism v6.01 (San Diego, United States) software. Volcano plots were carried out using BioStatFlow® v.2.9.2 INRA 2019 (Bordeaux, France) software and Pearson correlation tests were executed using GraphPad Prism v6.01 (San Diego, United States) software. Differences were considered statistically significant at  $P \leq 0.05$ .

## **RESULTS**

### ***miRNome of mule duck***

The small RNAseq on total RNA from plasma (n=4 at each time point) permitted to identify the whole of differentially expressed non coding miRNAs in plasma of overfed mule ducks as shown in Figure 2. Some of them are downregulated (represented in blue) or upregulated (in red) in volcano plots representations. Globally, the number of differentially expressed miRNAs is more important in second part of overfeeding (between M12 and M22) compare to the beginning of overfeeding period (M4 vs M12) and most are upregulated.

miR-122\_3p, miR-122\_5p and miR-221\_5p are the three miRs the most differentially expressed in plasma of overfed mule ducks according to the results of the small RNAseq (p=0.018, p=0.021 et p=0.018 for miR-122\_3p, miR-122\_5p and miR 221\_5p respectively). Seven others miRs were also observed as differentially expressed in plasma of overfed mule ducks: miR-193a\_5p, miR-215\_5p, miR-218, miR-194\_5p, miR-21\_5p, miR-130b\_3p and miR-107\_3p Table 2. Among these differentially expressed miRNAs in plasma, miR 221, miR-215\_5p, miR-218 and miR-194 seem to be more expressed in first half of overfeeding period (M4 vs M12) compared to the second part (M12 vs M22) according to the fold change values. In contrary, miR-122\_3p, mir-122\_5p, miR-193a\_5p, miR-21\_5p, miR-130b\_3p, miR-107\_3p seem to be more expressed in the second half of overfeeding compared to the first one (Table 2).

### ***qPCR TaqMan***

The expression of the ten differentially expressed miRNAs was analysed by TaqMan analysis in a larger number of plasma (Figure 3) and liver samples (Figure 4) of overfed ducks.

In plasma, the expressions of miR-122\_5p, miR-107\_3p, miR-218\_5p, miR-221\_5p and miR-193a\_5p show no significant differences during overfeeding. The others are significantly upregulated between M4 and M12 (miR-122\_3p, P=0.03; miR-130b\_3p, P=0.016; miR-194\_5p, P=0.003; miR-215\_5p, P=0.003) and then stabilized between M12 and M22. miR-21\_5p is significantly upregulated between M4 and M22 (P=0.037).

In liver, only miR-122\_5p expression shows no significant difference during overfeeding. miR-122\_3p, miR-21\_5p, miR-107\_3p, miR-130b\_3p and miR-193a\_5p are significantly upregulated during all the overfeeding period. The expressions of miR-194\_5p and miR-218\_5p significantly increase in first half of overfeeding (between M4 and M12) and then stabilize. Conversely, the expressions of miR-221\_5p and miR-215\_5p remain stable in the first half of overfeeding and significantly increase between M12 and M22.

### ***Correlations***

Liver weight and melting rate data from the previous kinetic study (Pioche *et al.*, 2019) were compared to miRNAs relative expression in plasma and in liver of overfed mule ducks according to Pearson correlation analysis (Table 3). Only miR-194\_5p and miR-107\_3p plasmatic and hepatic expressions are correlated with liver weight. Except the miR-122\_5p, all the miRNAs hepatic expressions are positively correlated with liver weight (Table 3).

Plasma miR-221\_5p expression is correlated with liver weight only at M12 (P= 0.837) and at M22 (hepatic level, P=0.604). Concerning melting rate, no significant correlations were found with plasmatic or hepatic expressions of miRNAs studied.

Total plasma cholesterol level and relative expression of genes involved in cholesterol synthesis during all the overfeeding period (from the previous kinetic study (Pioche *et al.*, 2019)) were compared to miRNAs relative expression in plasma and liver of overfed mule ducks (Table 4). Only the combined data of M4, M12 and M22 are shown as no significant results appear on the correlations performed on each sampling time.

Concerning plasma cholesterol, all hepatic miRNAs relative expressions are correlated with cholesterolemia except miR-122\_5p and miR-215\_5p. Only plasmatic miR-194\_5p relative expression is significantly correlated with total cholesterol level (P=0.571).

Concerning relative expression of cholesterol genes, only plasmatic miR-194\_5p and miR-107\_3p are correlated with *soat1* expression in liver of mule ducks. Plasmatic miR-194\_5p is also significantly correlated to *apob* liver expression (P=0.457). Many hepatic miRNAs appear related with relative expression of cholesterol genes. All hepatic miRNAs (except miR-122\_5p

and miR-193a\_5p) are positively correlated with *apob* relative expression. Fewer miRNAs seem to be involved in *soat1* expression: miR-122\_3p, miR-215\_5p, miR-218\_5p, miR-21\_5p and miR-107\_3p are correlated. Finally, only hepatic miR-122\_3p, miR-193a\_5p and miR-107\_3p appear correlated with *hmgcr* expression.

Concerning relative expression of *fabp4* (Table 5), it appears correlated with three hepatic miRNAs: miR-122\_3p, miR-107\_3p and miR-21\_5p and only one plasmatic miRNA: miR-107\_3p.

## **DISCUSSION**

Hepatic steatosis in duck leads to strong lipid accumulation in liver and miRNAs have been reported to play fundamental roles in regulation of various biological processes, including lipid and cholesterol metabolism (Aryal *et al.*, 2017). However, to date, very few microRNAs studies in palmipeds have been conducted. Considering our recent study revealing the obvious correlation between liver weight gain during development of fatty liver and cholesterol metabolism (Pioche *et al.*, 2019), the aim of the present study was firstly to define the plasmatic miRNome of mule ducks and then try to find if some circulating miRNAs could reflect the development of hepatic steatosis as potential biomarkers. This could help to optimize the production of foie gras by improving overfeeding conditions (especially reducing quantity of meals distributed and decreasing duration of overfeeding).

RNAseq analysis permitted to obtain a complete list of circulating miRNAs in plasma of overfed mule duck. The kinetic analysis during all overfeeding period (M4, M12 and M22) allowed to observe miRNAs expression differences and evolution (notably mostly upregulation) during overfeeding. Data show that overfeeding, and more particularly the massive carbohydrate intake, has a significant impact on circulating miRNAs.

In this study, 10 conserved miRNAs were differentially expressed in plasma mule ducks during overfeeding. According studies on microRNAs spectrum in different bio fluids, our ten differentially expressed miRNAs in plasma of mule duck are not part of those that are considered plasma specific or the most abundant in the plasma (Baulande *et al.*, 2014; Weber *et al.*, 2010). There is strong evidence that these miRNAs can be derived from strongly active organs during overfeeding, i.e. liver.

The level of expression of the ten miRNAs on a more important number of plasmatic and liver samples was made by qRT PCR TaqMan for verification. Some microRNAs found as

differentially expressed in plasma with small RNAseq method were not significantly expressed in plasma with the TaqMan analysis method while they are well expressed in liver. We hypothesize that these differences were due to a less rigor of TaqMan analysis compared to RNAseq. Indeed, small RNA sequencing analysis include steps of control and validation of samples by a capillary electrophoresis. In qPCR analysis, RNA degradations could more easily affect the samples.

MicroRNAs defined as differentially expressed in our overfed ducks are already known to be dysregulated in studies focused on lipid metabolism. Among them, miR-122 is the most differentially expressed in plasma. It has already been studied extensively for its implication in liver homeostasis regulating cholesterol and triglyceride metabolisms on genes crucial to lipid metabolism including *acc*, *acly*, *scd1* and *srebp2* (Esau *et al.*, 2006). These genes are known to be upregulated in ducks from the beginning and throughout the overfeeding (Hérault *et al.*, 2009; Pioche *et al.*, 2019; Tavernier *et al.*, 2017a). In the present study, miR-122\_3p is overexpressed in the liver and in the plasma of mule duck during overfeeding. Nevertheless, miR-122\_5p, contrary to the form 3p, is not significantly expressed in plasma or in liver during overfeeding. This is in accordance with the study realized in Landes goose (Chen *et al.*, 2017). This result reveals a possible non-functionality of the miR-122\_5p despite its abundance in plasma and liver of mule ducks.

In addition, miR-122 is also known to have an important role in cholesterol synthesis since it regulates several genes, including  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Méthylglutaryl Coenzyme A Synthase (*hmgcs*), HMGC reductase (*hmgcr*) and 7- Désydrocholestérol Reductase (*dhcr7*), which are involved in homeostasis between fatty acids and cholesterol biosynthetic pathways (Krützfeldt *et al.*, 2005). The inactivation of miR-122 by deletion in mice leads to an induction in plasma cholesterol and triglyceride levels and causes the appearance of key features of NAFLD phenotypes (Tsai *et al.*, 2012). Studies in humans associate an increase in cholesterol metabolism with NAFLD or NASH (Min *et al.*, 2012a) as observed in mule ducks with strong modifications of the cholesterol metabolism during hepatic steatosis development (Pioche *et al.*, 2019). In the present study, miR-122\_3p seems to be closely linked with cholesterol synthesis according to the positive correlations found between cholesterolemia and relative expression of *hmgcr*, *soat1* and *apob* in liver.

Moreover, positive correlation was found between liver weight gain during overfeeding and miR-122\_3p relative expression in liver of the mule ducks. Studies in human suggest that serum miR-122 combined with other serum miRNAs, can be used to differentiate different types of

liver damage (Laterza *et al.*, 2013). Given our results, we can suggest the use of miR-122\_3p as potential non-invasive biomarker for the development of foie gras.

miR-221\_5p a second most differentially expressed miRNAs in plasma of mule duck appears upregulated in liver at the end of overfeeding. In human, this miRNA is upregulated in adipose tissue of obese individuals (Meerson *et al.*, 2013). It is also known to be intensively induced in hepatic carcinoma case and to have roles in enhancing cell growth and inhibiting apoptosis (Rong *et al.*, 2013). Consequently, an increase in apoptotic cell death may be caused by the inactivation of miR-221. Regarding to our results, it is suggested that overexpression of miR-221\_5p in liver of mule ducks could allow hepatocytes to fight against apoptosis known to be involved at the end of the overfeeding and more globally against cell stress mechanisms caused by hepatic steatosis development (Pioche *et al.*, 2019; Rémignon *et al.*, 2018). Because of the lack of significant evolution in plasma, miR-221 could hardly be used as a biomarker of cellular stress involvement during foie gras development.

Finally, the global Pearson correlations analyzes show more extensive involvement of two miRNAs: miR-107\_3p and miR-194\_5p. They have the advantage to be positively correlated with liver weight, cholesterol metabolism and *fabp4* relative expression, which would make them good potential biomarkers. miR-107 and miR-194 are known to be upregulated in obese patients and would constitute non-invasive biomarkers for earlier detection of NASH in human (Hayes and Chayama, 2016).

## **CONCLUSION**

To summarize, this study permitted to establish the entire miRNome of overfed mule duck based on sequencing from small RNA libraries. This study completes our investigations of potential circulating biomarkers of hepatic steatosis development in mule ducks linked to cholesterol metabolism. Many potential biomarkers emerge from this study. Among the panel of differentially expressed miRNAs in plasma of ducks, miRNA-122, but also -107 and -194, seem to be potential candidates considering their involvement in lipid and cholesterol metabolisms. Further analyses must be performed to establish to what extent those miRNAs can be useful in foie gras production. The development of robust non-invasive biomarker of liver weight could be of great interest to monitor in real-time the development of hepatic steatosis and could help to improve foie gras production.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the “Conseil Départemental des Landes (CD40)” and Nutricia from the cooperative group Maïsador for financing this work. We also thank the technical staff of INRA Artiguères for rearing ducks. We are grateful to MGX platform for performing RNA-seq, clustering and sequencing for plasmatic miRNome analysis (MGX, Functional Genomics Institute, Montpellier, France) and Julien Bobe and Simon Roques for their help with data processing and bioinformatics.

## REFERENCES

Annabelle, T., Karine, R., Marie-Dominique, B., Stéphane, D., and Karine, G. (2017). Kinetics of expression of genes involved in glucose metabolism after the last meal in overfed mule ducks. *Mol. Cell. Biochem.* *430*, 127–137.

Arroyo, J., Molette, C., Lavigne, F., Margetyal, C., Amador, O., Dubois, J.-P., and Fortun-Lamothe, L. (2018). Effects of dietary protein level during rearing period and age at overfeeding on magret and foie gras quality in male mule ducks. *Anim. Sci. J.* *89*, 570–578.

Aryal, B., Singh, A.K., Rotllan, N., Price, N., and Fernández-Hernando, C. (2017). MicroRNAs and lipid metabolism: *Curr. Opin. Lipidol.* *28*, 273–280.

Auvergne, A., Rémignon, H., Babilé, R., and Baudonnet-Lenfant, C. (1995). Evolution corporelle au cours du gavage chez le canard de Barbarie. *Arch. Für Geflügelkd.* *59*, 234–240.

Babile, R., Auvergne, A., Dubois, J.P., Benard, G., and Manse, H. (1998). Reversibilité de la stéatose hépatique chez l’oie. 3èmes Journées de la recherche sur les Palmipèdes à Foie “gras. Bordeaux, France (October).

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* *116*, 281–297.

Baulande, S., Criqui, A., and Duthieuw, M. (2014). Les microARN circulants, une nouvelle classe de biomarqueurs pour la médecine. *médecine/sciences* *30*, 289–296.

Bénard, G., Bénard, P., Prehn, D., Bengone, T., Jouglar, J.Y., and Durand, S. (1998). Démonstration de la réversibilité de la stéatose hépatique obtenue par gavage de canards mulards. *Etude Réalis. Sur* *3*, 49–52.

Bonnefont, C.M.D., Molette, C., Lavigne, F., Manse, H., Bravo, C., Lo, B., Rémignon, H., Arroyo, J., and Bouillier-Oudot, M. (2019). Evolution of liver fattening and foie gras technological yield during the overfeeding period in mule duck. *Poult. Sci.*

- Cazeils, J.L., Bouillier-Oudot, M., Auvergne, A., Candau, M., and Babile, R. (1999). Lipid composition of hepatocyte plasma membranes from geese overfed with corn. *Lipids* 34, 937–942.
- Cermelli, S., Ruggieri, A., Marrero, J.A., Ioannou, G.N., and Beretta, L. (2011). Circulating MicroRNAs in Patients with Chronic Hepatitis C and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS ONE* 6, e23937.
- Chartrin, P., Bernadet, M.-D., Guy, G., Mourot, J., Hocquette, J.-F., Rideau, N., Duclos, M.J., and Baéza, E. (2006a). Does overfeeding enhance genotype effects on liver ability for lipogenesis and lipid secretion in ducks? *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 145, 390–396.
- Chartrin, P., Météau, K., Juin, H., Bernadet, M.D., Guy, G., Larzul, C., Remignon, H., Mourot, J., Duclos, M.J., and Baeza, E. (2006b). Effects of Intramuscular Fat Levels on Sensory Characteristics of Duck Breast Meat. *Poult. Sci.* 85, 914–922.
- Chen, F., Zhang, H., Li, J., Tian, Y., Xu, J., Chen, L., Wei, J., Zhao, N., Yang, X., Zhang, W., et al. (2017). Identification of differentially expressed miRNAs in the fatty liver of Landes goose (*Anser anser*). *Sci. Rep.* 7, 1–9.
- Elmén, J., Lindow, M., Schütz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjärn, M., Hansen, H.F., Berger, U., et al. (2008). LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452, 896–899.
- Esau, C., Davis, S., Murray, S.F., Yu, X.X., Pandey, S.K., Pear, M., Watts, L., Booten, S.L., Graham, M., McKay, R., et al. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 3, 87–98.
- Esquela-Kerscher, A., and Slack, F.J. (2006). Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 259–269.
- Fantini, J., Epand, R.M., and Barrantes, F.J. (2019). Cholesterol-Recognition Motifs in Membrane Proteins. In *Direct Mechanisms in Cholesterol Modulation of Protein Function*, A. Rosenhouse-Dantsker, and A.N. Bukiya, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 3–25.
- Gabarrou, J., Salichon, M., Guy, G., and Blum, J. (1996). Hybrid ducks overfed with boiled corn develop an acute hepatic steatosis with decreased choline and polyunsaturated fatty acid level in phospholipids. *Reprod. Nutr. Dev.* 36, 473–484.
- Girard, M., Jacquemin, E., Munnich, A., Lyonnet, S., and Henrion-Caude, A. (2008). miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J. Hepatol.* 48, 648–656.
- Guy, G., Rousselot-Pailley, D., and Gourichon, D. (1995). Comparaison des performances de l’oie, du canard mulard et du canard de Barbarie soumis au gavage. In *Annales de Zootechnie*, pp. 297–305.
- Hayes, C.N., and Chayama, K. (2016). MicroRNAs as Biomarkers for Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 280.

- He, J., Wang, W., Lu, L., Tian, Y., Niu, D., Ren, J., Dong, L., Sun, S., Zhao, Y., Chen, L., et al. (2016). Analysis of miRNAs and their target genes associated with lipid metabolism in duck liver. *Sci. Rep.* *6*, 1–9.
- Hérault, F., Saez, G., Robert, E., Mohammad, A.A., Davail, S., Chartrin, P., Baéza, E., and Diot, C. (2009). Liver gene expression in relation to hepatic steatosis and lipid secretion in two duck species. *Anim. Genet.* *41*, 12–20.
- Hermier, D., Saadoun, A., Salichon, M.-R., Sellier, N., Rousselot-Paillet, D., and Chapman, M.J. (1991). Plasma lipoproteins and liver lipids in two breeds of geese with different susceptibility to hepatic steatosis: Changes induced by development and force-feeding. *Lipids* *26*, 331–339.
- Hermier, D., Salichon, M.R., Guy, G., and Peresson, R. (1999). Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in the goose. *Poult. Sci.* *78*, 1398–1406.
- Hermier, D., Guy, G., Guillaumin, S., Davail, S., André, J.-M., and Hoo-Paris, R. (2003). Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *135*, 663–675.
- Inui, M., Martello, G., and Piccolo, S. (2010). MicroRNA control of signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 252–263.
- Ivey, K.N., and Srivastava, D. (2010). MicroRNAs as Regulators of Differentiation and Cell Fate Decisions. *Cell Stem Cell* *7*, 36–41.
- Krützfeldt, J., and Stoffel, M. (2006). MicroRNAs: A new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metab.* *4*, 9–12.
- Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs.’ *Nature* *438*, 685–689.
- Laterza, O.F., Scott, M.G., Garrett-Engele, P.W., Korenblat, K.M., and Lockwood, C.M. (2013). Circulating miR-122 as a potential biomarker of liver disease. *Biomark. Med.* *7*, 205–210.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843–854.
- Meerson, A., Traurig, M., Ossowski, V., Fleming, J.M., Mullins, M., and Baier, L.J. (2013). Human adipose microRNA-221 is upregulated in obesity and affects fat metabolism downstream of leptin and TNF- $\alpha$ . *Diabetologia* *56*, 1971–1979.
- Mennigen, J.A., Skiba-Cassy, S., and Panserat, S. (2013). Ontogenetic expression of metabolic genes and microRNAs in rainbow trout alevins during the transition from the endogenous to the exogenous feeding period. *J. Exp. Biol.* *216*, 1597–1608.
- Min, H.-K., Kapoor, A., Fuchs, M., Mirshahi, F., Zhou, H., Maher, J., Kellum, J., Warnick, R., Contos, M.J., and Sanyal, A.J. (2012). Increased Hepatic Synthesis and Dysregulation of Cholesterol Metabolism Is Associated with the Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* *15*, 665–674.



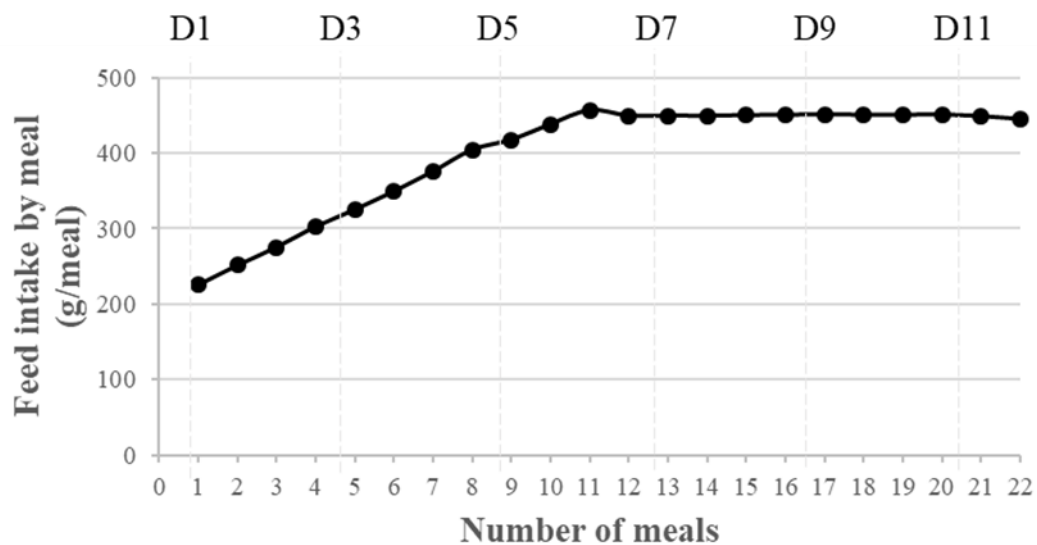
- Najafi-Shoushtari, S.H., Kristo, F., Li, Y., Shioda, T., Cohen, D.E., Gerszten, R.E., and Näär, A.M. (2010). MicroRNA-33 and the SREBP Host Genes Cooperate to Control Cholesterol Homeostasis. *Science* 328, 1566–1569.
- Pioche, T., Skiba, F., Bernadet, M.-D., Seiliez, I., Massimino, W., Houssier, M., Tavernier, A., Ricaud, K., Davail, S., Skiba-Cassy, S., et al. (2019). Kinetic study of the expression of genes related to hepatic steatosis, global intermediate metabolism and cellular stress during overfeeding in mule ducks. *BioRxiv* 690156.
- Rémignon, H., Yahia, R.B.H., Marty-Gasset, N., and Wilkesman, J. (2018). Apoptosis during the development of the hepatic steatosis in force-fed ducks and cooking yield implications. *Poult. Sci.* 97, 2211–2217.
- Rong, M., Chen, G., and Dang, Y. (2013). Increased MiR-221 expression in hepatocellular carcinoma tissues and its role in enhancing cell growth and inhibiting apoptosis in vitro. *BMC Cancer* 13, 21.
- Salichon, M.R., Guy, G., Rousselot, D., and Blum, J.C. (1994). Composition des 3 types de foie gras: oie, canard mulard et canard de Barbarie. In *Annales de Zootechnie*, pp. 213–220.
- Soifer, H.S., Rossi, J.J., and Sætrom, P. (2007). MicroRNAs in Disease and Potential Therapeutic Applications. *Mol. Ther.* 15, 2070–2079.
- Solsona-Vilarrasa, E., Fucho, R., Torres, S., Nuñez, S., Nuño-Lámbarri, N., Enrich, C., García-Ruiz, C., and Fernández-Checa, J.C. (2019). Cholesterol enrichment in liver mitochondria impairs oxidative phosphorylation and disrupts the assembly of respiratory supercomplexes. *Redox Biol.* 24, 101214.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., and Yu, Q. (2015). MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget* 6, 8474–8490.
- Tavernier, A., Davail, S., Ricaud, K., Bernadet, M.-D., and Gontier, K. (2017). Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks. *Mol. Cell. Biochem.* 424, 147–161.
- Tavernier, A., Karine, R., Marie-Dominique, B., Karine, G., and Stéphane, D. (2018). Pre- and post-prandial expression of genes involved in lipid metabolism at the end of the overfeeding period of mule ducks. *Mol. Cell. Biochem.* 438, 111–121.
- Tay, J.W., James, I., Hughes, Q.W., Tiao, J.Y., and Baker, R.I. (2017). Identification of reference miRNAs in plasma useful for the study of oestrogen-responsive miRNAs associated with acquired Protein S deficiency in pregnancy. *BMC Res. Notes* 10.
- Tsai, W.-C., Hsu, S.-D., Hsu, C.-S., Lai, T.-C., Chen, S.-J., Shen, R., Huang, Y., Chen, H.-C., Lee, C.-H., Tsai, T.-F., et al. (2012). MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J. Clin. Invest.* 122, 2884–2897.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, research0034.1.

Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., How Huang, K., Jen Lee, M., Galas, D.J., and Wang, K. (2010). The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin. Chem.* 56, 1733–1741.

Wienholds, E., and Plasterk, R.H.A. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.* 579, 5911–5922.

## FIGURES AND TABLES

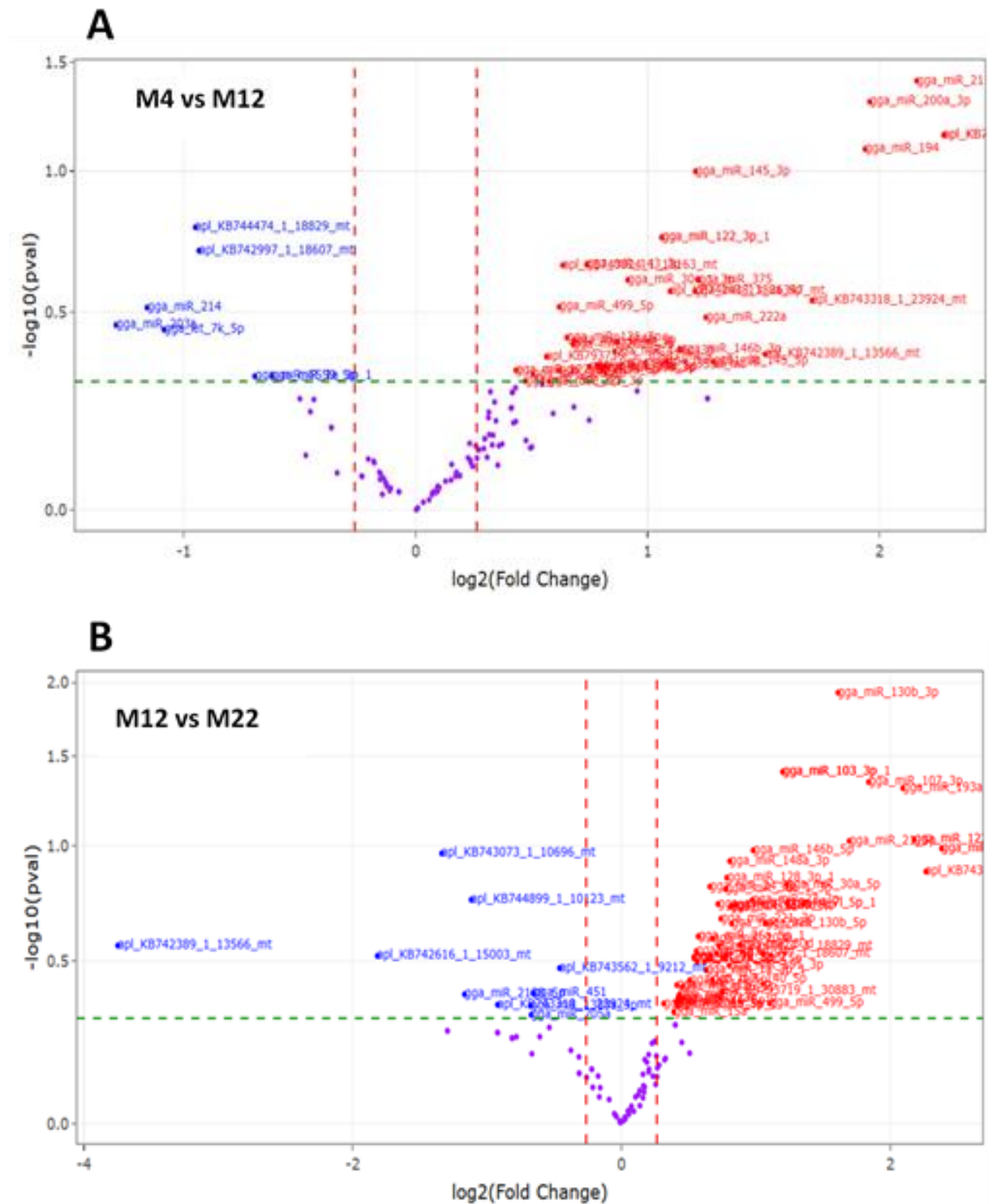
**Figure 1.** Curve of feed intake of mule ducks during overfeeding (D: day).



**Table 1.** Sequences of probes used in TaqMan Advanced miRNA assays in plasma and liver of overfed mule ducks.

<b>miRNAs</b>	<b>Assay ID</b>	<b>Probe sequences</b>
<i>miR-122_3p</i>	477874_mir	AACGCCATTATCACACTAAATA
<i>miR-122_5p</i>	480653_mir	TTTAGTGTGATAATGGCGTTTGA
<i>miR-221_5p</i>	481659_mir	ACCTGGCATAACAATGTAGATTTCTGT
<i>miR-193a_5p</i>	477954_mir	TGGGTCTTTGCGGGCGAGATGA
<i>miR-215_5p</i>	478516_mir	ATGACCTATGAATTGACAGAC
<i>miR-218_5p</i>	477977_mir	TTGTGCTTGATCTAACCATGT
<i>miR-194_5p</i>	477956_mir	TGTAACAGCAACTCCATGTGGA
<i>miR-21_5p</i>	477975_mir	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA
<i>miR-130b_3p</i>	477840_mir	CAGTGCAATGATGAAAGGGCAT
<i>miR-107_3p</i>	478254_mir	AGCAGCATTGTACAGGGCTATCA
<i>miR-39_3p</i>	478253_mir	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG

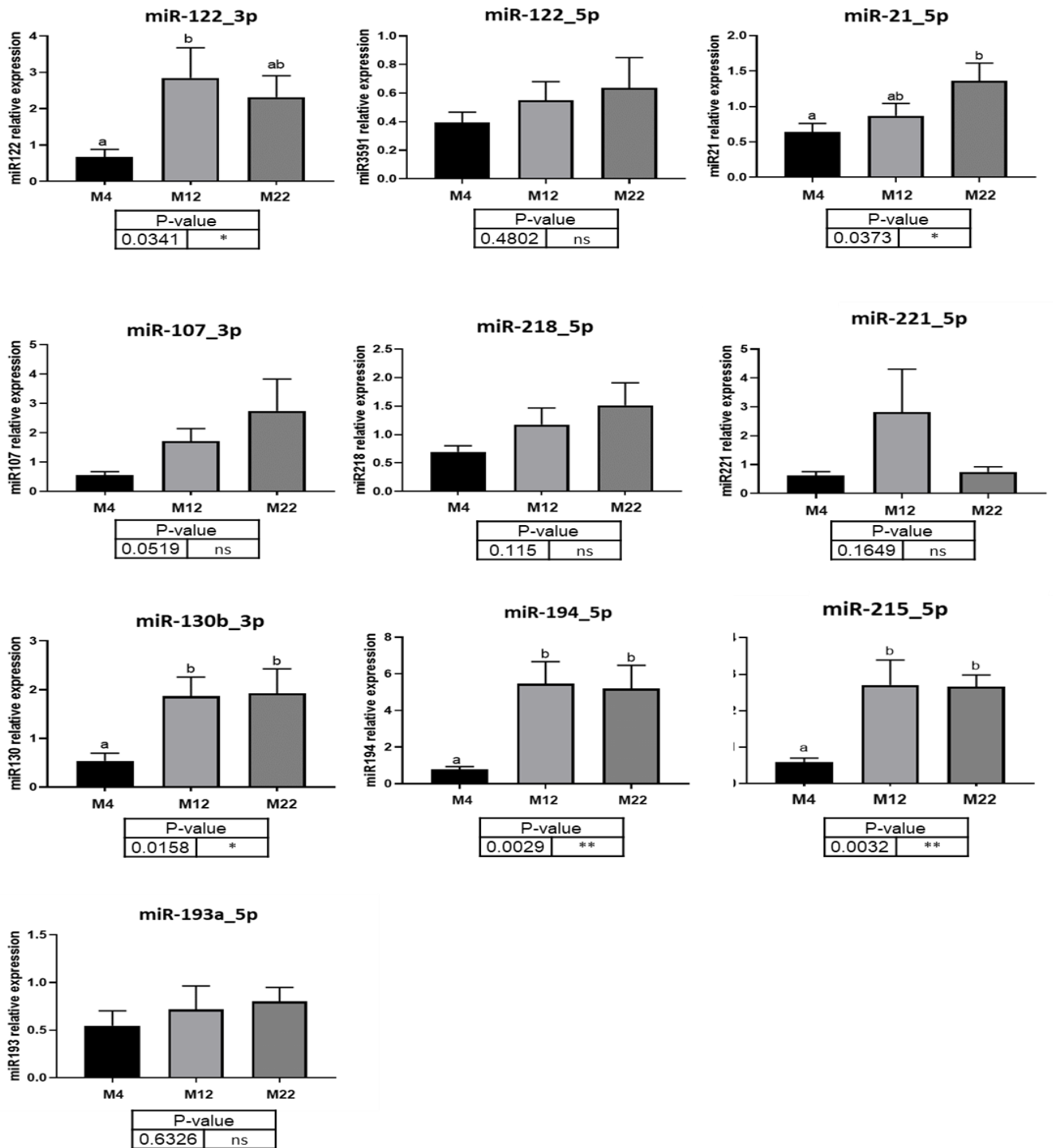
**Figure 2.** Volcano plots of plasmatic miRNome of overfed mule ducks. Blue and red plots represent differentially expressed miRNAs (downregulated or upregulated for blue and red plots respectively) and purple blots represent miRNAs with no significant difference. (A) Volcano plots of miRNAs between Meal (M) 4 and M12 (B) Volcano plots of miRNAs between M12 and M22; n=4 for each time point.



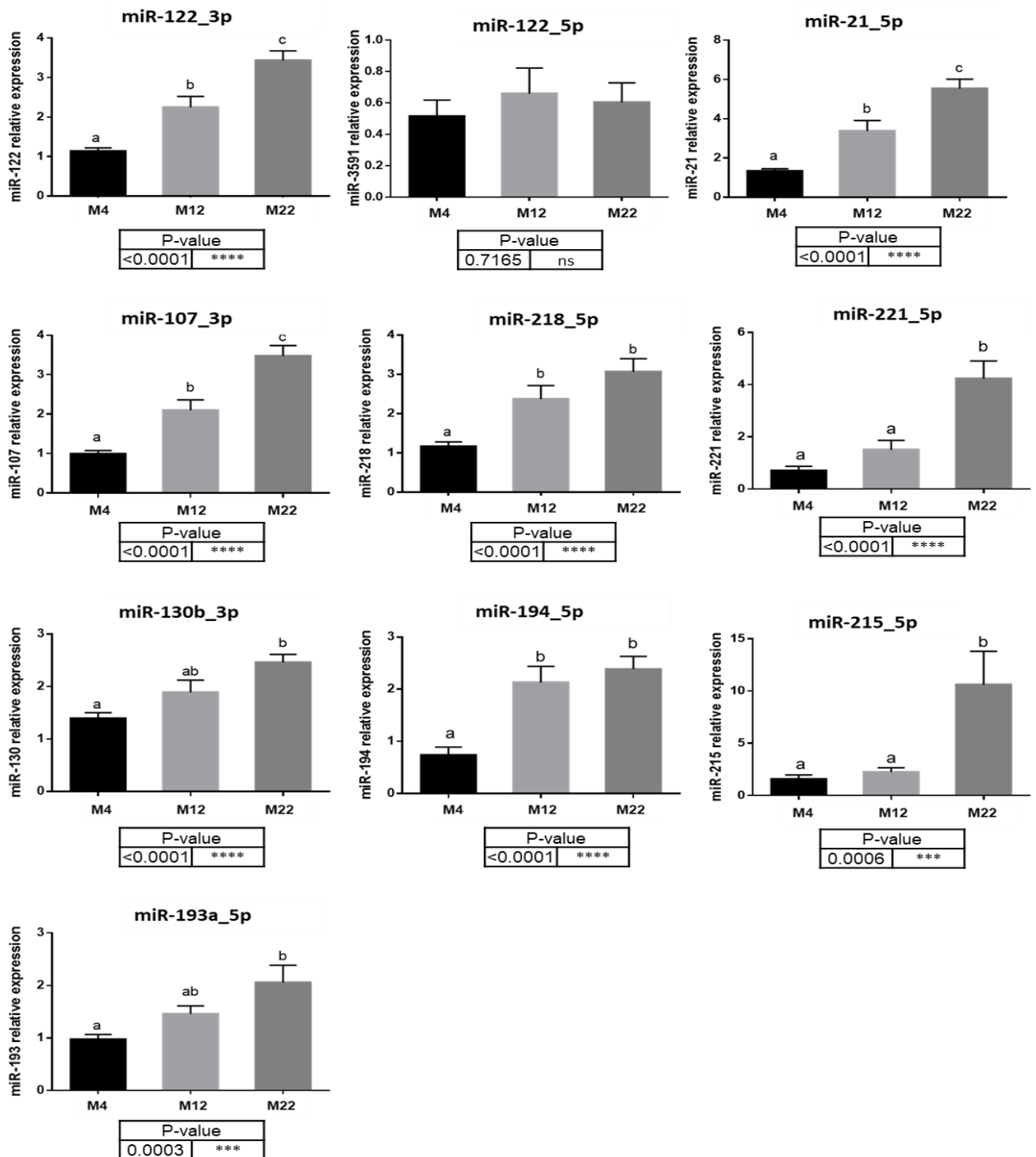
**Table 2.** The 10 miRNAs identified the most differentially expressed in plasma of overfed mule ducks.

miRBase	One-way Anova	M4 vs M12		M12 vs M22	
	p value	fold_Change	p-value	fold_Change	p-value
gga_miR_122_3p	0.018	2.087	0.179	4.526	0.093
gga_miR_221	0.018	3.885	0.050	1.244	0.447
gga_miR_122_5p	0.021	1.350	0.467	5.218	0.103
gga_miR_193a_5p	0.023	1.535	0.467	4.269	0.049
gga_miR_215_5p	0.025	4.474	0.039	1.033	0.929
gga_miR_218	0.030	1.605	0.583	0.445	0.416
gga_miR_194	0.035	3.832	0.081	1.153	0.715
gga_miR_21_5p	0.039	1.266	0.566	3.237	0.095
gga_miR_130b_3p	0.039	1.068	0.892	3.055	0.012
gga_miR_107_3p	0.039	1.278	0.801	3.578	0.045

**Figure 3.** miRNAs expressions analysed by qPCR TaqMan in **plasma** of overfed mule ducks. n=10 at each time point; one-way Anova followed by Tukey test, mean  $\pm$  SEM, letters a, b, c means significant differences between sampling points, ns: not significant, \*P < 0.1; \*\*P < 0.01, M: meal.



**Figure 4.** miRNAs expressions analysed by qPCR TaqMan in **liver** of overfed mule ducks. n=20 at each time point; one-way Anova followed by Tukey test, mean  $\pm$  SEM, letters a, b, c means significant differences between sampling points, ns: not significant, \*P < 0.1; \*\*P < 0.01, M: meal.



**Table 3.** Pearson correlation coefficients between relative expression of plasmatic or hepatic miRNAs and liver weight or melting rate of mule ducks during overfeeding. n=10 and n=20 at each time point for plasmatic miRNAs and hepatic miRNAs respectively, ns: not significant, \*P<0.1; \*\*P < 0.01; \*\*\*\*P < 0.0001; \* data's from previous kinetic study (Pioche *et al.*, 2019).

	Liver weight <sup>*</sup>				Melting rate <sup>*</sup>			
	M4	M12	M22	M4/12/22	M4	M12	M22	M4/12/22
<b>Plasmatic miRNAs</b>								
<i>miR-122_3p</i>	0.300 <sup>ns</sup>	0.769 <sup>ns</sup>	0.318 <sup>ns</sup>	0.045 <sup>ns</sup>	-	-	-0.748 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-122_5p</i>	0.315 <sup>ns</sup>	0.316 <sup>ns</sup>	0.621 <sup>ns</sup>	-0.103 <sup>ns</sup>	-	-	-0.298 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-221_5p</i>	-0.501 <sup>ns</sup>	0.837 <sup>*</sup>	-0.262 <sup>ns</sup>	-0.018 <sup>ns</sup>	-	-	0.122 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-193a_5p</i>	0.317 <sup>ns</sup>	0.135 <sup>ns</sup>	-0.240 <sup>ns</sup>	-0.128 <sup>ns</sup>	-	-	-0.692 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-215_5p</i>	0.309 <sup>ns</sup>	-0.294 <sup>ns</sup>	0.279 <sup>ns</sup>	-0.038 <sup>ns</sup>	-	-	-0.075 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-218_5p</i>	0.128 <sup>ns</sup>	-0.286 <sup>ns</sup>	0.122 <sup>ns</sup>	0.006 <sup>ns</sup>	-	-	-0.730 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-194_5p</i>	0.083 <sup>ns</sup>	-0.474 <sup>ns</sup>	0.119 <sup>ns</sup>	0.588 <sup>**</sup>	-	-	0.287 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-21_5p</i>	0.301 <sup>ns</sup>	-0.225 <sup>ns</sup>	0.660 <sup>ns</sup>	-0.084 <sup>ns</sup>	-	-	-0.355 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-130b_3p</i>	0.227 <sup>ns</sup>	0.227 <sup>ns</sup>	0.234 <sup>ns</sup>	0.077 <sup>ns</sup>	-	-	-0.152 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-107_3p</i>	0.168 <sup>ns</sup>	0.150 <sup>ns</sup>	0.767 <sup>ns</sup>	0.480 <sup>*</sup>	-	-	-0.317 <sup>ns</sup>	-
<b>Hepatic miRNAs</b>								
<i>miR-122_3p</i>	-0.105 <sup>ns</sup>	-0.304 <sup>ns</sup>	0.153 <sup>ns</sup>	0.638 <sup>****</sup>	-	-	0.446 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-122_5p</i>	0.169 <sup>ns</sup>	-0.679 <sup>*</sup>	-0.122 <sup>ns</sup>	0.006 <sup>ns</sup>	-	-	0.029 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-221_5p</i>	-0.3746 <sup>ns</sup>	-0.002 <sup>ns</sup>	0.604 <sup>*</sup>	0.690 <sup>****</sup>	-	-	0.454 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-193a_5p</i>	-0.198 <sup>ns</sup>	0.044 <sup>ns</sup>	0.226 <sup>ns</sup>	0.454 <sup>**</sup>	-	-	0.098 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-215_5p</i>	-0.194 <sup>ns</sup>	-0.237 <sup>ns</sup>	-0.105 <sup>ns</sup>	0.384 <sup>****</sup>	-	-	0.268 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-218_5p</i>	-0.231 <sup>ns</sup>	-0.411 <sup>ns</sup>	-0.152 <sup>ns</sup>	0.392 <sup>**</sup>	-	-	-0.213 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-194_5p</i>	-0.437 <sup>ns</sup>	-0.155 <sup>ns</sup>	-0.127 <sup>ns</sup>	0.421 <sup>*</sup>	-	-	-0.526 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-21_5p</i>	-0.161 <sup>ns</sup>	-0.232 <sup>ns</sup>	0.347 <sup>ns</sup>	0.638 <sup>****</sup>	-	-	0.218 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-130b_3p</i>	-0.094 <sup>ns</sup>	-0.222 <sup>ns</sup>	0.197 <sup>ns</sup>	0.431 <sup>**</sup>	-	-	0.237 <sup>ns</sup>	-
<i>miR-107_3p</i>	0.037 <sup>ns</sup>	-0.245 <sup>ns</sup>	0.497 <sup>ns</sup>	0.721 <sup>****</sup>	-	-	0.446 <sup>ns</sup>	-



**Table 4.** Pearson correlation coefficients between relative expression of plasmatic or hepatic miRNAs and cholesterolemia or hepatic relative expression of genes involved in cholesterol. Only the combined data of M4, M12 and M22 are shown as no significant results appear on the correlations performed on each sampling time. n=10 and n=20 for plasmatic miRNAs and hepatic miRNAs respectively, ns: not significant, \*P<0.1; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; \*\*\*\*P < 0.0001; \* data's from previous kinetic study (Pioche *et al.*, 2019).

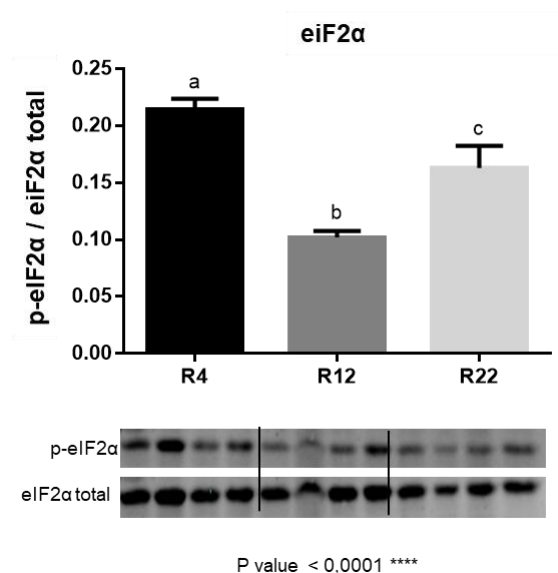
	Cholesterolemia <sup>x</sup>	Cholesterol genes		
		<i>hmgcr</i> <sup>x</sup>	<i>soat1</i> <sup>x</sup>	<i>apob</i> <sup>x</sup>
<b>Plasmatic miRNAs</b>				
<i>miR-122_3p</i>	-0.022 <sup>ns</sup>	-0.104 <sup>ns</sup>	-0.030 <sup>ns</sup>	-0.064 <sup>ns</sup>
<i>miR-122_5p</i>	-0.180 <sup>ns</sup>	-0.186 <sup>ns</sup>	-0.143 <sup>ns</sup>	-0.156 <sup>ns</sup>
<i>miR-221_5p</i>	0.093 <sup>ns</sup>	0.018 <sup>ns</sup>	-0.016 <sup>ns</sup>	-0.088 <sup>ns</sup>
<i>miR-193a_5p</i>	-0.200 <sup>ns</sup>	-0.202 <sup>ns</sup>	-0.179 <sup>ns</sup>	-0.181 <sup>ns</sup>
<i>miR-215_5p</i>	-0.101 <sup>ns</sup>	-0.134 <sup>ns</sup>	-0.089 <sup>ns</sup>	-0.102 <sup>ns</sup>
<i>miR-218_5p</i>	-0.070 <sup>ns</sup>	-0.108 <sup>ns</sup>	-0.020 <sup>ns</sup>	-0.002 <sup>ns</sup>
<i>miR-194_5p</i>	0.571 <sup>**</sup>	0.300 <sup>ns</sup>	0.573 <sup>**</sup>	0.457 <sup>*</sup>
<i>miR-21_5p</i>	-0.155 <sup>ns</sup>	-0.160 <sup>ns</sup>	-0.121 <sup>ns</sup>	-0.130 <sup>ns</sup>
<i>miR-130b_3p</i>	0.033 <sup>ns</sup>	-0.153 <sup>ns</sup>	0.038 <sup>ns</sup>	-0.020 <sup>ns</sup>
<i>miR-107_3p</i>	0.245 <sup>ns</sup>	0.014 <sup>ns</sup>	0.482 <sup>*</sup>	0.358 <sup>ns</sup>
<b>Hepatic miRNAs</b>				
<i>miR-122_3p</i>	0.554 <sup>****</sup>	0.349 <sup>*</sup>	0.429 <sup>**</sup>	0.430 <sup>**</sup>
<i>miR-122_5p</i>	0.138 <sup>ns</sup>	-0.167 <sup>ns</sup>	-0.087 <sup>ns</sup>	0.022 <sup>ns</sup>
<i>miR-221_5p</i>	0.541 <sup>***</sup>	0.134 <sup>ns</sup>	0.291 <sup>ns</sup>	0.342 <sup>*</sup>
<i>miR-193a_5p</i>	0.479 <sup>***</sup>	0.291 <sup>*</sup>	0.183 <sup>ns</sup>	0.195 <sup>ns</sup>
<i>miR-215_5p</i>	0.214 <sup>ns</sup>	0.245 <sup>ns</sup>	0.322 <sup>*</sup>	0.375 <sup>*</sup>
<i>miR-218_5p</i>	0.389 <sup>**</sup>	0.243 <sup>ns</sup>	0.330 <sup>**</sup>	0.310 <sup>*</sup>
<i>miR-194_5p</i>	0.549 <sup>***</sup>	0.155 <sup>ns</sup>	0.196 <sup>ns</sup>	0.203 <sup>ns</sup>
<i>miR-21_5p</i>	0.535 <sup>***</sup>	0.278 <sup>ns</sup>	0.391 <sup>**</sup>	0.412 <sup>**</sup>
<i>miR-130b_3p</i>	0.354 <sup>*</sup>	0.258 <sup>ns</sup>	0.289 <sup>ns</sup>	0.302 <sup>*</sup>
<i>miR-107_3p</i>	0.585 <sup>****</sup>	0.398 <sup>**</sup>	0.435 <sup>**</sup>	0.450 <sup>**</sup>

**Table 5.** Pearson correlation coefficients between relative expression of plasmatic or hepatic miRNAs and hepatic relative expression *fabp4*. n=10 and n=20 for plasmatic miRNAs and hepatic miRNAs respectively, ns: not significant, \*P<0.1; \*\*P < 0.01; \* data's from previous kinetic study (Pioche *et al.*, 2019).

	<i>fabp4</i> <sup>*</sup>
<b>Plasmatic miRNAs</b>	
<i>miR-122_3p</i>	-0.004 <sup>ns</sup>
<i>miR-122_5p</i>	-0.078 <sup>ns</sup>
<i>miR-221_5p</i>	-0.203 <sup>ns</sup>
<i>miR-193a_5p</i>	-0.114 <sup>ns</sup>
<i>miR-215_5p</i>	-0.053 <sup>ns</sup>
<i>miR-218_5p</i>	-0.012 <sup>ns</sup>
<i>miR-194_5p</i>	0.332 <sup>ns</sup>
<i>miR-21_5p</i>	-0.064 <sup>ns</sup>
<i>miR-130b_3p</i>	0.036 <sup>ns</sup>
<i>miR-107_3p</i>	0.495 <sup>*</sup>
<b>Hepatic miRNAs</b>	
<i>miR-122_3p</i>	0.418 <sup>**</sup>
<i>miR-122_5p</i>	-0.061 <sup>ns</sup>
<i>miR-221_5p</i>	0.326 <sup>ns</sup>
<i>miR-193a_5p</i>	0.237 <sup>ns</sup>
<i>miR-215_5p</i>	0.218 <sup>ns</sup>
<i>miR-218_5p</i>	0.293 <sup>ns</sup>
<i>miR-194_5p</i>	0.209 <sup>ns</sup>
<i>miR-21_5p</i>	0.425 <sup>**</sup>
<i>miR-130b_3p</i>	0.219 <sup>ns</sup>
<i>miR-107_3p</i>	0.440 <sup>**</sup>

## ✚ Résultats complémentaires non publiés

Dans le cadre de notre étude *EXPI* nous nous sommes intéressés à la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 (eukaryotic initiation factor 2 alpha - activating transcription factor 4) qui joue un rôle clé dans la réponse à des stress cellulaires tels que la carence en acides aminés ou le stress oxydant (Bruhat *et al.*, 2015; Walrand *et al.*, 2008). Les analyses Western blot de la forme phosphorylée de la protéine eIF2 $\alpha$  dans les hépatocytes (n=3 à chaque temps de prélèvement) montrent qu'il y a une diminution significative de sa quantité en milieu de gavage (entre R4 et R12) suivie d'une augmentation significative en fin de gavage (entre R12 et R22) mais moindre qu'à R4 ( $p < 0,0001$ ). Par ailleurs l'analyse d'expression des gènes *atf4* et *asn* impliqués également dans la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 montrent une augmentation significative au cours du gavage ( $p < 0,0001$  pour chaque gène respectivement). Globalement les résultats semblent indiquer que le développement de la stéatose hépatique s'accompagne d'une activation de la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 en seconde partie de gavage. Malheureusement des données avant gavage sont manquantes pour interpréter avec certitude cette évolution durant le gavage.



Blots représentatifs de la phosphorylation de la protéine eIF2 $\alpha$  chez les canards mulards après 4, 12 et 22 repas. Les graphiques montrent le rapport entre la forme phosphorylée et la forme totale de la protéine utilisée comme témoin de charge. n = 3 à chaque temps de prélèvement ; one-way Anova suivi d'un test Tukey, moyenne  $\pm$  SEM; les lettres a, b, c signifient qu'il y a des différences significatives entre les points de prélèvement; \*\*\*\* P < 0,0001. R : repas.

## Expérimentation 2

### Objectif du travail

L'étude précédente (*EXPI cinétique*) a permis une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques déclenchés par le gavage et impliqués dans le développement de la stéatose hépatique chez le canard mulard. Elle a notamment permis de mettre en avant l'impact de cette stéatose hépatique sur la voie de signalisation de l'insuline/mTOR ainsi que sur l'activation de mécanismes de protection cellulaire qui semblent permettre aux hépatocytes, majoritairement en fin de gavage, de gérer au mieux l'énorme surcharge en amidon engendrée par le gavage, tout en maintenant le foie dans un état de stéatose non pathologique.

Ainsi, dans le but de poursuivre ces investigations, une étude a été réalisée en se focalisant sur l'un des facteurs observés préalablement comme impacté par le développement de la stéatose hépatique : l'autophagie. Cette fonction intracellulaire permet la dégradation de contenus cytoplasmiques endommagés ou nuisibles à la cellule afin de fournir de nouveaux substrats et de l'énergie à celle-ci. Elle implique le lysosome et est généralement activée dans des conditions de carence ou de privation en nutriments, contribuant ainsi fortement à l'homéostasie cellulaire. Une inhibition de l'autophagie a été déduite de l'expérimentation précédente mais non démontrée de façon formelle. C'est pour cela que cette nouvelle expérimentation a été mise en place afin de mesurer le flux autophagique dans les hépatocytes des canards mulards comparé à des canards non gavés (rationnés) afin de postuler de façon définitive sur l'état d'inhibition de l'autophagie. Cette expérimentation à caractère novateur et exploratoire a nécessité l'emploi d'une drogue inhibitrice de l'activité autophagique testée *in vivo* et n'a donc été réalisée que sur peu d'individus en tout début de gavage.

Par ailleurs, l'intérêt s'est également porté sur la voie de signalisation de l'insuline/mTOR. En effet, selon les résultats de l'*EXPI cinétique*, le gavage semble induire la phosphorylation de protéines clés de cette voie (AKT et S6) ainsi que l'expression des gènes correspondants dans les hépatocytes des canards mulards gavés. Il a donc semblé pertinent d'évaluer le rôle de cette voie de signalisation au début du développement de la stéatose hépatique chez les canards mulard en utilisant la rapamycine, un inhibiteur de mTOR, et d'étudier la phosphorylation de Akt et S6 dans les cellules hépatiques à court terme par une étude cinétique postprandiale.

Ainsi, cette double expérimentation a permis compléter les recherches précédemment menées sur les mécanismes mis en place par les hépatocytes du canard mulard afin de faire face au gavage. L'objectif étant de mieux comprendre les mécanismes précoces du développement du foie gras et plus particulièrement l'autophagie et la voie de signalisation mTOR afin d'obtenir des informations utiles pour l'optimisation de la production de foie gras.

L'expérimentation a fait l'objet d'un article (en préparation) :

**Article 3:**

**Autophagic mechanisms and involvement of mTOR pathways in the first steps of hepatic steatosis development in mule ducks**

Tracy Pioche, Fabien Skiba, Marie-Dominique Bernadet, Iban Seiliez, William Massimino, Marianne Houssier, Annabelle Tavernier, Karine Ricaud, Sandra Biasutti, Stéphane Davail, Sandrine Skiba-Cassy, Karine Gontier

### ✚ Article 3 (*EXP2 chloroquine et rapamycine*)

#### **Autophagic mechanisms and involvement of mTOR pathways in the first steps of hepatic steatosis development in mule ducks**

Induite par le gavage, la stéatose hépatique est un procédé exploité pour la production de foie gras chez le canard mulard. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués et générés lors du développement de la stéatose hépatique chez les canards gavés, une double expérimentation a été mise en place. La première consistait en l'étude du processus autophagique dans le foie en cherchant si l'expression de gènes clés de l'autophagie était affectée par l'alimentation (gavage *versus* rationnement). Pour cela, la chloroquine, un inhibiteur de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome pendant le processus autophagique a été utilisé. La seconde expérimentation a permis d'interpréter les mécanismes d'action de l'insuline sur le développement de la stéatose hépatique *via* l'activation de la voie de signalisation TOR à l'aide d'un inhibiteur : la rapamycine. Ces études ont été réalisées au tout début du développement du foie gras chez le canard mulard mâle au quatrième repas de gavage. Dans la première expérimentation, des canards gavés (n = 3) et rationnés (n = 3) ont reçu soit une injection de chloroquine, soit une injection de sérum physiologique afin d'analyser le flux autophagique dans les hépatocytes. Les résultats de l'analyse de la protéine LC3-II (P = 0,0042) et la surexpression d'*atg8* (P = 0,1143) ont permis de conclure à l'inhibition de l'autophagie dès le début du développement de la stéatose hépatique. Les autres analyses ont montré qu'il n'y a ni induction de stress cellulaire, ni impact de la voie de signalisation TOR à cette étape du développement de la stéatose hépatique. Dans la deuxième expérimentation, des canards mulards mâles gavés ont reçu une injection de rapamycine (groupe traité, n = 48) ou de DMSO (groupe témoin, n = 48), 2 heures avant le quatrième repas. Des canards de chaque groupe (n=12) ont été abattus avant, 30 min et 2 h après le quatrième repas. Cette cinétique a permis de mettre en évidence le rétrocontrôle négatif de S6K1 sur les éléments précoces de la voie de l'insuline tel que Akt.

Mots clés : *stéatose hépatique, autophagie, voie de signalisation mTOR, stress cellulaire, canard mulard*

## **Autophagic mechanisms and involvement of mTOR pathways in the first steps of hepatic steatosis development in mule ducks**

Tracy Pioche<sup>1</sup>, Fabien Skiba<sup>2</sup>, Marie-Dominique Bernadet<sup>3</sup>, Iban Seiliez<sup>1</sup>, William Massimino<sup>1</sup>, Marianne Houssier<sup>1</sup>, Annabelle Tavernier<sup>1</sup>, Karine Ricaud<sup>1</sup>, Sandra Biasutti<sup>1</sup>  
Stéphane Davail<sup>1</sup>, Sandrine Skiba-Cassy<sup>1</sup>, Karine Gontier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Saint-Pée-sur-Nivelle, F-64310, France

<sup>2</sup>NUTRICIA, Route de Saint-Sever, F-40280 Haut-Mauco, France

<sup>3</sup>UEPFG INRA Bordeaux-Aquitaine, (Unité Expérimentale Palmipèdes à Foie Gras), Domaine d'Artiguères 1076, route de Haut-Mauco, F-40280 Benquet, France

Corresponding author: Gontier Karine

INRA, Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Saint-Pée-sur-Nivelle, F-64310, France

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

### **Keywords:**

Hepatic steatosis, autophagy, mTOR cellular pathway, cellular stress, mule ducks

### **ABSTRACT**

Induced by overfeeding, hepatic steatosis is a process exploited for “foie gras” production in mule ducks. To better understand the mechanisms involved and generated during the development of hepatic steatosis in overfed ducks, we set up a double experiment. The first one studied the autophagic process in liver by looking if the expression of key genes of autophagy was affected by feeding (overfeeding versus rationing) and by using an inhibitor of the fusion between the autophagosome and the lysosome during the autophagic process: chloroquine. The second one allowed to interpreting the mechanisms of action of insulin on the development of hepatic steatosis *via* the activation of the TOR signalling pathway using an inhibitor: rapamycin. These studies were performed at early step of foie gras development, in male mule ducks at the

fourth meal of overfeeding. In the first experiment, overfed (n=6) and rationed (n=6) ducks received either chloroquine injection for treated ones (n=3) or physiological serum injection for controls (n=3) to analyse the autophagic flux in hepatocytes. Results of LC3-II protein analysis (P=0.0042) and upregulation of *atg8* (P=0.1143) permitted to conclude in the inhibition of autophagy in the early stages of development of fatty liver. Global analysis show that there is neither induction of cellular stress, nor impact on TOR signalling pathway at this step of hepatic steatosis development. In the second experiment, male ducks, overfed during three meals, received an injection of rapamycin (treated group, n=48) or DMSO (control group, n=48), 2 hours before de fourth meal. Twelve individuals of each group were slaughtered before, 30 min and 2 h after the fourth meal. This kinetic permit to highlight a negative feedback of S6K1 on Akt.



## INTRODUCTION

Hepatic steatosis is a process that spontaneously occurs in some birds as a consequence of energy storage before migration (Pilo and George, 1983). It is induced by overfeeding (Hermier et al., 1991) and exploited for the “foie gras” production (Hermier et al., 2003) mostly in mule ducks (Chartrin et al., 2006; Hermier et al., 2003). Indeed, this sterile hybrid resulting from the crossing between a male Muscovy duck (*Cairina moschata*) and a female Pekin duck (common duck, *Anas platyrhynchos*), benefits from a heterosis effect and shares qualities specific to each of its parents, in particular a superior ingestion capacity as well as a bigger “foie gras” (Guy et al., 1995).

Many studies have investigated the different mechanisms involved in the establishment of hepatic steatosis in mule ducks (Annabelle *et al.*, 2017; Baeza *et al.*, 2013; Pioche *et al.*, 2019; Tavernier *et al.*, 2018a) Among these, one of the most important mechanism is the high activity of *de novo* lipogenesis, taking place mostly in liver in mule ducks, during the overfeeding period (Auvergne *et al.*, 1995; Chartrin *et al.*, 2006; Gabarrou *et al.*, 1996; Hermier *et al.*, 2003). In fact, in birds, the liver is the main site of *de novo* lipogenesis (Leveille *et al.*, 1975). Fatty acid synthesis depends on the availability of dietary carbohydrate precursors. During overfeeding, it is strongly stimulated because corn, distributed for 11 days (twice a day) is rich in starch and the amount of corn distributed per meal is high (from 300 g at the beginning of overfeeding to 600-700 g at the end). Taking into account the respective contents of starch (about 70%) and lipids (about 4%) of corn and the capacity of conversion of linoleic acid and glucose to neutral lipids by the liver (Saez *et al.*, 2008), the triglycerides stored in the liver from dietary carbohydrates can be estimated at 90%. This strong unbalanced diet leads to the obtaining of livers that weigh more than 550 g, approximately 8 times its normal weight (Hermier *et al.*, 2003).

A previous kinetic study of global intermediate metabolism and cellular stress mechanisms from the beginning to the end of the overfeeding period permitted to highlight others factors impacted by the development of hepatic steatosis in mule ducks (Pioche *et al.*, 2019).

The first factor was autophagy, the cellular stress pathway activated under conditions of nutrient deficiency or deprivation that contributes to maintain cellular homeostasis (Mizushima and Komatsu, 2011). Indeed, autophagy is an intracellular function conserved in eukaryotes that

delivers cytoplasmic substrates to lysosome for degradation *via* a double membrane autophagosome to provide nutrients and energy to the cell (Bento *et al.*, 2016).

In overfed mule ducks, a significant upregulation of the expression of key autophagy-related genes, known to be associated with the intensity of autophagy activity (*atg8* and *sqstm1*), was observed in our previous study (Pioche *et al.*, 2019). This was in contradiction with the concomitant increase of cytochrome P450 2E1 (*cyp2e1*), a mediator of the upregulation of oxidative stress-suppressed autophagy, suggesting that autophagy could be suppressed during hepatic steatosis development and thus, leading to lipid accumulation in hepatocytes (Wu *et al.*, 2010). Although our hypothesis was a possible inhibition of autophagy in hepatocytes during overfeeding (as observed in NASH patients (Lavallard and Gual, 2014)), it was necessary to confirm this hypothesis with an autophagic flux analysis. For this, we conducted a study on a small number of individuals (only 3 per group) to test the *in vivo* administration of a pharmacological drug (an antimalarial drug: chloroquine) in order to block autophagy in liver ducks. Few studies address the feasibility of measuring autophagic flux *in vivo* by pharmacological injection. It seems also interesting to observe, with this first explorative experiment, the possible mechanisms of protection of hepatic cells put in place to deal with the strong accumulation of lipids in hepatocytes during the development of hepatic steatosis in mule ducks without apparent lipotoxicity.

Our interest also focuses on the insulin / mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. The TOR signalling pathway is involved in many mechanisms: inhibition of autophagy (and therefore of lipophagy), inhibition of proteolysis, activation of protein synthesis and lipogenesis. It is therefore probably strongly implicated in the development of hepatic steatosis in mule ducks favoring the accumulation of lipids in the liver but also the maintenance of the integrity of the membranes, probably decisive in the melting rate of foie gras during cooking. Under the action of the anabolic hormone insulin, this pathway stimulates glycolysis, gluconeogenesis and lipogenesis promoting the synthesis and the storage of carbohydrates and lipids in the liver of ducks (Barthel and Schmoll, 2003; Gontier *et al.*, 2013). This pathway has also the ability to stimulate protein synthesis and inhibits the mechanisms of cell degradation (as autophagy) *via* Akt protein phosphorylation for the activation of the mTOR pathway (Haar *et al.*, 2007). We demonstrated, in previous study, that, during all the overfeeding, phosphorylation of Akt and S6 increased concomitantly with the significant increase of *akt*, *mtor* and *s6k1* expression in hepatocytes of mule ducks (Pioche *et al.*, 2019). It seems therefore relevant to evaluate the role of this signalling pathway in the beginning of the development of

hepatic steatosis in mule ducks by using rapamycin, a mTOR inhibitor, and study the Akt and S6 phosphorylation in hepatic cells in a short term by a kinetic study.

Therefore, this present study completes the investigations previously conducted on mechanisms put in place by mule ducks' hepatocytes to cope with the overfeeding diet. The aim is to better understand the early mechanisms put in place by hepatic cells in the first step of fatty liver development and more particularly on autophagy, mTOR signalling pathway and cellular stress process by protein and gene expression analysis.

This will provide useful information on the first mechanisms underlying the development of hepatic steatosis in mule ducks and help to optimize it.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Animals and experimental procedures*

All experimental procedures were carried out according to the ethic committee (approval No. C40-037-1) and the French National Guidelines for the care of animal for research purposes. Animals used for the two experimentations were male mule ducks (genetic line: *Cairina moschata* Mmg × *Anas platyrhynchos* Pkl) (n=108), reared in a Louisiana type building of 80 m<sup>2</sup> with 2.6 ducks/m<sup>2</sup> without outdoor access. They benefited from natural lighting and were raised on chip litter and watered by pipettes at the Experimental Station for Waterfowl Breeding (INRA Artiguères, France). They were fed *ad libitum* with the growing diet (17.5 % Crude Protein [CP], 2 850 kcal/kg Metabolize Energy [ME]) from hatching to the age of 8 weeks then with finishing diet (15.5 % CP, 2 800 kcal/kg ME) distributed by hourly rationing (1 h per day) from 8 to 12 weeks to prepare the overfeeding (Arroyo et al., 2018).

### *Autophagic flux and cellular stress study*

For this experiment, twelve ducks of 12 weeks of age were separated into two groups: a *chloroquine treated group* and a *control group*. In each batch: 6 ducks were overfed and 6 ducks were rationed during 4 meals. Two hours after the fourth meal, overfed and rationed ducks received an intraperitoneal injection (500µl/Kg) of chloroquine (50 mg/Kg, treated group, n=3) or NaCl 0.9% (control group, n=3). All ducks were conventionally slaughtered by electronarcosis and bleeding eight hours after the 4<sup>th</sup> meal (six hours after the injections).

*mTOR signalling pathway study.* For this experiment, 96 ducks of 12 weeks of age were overfed only during two days (i.e. 4 meals). They were separated into two groups: a *rapamycin treated group* (to block the postprandial activation of the TOR signalling pathway) and a *control group*. Two hours before the fourth meal (M4), all ducks received an intraperitoneal injection (500µl/Kg) of rapamycin (pharmacological TOR inhibitor, 0.5 mg/kg, treated group, n=48) or dimethyl sulfoxide (DMSO, control group, n=48). Then, for a kinetic analysis, ducks were slaughtered by electronarcosis and bleeding at three sampling times: before M4 (t=0) (n=12), 30 min after M4 (t=30 min) (n=12) and 2 hours after M4 (t=2h) (n=12). The times of kinetic were chosen to see the early activity of mTOR pathway on overfeeding diet.

The overfed diet used for the two experiments was composed with mash 53% MS Palma from Maïsadour (Haut-Mauco, France) (Corn: 98 % and Premix: 2 %, 3 230 kcal/kg ME, with CP: 7.2 %, Fat: 3.2 %, crude cellulose: 2 %, raw ashes: 2.1 %, lysine: 0.23 %, methionine: 0.15 %, calcium: 0.12 %, phosphorus: 0.25 % and sodium: 0.1 %) and 47% of water. The rationed food for ducks of experiment 1 is the same use from 8 to 12 weeks.

Blood was taken for the two experiments and plasma were separated by centrifugation (3000 xG for 10 min at 4°C) and stored at -20°C. After dissection, livers were weighed, sampled in 1,5 ml eppendorf tubes (100 mg) for gene expression analysis. 100 mg were also sampled for protein analysis. All the samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

### ***Biochemical assays***

Plasma glucose (GLU), triglyceride (TG) and total cholesterol (CHO) levels were quantified by colorimetric enzymatic methods using kits provided by BioMérieux (Marcy-l'Etoile, France) according to the manufacturer's recommendations.

### ***Electron microscopy***

Liver biopsy were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) and post-fixed in 1% osmium tetroxide in phosphate buffer. After ethanol dehydration and embedding in epoxy resin, ultrathin sections were stained with uranylless and lead citrate. Observations were performed on a Hitachi H7650 (80kV) transmission electron microscope.

### ***Protein extraction and Western Blot analyses***

For the autophagic flux analysis, LC3-II levels were measured as described previously in Belghit *et al.* (2014) using the following antibodies: anti-LC3b (#3868) and anti-TUBB (#2146)

from Cell Signalling Technology. For the other proteins: AMPK, S6, Akt and 4EBP1, levels were measured using the following antibodies: anti-phospho-AMPK (Thr 172, #2531), anti-AMPK (#2532), anti-phospho-S6 (Ser 235/236, #4856), anti-S6 (#2217), anti-phospho 4EB1 (Thr37/46, #2855), anti-4EBP1 (#9644), anti-phospho-Akt (Ser 473, #4060), anti-Akt (#9272) from Cell Signalling Technology (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France).

Frozen livers (100 mg) were crushed with Precellys Cryolys (Bertin Technologies, 3000 xG, 2 cycles/10 sec, break/15 sec) in 1 mL of lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, pH 7.4), 100 mM sodium fluoride, 4 mM sodium pyrophosphate, 2 mM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.5% IGEPAL® CA-630 (Sigma) and a protease inhibitor cocktail (Sigma). Homogenates were centrifuged (12000 xG, 4°C/15 min.). The supernatants were recovered and centrifuged (12000 xG, 4°C/15 min). Protein concentrations were determined by Bradford assay using BSA as standard. Lysates (10 µg of total protein for Akt and S6) were subjected to SDS-PAGE and western blotting using the appropriate rabbit antibody. All antibodies successfully cross-reacted with mule duck proteins. Membranes were washed and incubated with an IRDye Infrared secondary antibody (Li-COR Biosciences, Lincoln, USA). Bands were visualized by infrared fluorescence and quantified by densitometry using the Odyssey Imaging System (Li-COR Biosciences).

Carbonylated proteins were analysed using the OxyBlot™ protein oxidation detection kit (#S7150, USA) according to manufacturer's instructions.

### ***Ribonucleic acid isolation and reverse transcription***

#### *RNA extraction*

Total RNA was isolated from frozen tissue according to the Ribozol method (VWR Life Science). Total RNA concentrations were determined by spectrophotometry (optical density at 260 nm) using a Biotek EPOCH2 microplate reader (Take3 Plate) and normalized at 500 ng/µL. The integrity of total RNA was checked by electrophoresis (agarose gel 1 %).

#### *Reverse transcription*

After a DNase treatment using the Quanta DNase kit (Quanta Biosciences, Gaithersburg, United States), cDNA was obtained Iscript Reverse Transcription Supermix for RTqPCR (Bio-Rad, USA) according to manufacturer's instructions on 3 µg of total RNA. 100 pg/µL of luciferase (Promega, Wisconsin, United States), an exogenous RNA not present in duck, was added to each sample to allow normalization of the data as a reference gene as previously described

(Desvignes et al., 2011; Marandel et al., 2013). The reaction was carried out on CFX384 (Biorad, USA) according to this program: 25 °C/5 min, 46 °C/20 min, 95 °C/1 min

#### ***Determination of mRNA levels using real-time PCR***

Gene expressions levels were determined by qPCR from 2 µL cDNA (diluted 80 fold), target gene primers (10 µM), SYBr Green FastMix (Quantabio, USA) and RNase free water for a total volume of 15 µL. qPCR were carried out according to the following program: initiation at 95°C/10 s followed by 45 amplification cycles (60°C/15 s) on the CFX384. All the primer sequences are presented in Table 1. The genes *fas* and *acly* used for this study were designed by Tavernier *et al.* (Tavernier et al., 2017, 2018b). For the other genes involved in cellular stress, the primers were designed using Ensembl (EMBL-EBI, United Kingdom), Multalin (INRA, Toulouse, France) and Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Rozen et al.) software's and customised by Eurogentec (Liège, Belgium).

#### ***Gene expression analysis***

For the analysis of all data, the exogenous Luciferase RNA (Promega, Wisconsin, United States) were used as reference gene for normalization as previously described (Desvignes et al., 2011; Marandel et al., 2013). The relative amount of expression of the target genes was determined by the  $\Delta\Delta CT$  method (Vandesompele et al., 2002). The efficiency of PCR, as measured by the slope of a standard curve using serial cDNA dilutions, was between 1.85 and 2.

#### ***Statistical analysis***

Results were analyzed by two-ways or one-way ANOVA supplemented by a Tukey test after checked the normality of data. When ANOVA was not applicable, student test (t test) with Welch correction was made. Protein and gene expression analysis were executed using GraphPad Prism v6.01 (San Diego, United States) software. Differences were considered statistically significant at  $P \leq 0.05$ .

## **RESULTS**

### ***First experiment. Autophagic flux and cellular stress study.***

#### *Checking of the induction of hepatic steatosis in hepatocytes of 2 days overfed ducks*

The liver weight of overfed mule ducks is significantly more important than rationed ducks ( $P < 0.0001$ ). Indeed, the mean liver weight is 183.5 g ( $\pm 16.45$ ) against 75,8 g ( $\pm 3,4$ ) for overfed and rationed duck respectively (Figure 1). Analysis of plasma parameters showed no significant difference in glycaemia and cholesterolemia, but a significant effect of the diet on plasmatic triglycerides levels is observed. Indeed, triglyceridaemia of overfed ducks is significantly higher than rationed ducks ( $P = 0,0024$ ) (Figure 2). As concerned gene expression analysis, despite no significant differences observed in *acly* expression, *fas* is significantly more expressed in liver of overfed mule ducks compared to rationed (Figure 3). Moreover, as expected, electron microscopy shows lipid droplets in fatty livers of overfed ducks compared to rationed (Figure 4).

#### *Autophagic flux analysis*

We tested the ability of chloroquine to block autophagy in hepatocytes of mule ducks *in vivo*. For this purpose, an analysis by western blot of the well-established autophagy marker LC3-II in hepatocytes of ducks treated or not with chloroquine was made. As shown in Figure 5, the level of LC3-II/ $\beta$ -tubulin significantly increase in hepatocytes of chloroquine treated ducks compared to control ducks whether they are overfed or rationed ( $P = 0.0118$ ).

#### *Impact of overfeeding on autophagy in hepatocytes*

In two days overfed ducks, the quantity of LC3-II protein is significantly lower in hepatocytes of overfed ducks compared to rationed ( $P = 0.0042$ ) as observed in Figure 5. No significant differences on the level expression of the autophagy-related genes *atg8*, *atg4b* and *sqstm1* were observed in overfed mule ducks compared to rationed ones ( $P = 0.1143$ ,  $P = 0.2101$ ,  $P = 0.6$  for *atg8*, *atg4b* and *sqstm1* respectively) (Figure 6).

#### *Cellular and oxidative stress*

For these investigations, protein analysis was made only in liver of control ducks. The measure of carbonylated proteins did not show any significant differences between overfed and rationed ducks ( $P = 0.3557$ ) (Figure 7).

### *mTOR / Amino acids pathways*

Concerning mTOR signalling pathway, there is no significant differences observed in 4EBP1 or S6 levels proteins between overfed and rationed ducks (P=0.6110 and P=0.103 for 4EBP1 and S6 respectively) (Figure 8). It is the same for Ampk level proteins which is not significantly different between overfed and rationed ducks (P=0.2789) (Figure 8).

The analysis of phosphorylation of eIF2 $\alpha$  protein and gene expression of *asn* and *atf4* in hepatocytes showed no significant differences between overfed and rationed ducks (P=0.3538, P=0.8701 and P=0.8628 for eIF2 $\alpha$ , *asn* and *atf4* respectively) (Figure 9).

### ***Second experiment. mTOR signalling pathway study***

#### *Rapamycin effect on the mTOR pathway in hepatocytes of 2 days overfed ducks*

The analysis of plasma parameters showed a significant effect of rapamycin treatment on glycaemia, which is lower in treated ducks compared to control ducks 30 min (P=0,0008) and 2 h after the meal (P<0,0001). Glycaemia in control and treated ducks does not differ before meal, but it decreases significantly in treated duck between before meal and 30 min (P=0,006) or 2 h after the meal (P=0,01) (Figure 10). Cholesterolemia significantly increases after the meal in control ducks (P=0.01 between before meal and 30 min after meal and P=0.005 between before meal and 2h after meal). This increase does not appear in chloroquine treated ducks. For triglyceridaemia, an increase is observed in control and treated groups between before and 2 h after the meal (control group: P=0,0017 between before meal and 2h after meal; treated group: significant increase between 30 min and 2h, P=0,022 and between before meal and 2h after, P=0,0003).

The analysis of S6 showed a significant effect of the rapamycin treatment. The level of S6 phosphorylation is significantly lower in hepatocytes of treated ducks compared to the control group at each sampling points (P=0.0019) (Figure 11).

Concerning the protein Akt, the phosphorylation level analysis showed significant differences between rapamycin treated ducks and control ducks. The level of Akt phosphorylation is significantly induced in treated group 30 minutes and 2 hours after the 4<sup>th</sup> overfeeding meal while in control group, the level of Akt remains basal (P=0.0010) (Figure 11).



### *mTor implication in hepatic steatosis development of 2 days overfed ducks*

No effect of rapamycin treatment or of the time was observed in *fas* and *acly* expression in hepatocytes of mule ducks (P=0.3981 and P=0.9581 for treatment and time respectively for *fas* and P=0.5019 and P=0,232 for *acly*) (Figure 12). Rapamycin treatment has no significant impact on LC3-II protein level as shown in figure 12. Nevertheless, a time effect was observed on treated group, LC3-II protein level significantly decreasing between T 0 and T 2 hours after the 4<sup>th</sup> meal.

## **DISCUSSION**

In order to optimize the production of “foie gras”, it is necessary to understand the mechanisms underlying its development. The important lipid accumulation in liver that occurs in hepatic steatosis development conduced generally to a non-pathological state (Babile *et al.*, 1998; Bénard *et al.*, 1998). If we can assume that overfeeding is a stress inducer by the composition of its diet, it would be interesting to know when the implementation of cell protection mechanisms, known to be activated during hepatic steatosis development, takes place in the liver (Awde *et al.*, 2014; Pioche *et al.*, 2019; Theron *et al.*, 2011). Therefore, the objective of this double experiment was, on the one hand, to understand the mechanisms of action of insulin on the development of hepatic steatosis *via* the activation of the mTOR signalling pathway, using an inhibitor of this route: rapamycin. This allowed us to observe the consequences of the blocking of the mTOR signalling pathway on lipid metabolism. On the other hand, it was to study the autophagic flux and observe if overfeeding could affect the expression of key genes of autophagy. Indeed, under the action of insulin, the mTOR signalling pathway is activated. This activation could cause an inhibition of the autophagy. For this, the impact of the overfeeding on cellular stress and on the involvement of mTOR pathway in early step of foie gras development was studied (i.e. after only 2 days of overfeeding or 4 meals).

### ***Autophagic flux and cellular stress study***

Liver weight gain of overfed mule ducks in only two days of overfeeding was expected compared to rationed mule ducks (Bonfont *et al.*, 2019; Pioche *et al.*, 2019). From the fourth meal, as demonstrated (Tavernier *et al.*, 2017), plasma triglyceride levels of overfed ducks are significantly higher than rationed, reflecting the lipid export resulting from the strong lipid hepatic synthesis. The color and the visual appearance of the livers (results not shown) were

those of fatty livers, unlike livers of the rationed ones. The electron microscopy allows highlighting the presence of structures observed in fatty liver (lipid droplets) that confirms the development of steatosis. The accumulation of lipids in the cytoplasm of the hepatocytes through more or less voluminous lipid droplets shows the establishment of steatosis. We cannot talk about macrovacuolar steatosis (large intracytoplasmic vacuoles pushing back the nucleus on the periphery) but rather of microvacuolar steatosis (vacuoles of small size, leaving the nucleus in central position). In addition, the overexpression of *fas*, known to be involved in *de novo* lipogenesis during overfeeding and leading to the development of hepatic steatosis in mule ducks (François *et al.*, 2014; Saadoun and Leclercq, 1987; Tavernier *et al.*, 2017)) confirms the induction of fatty liver in overfed ducks with only four overfeeding meals.

In order to study the autophagic flux in conditions of overfeeding in mule ducks, a lysosomotropic agent: chloroquine, was used. This pharmacological drug accumulates in acidic compartments, increases pH by neutralizing protons and inhibits autophagosome fusion with lysosomes. During autophagy, LC3 protein is converted from a nonlipidated cytosolic form (LC3-I) to a phosphatidylethanolamineconjugated form (LC3-II) on the autophagosomal membrane (Klionsky *et al.*, 2016). Consequently, LC3-II is also degraded during the late stage of autophagy. It is now well accepted that the exposure of cells to lysosomal inhibitors, protease inhibitors or agent that block fusion of autophagosome with lysosomes, leads to LC3-II accumulation (Klionsky *et al.*, 2016). Thus, the significant high level of LC3-II observed in hepatocytes of chloroquine treated ducks indicates firstly, that this drug is useful in mule ducks. Secondly, we can say that hepatocytes of chloroquine treated ducks displayed a loss of autophagic function. This exploratory study validated the autophagy blocking *in vivo* by injecting chloroquine in mule ducks. It would be now interesting to see the effect of this blocking over a longer period to observe its involvement in cellular and metabolic homeostasis, taking care not to cause harm to the health of the animal.

Although mule ducks received only four overfeeding meals (enough to induce hepatic steatosis), autophagy activity seems inhibited by this early hepatic steatosis establishment. This is suggested by the quantity of LC3-II protein significantly lower in hepatocytes of overfed ducks compared to rationed. This inhibition of autophagy explains the upregulation of the autophagy-related genes (*atg8*, *atg9*, *Sqstm1* and *atg4b*) observed in previous kinetic experiment during all the overfeeding period (Pioche *et al.*, 2019). Indeed, ATG8 (LC3) and ATG9 are two proteins known to be associated with the number of autophagosomes formed in

yeast (Zhuang *et al.*, 2017). *Sqstm1* (p62), is an autophagy receptor that links ubiquitinated proteins to LC3; and *atg4b*, which hydrolyses the bond between *atg8* and phosphatidylethanolamine (PE), making it a specific marker for this organelle (Codogno and Meijer, 2005). This upregulation is in accordance with the observations in the present study, and this would be ensured by the eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway activation that has the ability to trigger the transcriptional expression of genes involved in amino acid metabolism or resistance to oxidative stress (Barbosa-Tessmann, 2000; Harding *et al.*, 2003; Kilberg *et al.*, 2012; Roybal *et al.*, 2005). In fact, B'chir *et al.* (2013) suggested that, during activation of the autophagic process, the autophagy proteins associated with the membrane of autophagosomes being continuously degraded upon fusion with lysosomes, the eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway would play a key role in replenishing the autophagosome-associated protein pool to allow the cell to maintain autophagy and therefore to survive during prolonged stress or amino acid deficiency. So, this upregulation would be set up to compensate for this inhibition and to maintain the capacity to autophagy in hepatic cells of overfed ducks. Although there are no significant differences in the expression of *atg8*, *atg4b* or *sqstm1* genes in this experiment at the fourth meal between overfed and rationed ducks, their expressions increase during all the overfeeding period (Pioche *et al.*, 2019). This was concomitant with the upregulation of *atf4* and *asns*. In this study, the cellular stress pathway eIF2 $\alpha$ /ATF4 is not impacted by this early step of fatty liver development. Therefore, the strong nutritional imbalance of the feed used (corn, with protein and amino acid deficiency) that induces endoplasmic reticulum stress and activates the eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway, which stimulates expression of autophagy-related genes, does not influence all these mechanisms at the beginning of the overfeeding.

In order to detect the presence of oxidative stress in hepatocytes on 2 days overfed mule ducks, protein carbonyl measurements were performed. Indeed, protein carbonylation is considered as a major hallmark of oxidative stress-related disorders. It is one of the most harmful irreversible oxidative protein modifications (Fedorova *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2010). The lack of differences in quantity of carbonylated proteins in hepatocytes from overfed and rationed ducks suggest that only two overfeeding days are not enough to induce any oxidative stress in liver cells although the hepatic steatosis induction. Many studies associated hepatic steatosis to an induction of oxidative stress in mule ducks' hepatocytes (François *et al.*, 2014; Théron *et al.*, 2011). Nevertheless, these observations were obtained on ducks after 22 meals of overfeeding (two weeks and not only two days). It would be interesting to compare our results on

hepatocytes of 2 days overfed ducks with the level of carbonylated protein of ducks who received a complete overfeeding.

Our investigations on mTOR and amino acid pathways showed that they are not impacted by two overfeeding days although the hepatic steatosis is already induced. We have previously shown that the mTOR pathway was activated in overfed mule ducks: phosphorylation of Akt and S6 increased, concomitant with the overexpression of *akt*, *mtor* and *s6k1* in the liver all along the overfeeding period in hepatocytes of mules ducks (Pioche *et al.*, 2019). S6 and 4EBP1 are two effectors considered as good indicators of the activity status of mTOR (Dufner and Thomas, 1999; Hay and Sonenberg, 2004). The lack of differences in level of these two proteins phosphorylation's observed between two days overfed ducks and rationed ones suggest that 4 overfeeding meals are not enough to induce significant differences in TOR activity in hepatocytes. This hypothesis is also valid for Ampk. AMPK enzyme is considered as key metabolic energy homeostasis regulator in avian species (Proszkowiec-Weglarz *et al.*, 2009). Studies in rat suggested a direct relationship between AMPK activation status and fatty acid synthesis in the liver in response to acute changes in energy status (Munday *et al.*, 1988). This has not been shown in birds. Nevertheless, the potential indirect role for AMPK in long-term regulation hepatic lipogenesis in birds *via* its ability to modulate the actions of transcription factors such as SREBP-1, LXR and ChREBP through post-translational mechanisms cannot be rule out (Viollet *et al.*, 2009).

### ***mTOR signalling pathway study***

Rapamycin is an allosteric inhibitor of mTOR who binds the mTORC1 complex of the protein kinase (Benjamin *et al.*, 2011). The significant decrease of S6 phosphorylation level on hepatocytes of rapamycin treated ducks compared to control ducks means the treatment successfully inhibit the mTOR activity. Rapamycin abolished effectively the phosphorylation of S6. Indeed, the protein S6 is phosphorylated by the protein S6K1 which is activated by mTOR in response to insulin stimulation or in presence of amino acids (Dufner and Thomas, 1999).

Concerning plasma parameters, glycaemia is lower in rapamycin treated ducks compared to controls despite effective inhibition of TORC1. As observed in fish (Dai *et al.*, 2015; Kostyniuk *et al.*, 2018; Rashidpour *et al.*, 2019), rapamycin treatment improved glucose homeostasis in ducks inhibiting gluconeogenesis. No impact of rapamycin was particularly observed on

triglyceridaemia, the increase of plasma TG after the meal was comparable on treated and control ducks. In human, rapamycin is known to increase both plasma TG and cholesterol by increasing HMGCR expression (rapamycin inhibiting CYP27A1 activity, (Gueguen *et al.*, 2007)). This is not observed in this experiment, on the contrary, while plasma cholesterol significantly increase in control ducks no significant increase appears in rapamycin treated ducks.

Unlike to S6, Akt phosphorylation's level is significantly more important in rapamycin treated ducks compare to control ones. Studies in muscle cells have shown that overactivation of the mTORC1 / S6K1 pathway by an excess of amino acids led to a negative feedback of mTOR and S6K1 on the early elements of the insulin signalling pathway (Patti *et al.*, 1998; Tremblay and Marette, 2001). This feedback is effected at the level of IRS-1 *via* phosphorylation of different serine residues causing the physical separation of IRS-1 and the insulin receptor and thus the blocking of the insulin signal propagation (Carlson *et al.*, 2004). In this study, in hepatocytes of treated ducks, by blocking the insulin pathway with rapamycin we inhibited the S6K1-induced negative feedback loop on early events of insulin signalling pathway and lifts inhibition promoting AKT activity. This high AKT activity could explain the lower glycaemia noted in treated ducks. In fact, it is known in mammals that AKT plays a key role in glucose transport, being responsible for the translocation of insulin-sensitive glucose transporters GLUT4 to the plasma membrane, thereby allowing the uptake of extracellular glucose by myocytes and adipocytes (Sano *et al.*, 2003). Although this isoform does not exist or has not been characterized in birds (Seki *et al.*, 2003), an identical role of AKT can be suspected on another specific transporter. Just like GLUT 12, another insulin-sensitive glucose transporter has been identified in chicken (Coudert *et al.*, 2015).

To study mTOR implication in hepatic steatosis development, it was interesting to analyze enzymes of lipogenesis. As targets of the TOR pathway, an inhibition of the expression of *fas* was expected in rapamycin treated ducks. Indeed, fatty acid synthase is the main enzyme of lipogenesis. Its activity increases during overfeeding (Baéza *et al.*, 2005) just like its level of expression (Hérault *et al.*, 2009). In our previous kinetic study, the expression of *fas* was upregulated during the second half of overfeeding (Pioche *et al.*, 2019). Regarding the results of this present study, we can suggest that 2 days of overfeeding is not enough to observe impact of rapamycin treatment. Another hypothesis maybe an activation of *fas* through another pathway, which requires further investigations.

## **CONCLUSION**

To conclude, the present study firstly permitted to demonstrate that overfeeding induces the inhibition of autophagy in hepatocytes of mule ducks. Secondly, this study contributes to understand when hepatocytes set up necessary metabolic response to promote hepatic steatosis development without falling into a pathological state. Even though hepatic steatosis is well induced with two overfeeding days, it seems to be not enough to activate oxidative stress or to have a significant impact on mTOR signalling pathway. This experimental study should be renewed with different overfeeding time (kinetic study) to succeed to detect the key moments of protection mechanisms cells apparition.

Finally, rapamycin experiment permitted to highlight the negative feedback of mTOR and S6K1 on Akt, a phenomenon well known but not observed in mule ducks before.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank the “Conseil Départemental des Landes (CD40)” and Nutricia from the cooperative group Maïsador for financing this work. We also thank the technical staff of INRA Artiguères for rearing ducks. Imaging was performed on the Bordeaux Imaging Center, member of the FranceBioImaging national infrastructure (ANR-10-INBS-04).

## **REFERENCES**

Annabelle, T., Karine, R., Marie-Dominique, B., Stéphane, D., and Karine, G. (2017). Kinetics of expression of genes involved in glucose metabolism after the last meal in overfed mule ducks. *Molecular and Cellular Biochemistry* 430, 127–137.

Arroyo, J., Molette, C., Lavigne, F., Margetyal, C., Amador, O., Dubois, J.-P., and Fortun-Lamothe, L. (2018). Effects of dietary protein level during rearing period and age at overfeeding on magret and foie gras quality in male mule ducks. *Animal Science Journal* 89, 570–578.

Auvergne, A., Rémignon, H., Babilé, R., and Baudonnet-Lenfant, C. (1995). Evolution corporelle au cours du gavage chez le canard de Barbarie. *Archiv Für Geflügelkunde* 59, 234–240.

Awde, S., Marty-Gasset, N., Prahkarnkao, K., and Rémignon, H. (2014). Relationship between Proteolytic Activities and Cooking Loss Variability in Liver Issued from Force-Fed Mule Ducks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 3262–3268.

- Babile, R., Auvergne, A., Dubois, J.P., Benard, G., and Manse, H. (1998). Reversibilité de la stéatose hépatique chez l'oie. 3èmes Journées de la recherche sur les Palmipèdes à Foie "gras". Bordeaux, France (October).
- Baéza, E., Rideau, N., Chartrin, P., Davail, S., Hoo-Paris, R., Mourot, J., Guy, G., Bernadet, M.D., Juin, H., Météau, K., et al. (2005). Canards de Barbarie, Pékin et leurs hybrides: aptitude à l'engraissement. *INRA Prod. Anim* 18, 131–141.
- Baeza, E., Marie-Etancelin, C., Davail, S., and Diot, C. (2013). La stéatose hépatique chez les palmipèdes. *INRA Productions Animales* 26, 403–414.
- Barbosa-Tessmann, I.P. (2000). Activation of the Human Asparagine Synthetase Gene by the Amino Acid Response and the Endoplasmic Reticulum Stress Response Pathways Occurs by Common Genomic Elements. *Journal of Biological Chemistry*.
- Barthel, A., and Schmoll, D. (2003). Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 285, E685–E692.
- B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2013). The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Research* 41, 7683–7699.
- Belghit, I., Skiba-Cassy, S., Geurden, I., Dias, K., Surget, A., Kaushik, S., Panserat, S., and Seiliez, I. (2014). Dietary methionine availability affects the main factors involved in muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition* 112, 493–503.
- Bénard, G., Bénard, P., Prehn, D., Bengone, T., Jouglar, J.Y., and Durand, S. (1998). Démonstration de la réversibilité de la stéatose hépatique obtenue par gavage de canards mulards. *Etude Réalisée Sur* 3, 49–52.
- Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C., and Hall, M.N. (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 10, 868–880.
- Bento, C.F., Renna, M., Ghislat, G., Puri, C., Ashkenazi, A., Vicinanza, M., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2016). Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annual Review of Biochemistry* 85, 685–713.
- Bonnefont, C.M.D., Molette, C., Lavigne, F., Manse, H., Bravo, C., Lo, B., Rémignon, H., Arroyo, J., and Bouillier-Oudot, M. (2019). Evolution of liver fattening and foie gras technological yield during the overfeeding period in mule duck. *Poult. Sci.*
- Carlson, C.J., White, M.F., and Rondinone, C.M. (2004). Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316, 533–539.
- Chartrin, P., Bernadet, M.-D., Guy, G., Mourot, J., Hocquette, J.-F., Rideau, N., Duclos, M.J., and Baéza, E. (2006). Does overfeeding enhance genotype effects on liver ability for lipogenesis and lipid secretion in ducks? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 145, 390–396.

- Codogno, P., and Meijer, A.J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death & Differentiation* 12, 1509–1518.
- Coudert, E., Crochet, S., Cailleau-Audouin, E., Bordeau, T., Collin, A., Berri, C., Tesseraud, S., and Métayer-Coustard, S. (2015). Expression and ontogenesis of glucose transporters SLC2A-1, -8 and -12 in different chicken muscles [Conference poster]. Actes des 11èmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours, France, les 25 et 26 mars 2015 819–822.
- Dai, W., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Seiliez, I., and Skiba-Cassy, S. (2015). Amino Acids Attenuate Insulin Action on Gluconeogenesis and Promote Fatty Acid Biosynthesis via mTORC1 Signaling Pathway in trout Hepatocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry* 36, 1084–1100.
- Desvignes, T., Fauvel, C., and Bobe, J. (2011). The nme gene family in zebrafish oogenesis and early development. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 384, 439–449.
- Dufner, A., and Thomas, G. (1999). Ribosomal S6 Kinase Signaling and the Control of Translation. *Experimental Cell Research* 253, 100–109.
- Fedorova, M., Bollineni, R.C., and Hoffmann, R. (2014). Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrometry Reviews* 33, 79–97.
- François, Y., Marie-Etancelin, C., Vignal, A., Viala, D., Davail, S., and Molette, C. (2014). Mule Duck “Foie Gras” Shows Different Metabolic States According to Its Quality Phenotype by Using a Proteomic Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 7140–7150.
- Gabarrou, J., Salichon, M., Guy, G., and Blum, J. (1996). Hybrid ducks overfed with boiled corn develop an acute hepatic steatosis with decreased choline and polyunsaturated fatty acid level in phospholipids. *Reproduction Nutrition Development* 36, 473–484.
- Gontier, K., André, J.-M., Bernadet, M.-D., Ricaud, K., and Davail, S. (2013). Insulin effect on lipogenesis and fat distribution in three genotypes of ducks during overfeeding. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 164, 499–505.
- Gueguen, Y., Ferrari, L., Souidi, M., Batt, A.-M., Lutton, C., Siest, G., and Visvikis, S. (2007). Compared Effect of Immunosuppressive Drugs Cyclosporine A and Rapamycin on Cholesterol Homeostasis Key Enzymes CYP27A1 and HMG-CoA Reductase. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 100, 392–397.
- Guy, G., Rousselot-Pailley, D., and Gourichon, D. (1995). Comparaison des performances de l'oie, du canard mulard et du canard de Barbarie soumis au gavage. In *Annales de Zootechnie*, pp. 297–305.
- Haar, E.V., Lee, S., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., and Kim, D.-H. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature Cell Biology* 9, 316.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Molecular Cell* 11, 619–633.



- Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* *18*, 1926–1945.
- Hérault, F., Saez, G., Robert, E., Mohammad, A.A., Davail, S., Chartrin, P., Baéza, E., and Diot, C. (2009). Liver gene expression in relation to hepatic steatosis and lipid secretion in two duck species. *Animal Genetics* *41*, 12–20.
- Hermier, D., Saadoun, A., Salichon, M.-R., Sellier, N., Rousselot-Paillet, D., and Chapman, M.J. (1991). Plasma lipoproteins and liver lipids in two breeds of geese with different susceptibility to hepatic steatosis: Changes induced by development and force-feeding. *Lipids* *26*, 331–339.
- Hermier, D., Guy, G., Guillaumin, S., Davail, S., André, J.-M., and Hoo-Paris, R. (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*, 663–675.
- Kilberg, M.S., Balasubramanian, M., Fu, L., and Shan, J. (2012). The Transcription Factor Network Associated With the Amino Acid Response in Mammalian Cells. *Advances in Nutrition* *3*, 295–306.
- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* *12*, 1–222.
- Kostyniuk, D.J., Culbert, B.M., Mennigen, J.A., and Gilmour, K.M. (2018). Social status affects lipid metabolism in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* *315*, R241–R255.
- Lavallard, V.J., and Gual, P. (2014). Autophagy and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *BioMed Research International* *2014*, 1–13.
- Leveille, G.A., Romsos, D.R., Yeh, Y.-Y., and O’Hea, E.K. (1975). Lipid Biosynthesis in the Chick. A Consideration of Site of Synthesis, Influence of Diet and Possible Regulatory Mechanisms. *Poult Sci* *54*, 1075–1093.
- Marandel, L., Labbe, C., Bobe, J., Jammes, H., Lareyre, J.-J., and Le Bail, P.-Y. (2013). Do not put all teleosts in one net: Focus on the *sox2* and *pou2* genes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* *164*, 69–79.
- Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* *147*, 728–741.
- Munday, M.R., Campbell, D.G., Carling, D., and Hardie, D.G. (1988). Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *European Journal of Biochemistry* *175*, 331–338.
- Patti, M.E., Brambilla, E., Luzi, L., Landaker, E.J., and Kahn, C.R. (1998). Bidirectional modulation of insulin action by amino acids.
- Pilo, B., and George, J.C. (1983). Diurnal and seasonal variation in liver glycogen and fat in relation to metabolic status of liver and m. pectoralis in the migratory starling, *Sturnus roseus*,

wintering in India. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology* 74, 601–604.

Pioche, T., Skiba, F., Bernadet, M.-D., Seiliez, I., Massimino, W., Houssier, M., Tavernier, A., Ricaud, K., Davail, S., Skiba-Cassy, S., et al. (2019). Kinetic study of the expression of genes related to hepatic steatosis, global intermediate metabolism and cellular stress during overfeeding in mule ducks. *BioRxiv* 690156.

Proszkowiec-Weglarz, M., Richards, M.P., Humphrey, B.D., Rosebrough, R.W., and McMurtry, J.P. (2009). AMP-activated protein kinase and carbohydrate response element binding protein: A study of two potential regulatory factors in the hepatic lipogenic program of broiler chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 154, 68–79.

Rashidpour, A., Silva-Marrero, J.I., Seguí, L., Baanante, I.V., and Metón, I. (2019). Metformin counteracts glucose-dependent lipogenesis and impairs transdeamination in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 316, R265–R273.

Roybal, C.N., Hunsaker, L.A., Barbash, O., Jagt, D.L.V., and Abcouwer, S.F. (2005). The Oxidative Stressor Arsenite Activates Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Transcription by an ATF4-dependent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 280, 20331–20339.

Saadoun, A., and Leclercq, B. (1987). In Vivo Lipogenesis of Genetically Lean and Fat Chickens: Effects of Nutritional State and Dietary Fat. *J Nutr* 117, 428–435.

Saez, G., Baéza, E., Davail, S., Durand, D., Bauchart, D., and Gruffat, D. (2008). Is the hepatic metabolism of glucose and linoleic acid influenced by species in overfed ducks? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 151, 576–581.

Sano, H., Kane, S., Sano, E., Mîinea, C.P., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.W., and Lienhard, G.E. (2003). Insulin-stimulated Phosphorylation of a Rab GTPase-activating Protein Regulates GLUT4 Translocation. *J. Biol. Chem.* 278, 14599–14602.

Seki, Y., Sato, K., Kono, T., Abe, H., and Akiba, Y. (2003). Broiler chickens (Ross strain) lack insulin-responsive glucose transporter GLUT4 and have GLUT8 cDNA. *General and Comparative Endocrinology* 133, 80–87.

Suzuki, Y.J., Carini, M., and Butterfield, D.A. (2010). Protein Carbonylation. *Antioxid Redox Signal* 12, 323–325.

Tavernier, A., Davail, S., Ricaud, K., Bernadet, M.-D., and Gontier, K. (2017). Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks. *Molecular and Cellular Biochemistry* 424, 147–161.

Tavernier, A., Karine, R., Marie-Dominique, B., Karine, G., and Stéphane, D. (2018a). Pre- and post-prandial expression of genes involved in lipid metabolism at the end of the overfeeding period of mule ducks. *Molecular and Cellular Biochemistry* 438, 111–121.

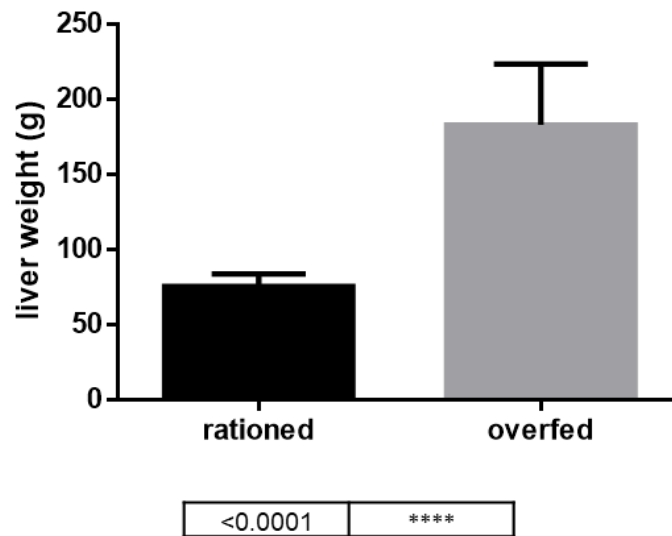
- Tavernier, A., Karine, R., Marie-Dominique, B., Karine, G., and Stéphane, D. (2018b). Pre- and post-prandial expression of genes involved in lipid metabolism at the end of the overfeeding period of mule ducks. *Molecular and Cellular Biochemistry* 438, 111–121.
- Theron, L., Fernandez, X., Marty-Gasset, N., Pichereaux, C., Rossignol, M., Chambon, C., Viala, D., Astruc, T., and 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.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 12617–12628.
- Théron, L., Astruc, T., Bouillier-Oudot, M., Molette, C., Vénien, A., Peyrin, F., Vitezica, Z.G., and Fernandez, X. (2011). The fusion of lipid droplets is involved in fat loss during cooking of duck “foie gras.” *Meat Science* 89, 377–383.
- Tremblay, F., and Marette, A. (2001). Amino Acid and Insulin Signaling via the mTOR/p70 S6 Kinase Pathway A NEGATIVE FEEDBACK MECHANISM LEADING TO INSULIN RESISTANCE IN SKELETAL MUSCLE CELLS. *J. Biol. Chem.* 276, 38052–38060.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, research0034.1.
- Viollet, B., Lantier, L., Devin-Leclerc, J., Hébrard, S., Amouyal, C., Mounier, R., Foretz, M., and Andreelli, F. (2009). Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, 3380–3400.
- Wu, D., Wang, X., Zhou, R., and Cederbaum, A. (2010). CYP2E1 enhances ethanol-induced lipid accumulation but impairs autophagy in HepG2 E47 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 402, 116–122.
- Zhuang, X., Chung, K.P., Cui, Y., Lin, W., Gao, C., Kang, B.-H., and Jiang, L. (2017). ATG9 regulates autophagosome progression from the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E426–E435.

## **FIGURES AND TABLES**

**Table 1.** Primers used for determination of mRNA levels

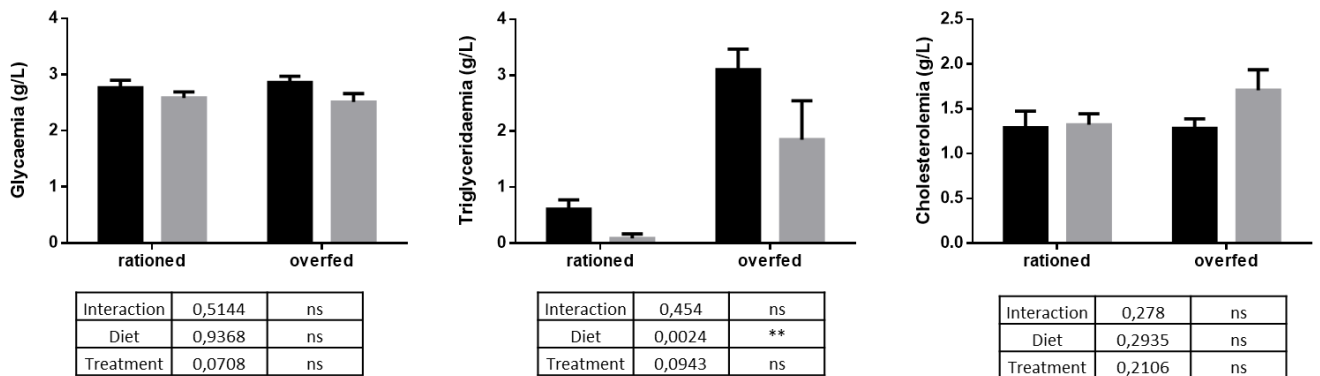
<b>Genes (name and symbol)</b>		<b>Primer sequences 5'-3'</b>
<b>Lipid metabolism</b>		
ATP Citrate Lyase	Forward	ACCCCACTGTTGGACTATGC
<i>acly</i>	Reverse	GCTTCAAGCGCTTCTGATCT
Fatty Acid Synthase	Forward	TGAAGAAGGTCTGGGTGGAG
<i>fas</i>	Reverse	CTCCAATAAGGTGCGGTGAT
<b>Cellular stress</b>		
Asparagine Synthetase	Forward	GGTGATCACGGAAAAGAAGC
<i>asns</i>	Reverse	GTACAGCCCTTTTTGGCAGA
Activating Transcription Factor 4	Forward	CAGGTCCTTTTCCTCTGCTG
<i>atf4</i>	Reverse	CCTGGGATTCCTGGGATACT
Autophagy related gene 4	Forward	AAGGGAAGAGGCAGATGGAT
<i>atg4b</i>	Reverse	CCGCCTGATTTCTTCCATTA
Autophagy related gene 8	Forward	AAATCCCGGTCATCATTGAA
<i>atg8/lc3</i>	Reverse	AGGAAGCCATCCTCATCCTT
Sequestosome 1	Forward	AGTCTCCCCGTGATATGGTG
<i>sqstm1/p62</i>	Reverse	ACCATGTTGTGCTCCTTG TG
<b>Reference gene</b>		
<i>luciferase</i>	Forward	CATTCTTCGCCAAAAGCACTCTG
	Reverse	AGCCCATATCCTTGTCGTATCCC

**Figure 1.** Liver weight of mule ducks rationed or overfed during 2 days. (n=6), student t-test, mean  $\pm$  SEM, \*\*\*\* P <0.0001, ns: not significant

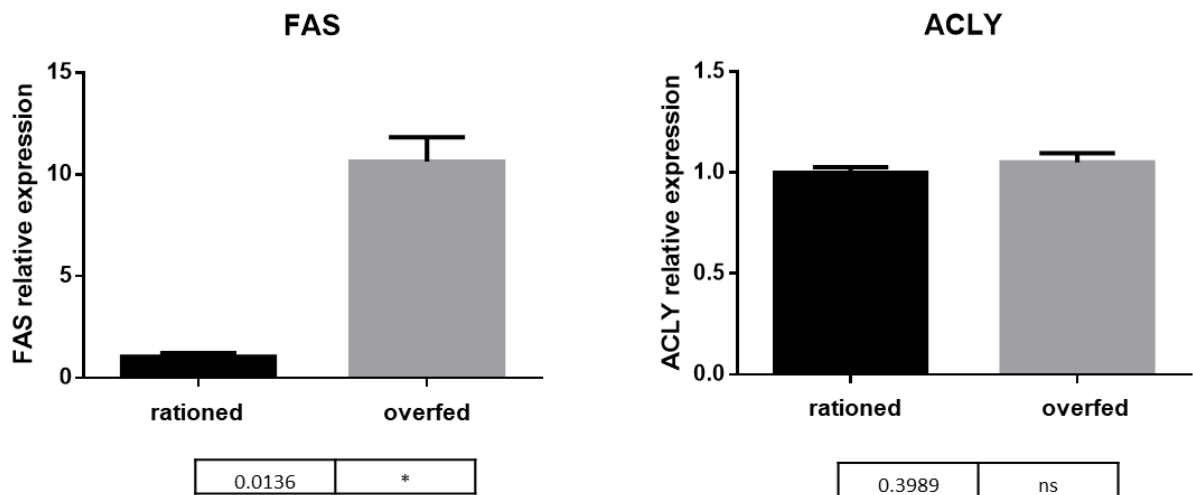


**Figure 2.** Plasma parameters of mule ducks rationed or overfed during 2 days treated or not with chloroquine. (n=12), two-way Anova, mean  $\pm$  SEM, \*\* P <0.01, ns: not significant

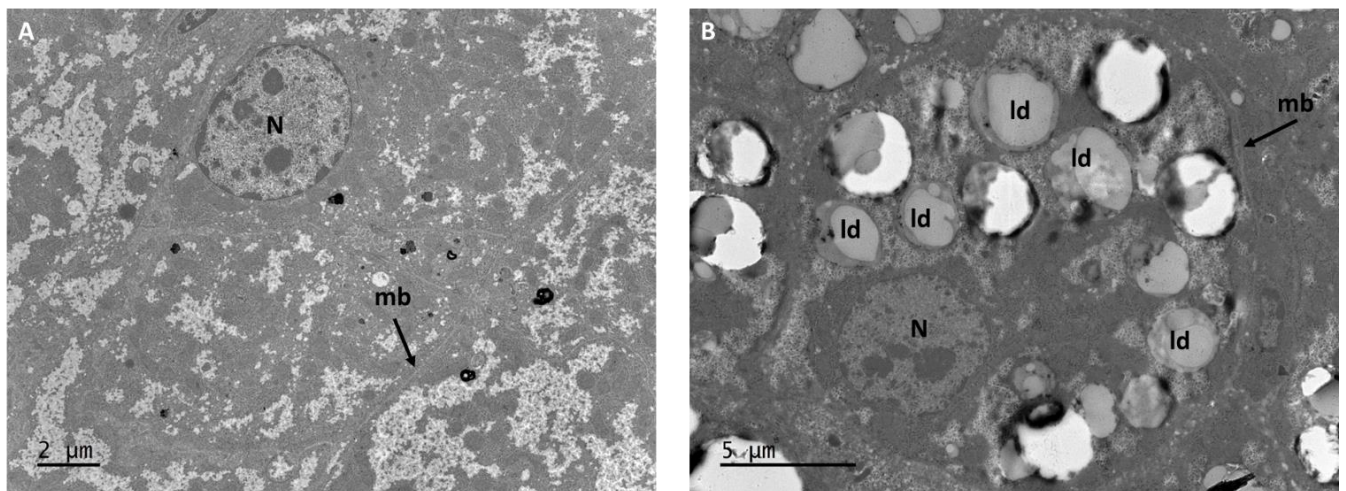
Control  
 Chloroquine



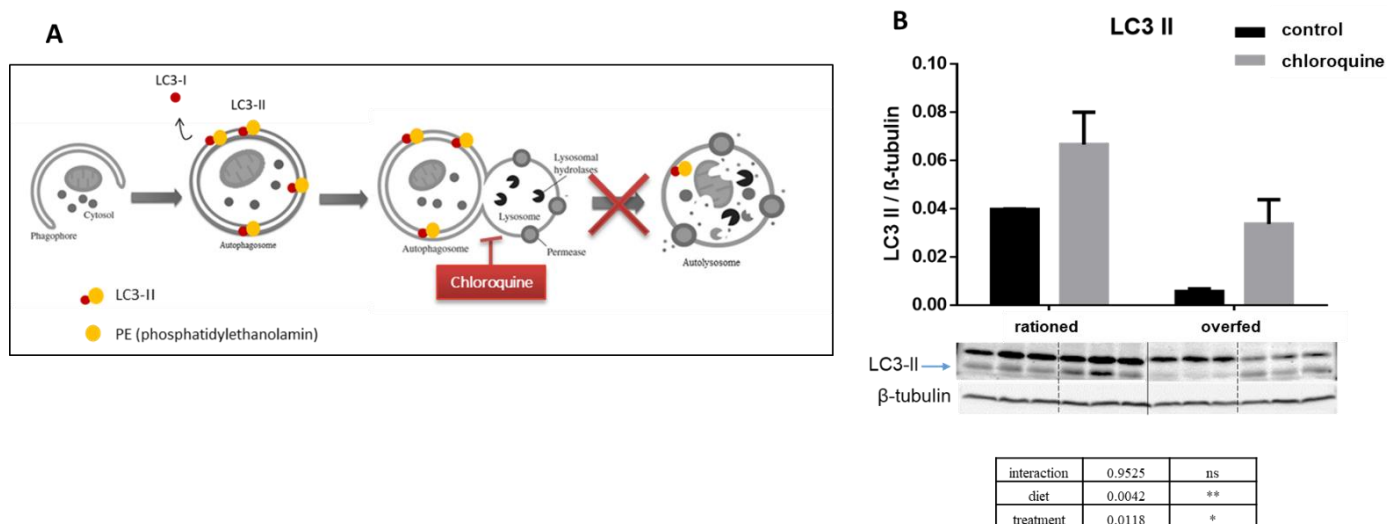
**Figure 3.** Relative expression of *fas* and *acly*, two genes involved in lipogenesis in liver of mule ducks rationed or overfed during two days, (n=3), student t-test, mean  $\pm$  SEM, \* P < 0.1, ns: not significant



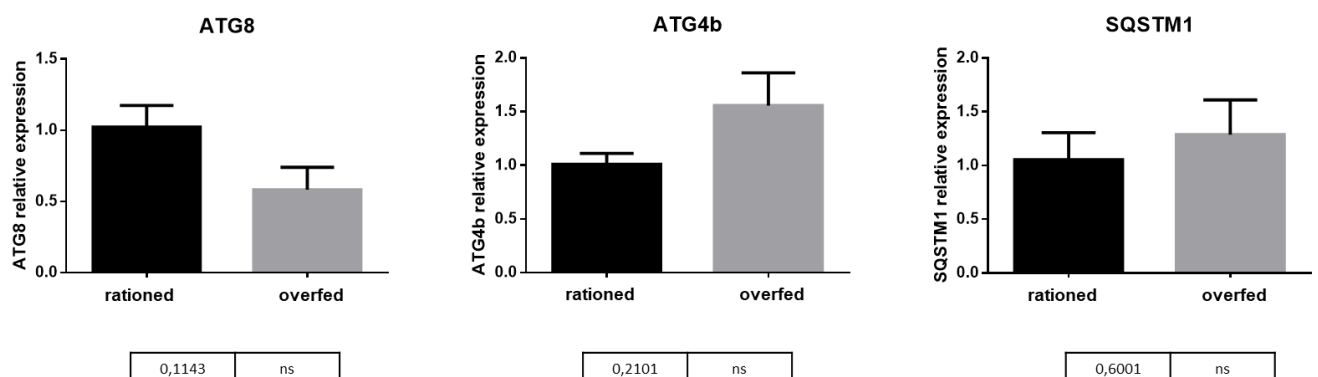
**Figure 4.** Electron microscopy of hepatocytes from mule ducks rationed (A) or overfed during two days (B). N: nucleus; mb: plasma membrane; ld: lipid droplet



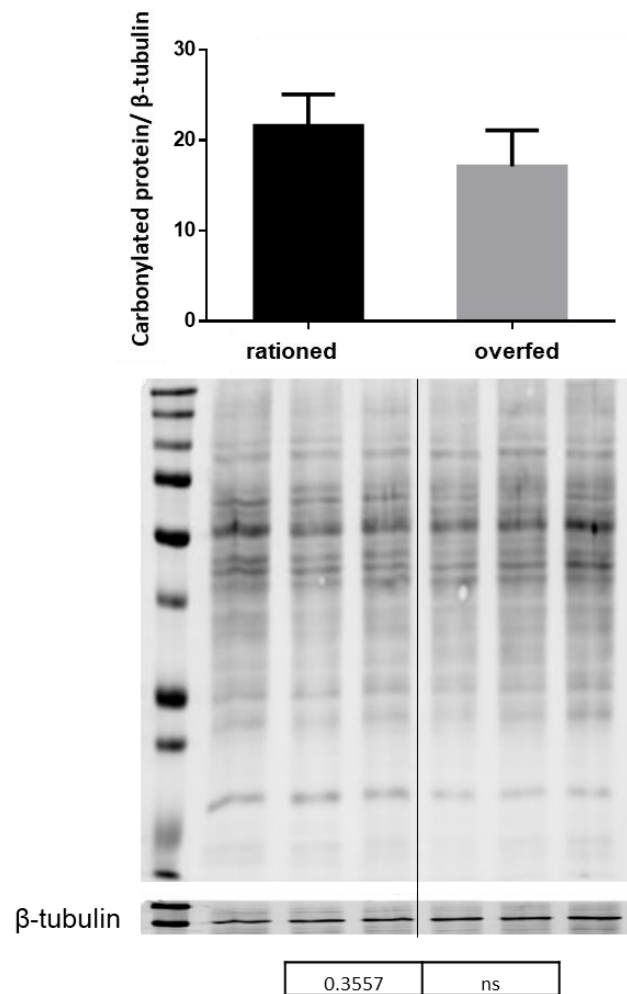
**Figure 5.** Chloroquine inhibition autophagy in mule duck hepatocytes. Macroautophagy process and inhibitory action of chloroquine that prevents the fusion between the autophagosome and the lysosome (A). Representative LC3 and  $\beta$ -tubulin immunoblots of protein homogenates from duck hepatocytes treated or not with chloroquine. Graphs show the ratio between LC3-II and  $\beta$ -tubulin used as a loading control. (n = 3), two-way Anova test, means  $\pm$  SEM, \* P <0.1, \*\* P <0.01, ns: not significant (B).



**Figure 6.** Relative expression of *atg8*, *atg4b* and *sqstm1*, three genes involved in macroautophagy in liver of mule ducks rationed or overfed during two days. (n=3), student t-test, mean  $\pm$  SEM, ns: not significant

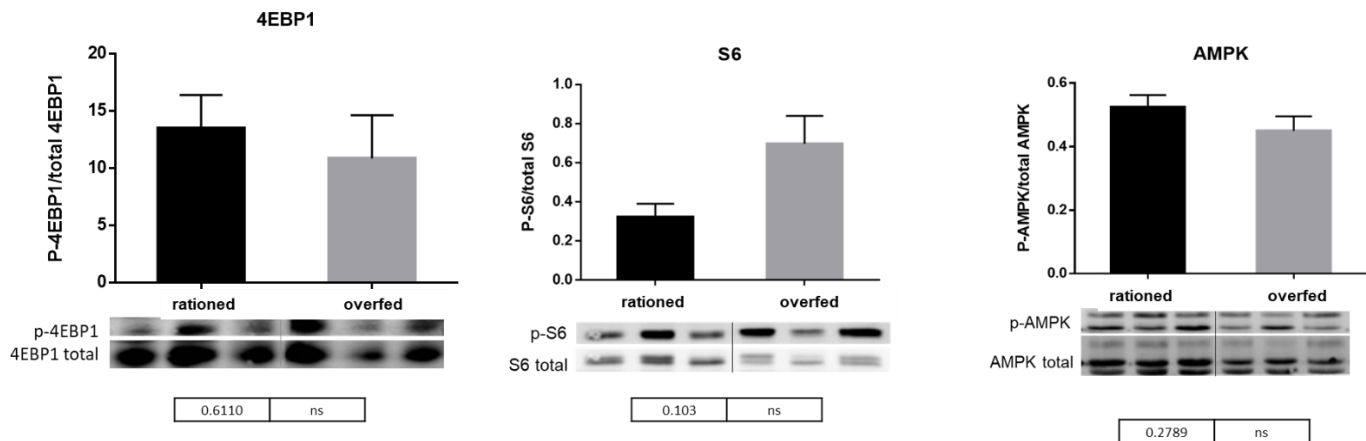


**Figure 7.** Representative immunoblots of total carbonylated proteins from duck hepatocytes rationed or overfed. Graphs show the ratio between carbonylated proteins and  $\beta$ -tubulin used as a loading control. (n = 3), two-way Anova test, means  $\pm$  SEM, ns: not significant.

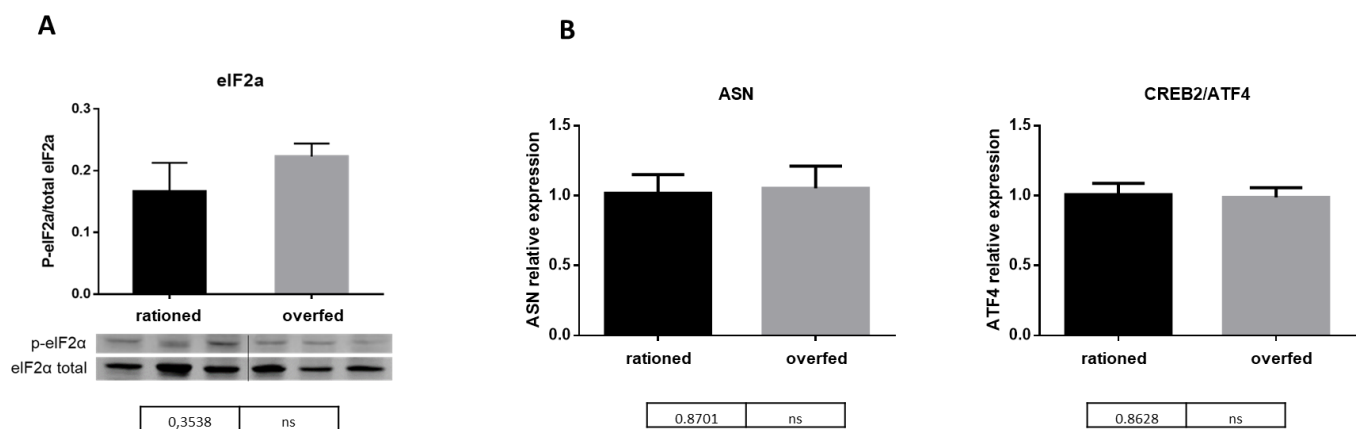




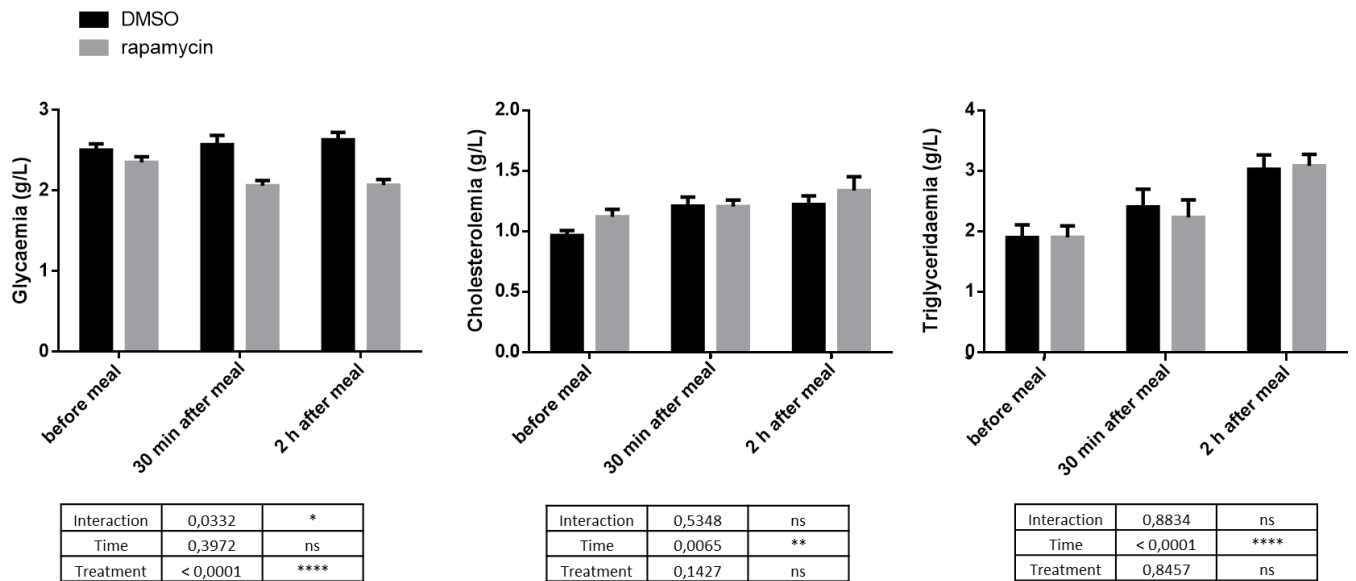
**Figure 8.** Representative immunoblots of 4EBP1, S6 and AMPK proteins homogenates from duck hepatocytes rationed or overfed during two days. Graphs show the ratio between phosphorylated and total form of the protein used as a loading control. (n = 3), two-way Anova test, means  $\pm$  SEM, ns: not significant.



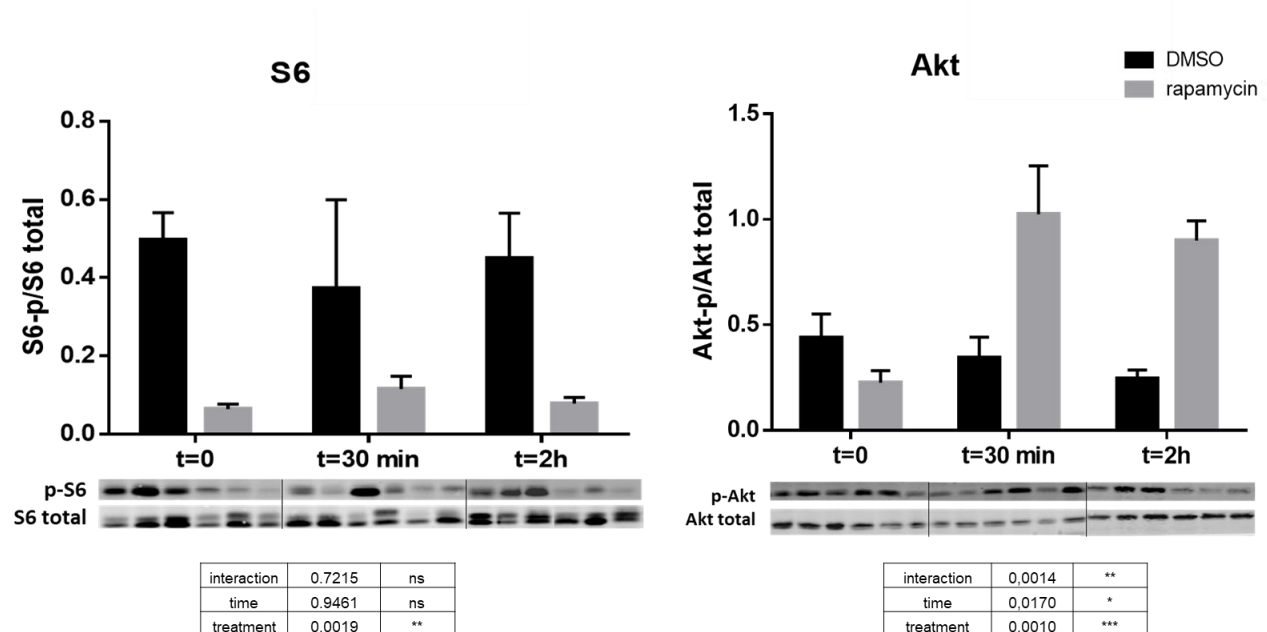
**Figure 9.** Representative immunoblots of eIF2 $\alpha$  protein homogenates from duck hepatocytes rationed or overfed during two days. Graphs show the ratio between phosphorylated and total form of the protein used as a loading control. (n = 3), two-way Anova test, means  $\pm$  SEM, ns: not significant (A). Relative expression of *asn* and *atf4* in liver of mule ducks rationed or overfed during two days. (n=3), student t-test, mean  $\pm$  SEM, ns: not significant (B).



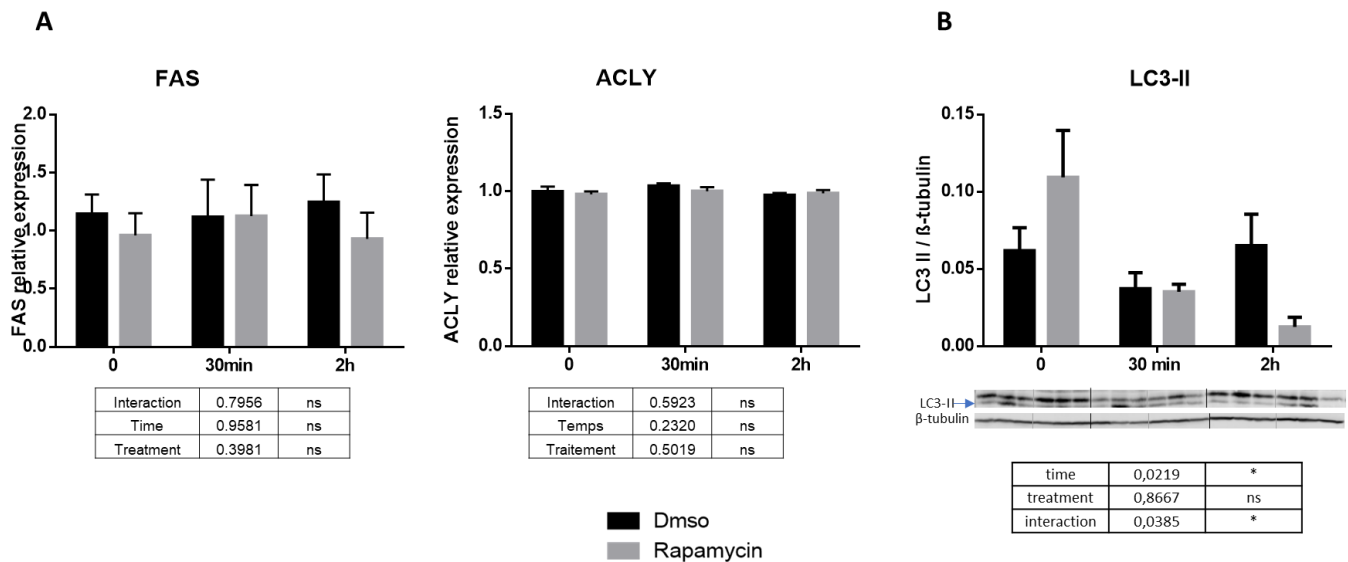
**Figure 10.** Plasma parameters of mule ducks treated with rapamycin or DMSO before meal, 30 minutes and 2 hours after meal. (n=12), two-way Anova, mean  $\pm$  SEM, \* P <0.1, \*\* P <0.01, \*\*\*\* P <0.0001, ns: not significant.



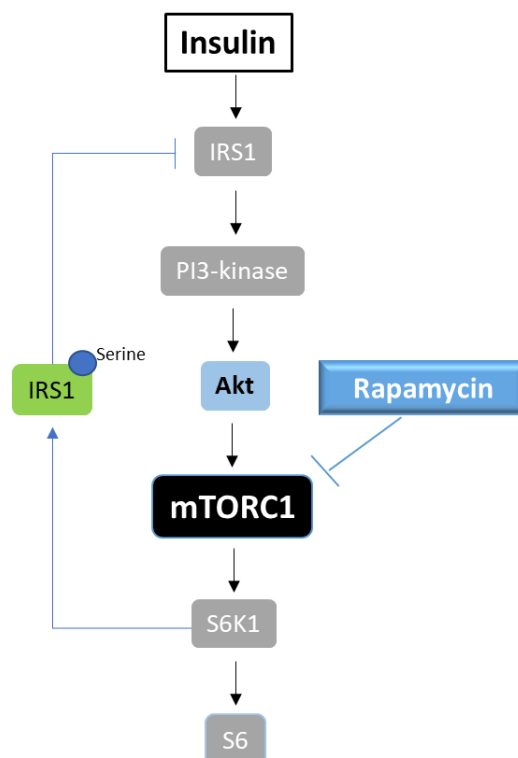
**Figure 11.** Representative immunoblots of S6 and AKT proteins homogenates from duck hepatocytes treated with DMSO or rapamycin. Graphs show the ratio between phosphorylated and total form of the protein used as a loading control. (n = 3), two-way Anova test, means  $\pm$  SEM, \* P <0.1, \*\* P <0.01, \*\*\* P <0.001, ns: not significant.



**Figure 12.** Relative expression of *fas* and *acly*, two genes involved in lipogenesis in liver of mule ducks treated with rapamycin or DMSO after 2 overfeeding days, (n=12), two-way Anova test, means  $\pm$  SEM, ns: not significant (A). Representative LC3-II and  $\beta$ -tubulin immunoblots of protein homogenates from duck hepatocytes treated with DMSO or rapamycin. Graphs show the ratio between LC3-II and  $\beta$ -tubulin used as a loading control. (n = 3), two-way Anova test, means  $\pm$  SEM, \* P <0.1, ns: not significant (B).



**Figure 13.** Representative illustration of the negative feedback of mTor and S6K1 on Akt in the insulin pathway.





## **Discussion générale**

Cette thèse s'inscrit dans une meilleure compréhension des différents mécanismes impliqués dans la mise en place de la stéatose hépatique chez le canard mulard. Elle a permis de décrire à travers une étude cinétique, les modifications induites dans le métabolisme glucidique et lipidique du canard mulard au cours du gavage. Elle a également mis en avant l'activation de mécanismes de protection cellulaire nécessaires au maintien du foie dans un état de stéatose non pathologique. Enfin, une nouvelle approche sur les microARNs a permis de considérer l'utilisation de microARNs circulants comme potentiels biomarqueurs de la stéatose hépatique chez le canard mulard.

### **Impact de la stéatose hépatique sur le métabolisme intermédiaire et le stress cellulaire (Article 1)**

L'*EXPI* cinétique réalisée sur 3 temps de gavage (au début : repas 4, milieu : repas 12 et fin de gavage : repas 22) a permis d'avoir des informations complémentaires sur le métabolisme intermédiaire du canard mulard au cours du gavage mais aussi sur certains mécanismes de protections activés par les hépatocytes.

Le premier point intéressant de cette étude est la corrélation positive significative observée entre le poids du foie et le taux de cholestérol plasmatique. Le taux de cholestérol plasmatique étant lui-même significativement induit au cours du gavage, l'idée que le métabolisme du cholestérol puisse être affecté lors du gavage du canard mulard a suscité notre intérêt. Afin de mieux comprendre l'implication du métabolisme du cholestérol dans le développement de la stéatose hépatique, l'expression de gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol (*hmgcr*, *cyp51a*) et son estérification (*soat1*) ont été analysés. L'expression de *hmgcr*, impliquée dans la voie du mévalonate produisant des précurseurs de cholestérol, augmente au cours de la seconde moitié du gavage, ce qui est en accord avec les données observées chez les patients atteints de NAFLD (Min *et al.*, 2012). Une augmentation significative de *cyp51a*, responsable d'une autre étape de la voie de biosynthèse du cholestérol, a également été observée pendant le gavage (plus précisément à mi-gavage), ce qui confirme que la voie de biosynthèse du cholestérol est bien activée lors du développement de la stéatose hépatique induite par le gavage chez le canard mulard. De plus, l'augmentation significative et progressive sur toute la durée du gavage de l'expression de *soat1* suggère la conversion du cholestérol en esters de cholestérol (forme de stockage), probablement en réponse à l'accumulation de cholestérol libre comme indiqué précédemment par Rogers *et al.* (2015). Une situation similaire est également observée chez

l'homme atteint de NAFLD, où la teneur en cholestérol libre augmente dans le foie et où l'induction de l'activité de SOAT1 entraîne l'estérification d'un excès de cholestérol synthétisé (Simonen *et al.*, 2011). Les gènes *apob* et *mttp*, dont les protéines sont impliquées dans le transport des lipides du foie vers les tissus périphériques, ont également été surexprimés dans le foie des canards mulards au cours du développement de la stéatose. Une analyse de corrélation réalisée entre le poids de foie et l'expression d'*apob* et de *soat1* a révélé une corrélation significative et positive. Ces résultats indiquent que la mise en place d'une stéatose hépatique lors d'une suralimentation chez le canard mulard semble étroitement liée à une forte modification du métabolisme du cholestérol basée sur l'induction de la synthèse du cholestérol et le stockage du cholestérol libre sous forme d'esters de cholestérol.

Concernant le métabolisme du glucose, d'importantes modifications ont été observées. Premièrement, le transport du glucose est affecté par une augmentation significative de l'expression hépatique des transporteurs *glut1/2* et *8* tout au long du gavage. Aucune expression de *glut2* n'a été détectée dans le muscle ou le gras abdominal, ce qui confirme les résultats antérieurs obtenus par Tavernier *et al.* (2017) chez les canards. De plus, l'expression hépatique de *chrebp*, facteur de transcription activé par le glucose et impliqué dans la mise en place des transporteurs de glucose (Iizuka *et al.*, 2004; Ishii *et al.*, 2004; Uyeda et Repa, 2006) augmente significativement au cours du gavage. Par conséquent, globalement, ces résultats suggèrent que le foie des canards mulards répond au gavage en augmentant sa capacité d'absorption du glucose, parallèlement à l'évolution des teneurs en glucose et en glycogène dans le foie en période de gavage (Baeza *et al.*, 2013; Bonnefont *et al.*, 2019). Par ailleurs, malgré une induction globale de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose (*hkl*, *eno1*, *sdha*), une légère augmentation du glucose plasmatique à la fin de la période de gavage est observée et suggère que le métabolisme a atteint une limite d'utilisation du glucose.

Concernant le métabolisme des lipides, l'augmentation significative de l'expression hépatique de *acox* (gène cible de CHREBP), *scd1*, *acs11* et des facteurs de transcription *ppary* et *lxra* ainsi que les gènes *fas*, *scd1* et *dgat2* est synonyme de forte induction de la lipogenèse *de novo* chez le canard mulard comme déjà observée dans de précédentes études (François *et al.*, 2014; Saadoun et Leclercq, 1987; Tavernier *et al.*, 2017). Une surexpression de *apoa*, *apob*, *mttp* (impliqués dans la formation de lipoprotéines), *fabp4*, *fat/cd36* (impliqués dans le transport des acides gras) et *vldlr*, *ldlr* (impliqués dans le captage des lipoprotéines) a été observée tout au long du gavage, majoritairement dans le foie, et un peu dans le muscle. La forte absorption de lipides hépatiques associée à la surexpression de *ldlr*, *vldlr*, *fat/cd36* et *fabp4* est bien connue

chez le canard mulard (Tavernier *et al.*, 2017) et est confirmée par notre étude. Ces résultats suggèrent que, durant le gavage, les lipides nouvellement synthétisés sont exportés du foie vers les tissus périphériques, comme cela avait été observé auparavant dans une étude chez le canard (Hermier *et al.*, 1991). Cependant, le défaut de captage des lipides au niveau périphérique entraîne un retour des lipides vers le foie, qui sont ensuite réintroduits *via* des transporteurs d'acides gras ou des récepteurs lipoprotéiques, entraînant une plus grande accumulation de lipides dans le foie en fin de gavage.

Parmi les différents transporteurs de lipides, on note l'importante surexpression de *fabp4* dans le foie des canards en fin de gavage. Une corrélation négative significative entre l'expression hépatique de *fabp4* et le taux de fonte des foies a également été observée en fin de gavage. Théron *et al.* avaient précédemment établi un lien entre l'expression de ce gène et la perte de graisse au cours de la cuisson (Theron *et al.*, 2011). De plus, Gabarrou et collaborateurs ont mis en évidence une corrélation significative entre le taux de fonte et la composition du foie en lipides et acides gras libres. Ils ont notamment démontré que les foies gras contenant de faibles taux de phospholipides et de phosphatidylcholine présentaient un taux de fonte plus élevé (Gabarrou *et al.*, 1996). Cela nous permet de suggérer que la composition en acides gras peut être contrôlée par des gènes liés à la synthèse des lipides et au métabolisme des acides gras (import et export).

Par ailleurs, l'insuline étant un régulateur clé des métabolismes glucidique et lipidique. Dans cette étude, nous avons décidé d'analyser l'activation de deux protéines : AKT et S6, impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline / mTOR. Nous avons alors observé que les phosphorylations des protéines AKT et S6 sont induites significativement tout comme l'expression hépatique des gènes *akt*, *mtor* et *s6kl* au cours du gavage. Plusieurs études ont montré que la plupart des patients atteints de NASH présentaient une résistance à l'insuline (Chitturi *et al.*, 2002; Sanyal *et al.*, 2001), mais nos résultats semblent indiquer qu'aucune résistance à l'insuline ne se produit lors du développement de la stéatose hépatique chez les canards mulards car la voie de signalisation mTOR n'est pas inhibée. De plus, l'expression de *insr* et *igfl* majoritairement dans le foie suggèrent que, pour faire face à un apport très important en glucides, le canard mulard augmente son nombre de récepteurs hépatiques à l'insuline afin de favoriser l'absorption du glucose et l'utiliser *via* la glycolyse et la lipogénèse.

La bêta-oxydation, voie de dégradation des acides gras dans les mitochondries, est également impactée par la stéatose hépatique. Dans le foie des canards mulards gavés, l'expression de *cpt1a* augmente significativement en fin de gavage tandis que celle de *acad* et de *hadh*

n'augmente qu'en première moitié de gavage. Le facteur de transcription *ppara* quant à lui augmente durant tout le gavage. Dans les muscles, les expressions de *cpt1a*, *acad* et *hadh* augmentent également à la fin du gavage. Ces résultats suggèrent une induction de la bêta-oxydation dans le foie et dans le muscle des canards, avec un effet plus prononcé dans le foie que dans le muscle. Ainsi, durant le gavage, une augmentation concomitante de la lipogenèse et de la bêta-oxydation est observée. Cela suggère que les cellules hépatiques et musculaires du canard gavé tentent de limiter l'accumulation de lipides en mettant en place de façon coordonnée la synthèse et l'utilisation des lipides à des fins énergétiques. Nos résultats sont également cohérents avec les travaux de Tavernier et collaborateurs (Tavernier *et al.*, 2017) montrant que les acides gras libres plasmatiques augmentent rapidement chez les canards mulards gavés et restent à un niveau élevé pendant toute la durée du gavage.

Pour finir, notre intérêt s'est porté sur les mécanismes de défense cellulaire mis en place par le canard pour surmonter cet état de stéatose induit par le gavage.

Tout d'abord l'autophagie, qui contribue au maintien de l'homéostasie cellulaire et permet la dégradation d'une partie du cytoplasme, notamment des protéines, des organites et des lipides endommagés pour produire de l'énergie ou des macromolécules (Ha *et al.*, 2015; He et Klionsky, 2009), a été étudiée. Notre étude a révélé une surexpression des gènes *atg8*, *atg9* et *sqstm1* dans le foie des canards mulards au cours du gavage. Cependant, en parallèle, une induction de *cyp2e1* a été observée suggérant que l'autophagie était inhibée par le gavage. En effet, il a été démontré que *cyp2e1* intervient dans la régulation à la hausse de l'autophagie supprimée par le stress oxydatif, conduisant ainsi à une accumulation de lipides dans des cellules hépatiques en culture (Wu *et al.*, 2010). Si l'autophagie est effectivement inhibée chez le canard mulard gavé, cela doit être démontré à l'aide d'analyses de flux autophagiques, ce qui a été réalisé plus tard dans l'EXP2 chloroquine.

Ensuite, la voie EIF2 $\alpha$  / ATF4 a été analysée. Activée en situation de privation d'acides aminés ou de stress du réticulum endoplasmique (Barbosa-Tessmann, 2000; Harding *et al.*, 2003; Kilberg *et al.*, 2012; Roybal *et al.*, 2005), la voie EIF2 $\alpha$  / ATF4 a la capacité de déclencher la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés ou dans la résistance au stress oxydatif. Tout au long du gavage, une augmentation significative de l'expression de *atf4* et de sa cible, *asns*, a été observée dans le foie des canards. Cette induction hépatique reflète probablement le fort déséquilibre nutritionnel de l'aliment utilisé lors du gavage. Principalement composé de maïs, ce régime présente une très faible teneur en protéines et en acides aminés qui ne couvre probablement pas les besoins du canard mulard.



Enfin, une activité apoptotique a été décelée par la surexpression des caspases dans le foie et le muscle des canards mulards au cours du gavage. Ce résultat est conforme aux mesures d'activités hépatiques de ces caspases dans l'étude de Rémignon *et al.* (2018). Conjointement, la surexpression observée de *hspb1*, impliquée dans la résistance au stress et connue pour réduire le stress oxydatif et supprimer certains modes d'apoptose ou de mort cellulaire (Vidyasagar *et al.*, 2012) permettent de suggérer que des mécanismes de protection sont mis en œuvre lors du gavage pour limiter le stress cellulaire et l'apoptose lors du développement de la stéatose hépatique.

### **Autophagie et implication de la voie de signalisation mTOR dans les premières étapes de développement de la stéatose hépatique chez le canard mulard**

Cette étude a été réalisée en début de gavage afin de poursuivre les précédentes investigations menées sur l'autophagie et la voie de signalisation mTOR chez le canard mulard. Ainsi, d'une part, le flux autophagique par l'emploi de la chloroquine a été étudié dans les hépatocytes de canards mulards gavés et les conséquences du gavage sur l'expression des gènes clés de l'autophagie ont été observés. D'autre part, nous avons tenté de comprendre les mécanismes d'action de l'insuline sur le développement de la stéatose hépatique grâce à l'inhibition de la voie de signalisation mTOR induite par l'utilisation de la rapamycine.

L'étude du flux autophagique est basée sur quantification de la protéine LC3-II. Fixée sur la membrane autophagosomale, elle est dégradée au stade tardif de l'autophagie. Une exposition à des inhibiteurs lysosomaux, tel que la chloroquine, qui bloquent la fusion de l'autophagosome avec les lysosomes, entraîne une accumulation de LC3-II (Klionsky *et al.*, 2016b). Le taux élevé de LC3-II observé dans les hépatocytes de canards traités a permis de valider le blocage *in vivo* de l'autophagie chez le canard mulard par injection de chloroquine. De plus, la quantité de protéines LC3-II apparaît significativement inférieure dans les hépatocytes de canards gavés par rapport aux canards non gavés ce qui confirme bien que le gavage induit une inhibition de l'autophagie chez le canard mulard. Cette inhibition de l'autophagie est concomitante avec la surexpression des gènes *atg8*, *atg9*, *sqstm1* et *atg4b* observés lors de l'étude cinétique précédente et s'explique par le fait que ATG8 (LC3) et ATG9 sont deux protéines connues pour être associées au nombre d'autophagosomes formés dans la levure (Zhuang *et al.*, 2017), SQSTM1 est un récepteur de l'autophagie qui lie les protéines ubiquitinées à LC3 et ATG4b

hydrolyse la liaison entre ATG8 et la phosphatidyléthanolamine (PE), ce qui en fait un marqueur spécifique pour cet organite (Codogno et Meijer, 2005). Cette surexpression serait assurée par l'activation de la voie eIF2 $\alpha$  / ATF4, capable de déclencher l'expression transcriptionnelle de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés ou de la résistance au stress oxydatif (Barbosa-Tessmann, 2000; Harding *et al.*, 2003; Kilberg *et al.*, 2012; Roybal *et al.*, 2005). En effet, B'chir *et al.* (2013) ont suggéré que, les protéines de l'autophagie associées à la membrane des autophagosomes étant continuellement dégradées lors de la fusion avec les lysosomes, la voie eIF2 $\alpha$  / ATF4 jouait un rôle clé dans la reconstitution du pool de protéines associées à l'autophagosome pour permettre à la cellule de maintenir l'autophagie et donc de survivre en cas de stress prolongé ou de déficit en acides aminés. Cette régulation à la hausse serait donc mise en place pour compenser l'inhibition et maintenir la capacité d'autophagie des cellules hépatiques chez les canards gavés.

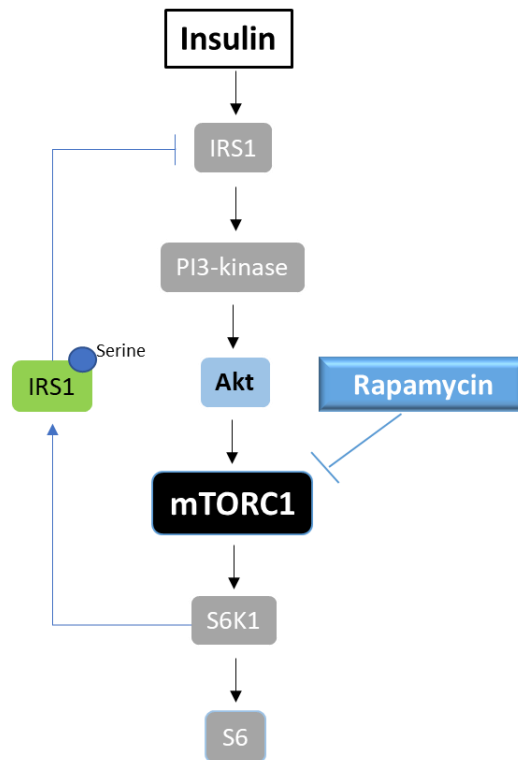
Afin de connaître l'impact du gavage sur les hépatocytes en début de gavage, le voie eIF2 $\alpha$  / ATF4 et le stress oxydant *via* l'étude des protéines carbonylées ont été analysés. L'absence de résultats significatifs de la protéine EIF2 $\alpha$  ou de l'expression des gènes *asn* et *atf4* ainsi que l'absence de différences entre les quantités de protéines carbonylées chez les canards gavés par rapport aux non gavés suggèrent que deux jours de gavage ne sont pas suffisants pour influencer la voie de stress cellulaire eIF2 $\alpha$  / ATF4 ni induire de stress oxydatif dans les hépatocytes.

Cette étude a ainsi globalement montré qu'il n'y avait ni induction de stress cellulaire, ni impact sur la voie de signalisation mTOR à cette étape du développement de la stéatose hépatique ce qui suggère de poursuivre l'étude sur une étape un peu plus avancée du gavage.

Concernant l'étude sur la voie mTOR, l'emploi de la rapamycine a eu un effet inhibiteur immédiat sur le taux de phosphorylation de la protéine S6 dans les hépatocytes des canards traités à la rapamycine par rapport aux canards témoins. Cela a permis avant tout de valider l'emploi de la rapamycine pour l'inhibition de l'activité mTOR chez le canard mulard. De plus, le dosage des paramètres plasmatiques a permis d'observer que la glycémie était inférieure chez les canards traités à la rapamycine par rapport aux témoins malgré une inhibition efficace de la protéine TORC1. Comme observé chez les poissons (Dai *et al.*, 2015; Kostyniuk *et al.*, 2018; Rashidpour *et al.*, 2019), le traitement à la rapamycine a amélioré l'homéostasie du glucose chez les canards, inhibant la gluconéogenèse. Par ailleurs, la rapamycine n'a pas eu d'impact particulier sur la triglycéridémie des canards. Or, chez l'homme, la rapamycine augmente à la fois le taux de TG plasmatique et le cholestérol en augmentant l'expression de *hmgcr* (Gueguen *et al.*, 2007). Ceci n'a pas été observé dans notre étude.

Contrairement à S6, le niveau de phosphorylation d'Akt est significativement plus important chez les canards traités à la rapamycine que chez les canards témoins. Des études sur des cellules musculaires ont montré qu'une suractivation de la voie mTORC1 / S6K1 par un excès d'acides aminés conduisait à une rétroaction négative de mTOR et de S6K1 sur les éléments précoces de la voie de signalisation de l'insuline (Patti *et al.*, 1998; Tremblay ET Marette, 2001). Cette rétroaction est effectuée au niveau de l'IRS-1 *via* la phosphorylation de différents résidus de sérine provoquant la séparation physique de l'IRS-1 et du récepteur de l'insuline et donc le blocage de la propagation du signal de l'insuline (Carlson *et al.*, 2004). Ce que nous observons ici nous laisse suspecter l'existence de cette boucle de rétroaction chez le canard mulard gavé. Dans cette étude, dans les hépatocytes de canards traités, en bloquant la voie de l'insuline avec la rapamycine, nous avons inhibé la boucle de rétroaction négative induite par S6K1 sur les réactions précoces de la voie de signalisation de l'insuline. En levant l'inhibition avec la rapamycine, nous avons favorisé l'activité d'AKT. L'activité élevée de AKT pourrait expliquer la glycémie plus faible observée chez les canards traités. En effet, il est connu chez les mammifères que AKT joue un rôle clé dans le transport du glucose, étant responsable de la translocation des transporteurs du glucose sensibles à l'insuline GLUT4 vers la membrane plasmique, permettant ainsi l'absorption du glucose extracellulaire par les myocytes et les adipocytes (Sano *et al.*, 2003). Bien que cette isoforme n'existe pas ou n'ait pas été caractérisée chez les oiseaux (Seki *et al.*, 2003), un rôle identique de AKT peut être suspecté sur un autre transporteur spécifique. Tout comme GLUT 12, un autre transporteur de glucose sensible à l'insuline a été identifié chez le poulet (Coudert *et al.*, 2015b).

Globalement, cette étude a permis de mettre en évidence l'implication de la voie TOR dans la mise en place de la stéatose hépatique chez le canard mulard gavé ainsi que la boucle de rétroaction négative de S6K1 sur AKT :



#### ✚ Etude des microARNs chez le canard gavé et recherche de potentiels biomarqueurs du développement de la stéatose hépatique.

Cette dernière étude a permis d'aborder l'étude des mécanismes de la mise en place de la stéatose hépatique par le biais d'une nouvelle approche : les microARNs. Notre première étude ayant révélé la corrélation entre la prise de poids du foie au cours du développement de la stéatose hépatique et le métabolisme du cholestérol (Pioche *et al.*, 2019), le but de cette étude était de tenter de trouver parmi les microARNs en circulation dans le plasma des canards mulards gavés, des microARNs capables de refléter le développement de la stéatose hépatique ou le taux de fonte en tant que biomarqueurs non-invasifs.

Pour cela, il a fallu avant tout définir le miRNome plasmatique du canard mulard. Le séquençage a permis d'obtenir une liste complète des miARNs en circulation dans le plasma des canards gavés. L'analyse cinétique a permis par ailleurs d'observer les différences d'expression et l'évolution des miARNs (notamment leur surexpression) au cours du gavage.

L'analyse du miRNome a permis de mettre en évidence 10 miARNs différenciellement exprimés dans le plasma des canards mulards au cours du gavage. L'analyse du niveau

d'expression de ces 10 microARNs dans le plasma et dans le foie a permis de déceler de potentiels candidats comme biomarqueurs du développement du foie gras.

Tout d'abord, le miR-122\_3p. Il s'est avéré être le microARN le plus différentiellement exprimé dans le plasma des canards mulards et il est également surexprimé dans le plasma (en début de gavage) et dans le foie (tout au long du gavage). Ce microARN est connu pour être impliqué dans l'homéostasie du foie et dans la régulation de la transcription de gènes essentiels au métabolisme des lipides (*acl*, *scd1* et *srebp1*) (Esau *et al.*, 2006). Or ces gènes sont régulés positivement chez les canards dès le début et tout au long du gavage (Hérault *et al.*, 2009; Pioche *et al.*, 2019; Tavernier *et al.*, 2017). De plus, miR-122 joue un rôle important dans la synthèse du cholestérol puisqu'il régule plusieurs gènes tels que *hmgcs*, *hmgcr* et *dhcr7* qui sont impliqués dans l'homéostasie entre les acides gras et les voies de biosynthèse du cholestérol (Krützfeldt *et al.*, 2005). Des études chez l'homme associent une augmentation du métabolisme du cholestérol à la NAFLD ou à la NASH (Min *et al.*, 2012). Dans notre étude, le miR-122\_3p semble être étroitement lié à la synthèse du cholestérol au vu des corrélations positives trouvées entre le taux de cholestérol plasmatique et l'expression relative de *hmgcr*, *soat1* et *apob* dans le foie des canards mulards. De plus, une corrélation positive a été trouvée entre le poids de foie et l'expression relative de *miR-122\_3p* dans le foie des canards mulards. Compte tenu de nos résultats, nous pouvons suggérer l'utilisation de miR-122\_3p en tant que biomarqueur potentiel non-invasif pour le développement du foie gras.

Le miR-221\_5p est apparu comme le second miARN le plus différentiellement exprimé dans le plasma du canard mulard et semble être régulé positivement dans le foie en fin de gavage. Chez l'homme, ce miARN est régulé positivement dans le tissu adipeux des individus obèses (Meerson *et al.*, 2013). On sait également qu'il est induit de manière intensive dans les cas de carcinome hépatique et qu'il joue un rôle dans l'amélioration de la croissance cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (Rong *et al.*, 2013). En conséquence, l'inactivation de miR-221 peut entraîner une augmentation de la mort cellulaire apoptotique. En ce qui concerne nos résultats, il est suggéré que la surexpression de miR-221\_5p dans le foie des canards mulards pourrait permettre aux hépatocytes de lutter contre l'apoptose connue pour être induite en fin de gavage et plus globalement contre les mécanismes de stress cellulaire causés par le développement de la stéatose hépatique (Pioche *et al.*, 2019; Réminon *et al.*, 2018). Cependant, en raison de l'absence d'évolution significative dans le plasma, le miR-221 pourrait difficilement être utilisé comme biomarqueur de l'implication d'un stress cellulaire lors du développement du foie gras.

Enfin, les analyses globales de corrélations mettent en avant deux miARNs : miR-107\_3p et miR-194\_5p. Ils ont l'avantage d'être positivement corrélés au poids de foie, au métabolisme du cholestérol et à l'expression relative de *fabp4*, ce qui en ferait de bons biomarqueurs potentiels. On sait que miR-107 et miR-194 sont régulés positivement chez les patients obèses et constitueraient des biomarqueurs non-invasifs permettant une détection plus précoce de la NASH chez l'homme (Hayes et Chayama, 2016).

Cette étude a permis de mettre en avant certains microARNs potentiellement utilisables pour le suivi en temps réel du développement de la stéatose hépatique mais des études plus poussées sur chacun de ces microARNs sont nécessaires afin de définir dans quelle mesure ils pourraient constituer des biomarqueurs non-invasifs fiables.



## **Conclusions et perspectives**

Les objectifs de ces travaux étaient principalement de poursuivre les investigations sur les mécanismes impliqués dans la mise en place de la stéatose hépatique chez le canard mulard.

L'étude **EXPI cinétique** a en effet permis d'analyser les métabolismes glucidique et lipidique du canard mulard tout au long du gavage mais également de mettre l'accent sur des mécanismes de protections cellulaires mis en place par les hépatocytes. En effet, au cours du gavage, les canards mulards semblent adapter en conséquence la réponse tissulaire pour résister aux divers stress cellulaires, notamment l'autophagie, le déficit en acides aminés, le stress du réticulum endoplasmique, le stress oxydatif ou l'apoptose. Ensemble, ces mécanismes permettent au canard mulard de gérer efficacement l'énorme surcharge en amidon apportée par le gavage tout en maintenant le foie dans un état de stéatose non pathologique.

Cette étude a également mis en exergue des corrélations prometteuses pour la filière entre : 1- le poids de foie et le métabolisme du cholestérol et 2- le taux de fonte et un transporteur d'acide gras particulièrement surexprimé en fin de gavage : *fabp4*. Ces observations constituent dorénavant des orientations pour des biomarqueurs spécifiques de ces 2 critères qui sont primordiaux pour les producteurs de foie gras.

En résumé, cette étude a permis de mieux comprendre le développement du foie gras chez le canard mulard, ainsi que les mécanismes de stress associés au glucose, aux protéines et aux cellules. Une des critiques que l'on pourrait faire à cette étude est l'absence d'un groupe de canards témoins, non gavés. En effet, un groupe témoin aurait certainement permis d'avoir une idée plus précise des mécanismes précoces mis en place par l'animal pour réagir au gavage à savoir entre la mise en gavage et le repas 4.

L'étude **EXP2 chloroquine** a permis de démontrer que le gavage induisait l'inhibition de l'autophagie dans les hépatocytes des canards mulards. Cette étude a contribué à mieux cerner le moment où les hépatocytes activent une réponse métabolique nécessaire pour favoriser le développement de la stéatose hépatique sans tomber dans un état pathologique. Il semble cependant que 2 jours de gavage (4 repas) ne soient pas suffisant pour activer le stress oxydatif ou avoir un impact significatif sur la voie de signalisation de mTOR. Cette étude expérimentale devrait être reconduite sur une cinétique plus importante afin de voir l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur une période plus longue et d'observer son implication dans l'homéostasie



cellulaire et métabolique. Cela permettrait une détection des moments clés de l'apparition des mécanismes de protection.

Par ailleurs, l'étude *EXP2 rapamycine* a permis de mettre en évidence la boucle de rétroaction négative de S6K1 sur les éléments précoces de la voie de l'insuline mTOR et plus particulièrement sur AKT, un phénomène bien connu mais non observé auparavant chez le canard mulard.

Enfin, l'étude *EXP1 microARNs* a permis d'établir le miRNome complet du canard mulard gavé pour la première fois et de définir une bonne base de microARNs sur lesquels les recherches vont pouvoir se poursuivre.

Certains microARNs trouvés comme différentiellement exprimés dans le plasma avec la méthode de séquençage haut débit ne sont pas exprimés de manière significative dans le plasma avec la méthode d'analyse TaqMan, bien qu'ils soient significativement exprimés dans le foie. Nous émettons l'hypothèse que ces différences d'expressions sont dues à une analyse en TaqMan moins rigoureuse que celle du séquençage haut débit qui comporte des étapes de contrôle et de validation des échantillons par électrophorèse capillaire. Par ailleurs, nous avons éprouvé des difficultés à doser les microARNs plasmatiques, le plasma étant un fluide particulier et les microARNs très sensibles à la dégradation, la perte conséquente de microARNs au cours des cycles de congélation/décongélation a pu engendrer les différences de niveaux expressions observées. Le protocole d'extraction des ARN totaux dans le plasma demande également à être optimisé.

Cependant, parmi les microARNs les plus différentiellement exprimés dans le plasma, trois microARNs, ont suscité un intérêt de par leur lien étroit avec le métabolisme des lipides et celui du cholestérol : le miR-122\_3p, le miR-107 et le miR-194. Ils semblent être des candidats potentiels de l'établissement de la stéatose hépatique chez le canard mulard. Des analyses supplémentaires doivent être effectuées pour déterminer dans quelle mesure ces miARNs peuvent être utiles dans la production de foie gras. Le développement de biomarqueurs robustes non-invasifs du poids du foie pourrait être d'un grand intérêt pour suivre en temps réel l'évolution de la stéatose hépatique et pourrait contribuer à améliorer la production de foie gras.

Pour conclure, les travaux de cette thèse ont bien contribué à une meilleure connaissance des différents mécanismes et métabolismes impactés par la formation du foie gras et fournissent encore de nombreuses perspectives d'études notamment les mécanismes de protections cellulaires ou encore les microARNs circulants utilisables en tant que biomarqueurs non invasifs de la stéatose hépatique chez le canard mulard... et pourquoi pas inducteurs ?



## **Références bibliographiques**

- Adams, L.A. (2005). Nonalcoholic fatty liver disease. *Can. Med. Assoc. J.* *172*, 899–905.
- Annabelle, T., Karine, R., Marie-Dominique, B., Stéphane, D., and Karine, G. (2017). Kinetics of expression of genes involved in glucose metabolism after the last meal in overfed mule ducks. *Mol. Cell. Biochem.* *430*, 127–137.
- Arrese, M., Eguchi, A., and Feldstein, A.E. (2015). Circulating microRNAs: Emerging Biomarkers of Liver Disease. *Semin. Liver Dis.* *35*, 43–54.
- Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanian, E.L., Stirewalt, D.L., et al. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 5003–5008.
- Auvergne, A., Rémignon, H., Babilé, R., and Baudonnet-Lenfant, C. (1995). Evolution corporelle au cours du gavage chez le canard de Barbarie. *Arch. Für Geflügelkd.* *59*, 234–240.
- Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G., and Fafournoux, P. (2004). Induction of CHOP Expression by Amino Acid Limitation Requires Both ATF4 Expression and ATF2 Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *279*, 5288–5297.
- Avruch, J. (1998). Insulin signal transduction through protein kinase cascades. In *Insulin Action*, A.K. Srivastava, and B.I. Posner, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 31–48.
- Babile, R., Auvergne, A., Dubois, J.P., Benard, G., and Manse, H. (1998). Reversibilité de la stéatose hépatique chez l’oie. 3èmes Journées de la recherche sur les Palmipèdes à Foie “gras”. Bordeaux, France (October).
- Baéza, E., Rideau, N., Chartrin, P., Davail, S., Hoo-Paris, R., Mourot, J., Guy, G., Bernadet, M.D., Juin, H., and Météau, K. (2005). Canards de Barbarie, Pékin et leurs hybrides: aptitude à l’engraissement. *INRA Prod. Anim.* *18*, 131–141.
- Baeza, E., Marie-Etancelin, C., Davail, S., and Diot, C. (2013). La stéatose hépatique chez les palmipèdes. *INRA Prod. Anim.* *26*, 403–414.
- Baéza, E., Marie-Etancelin, C., Davail, S., and Diot, C. (2013). La stéatose hépatique chez les palmipèdes. *INRA Prod Anim* *26*, 403–414.
- Bai, X., and Jiang, Y. (2010). Key factors in mTOR regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 239–253.
- Ban, J.-J., Lee, M., Im, W., and Kim, M. (2015). Low pH increases the yield of exosome isolation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *461*, 76–79.
- Banerjee, D., and 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.
- Barbosa-Tessmann, I.P. (2000). Activation of the Human Asparagine Synthetase Gene by the Amino Acid Response and the Endoplasmic Reticulum Stress Response Pathways Occurs by Common Genomic Elements. *J. Biol. Chem.*

- Bardag-Gorce, F., Francis, T., Nan, L., Li, J., He Lue, Y., French, B.A., and French, S.W. (2005). Modifications in P62 occur due to proteasome inhibition in alcoholic liver disease. *Life Sci.* 77, 2594–2602.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281–297.
- Baudonnet-Lenfant, C. (1993). Facteurs de variation de la composition biochimique et de la qualité technologique des foies gras de canards.
- Baulande, S., Criqui, A., and Duthieuw, M. (2014). Les microARN circulants, une nouvelle classe de biomarqueurs pour la médecine. *médecine/sciences* 30, 289–296.
- B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2013). The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* 41, 7683–7699.
- Benard, G., and Labie, C. (1998). Evolution histologique du foie des Palmipèdes au cours du gavage. 3èmes Journées de la recherche sur les Palmipèdes à Foie gras. Bordx. France October 27–28.
- Bénard, G., Bénard, P., Prehn, D., Bengone, T., Jouglar, J.Y., and Durand, S. (1998). Démonstration de la réversibilité de la stéatose hépatique obtenue par gavage de canards mulards. *Etude Réalis. Sur* 3, 49–52.
- Benard, G., Bengone, T., Prehn, D., Durand, S., Labie, C., and Benard, P. (2006). Contribution à l'étude de la physiologie du canard en gavage : étude de la stéatose hépatique. *Bull. Académie Vét. Fr.* 43.
- Berradi, H., Guy, G., and Rideau, N. (2004). A glucokinase-like enzyme induced in Mule duck livers by overfeeding. *Poult. Sci.* 83, 161–168.
- Bonnefont, C.M.D., Molette, C., Lavigne, F., Manse, H., Bravo, C., Lo, B., Rémignon, H., Arroyo, J., and Bouillier-Oudot, M. (2019). Evolution of liver fattening and foie gras technological yield during the overfeeding period in mule duck. *Poult. Sci.*
- Bourneuf, E., Hérault, F., Chicault, C., Carré, W., Assaf, S., Monnier, A., Mottier, S., Lagarrigue, S., Douaire, M., Mosser, J., et al. (2006). Microarray analysis of differential gene expression in the liver of lean and fat chickens. *Gene* 372, 162–170.
- Boya, P., Reggiori, F., and Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat. Cell Biol.* 15, 713–720.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLOS Biol.* 3, e85.
- Browning, J.D., and Horton, J.D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury.
- Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Maurin, A.-C., Chaveroux, C., Parry, L., Averous, J., Mesclon, F., and Fafournoux, P. (2015). L'activation de la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4, une réponse adaptative au stress cellulaire. *médecine/sciences* 31, 1057–1060.

- Brun, J., Richard, M.M., Marie-Etancelin, C., Rouvier, R., and Larzul, C. (2005). Le canard mulard: déterminisme génétique d'un hybride intergénérique. *Prod. Anim.-PARIS-Inst. Natl. Rech. Agron.- 18*, 295.
- Brunt, E.M. (2010). Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 195–203.
- Byrne, C.D., and Targher, G. (2015). NAFLD: A multisystem disease. *J. Hepatol.* 62, S47–S64.
- Cabon, L., Martinez-Torres, A.-C., and Susin, S.A. (2013). La mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire. *médecine/sciences* 29, 1117–1124.
- Caldwell, S.H., Swerdlow, R.H., Khan, E.M., Iezzoni, J.C., Hespeneide, E.E., Parks, J.K., and Parker, W.D. (1999). Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* 31, 430–434.
- Capeau, J. (2003). Voies de signalisation de l'insuline : mécanismes affectés dans l'insulino-résistance. *médecine/sciences* 19, 834–839.
- Carlson, C.J., White, M.F., and Rondinone, C.M. (2004). Mammalian target of rapamycin regulates IRS-1 serine 307 phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 533–539.
- Cazeils, J.L., Bouillier-Oudot, M., Auvergne, A., Candau, M., and Babile, R. (1999). Lipid composition of hepatocyte plasma membranes from geese overfed with corn. *Lipids* 34, 937–942.
- Chalasanani, N., Deeg, M., and Crabb, D. (2004). Systemic Levels of Lipid Peroxidation and Its Metabolic and Dietary Correlates in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 99, 1497–1502.
- Chartrin, P., Bernadet, M.-D., Guy, G., Mourot, J., Hocquette, J.-F., Rideau, N., Duclos, M.J., and Baéza, E. (2006a). Does overfeeding enhance genotype effects on liver ability for lipogenesis and lipid secretion in ducks? *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 145, 390–396.
- Chartrin, P., Bernadet, M.-D., Guy, G., Mourot, J., Hocquette, J.-F., Rideau, N., Duclos, M.J., and Baéza, E. (2006b). Does overfeeding enhance genotype effects on energy metabolism and lipid deposition in breast muscle of ducks? *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 145, 413–418.
- Chen, F., Zhang, H., Li, J., Tian, Y., Xu, J., Chen, L., Wei, J., Zhao, N., Yang, X., Zhang, W., et al. (2017). Identification of differentially expressed miRNAs in the fatty liver of Landes goose ( *Anser anser* ). *Sci. Rep.* 7, 1–9.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., et al. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 18, 997–1006.
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., and Zhang, C.-Y. (2012). Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol.* 22, 125–132.

- Chen, Y., Gao, D.-Y., and Huang, L. (2015). In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: Challenges and strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *81*, 128–141.
- Cheng, S.W.Y., Fryer, L.G.D., Carling, D., and Shepherd, P.R. (2004). Thr2446 Is a Novel Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Phosphorylation Site Regulated by Nutrient Status. *J. Biol. Chem.* *279*, 15719–15722.
- Cheung, O., Puri, P., Eicken, C., Contos, M.J., Mirshahi, F., Maher, J.W., Kellum, J.M., Min, H., Luketic, V.A., and Sanyal, A.J. (2008). Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology* *48*, 1810–1820.
- Chevillet, J.R., Kang, Q., Ruf, I.K., Briggs, H.A., Vojtech, L.N., Hughes, S.M., Cheng, H.H., Arroyo, J.D., Meredith, E.K., Gallichotte, E.N., et al. (2014). Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 14888–14893.
- Chim, S.S.C., Shing, T.K.F., Hung, E.C.W., Leung, T., Lau, T., Chiu, R.W.K., and Lo, Y.M.D. (2008). Detection and Characterization of Placental MicroRNAs in Maternal Plasma. *Clin. Chem.* *54*, 482–490.
- Chitturi, S., Abeygunasekera, S., Farrell, G.C., Holmes-Walker, J., Hui, J.M., Fung, C., Karim, R., Lin, R., Samarasinghe, D., Liddle, C., et al. (2002). NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* *35*, 373–379.
- Codogno, P., and Meijer, A.J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.* *12*, 1509–1518.
- Copp, J., Manning, G., and Hunter, T. (2009). TORC-Specific Phosphorylation of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Phospho-Ser<sup>2481</sup> Is a Marker for Intact mTOR Signaling Complex 2. *Cancer Res.* *69*, 1821–1827.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* *16*, 10881–10890.
- Coudert, E., Crochet, S., Cailleau-Audouin, E., Bordeau, T., Collin, A., Berri, C., Tesseraud, S., and Métayer-Coustard, S. (2015a). Expression and ontogenesis of glucose transporters SLC2A-1, -8 and -12 in different chicken muscles [Conference poster]. Actes 11èmes Journ. Rech. Avic. Palmipèdes À Foie Gras Tours Fr. 25 26 Mars 2015 819–822.
- Coudert, E., Pascal, G., Dupont, J., Simon, J., Cailleau-Audouin, E., Crochet, S., Duclos, M.J., Tesseraud, S., and Métayer-Coustard, S. (2015b). Phylogenesis and Biological Characterization of a New Glucose Transporter in the Chicken (*Gallus gallus*), GLUT12. *PLOS ONE* *10*, e0139517.
- Couzinet, A., Hérincs, Z., and Hueber, A.-O. (2002). Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *médecine/sciences* *18*, 841–852.
- Crozier, S.J., Kimball, S.R., Emmert, S.W., Anthony, J.C., and Jefferson, L.S. (2005). Oral Leucine Administration Stimulates Protein Synthesis in Rat Skeletal Muscle. *J. Nutr.* *135*, 376–382.

- Cuervo, A.M. (2004). Autophagy: Many paths to the same end. *Mol. Cell. Biochem.* 263, 55–72.
- Cuervo, A.M., Bergamini, E., Brunk, U.T., Dröge, W., Ffrench, M., and Terman, A. (2005). Autophagy and Aging: The Importance of Maintaining “Clean” Cells. *Autophagy* 1, 131–140.
- Dai, W., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Seiliez, I., and Skiba-Cassy, S. (2015). Amino Acids Attenuate Insulin Action on Gluconeogenesis and Promote Fatty Acid Biosynthesis via mTORC1 Signaling Pathway in trout Hepatocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 36, 1084–1100.
- Davail, S., Rideau, N., Guy, G., André, J.-M., Hermier, D., and Hoo-Paris, R. (2003a). Hormonal and metabolic responses to overfeeding in three genotypes of ducks. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 134, 707–715.
- Davail, S., Rideau, N., Guy, G., André, J.-M., Hermier, D., and Hoo-Paris, R. (2003b). Hormonal and metabolic responses to overfeeding in three genotypes of ducks. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 134, 707–715.
- Dentin, R., Benhamed, F., Pégurier, J.-P., Foufelle, F., Viollet, B., Vaulont, S., Girard, J., and Postic, C. (2005). Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation.
- Desagher, S., and Martinou, J.-C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10, 369–377.
- Desvignes, T., Fauvel, C., and Bobe, J. (2011). The nme gene family in zebrafish oogenesis and early development. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 384, 439–449.
- Dietschy, J.M., Turley, S.D., and Spady, D.K. (1993). Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J. Lipid Res.* 34, 1637–1659.
- Dolnik, V.R., and Blyumental, T.I. (1967). Autumnal Premigratory and Migratory Periods in the Chaffinch (*Fringilla coelebs coelebs*) and Some Other Temperate-Zone Passerine Birds. *The Condor* 69, 435–468.
- Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J., and Hinnebusch, A.G. (2000). Uncharged tRNA Activates GCN2 by Displacing the Protein Kinase Moiety from a Bipartite tRNA-Binding Domain. *Mol. Cell* 6, 269–279.
- Dufner, A., and Thomas, G. (1999). Ribosomal S6 Kinase Signaling and the Control of Translation. *Exp. Cell Res.* 253, 100–109.
- Duve, C. de, and Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Ann Rev Physiol* 28, 435–492.
- Eaton, S. (2002). Control of mitochondrial  $\beta$ -oxidation flux. *Prog. Lipid Res.* 41, 197–239.
- Elmén, J., Lindow, M., Silahtaroglu, A., Bak, M., Christensen, M., Lind-Thomsen, A., Hedtjærn, M., Hansen, J.B., Hansen, H.F., Straarup, E.M., et al. (2008). Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res.* 36, 1153–1162.



- Esau, C., Davis, S., Murray, S.F., Yu, X.X., Pandey, S.K., Pear, M., Watts, L., Booten, S.L., Graham, M., McKay, R., et al. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 3, 87–98.
- Esquela-Kerscher, A., and Slack, F.J. (2006). Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 259–269.
- Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J.-L., and Mignotte, B. (2012). The Mitochondrial Pathways of Apoptosis. In *Advances in Mitochondrial Medicine*, R. Scatena, P. Bottoni, and B. Giardina, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 157–183.
- Fantini, J., Epanand, R.M., and Barrantes, F.J. (2019). Cholesterol-Recognition Motifs in Membrane Proteins. In *Direct Mechanisms in Cholesterol Modulation of Protein Function*, A. Rosenhouse-Dantsker, and A.N. Bukiya, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 3–25.
- Farhat, A., and 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.
- Fernandez, X., Bouillier-Oudot, M., Molette, C., Bernadet, M.D., and 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, 2360–2369.
- Fernandez, X., Guy, G., Laverze, J.B., Bonnefont, C., Knudsen, C., and Fortun-Lamothe, L. (2016). A kinetic study of the natural induction of liver steatosis in Greylag Landaise geese: the role of hyperphagia 1. *animal* 10, 1288–1295.
- Finn, P.F., and Dice, J.F. (2006). Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition* 22, 830–844.
- Flamment, M., and Foufelle, F. (2013). Le stress du réticulum endoplasmique: de la physiologie à la pathogenèse du diabète de type 2. *médecine/sciences* 29, 756–764.
- Fleming, G.B. (1919). Carbohydrate metabolism in ducks. *J. Physiol.* 53, 236–246.
- Ford, E.S., Giles, W.H., and Dietz, W.H. (2002). Prevalence of the Metabolic Syndrome Among US Adults: Findings From the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 287, 356–359.
- Foufelle, F., and Ferré, P. (2007). La réponse UPR: Son rôle physiologique et physiopathologique. *médecine/sciences* 23, 291–296.
- François, Y., Marie-Etancelin, C., Vignal, A., Viala, D., Davail, S., and Molette, C. (2014a). Mule Duck “Foie Gras” Shows Different Metabolic States According to Its Quality Phenotype by Using a Proteomic Approach. *J. Agric. Food Chem.* 62, 7140–7150.
- François, Y., Marie-Etancelin, C., Vignal, A., Viala, D., Davail, S., and Molette, C. (2014b). Mule Duck “Foie Gras” Shows Different Metabolic States According to Its Quality Phenotype by Using a Proteomic Approach. *J. Agric. Food Chem.* 62, 7140–7150.

- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.
- Gabarrou, J., Salichon, M., Guy, G., and Blum, J. (1996). Hybrid ducks overfed with boiled corn develop an acute hepatic steatosis with decreased choline and polyunsaturated fatty acid level in phospholipids. *Reprod. Nutr. Dev.* *36*, 473–484.
- Geng, J., and Klionsky, D.J. (2010). The Golgi as a potential membrane source for autophagy. *Autophagy* *6*, 950–951.
- Girard, M., Jacquemin, E., Munnich, A., Lyonnet, S., and Henrion-Caude, A. (2008). miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J. Hepatol.* *48*, 648–656.
- Goedeke, L., and Fernández-Hernando, C. (2012). Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 915–930.
- Goldberg, I.J. (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Lipid Res.* *37*, 693–707.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2009). The LDL Receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *29*, 431–438.
- Gontier, K., André, J.-M., Bernadet, M.-D., Ricaud, K., and 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.
- Gonzalez, J., Düttmann, H., and Wink, M. (2009). Phylogenetic relationships based on two mitochondrial genes and hybridization patterns in Anatidae. *J. Zool.* *279*, 310–318.
- González-Rodríguez, á, Mayoral, R., Agra, N., Valdecantos, M.P., Pardo, V., Miquilena-Colina, M.E., Vargas-Castrillón, J., Lo Iacono, O., Corazzari, M., Fimia, G.M., et al. (2014). Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death Dis.* *5*, e1179–e1179.
- Goodridge, A.G., Back, D.W., Wilson, S.B., and Goldman, M.J. (1986). Regulation of Genes for Enzymes Involved in Fatty Acid Synthesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *478*, 46–62.
- Gosmain, Y., Dif, N., Berbe, V., Loizon, E., Rieusset, J., Vidal, H., and Lefai, E. (2005). Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *J. Lipid Res.* *46*, 697–705.
- Green, D.R. (2011). The End and After: How Dying Cells Impact the Living Organism. *Immunity* *35*, 441–444.
- Gueguen, Y., Ferrari, L., Souidi, M., Batt, A.-M., Lutton, C., Siest, G., and Visvikis, S. (2007). Compared Effect of Immunosuppressive Drugs Cyclosporine A and Rapamycin on Cholesterol Homeostasis Key Enzymes CYP27A1 and HMG-CoA Reductase. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* *100*, 392–397.
- Guo, F., and Cavener, D.R. (2007). The GCN2 eIF2 $\alpha$  Kinase Regulates Fatty-Acid Homeostasis in the Liver during Deprivation of an Essential Amino Acid. *Cell Metab.* *5*, 103–114.

- Guo, J., Shu, G., Zhou, L., Zhu, X., Liao, W., Wang, S., Yang, J., Zhou, G., Xi, Q., Gao, P., et al. (2013). Selective transport of long-chain fatty acids by FAT/CD36 in skeletal muscle of broilers. *animal* 7, 422–429.
- Guy, G., Rousselot-Pailley, D., and 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.
- Guy, G., Fortun-Lamothe, L., Bénard, G., and Fernandez, X. (2013). Natural induction of spontaneous liver steatosis in Greylag Landaise geese (*Anser anser*). *J. Anim. Sci.* 91, 455–464.
- Ha, J., Guan, K.-L., and Kim, J. (2015). AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism. *Mol. Aspects Med.* 46, 46–62.
- Haas, M.E., Attie, A.D., and Biddinger, S.B. (2013). The regulation of ApoB metabolism by insulin. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 391–397.
- Hajri, T., and Abumrad, N.A. (2002). FATTY ACID TRANSPORT ACROSS MEMBRANES: Relevance to Nutrition and Metabolic Pathology. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 383–415.
- Halliwell, B.E. (1989). Lipid peroxidation: a radical chain reaction. *Free Radic. Biol. Med.*
- Han, J., and Kaufman, R.J. (2016). The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J. Lipid Res.* 57, 1329–1338.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Mol. Cell* 11, 619–633.
- Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18, 1926–1945.
- Hayes, C.N., and Chayama, K. (2016). MicroRNAs as Biomarkers for Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 280.
- Hayes, J., Peruzzi, P.P., and Lawler, S. (2014). MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol. Med.* 20, 460–469.
- Hazelwood, R.L., and Lorenz, F.W. (1959). Effects of fasting and insulin on carbohydrate metabolism of the domestic fowl. *Am. J. Physiol.-Leg. Content.*
- He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67–93.
- He, J., Tian, Y., Li, J., Shen, J., Tao, Z., Fu, Y., Niu, D., and 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, 189–195.
- He, J., Wang, W., Lu, L., Tian, Y., Niu, D., Ren, J., Dong, L., Sun, S., Zhao, Y., Chen, L., et al. (2016). Analysis of miRNAs and their target genes associated with lipid metabolism in duck liver. *Sci. Rep.* 6, 1–9.

- He, J., Tian, Y., Zhao, Y., Liu, Y., Tao, Z., Li, G., Niu, D., Lu, L., and Lu, Y. (2017). MiR-144 affects fatty acid composition by regulating ELOVL6 expression in duck hepatocytes. *Cell Biol. Int.* *41*, 691–696.
- Hérault, F., Saez, G., Robert, E., Mohammad, A.A., Davail, S., Chartrin, P., Baéza, E., and Diot, C. (2009). Liver gene expression in relation to hepatic steatosis and lipid secretion in two duck species. *Anim. Genet.* *41*, 12–20.
- Hermier, D., Saadoun, A., Salichon, M.-R., Sellier, N., Rousselot-Paillet, D., and Chapman, M.J. (1991). Plasma lipoproteins and liver lipids in two breeds of geese with different susceptibility to hepatic steatosis: Changes induced by development and force-feeding. *Lipids* *26*, 331–339.
- Hermier, D., Salichon, M.R., Guy, G., Peresson, R., Mourot, J., and Lagarrigue, S. (1999). La stéatose hépatique des palmipèdes gavés : bases métaboliques et sensibilité génétique. *Prod. Anim.* *4* 12 265-271 1999.
- Hermier, D., Guy, G., Guillaumin, S., Davail, S., André, J.-M., and Hoo-Paris, R. (2003). Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *135*, 663–675.
- Hu, J., Xu, Y., Hao, J., Wang, S., Li, C., and Meng, S. (2012). MiR-122 in hepatic function and liver diseases. *Protein Cell* *3*, 364–371.
- Humphrey, B.D., Stephensen, C.B., Calvert, C.C., and 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*, 515–525.
- Hussain, M.M., Rava, P., Walsh, M., Rana, M., and Iqbal, J. (2012). Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutr. Metab.* *9*, 14.
- Iizuka, K., Bruick, R.K., Liang, G., Horton, J.D., and Uyeda, K. (2004). Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 7281–7286.
- Iliopoulos, D., Drosatos, K., Hiyama, Y., Goldberg, I.J., and Zannis, V.I. (2010). MicroRNA-370 controls the expression of MicroRNA-122 and Cpt1 $\alpha$  and affects lipid metabolism. *J. Lipid Res.* *51*, 1513–1523.
- Inui, M., Martello, G., and Piccolo, S. (2010). MicroRNA control of signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 252–263.
- Ishii, S., Iizuka, K., Miller, B.C., and Uyeda, K. (2004). Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 15597–15602.
- Iurlaro, R., and Muñoz-Pinedo, C. (2016). Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J.* *283*, 2640–2652.
- Ivey, K.N., and Srivastava, D. (2010). MicroRNAs as Regulators of Differentiation and Cell Fate Decisions. *Cell Stem Cell* *7*, 36–41.

Iwata, J., Ezaki, J., Komatsu, M., Yokota, S., Ueno, T., Tanida, I., Chiba, T., Tanaka, K., and Kominami, E. (2006). Excess Peroxisomes Are Degraded by Autophagic Machinery in Mammals. *J. Biol. Chem.* *281*, 4035–4041.

Jefferies, H.B.J., Fumagalli, S., Dennis, P.B., Reinhard, C., Pearson, R.B., and Thomas, G. (1997). Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.* *16*, 3693–3704.

Jordan, S.D., Krüger, M., Willmes, D.M., Redemann, N., Wunderlich, F.T., Brönneke, H.S., Merkwirth, C., Kashkar, H., Olkkonen, V.M., Böttger, T., et al. (2011). Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nat. Cell Biol.* *13*, 434–446.

Kilberg, M.S., Shan, J., and Su, N. (2009). ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol. Metab.* *20*, 436–443.

Kilberg, M.S., Balasubramanian, M., Fu, L., and Shan, J. (2012). The Transcription Factor Network Associated With the Amino Acid Response in Mammalian Cells. *Adv. Nutr.* *3*, 295–306.

Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J.J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* *462*, 245–253.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* *13*, 132–141.

Kimball, S., and Jefferson, L. (2002). Control of protein synthesis by amino acid availability. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *5*, 63–67.

Klionsky, D.J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.* *118*, 7–18.

Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozana, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., and Adeli, K. (2016a). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* *12*, 1–222.

Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozana, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016b). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* *12*, 1–222.

Knudsen, C., Bonnefont, C., Fortun-Lamothe, L., Ricaud, K., and Fernandez, X. (2018). L'engraissement spontané du foie chez les palmipèdes : état des lieux et perspectives de recherche. *INRA Prod. Anim.* *31*, 117–130.

Koga, H., Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2010). Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB J.* *24*, 3052–3065.

Kono, T., Nishida, M., Nishiki, Y., Seki, Y., Sato, K., and Dr, Y.A. (2005). Characterisation of glucose transporter (GLUT) gene expression in broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* *46*, 510–515.

Koressaar, T., and Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* *23*, 1289–1291.

- Kostyniuk, D.J., Culbert, B.M., Mennigen, J.A., and Gilmour, K.M. (2018). Social status affects lipid metabolism in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *315*, R241–R255.
- Krützfeldt, J., and Stoffel, M. (2006). MicroRNAs: A new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metab.* *4*, 9–12.
- Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs.’ *Nature* *438*, 685–689.
- Kumar, K.A., Lalitha, A., Pavithra, D., Padmavathi, I.J., Ganeshan, M., Rao, K.R., Venu, L., Balakrishna, N., Shanker, N.H., and Reddy, S.U. (2013). Maternal dietary folate and/or vitamin B12 restrictions alter body composition (adiposity) and lipid metabolism in Wistar rat offspring. *J. Nutr. Biochem.* *24*, 25–31.
- Labie, C., and Tournut, J. (1970). Investigations on the histological and biochemical modifications in geese subject to cramming. *Cah. Med. Veterinaire.*
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2009). mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* *122*, 3589–3594.
- Larzul, C., Imbert, B., Bernadet, M.-D., Guy, G., and Rémygnon, H. (2006). Meat quality in an intergeneric factorial crossbreeding between muscovy ( *Cairina moschata* ) and Pekin ( *Anas platyrhynchos* ) ducks. *Anim. Res.* *55*, 219–229.
- Laudadio, I., Manfroid, I., Achouri, Y., Schmidt, D., Wilson, M.D., Cordi, S., Thorrez, L., Knoop, L., Jacquemin, P., Schuit, F., et al. (2012). A Feedback Loop Between the Liver-Enriched Transcription Factor Network and Mir-122 Controls Hepatocyte Differentiation. *Gastroenterology* *142*, 119–129.
- Leclercq, B., Blum, J.C., and Salichon, M.R. (1975). ÉTUDE DE LA SURALIMENTATION FORCÉE : EFFETS SUR LE MÉTABOLISME HÉPATIQUE ET LES FORMES DE TRANSPORT HÉPATIQUES CHEZ LE CANARD. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* *15*, 559–568.
- Lee, J.-S., Mendez, R., Heng, H.H., Yang, Z., and Zhang, K. Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. *12*.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843–854.
- Lemasters, J.J. (2005). Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Rejuvenation Res.* *8*, 3–5.
- Lepesheva, G.I., Ott, R.D., Hargrove, T.Y., Kleshchenko, Y.Y., Schuster, I., Nes, W.D., Hill, G.C., Villalta, F., and Waterman, M.R. (2007). Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase as a Potential Target for Antitrypanosomal Therapy: Enzyme Inhibition and Parasite Cell Growth. *Chem. Biol.* *14*, 1283–1293.
- Lewis, A.P., and Jopling, C.L. (2010). Regulation and biological function of the liver-specific miR-122. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 1553–1557.

- Liu, H.-Y., Han, J., Cao, S.Y., Hong, T., Zhuo, D., Shi, J., Liu, Z., and Cao, W. (2009). Hepatic Autophagy Is Suppressed in the Presence of Insulin Resistance and Hyperinsulinemia INHIBITION OF FoxO1-DEPENDENT EXPRESSION OF KEY AUTOPHAGY GENES BY INSULIN. *J. Biol. Chem.* 284, 31484–31492.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402–408.
- Locsmáncsi, L., Romvári, R., Bogenfürst, F., Szabó, A., Molnár, M., Andrásy-Baka, G., and Horn, P. (2005). In vivo studies on goose liver development by means of computer tomography. *Anim. Res.* 54, 135–145.
- Locsmáncsi, L., Hegedüs, G., Andrásy-Baka, G., Bogenfürst, F., and Romvári, R. (2007). Following the goose liver development by means of cross-sectional digital imaging, liver histology and blood biochemical parameters. *Acta Biol. Hung.*
- Loguercio, C., De Girolamo, V., de Sio, I., Tuccillo, C., Ascione, A., Baldi, F., Budillon, G., Cimino, L., Di Carlo, A., Pia Di Marino, M., et al. (2001). Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects. *J. Hepatol.* 35, 568–574.
- Lorenz, M.C., and Heitman, J. (1995). TOR Mutations Confer Rapamycin Resistance by Preventing Interaction with FKBP12-Rapamycin. *J. Biol. Chem.* 270, 27531–27537.
- Lu, P.D., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.* 167, 27–33.
- Lutter, D., Marr, C., Krumsiek, J., Lang, E.W., and Theis, F.J. (2010). Intronic microRNAs support their host genes by mediating synergistic and antagonistic regulatory effects. *BMC Genomics* 11, 224.
- Marandel, L., Labbe, C., Bobe, J., Jammes, H., Lareyre, J.-J., and Le Bail, P.-Y. (2013). Do not put all teleosts in one net: Focus on the *sox2* and *pou2* genes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 164, 69–79.
- Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, A.M., Bianchi, G., Bugianesi, E., McCullough, A.J., Forlani, G., and Melchionda, N. (1999). Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am. J. Med.* 107, 450–455.
- Mariño, G., Pietrocola, F., Eisenberg, T., Kong, Y., Malik, S.A., Andryushkova, A., Schroeder, S., Pendl, T., Harger, A., Niso-Santano, M., et al. (2014). Regulation of Autophagy by Cytosolic Acetyl-Coenzyme A. *Mol. Cell* 53, 710–725.
- Masuoka, H.C., and Chalasani, N. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease: an emerging threat to obese and diabetic individuals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1281, 106–122.
- McGarry, J.D., and Brown, N.F. (1997). The Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase System — From Concept to Molecular Analysis. *Eur. J. Biochem.* 244, 1–14.
- McNeil, C.J., Hay, S.M., Rucklidge, G.J., Reid, M., Duncan, G., Maloney, C.A., and Rees, W.D. (2008). Disruption of lipid metabolism in the liver of the pregnant rat fed folate-deficient and methyl donor-deficient diets. *Br. J. Nutr.* 99, 262–271.

- McNeil, C.J., Hay, S.M., Rucklidge, G.J., Reid, M.D., Duncan, G.J., and Rees, W.D. (2009). Maternal diets deficient in folic acid and related methyl donors modify mechanisms associated with lipid metabolism in the fetal liver of the rat. *Br. J. Nutr.* *102*, 1445–1452.
- Meerson, A., Traurig, M., Ossowski, V., Fleming, J.M., Mullins, M., and Baier, L.J. (2013). Human adipose microRNA-221 is upregulated in obesity and affects fat metabolism downstream of leptin and TNF- $\alpha$ . *Diabetologia* *56*, 1971–1979.
- Migdal, C., and Serres, M. (2011). Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences* *27*, 405–412.
- Min, H.-K., Kapoor, A., Fuchs, M., Mirshahi, F., Zhou, H., Maher, J., Kellum, J., Warnick, R., Contos, M.J., and Sanyal, A.J. (2012). Increased Hepatic Synthesis and Dysregulation of Cholesterol Metabolism Is Associated with the Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* *15*, 665–674.
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O’Briant, K.C., Allen, A., et al. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 10513–10518.
- Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* *147*, 728–741.
- Molee, W., Bouillier-Oudot, M., Auvergne, A., and Babilé, R. (2005). Changes in lipid composition of hepatocyte plasma membrane induced by overfeeding in duck. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *141*, 437–444.
- Mourot, J. (Institut N. de la R.A., and Kouba, M. (1999). Development of intra- and intermuscular adipose tissue in growing Large White and Meishan pigs [lipogenic enzyme, meat quality]. *Reprod. Nutr. Dev. Fr.*
- Nave, B.T., Ouwens, D.M., Withers, D.J., Alessi, D.R., and Shepherd, P.R. (1999). Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B : identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *5*.
- Niemeyer, H., Ureta, T., and Clark-Turri, L. (1975). Adaptive character of liver glucokinase. *Mol. Cell. Biochem.* *6*, 109–126.
- Nofer, J.-R., Kehrel, B., Fobker, M., Levkau, B., Assmann, G., and Eckardstein, A. von (2002). HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* *161*, 1–16.
- Ortega, F.J., Mercader, J.M., Catalán, V., Moreno-Navarrete, J.M., Pueyo, N., Sabater, M., Gómez-Ambrosi, J., Anglada, R., Fernández-Formoso, J.A., Ricart, W., et al. (2013). Targeting the Circulating MicroRNA Signature of Obesity. *Clin. Chem.* *59*, 781–792.
- Ottosen, S., Parsley, T.B., Yang, L., Zeh, K., Doorn, L.-J. van, Veer, E. van der, Raney, A.K., Hodges, M.R., and Patick, A.K. (2015). In Vitro Antiviral Activity and Preclinical and Clinical Resistance Profile of Miravirsin, a Novel Anti-Hepatitis C Virus Therapeutic Targeting the Human Factor miR-122. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 599–608.



- Pan, M., Maitin, V., Parathath, S., Andreo, U., Lin, S.X., Germain, C.St., Yao, Z., Maxfield, F.R., Williams, K.J., and Fisher, E.A. (2008). Presecretory oxidation, aggregation, and autophagic destruction of apoprotein-B: A pathway for late-stage quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 5862–5867.
- Parzych, K.R., and Klionsky, D.J. (2013). An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 460–473.
- Patti, M.E., Brambilla, E., Luzi, L., Landaker, E.J., and Kahn, C.R. (1998). Bidirectional modulation of insulin action by amino acids.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell* *122*, 927–939.
- Pioche, T., Skiba, F., Bernadet, M.-D., Seiliez, I., Massimino, W., Houssier, M., Tavernier, A., Ricaud, K., Davail, S., Skiba-Cassy, S., et al. (2019). Kinetic study of the expression of genes related to hepatic steatosis, global intermediate metabolism and cellular stress during overfeeding in mule ducks. *BioRxiv* 690156.
- Printz, R.L., Koch, S., Potter, L.R., O’Doherty, R.M., Tiesinga, J.J., Moritz, S., and Granner, D.K. (1993). Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution. *J. Biol. Chem.* *268*, 5209–5219.
- Pritchard, C.C., Kroh, E., Wood, B., Arroyo, J.D., Dougherty, K.J., Miyaji, M.M., Tait, J.F., and Tewari, M. (2012). Blood Cell Origin of Circulating MicroRNAs: A Cautionary Note for Cancer Biomarker Studies. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* *5*, 492–497.
- Rashidpour, A., Silva-Marrero, J.I., Seguí, L., Baanante, I.V., and Metón, I. (2019). Metformin counteracts glucose-dependent lipogenesis and impairs transdeamination in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *316*, R265–R273.
- Ray, K. (2013). NAFLD—the next global epidemic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 621–621.
- Rayner, K.J., Suárez, Y., Dávalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, M.L., Tamehiro, N., Fisher, E.A., Moore, K.J., and Fernández-Hernando, C. (2010). MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* *328*, 1570–1573.
- RegulusTherapeutics, I. (2015). RG-125 (AZD4076), a microRNA therapeutic targeting microRNA 103/107 for the treatment of NASH in patients with type 2 diabetes/Pre-Diabetes, selected as clinical candidate by AstraZeneca. Press Release.
- Rémignon, H., Yahia, R.B.H., Marty-Gasset, N., and Wilkesman, J. (2018). Apoptosis during the development of the hepatic steatosis in force-fed ducks and cooking yield implications. *Poult. Sci.* *97*, 2211–2217.
- Roberts, T.C. (2015). The microRNA machinery. In *MicroRNA: Basic Science*, (Springer), pp. 15–30.
- Roblin, X., Pofelski, J., and Zarski, J.-P. (2007). Role de l’homocysteine au cours de la steatose hepatique et de l’hepatite chronique C. *Gastroentérologie Clin. Biol.* *31*, 415–420.

- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Res.* *14*, 1902–1910.
- Rogers, M.A., Liu, J., Song, B.-L., Li, B.-L., Chang, C.C.Y., and Chang, T.-Y. (2015). Acyl-CoA:cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): Enzymes with multiple sterols as substrates and as activators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *151*, 102–107.
- Rong, M., Chen, G., and Dang, Y. (2013). Increased MiR-221 expression in hepatocellular carcinoma tissues and its role in enhancing cell growth and inhibiting apoptosis in vitro. *BMC Cancer* *13*, 21.
- Rowland, A.A., and Voeltz, G.K. (2012). Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 607–615.
- Roybal, C.N., Hunsaker, L.A., Barbash, O., Jagt, D.L.V., and Abcouwer, S.F. (2005). The Oxidative Stressor Arsenite Activates Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Transcription by an ATF4-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* *280*, 20331–20339.
- Rozen, S., and Skaletsky, H. (1999). Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols*, S. Misener, and S.A. Krawetz, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 365–386.
- Saadoun, A., and Leclercq, B. (1987). In Vivo Lipogenesis of Genetically Lean and Fat Chickens: Effects of Nutritional State and Dietary Fat. *J. Nutr.* *117*, 428–435.
- Saez, G., Davail, S., Gentes, G., Hocquette, J.F., Jourdan, T., Degrace, P., and Baeza, E. (2009). Gene expression and protein content in relation to intramuscular fat content in Muscovy and Pekin ducks. *Poult. Sci.* *88*, 2382–2391.
- Saitoh, M., Pullen, N., Brennan, P., Cantrell, D., Dennis, P.B., and Thomas, G. (2002). Regulation of an Activated S6 Kinase 1 Variant Reveals a Novel Mammalian Target of Rapamycin Phosphorylation Site. *J. Biol. Chem.* *277*, 20104–20112.
- Salichon, M.R., Guy, G., Rousselot, D., and Blum, J.C. (1994). Composition des 3 types de foie gras: oie, canard mulard et canard de Barbarie. In *Annales de Zootechnie*, pp. 213–220.
- Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* *414*, 799.
- Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C.P., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.W., and Lienhard, G.E. (2003). Insulin-stimulated Phosphorylation of a Rab GTPase-activating Protein Regulates GLUT4 Translocation. *J. Biol. Chem.* *278*, 14599–14602.
- Sanyal, A.J., Campbell–Sargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W.B., Contos, M.J., Sterling, R.K., Luketic, V.A., Shiffman, M.L., and Clore, J.N. (2001). Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* *120*, 1183–1192.
- Schulze, R.J., Sathyanarayan, A., and Mashek, D.G. (2017). Breaking fat: The regulation and mechanisms of lipophagy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1862*, 1178–1187.

- Séité, S., Pioche, T., Ory, N., Plagnes-Juan, E., Panserat, S., and Seiliez, I. (2019). The Autophagic Flux Inhibitor Bafilomycine A1 Affects the Expression of Intermediary Metabolism-Related Genes in Trout Hepatocytes. *Front. Physiol.* *10*.
- Seki, Y., Sato, K., Kono, T., Abe, H., and Akiba, Y. (2003). Broiler chickens (Ross strain) lack insulin-responsive glucose transporter GLUT4 and have GLUT8 cDNA. *Gen. Comp. Endocrinol.* *133*, 80–87.
- Senft, D., and Ronai, Z.A. (2015). UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 141–148.
- Shefer, S., Salen, G., Honda, A., Batta, A.K., Nguyen, L.B., Tint, G.S., Ioannou, Y.A., and Desnick, R. (1998). Regulation of rat hepatic 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 7-reductase: substrate specificity, competitive and non-competitive inhibition, and phosphorylation/dephosphorylation. *J. Lipid Res.* *39*, 2471–2476.
- Shen, Y., and White, E. (2001). p53-Dependent apoptosis pathways. In *Advances in Cancer Research*, (Academic Press), pp. 55–84.
- Shen, W.-J., Azhar, S., and Kraemer, F.B. (2018). SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annu. Rev. Physiol.* *80*, 95–116.
- Simonen, P., Kotronen, A., Hallikainen, M., Sevastianova, K., Makkonen, J., Hakkarainen, A., Lundbom, N., Miettinen, T.A., Gylling, H., and Yki-Järvinen, H. (2011). Cholesterol synthesis is increased and absorption decreased in non-alcoholic fatty liver disease independent of obesity. *J. Hepatol.* *54*, 153–159.
- Singh, R., and Cuervo, A.M. (2011). Autophagy in the Cellular Energetic Balance. *Cell Metab.* *13*, 495–504.
- Singh, R., and Cuervo, A.M. (2012). Lipophagy: Connecting Autophagy and Lipid Metabolism. *Int. J. Cell Biol.* *2012*, 1–12.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009a). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* *458*, 1131–1135.
- Singh, R., Wang, Y., Xiang, Y., Tanaka, K.E., Gaarde, W.A., and Czaja, M.J. (2009b). Differential effects of JNK1 and JNK2 inhibition on murine steatohepatitis and insulin resistance. *Hepatology* *49*, 87–96.
- Siuta-Mangano, P., Janero, D.R., and 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.
- Skiba-Cassy, S., Collin, A., Chartrin, P., Médale, F., Simon, J., Duclos, M.J., and Tesseraud, S. (2007). Chicken liver and muscle carnitine palmitoyltransferase 1: Nutritional regulation of messengers. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *147*, 278–287.
- Smith, B.W., and Adams, L.A. (2011). Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* *48*, 97–113.

- Soifer, H.S., Rossi, J.J., and Sætrom, P. (2007). MicroRNAs in Disease and Potential Therapeutic Applications. *Mol. Ther.* *15*, 2070–2079.
- Solsona-Vilarrasa, E., Fucho, R., Torres, S., Nuñez, S., Nuño-Lámbarki, N., Enrich, C., García-Ruiz, C., and Fernández-Checa, J.C. (2019). Cholesterol enrichment in liver mitochondria impairs oxidative phosphorylation and disrupts the assembly of respiratory supercomplexes. *Redox Biol.* *24*, 101214.
- Stahl, A. (2004). A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflüg. Arch.* *447*, 722–727.
- Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S., and Kauppinen, S. (2012). Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence* *3*, 1.
- Strandholm, J.J., Cardenas, J.M., and Dyson, R.D. (1975). Pyruvate kinase isoenzymes in adult and fetal tissues of chicken. *Biochemistry* *14*, 2242–2246.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., and Yu, Q. (2015). MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget* *6*, 8474–8490.
- Sud, N., Taher, J., and Su, Q. (2015). MicroRNAs and Noncoding RNAs in Hepatic Lipid and Lipoprotein Metabolism: Potential Therapeutic Targets of Metabolic Disorders: NONCODING RNAS AND MICRORNAS IN ANTIMETABOLIC SYNDROME. *Drug Dev. Res.* *76*, 318–327.
- Takane, K., Fujishima, K., Watanabe, Y., Sato, A., Saito, N., Tomita, M., and Kanai, A. (2010). Computational prediction and experimental validation of evolutionarily conserved microRNA target genes in bilaterian animals. *BMC Genomics* *11*, 101.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Kahn, C.R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 85–96.
- Tavernier, A., Davail, S., Ricaud, K., Bernadet, M.-D., and Gontier, K. (2016). Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks. *Mol. Cell. Biochem.*
- Tavernier, A., Davail, S., Ricaud, K., Bernadet, M.-D., and Gontier, K. (2017). Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks. *Mol. Cell. Biochem.* *424*, 147–161.
- Tavernier, A., Karine, R., Marie-Dominique, B., Karine, G., and Stéphane, D. (2018). Pre- and post-prandial expression of genes involved in lipid metabolism at the end of the overfeeding period of mule ducks. *Mol. Cell. Biochem.* *438*, 111–121.
- Theron, L., Fernandez, X., Marty-Gasset, N., Pichereaux, C., Rossignol, M., Chambon, C., Viala, D., Astruc, T., and 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.
- Théron, L., Astruc, T., Bouillier-Oudot, M., Molette, C., Vénien, A., Peyrin, F., Vitezica, Z.G., and Fernandez, X. (2011). The fusion of lipid droplets is involved in fat loss during cooking of duck “foie gras.” *Meat Sci.* *89*, 377–383.

- Trajkovski, M., Hausser, J., Soutschek, J., Bhat, B., Akin, A., Zavolan, M., Heim, M.H., and Stoffel, M. (2011). MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* 474, 649–653.
- Tremblay, F., and Marette, A. (2001). Amino Acid and Insulin Signaling via the mTOR/p70 S6 Kinase Pathway A NEGATIVE FEEDBACK MECHANISM LEADING TO INSULIN RESISTANCE IN SKELETAL MUSCLE CELLS. *J. Biol. Chem.* 276, 38052–38060.
- Tsai, W.-C., Hsu, S.-D., Hsu, C.-S., Lai, T.-C., Chen, S.-J., Shen, R., Huang, Y., Chen, H.-C., Lee, C.-H., Tsai, T.-F., et al. (2012). MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J. Clin. Invest.* 122, 2884–2897.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., and Rozen, S.G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115–e115.
- Uyeda, K., and Repa, J.J. (2006). Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab.* 4, 107–110.
- Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D.R. (2000). The PI3K–PDK1 connection : more than just a road to PKB. 16.
- Videla, L.A., Rodrigo, R., Orellana, M., Fernandez, V., Tapia, G., Quiñones, L., Varela, N., Contreras, J., Lazarte, R., Csendes, A., et al. (2004). Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin. Sci.* 106, 261–268.
- Walrand, S., Guillet, C., Salles, J., Tardif, N., Maurin, A.-C., Fafournoux, P., Cano, N., and Boirie, Y. (2008). Acides aminés et signalisation cellulaire. *Nutr. Clin. Métabolisme* 22, 161–167.
- Wang, H., and Eckel, R.H. (2009). Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 297, E271–E288.
- Waterham, H.R., and Wanders, R.J.A. (2000). Biochemical and genetic aspects of 7-dehydrocholesterol reductase and Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1529, 340–356.
- Weber, J.-M. (2009). The physiology of long-distance migration: extending the limits of endurance metabolism. *J. Exp. Biol.* 212, 593–597.
- Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., How Huang, K., Jen Lee, M., Galas, D.J., and Wang, K. (2010). The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin. Chem.* 56, 1733–1741.
- Weltman, M.D., Farrell, G.C., Hall, P., Ingelman-Sundberg, M., and Liddle, C. (1998). Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 27, 128–133.
- White, M.F. (1997). The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40, S2–S17.
- White, M.F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 283, E413–E422.

- Wienholds, E., and Plasterk, R.H.A. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.* *579*, 5911–5922.
- Wilson, J.E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J. Exp. Biol.* *206*, 2049–2057.
- Wu, D., Wang, X., Zhou, R., and Cederbaum, A. (2010). CYP2E1 enhances ethanol-induced lipid accumulation but impairs autophagy in HepG2 E47 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *402*, 116–122.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* *12*, 814–822.
- Yang, J., Fernández-Galilea, M., Martínez-Fernández, L., González-Muniesa, P., Pérez-Chávez, A., Martínez, J.A., and Moreno-Aliaga, M.J. (2019). Oxidative Stress and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation. *Nutrients* *11*, 872.
- Yang, Z., Chen, H., Si, H., Li, X., Ding, X., Sheng, Q., Chen, P., and Zhang, H. (2014). Serum miR-23a, a potential biomarker for diagnosis of pre-diabetes and type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* *51*, 823–831.
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., and Simon, H.-U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1124–1132.
- Zhang, C., and Cuervo, A.M. (2008). Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nat. Med.* *14*, 959–965.
- Zhang, P., McGrath, B.C., Reinert, J., Olsen, D.S., Lei, L., Gill, S., Wek, S.A., Vatter, K.M., Wek, R.C., Kimball, S.R., et al. (2002). The GCN2 eIF2 Kinase Is Required for Adaptation to Amino Acid Deprivation in Mice. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 6681–6688.
- Zhao, R., Feng, J., and He, G. (2014). miR-613 regulates cholesterol efflux by targeting LXR $\alpha$  and ABCA1 in PPAR $\gamma$  activated THP-1 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *448*, 329–334.
- Zhu, L.H., Meng, H., Duan, X.J., Xu, G.Q., Zhang, J., and Gong, D.Q. (2011). Gene expression profile in the liver tissue of geese after overfeeding. *Poult. Sci.* *90*, 107–117.
- Zhuang, X., Chung, K.P., Cui, Y., Lin, W., Gao, C., Kang, B.-H., and Jiang, L. (2017). ATG9 regulates autophagosome progression from the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, E426–E435.



## **Annexes**

## Liste des annexes

### **Article pour les Treizièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à foie gras**

(Tours, France, 20 et 21 mars 2019) :

*Recherche de biomarqueurs de l'établissement de la stéatose hépatique chez le canard mulard : étude cinétique de l'expression de gènes en lien avec le métabolisme du cholestérol et l'autophagie.* **Tracy Pioche**, Fabien Skiba, Marie-Dominique Bernadet, William Massimino, Marianne Houssier, Karine Ricaud, Stéphane Davail, Sandrine Cassy-Skiba, Karine Gontier

### **Poster présenté lors des Doctoriales transfrontalières**

(Arantzazu, Espagne, 16 au 19 octobre 2017)

*Interest in food proteins to stimulate the synthesis of foie gras in overfed mule ducks.* **Tracy Pioche**, Fabien Skiba, Marie-Dominique Bernadet Sandrine Skiba-Cassy, Karine Gontier.

### **Poster présenté lors des Journées de l'école doctorale 2018**

(Pau, France, juin 2018)

*Interest of amino acids to stimulate hepatic steatosis in mule ducks.* **Tracy Pioche**, Fabien Skiba, Marie-Dominique Bernadet Sandrine Skiba-Cassy, Karine Gontier.



**RECHERCHE DE BIOMARQUEURS DE L'ETABLISSEMENT DE LA STEATOSE  
HEPATIQUE CHEZ LE CANARD MULARD : ÉTUDE CINÉTIQUE DE  
L'EXPRESSION DE GENES EN LIEN AVEC LE METABOLISME DU  
CHOLESTEROL ET L'AUTOPHAGIE**

**Tracy Pioche<sup>1</sup>, Fabien Skiba<sup>2</sup>, Marie-Dominique Bernadet<sup>3</sup>, William Massimino<sup>1</sup>,  
Marianne Houssier<sup>1</sup>, Karine Ricaud<sup>1</sup>, Stéphane Davail<sup>1</sup>, Sandrine Cassy-Skiba<sup>1</sup>, Karine  
Gontier<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>INRA, Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme,  
Aquaculture, Saint Pée sur Nivelle, F-64310, France*

*<sup>2</sup>NUTRICIA - route de Saint-Sever - 40280 HAUT-MAUCO*

*<sup>3</sup>UEPFG INRA Bordeaux-Aquitaine - domaine d'Artiguères Benquet - 40280 HAUT-MAUCO*

[tracy.pioche@univ-pau.fr](mailto:tracy.pioche@univ-pau.fr)

**RÉSUMÉ**

Afin d'optimiser le gavage chez le canard, il est indispensable de comprendre les mécanismes sous-jacents du développement de la stéatose hépatique pour proposer de nouvelles stratégies d'élevage. Dans cette étude cinétique, les effets du gavage sur l'expression de gènes en lien avec le métabolisme du cholestérol et l'autophagie ont été analysés chez des canards mulards. Les principaux résultats montrent une augmentation significative du taux de cholestérol plasmatique au cours du gavage ainsi qu'une corrélation positive entre le taux de cholestérol plasmatique et les poids de foie marquée en fin de gavage. De plus, l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol (SOAT1, HMGCR...) augmente significativement au cours du gavage et une forte corrélation existe entre les poids de foie et l'expression de gènes tel que SOAT1, impliqué dans l'estérification et le stockage du cholestérol. Il existe dans le même temps une augmentation significative de gènes impliqués dans des mécanismes de réponse au stress et autophagie (SQSTM1, ASN...). L'établissement de la stéatose hépatique chez le canard mulard se caractériserait ainsi par une modification du métabolisme du cholestérol et l'induction de processus autophagiques.

**ABSTRACT**

**Kinetic study of the expression of genes related to cholesterol metabolism and autophagy during overfeeding in mule ducks**

In order to optimize the overfeeding in ducks, it is essential to understand the mechanisms underlying the development of hepatic steatosis in order to propose new breeding strategies. In this kinetic study, the effects of overfeeding on the expression of genes related to cholesterol metabolism and autophagy were analysed on mule ducks. The main results show a significant increase in plasma cholesterol levels during overfeeding as well as a positive correlation between plasma cholesterol levels and liver weights at the end of the overfeeding. Furthermore, the expression of genes involved in cholesterol metabolism (SOAT1, HMGCR...) increased significantly during overfeeding and there was a strong correlation between liver weights and the expression of genes such as SOAT1, involved in cholesterol storage and esterification. Simultaneously, there was a significant increase of genes involved the mechanisms of stress response and autophagy (SQSTM1, ASN...). The establishment of hepatic steatosis in mule duck may be characterized by a modification of cholesterol metabolism and the induction of autophagic processes.

## INTRODUCTION

Induite par le gavage, la stéatose hépatique (aussi appelée foie gras) est le résultat d'une forte accumulation de triglycérides dans les hépatocytes des oiseaux aquatiques domestiques (Davail *et al.*, 2003). Ce mécanisme, qui est à l'origine une adaptation physiologique des animaux aux besoins énergétiques dans des situations telles que la migration ou l'hibernation, est exploitée aujourd'hui pour la production de foie gras (Hermier *et al.*, 2003). Afin de faire face aux différentes contraintes économiques et réglementaires que supporte cette production, il est nécessaire d'optimiser les conditions d'élevage et de gavage des animaux. Pour cela, différentes options s'offrent à nous : tenter d'identifier des marqueurs du développement du foie gras, mais aussi comprendre les mécanismes sous-jacents liés à ce développement afin de l'optimiser.

Notre modèle animal, le canard mulard est un hybride stérile issu du croisement entre un mâle Barbarie (*Cairina moschata*) et une femelle Pékin (*Anas platyrhynchos*) qui présente des aptitudes à l'engraissement optimales pour la production de foie gras (Tavernier *et al.*, 2016 ; Chartrin *et al.*, 2006).

Le foie gras est très riche en cholestérol (parfois plus de 1g pour 100g) (Hermier *et al.*, 1999) mais à ce jour, pas ou peu d'études ont été menées sur le métabolisme du cholestérol au cours du gavage chez le canard mulard. Seules des mesures plasmatiques en fin de gavage ou chez des canards non gavés ont été réalisées (Chartrin *et al.*, 2006), ou encore au cours du gavage chez l'oie Landaise (Zhu *et al.*, 2011). C'est pour cela que notre intérêt s'est porté sur l'étude cinétique du métabolisme du cholestérol au cours du développement de la stéatose hépatique chez le canard mulard.

D'autre part, la pâtée de gavage distribuée aux canards est une alimentation riche en amidon composée quasi exclusivement de glucides. Cela représente un régime contenant de très faibles quantités de lipides, d'acides aminés et de protéines et caractérisé par un fort déséquilibre protéines/énergie (Baéza *et al.*, 2013). On peut ainsi s'interroger sur les effets que peuvent engendrer ce régime notamment au niveau des hépatocytes tels que l'activation de processus comme l'autophagie, généralement induite en situation de carence ou de stress cellulaire (Mizushima *et al.*, 2011).

Ainsi, afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents du développement de la stéatose hépatique, on se propose ici de faire une étude cinétique des effets du gavage sur l'expression de gènes en lien avec le métabolisme du cholestérol et l'autophagie chez le canard mulard au cours du gavage.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Animaux et design expérimental

Toutes les procédures expérimentales ont été effectuées conformément aux directives nationales françaises sur le soin et l'utilisation des animaux à des fins de recherche et en accord avec le comité d'éthique (n° agrément : C40-037-1). Cette étude a été réalisée sur 96 canards mulards mâles élevés dans un bâtiment de type Louisiane de 80 m<sup>2</sup> à raison de 2,6 canards / m<sup>2</sup>. Face au risque élevé par rapport à la grippe aviaire au moment de l'élevage, les canards ont été maintenus en claustration totale. Ils ont bénéficié de l'éclairage naturel et ont été élevés sur litière de copeaux et abreuvés par pipettes à la station expérimentale palmipèdes à foies gras (INRA Artiguères, France). Ils ont été nourris (aliment de type commercial) *ad libitum* de l'éclosion à l'âge de 8 semaines pour la phase de démarrage (17,5 MAT, 2850 Kcal) puis par rationnement horaire (1h/jour) de 8 à 9 semaines suivi d'un rationnement quantitatif de 9 à 12 semaines pour la phase de croissance et de définition (15,5 MAT, 2800 Kcal). Le gavage a débuté à l'âge de 12 semaines et a duré 11 jours soit 22 repas composés uniquement de pâtée (53% MS Palma 146, Maïsador) et d'eau. Les quantités d'aliments distribuées au cours du gavage sont ajustées au poids vif des animaux. Deux heures après les 4<sup>ème</sup> (R4), 12<sup>ème</sup> (R12) et 22<sup>ème</sup> (R22) repas de gavage, les canards ont été abattus conventionnellement par électronarcose puis saignés et éviscérés à chaud. Les plasmas ont été séparés par centrifugation (3000rpm, 10 min, à 4 °C) puis stockés à -20°C. Après dissection, le foie, le *pectoralis major* (muscle), le gras abdominal et le gras sous-cutané ont été pesés, échantillonnés puis stockés à -80 °C.

### 1.2. Analyses plasmatiques

Les taux de glucose (GLU), triglycérides (TG) et cholestérol (CHO) plasmatiques (cholestérol total) ont été quantifiés par méthodes enzymatiques colorimétriques (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) selon les recommandations du fabricant.

### 1.3. Analyses Western blot

Les foies congelés (100 mg, n=12 à chaque temps de prélèvement) ont été broyés au Precellys Cryollis (Bertin technologies) (5000rpm, 2 cycles/10 sec, pause/15sec) dans 1 ml de tampon de lyse contenant un inhibiteur de protéase (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Sigma). Les homogénats ont ensuite été centrifugés (4°C/15min, 12000g) et les surnageants ont été récupérés puis centrifugés (4°C/15min, 12000g). Les concentrations de protéines ont été déterminées par dosage selon la méthode de Bradford avec l'utilisation de BSA comme standard.

Des lysats (20µg) ont été soumis à une SDS-PAGE et à un Western blot en utilisant l'anticorps anti-phospho-eIF2α (Ser51) (n°9721) et anti eIF2α total (n°9722) de Cell Signaling Technologies (Ozyme,

Saint Quentin Yvelines, France). Les membranes ont été lavées puis incubées dans un anticorps secondaire IRDye Infrarouge (Li-COR Biosciences, Lincoln, USA). Les bandes ont été visualisées par fluorescence infrarouge et quantifiées par densitométrie à l'aide du système d'imagerie Odyssey (Li-COR Biosciences).

#### 1.4. Analyses d'expression de gènes

##### Extraction d'ARNs

L'ARNm total a été isolé en utilisant le TRIzol Reagent (Invitrogen/Life technologies) selon les recommandations du fabricant puis quantifié par spectrophotométrie (absorbance à 260 nm) en utilisant l'appareil NanoVuePlus (GE Healthcare). Les échantillons ont été normalisés à 500 ng/μl. La qualité et l'intégrité des ARN totaux ont été vérifiées par électrophorèse (gel d'agarose 1%).

##### Rétrotranscription des ARNs

Après un traitement à la DNase (Quanta Biosciences), les ADNc ont été obtenus par rétrotranscription en utilisant le kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) et un mélange d'oligo dT et de random primers (Promega) selon les instructions du fabricant. 1 μl de luciférase (100 μg/μl), ARN exogène non présent chez le canard, a été ajouté lors de l'étape de dénaturation afin de servir comme gène de référence. La réaction a été réalisée sur un thermocycler (Biorad) selon le programme 25°C/5min, 55°C/1h, 70°C/15min, 4°C/∞ puis stockage à -20°C.

##### qPCR et Fluidigm

Les niveaux d'expression des gènes liés au métabolisme du cholestérol ont été déterminés par qPCR à partir de 2 μl d'ADNc (dilué 80 fois), d'amorces des gènes cibles (10 μmol.L<sup>-1</sup>), de SYBr Green FastMix (Quanta) et d'eau RNase free pour un volume total de 15 μl. Les qPCR ont été réalisées selon le programme suivant : initiation à 95°C/10s suivi de 45 cycles d'amplification (60°C/15s) 15s suivi de 45 cycles d'amplification sur l'appareil CFX Mastro (Biorad).

Pour les gènes liés à l'autophagie, la méthode Fluidigm a été employée car réalisée antérieurement. Pour cela, une amplification cible spécifique (STA) a été réalisée au préalable avec 5 ng/μl d'ADNc afin de normaliser tous les échantillons et s'assurer qu'il y a suffisamment de copies d'ADNc dans chaque puits. La réaction a été effectuée à l'aide du colorant 20X EvaGreen suivant le programme 95°C/10min (étape de maintien) suivi de 35 cycles d'amplification (95°C/15s, 60°C/1min). Toutes les données ont été analysées avec le logiciel d'analyse PCR en temps réel Fluidigm (Fluidigm Corporation v4.1.3). Cette partie du travail a été réalisée à la plateforme de transcription quantitative GeT-TQ (GenoToul, Toulouse, France).

Pour l'analyse de l'ensemble des données, le gène de référence choisi est la luciférase. La quantité relative d'expression des gènes cibles a été déterminée par la méthode ΔΔCT. L'efficacité de la PCR, mesurée par la pente d'une courbe standard à l'aide de dilutions en série d'ADNc, était comprise entre 1,85 et 2.

#### 1.5. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM et analysés par analyse de variance à une voie (one-way ANOVA) ( $P < 0,05$ ) complétée par un test de Tukey avec le logiciel GraphPad Prism. Les tests de corrélations de Pearson et les ACP sont réalisés avec le logiciel R (Rcmdr, FactominR).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Données zootechniques - dosages biochimiques

Afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes mis en place au cours du développement du foie gras chez le canard mulard gavé, les données zootechniques (poids de tissus) ainsi que les données plasmatiques ont été analysées au cours du gavage (n=32 à chaque point de prélèvement R4, R12 et R22) (Tableau 1). Une augmentation significative des poids de foie ( $p < 0,0001$ ), gras abdominal ( $p < 0,0001$ ) et gras sous-cutané ( $p < 0,0001$ ) est observée au cours du gavage tandis que le poids de muscle augmente significativement en début de gavage (entre R4 et R12) puis se stabilise en fin de gavage ( $p = 0,0007$ ).

De plus, l'analyse des paramètres plasmatiques montre une augmentation significative du taux de glucose ( $p = 0,0052$ ), triglycérides ( $p < 0,0001$ ) et cholestérol total ( $p < 0,0001$ ) au cours du gavage. On a ainsi une croissance régulière du poids de foie au cours du gavage qui s'accompagne d'une concentration accrue des paramètres plasmatiques comme cela a déjà été montré dans différentes études (Baéza *et al.*, 2005, Chartrin *et al.*, 2006).

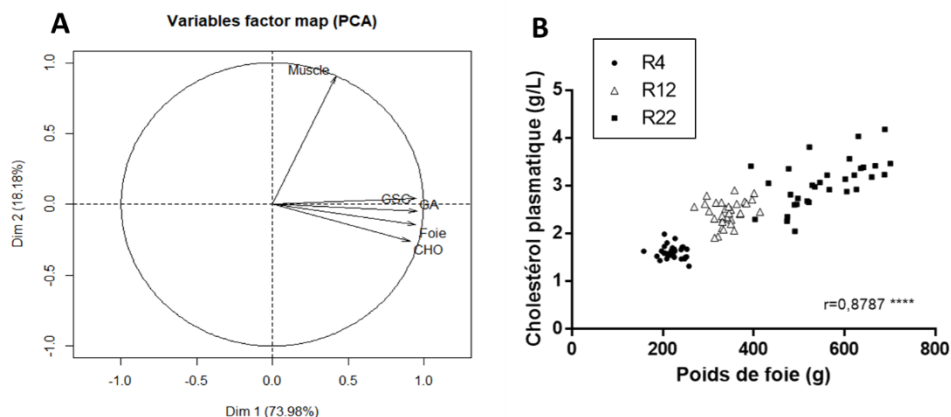
Par ailleurs, des tests d'analyses en composantes

**Tableau 1.** Effets du gavage sur les paramètres plasmatiques et sur les poids de tissus (n=32, moyenne ± SEM) ; GA : gras abdominal, GSC : gras sous-cutané ; \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$

	R4	R12	R22	P value
<b>Tissus (g)</b>				
Foie	220,9 ± 3,87 a	344,1 ± 5,85 b	556,0 ± 15,12 c	****
Muscle	287,4 ± 4,43 a	306,9 ± 4,36 b	314,1 ± 5,94 b	***
GA	38,09 ± 2,86 a	77,08 ± 4,02 b	156,9 ± 4,25 c	****
GSC	69,59 ± 2,34 a	116,7 ± 2,49 b	154,3 ± 3,05 c	****
<b>Plasma (g/l)</b>				
GLU	3,21 ± 0,08 a	3,48 ± 0,11 ab	3,62 ± 0,07 b	**
TG	3,202 ± 0,14 a	4,05 ± 0,20 b	5,27 ± 0,29 c	****
CHO	1,61 ± 0,02 a	2,45 ± 0,04 b	3,06 ± 0,09 c	****

principales montrent qu'il existe une corrélation significative entre les poids de tissus et le taux de cholestérol total ( $r = 0,88$ ,  $p < 0,0001$  ;  $r = 0,81$ ,  $p < 0,0001$  et  $r = 0,81$ ,  $p < 0,0001$  pour le foie, le gras abdominal et le gras sous cutané respectivement (Figure 1a). Cette

**Figure 1.** Corrélations entre paramètres zootechniques et plasmatiques. (A) : Analyse en composantes principales (GA : gras abdominal, GSC : gras sous-cutané, CHO : cholestérol total. (B) : Test de corrélation de Pearson entre poids de foie et cholestérol total plasmatique.



corrélation est marquée en fin de gavage entre poids de foie et taux de cholestérol total d'après le test de corrélations de Pearson ( $r=0,17$  ns,  $r=0,24$  ns et  $r=0,59$   $p<0,001$  à R4, R12 et R22 respectivement (Figure 1b). Ces résultats préliminaires devront être confirmés avant d'envisager l'utilisation d'un éventuel marqueur du développement du foie gras en lien avec le métabolisme du cholestérol.

## 2.2. Métabolisme du cholestérol et gavage

Différents gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol ont été étudiés afin d'avoir une meilleure connaissance de l'action du gavage sur ce métabolisme. Ainsi, l'expression des gènes HMGCR (hydroxyméthylglutaryl-CoA reductase), DHCR7 (7-dehydrocholesterol reductase) et CYP51a (cytochrome P450 family 5) impliqués dans la synthèse du cholestérol; SOAT1 (sterol O-acyltransferase 1) impliqué dans l'estérification du cholestérol; Apo B (apolipoprotéines B) impliqué dans le transport du cholestérol; VLDLR (very low density lipoproteins receptor) et LDLR (low density lipoproteins receptor) récepteurs impliqués dans le retour du cholestérol au niveau du foie; ont été analysés au cours du gavage ( $n=32$  à chaque point de prélèvement) (Tableau 2). Les résultats montrent une augmentation significative de l'expression de HMGCR ( $p=0,0004$ ) entre R12 et R22 ainsi qu'une augmentation significative de l'expression de CYP51a ( $p=0,03$ ) marquée en milieu de gavage. HMGCR est une enzyme clé qui intervient dans la voie du mévalonate qui produit les précurseurs du cholestérol. Il semble alors que le gavage induise une hausse notable de la synthèse de cholestérol. On observe également une augmentation significative des gènes ACAT, ApoB, VLDLR et LDLR au cours du gavage ( $p<0,0001$ ).

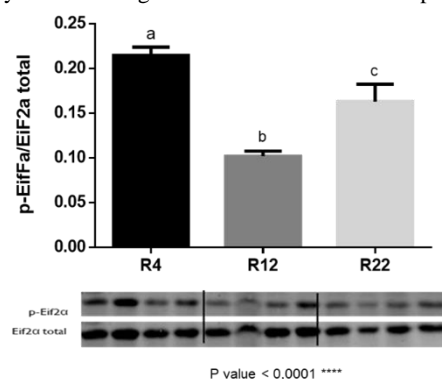
Des études menées chez l'homme associent une augmentation du métabolisme du cholestérol à la maladie du « foie gras » non-alcoolique (NAFLD) ou encore à la stéato-hépatite (NASH) (Min *et al.*, 2012). Cela dit chez le canards et l'ensemble des palmipèdes à foies gras, le processus de formation du foie gras est

un phénomène non pathologique et totalement réversible (Babilé *et al.*, 1996; Benard *et al.*, 1998).

## 2.3. Stress cellulaire et autophagie au cours du gavage

Notre étude s'est portée sur la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 (eukaryotic initiation factor 2 alpha - activating transcription factor 4) qui joue un rôle clé dans la réponse à des stress cellulaires tels que la carence en acides aminés ou le stress oxydant (Bruhat *et al.*, 2015, Warland *et al.*, 2008). Les analyses Western blot de la forme phosphorylée de la protéine eIF2 $\alpha$  dans les hépatocytes ( $n=12$  à chaque temps de prélèvement) montrent qu'il y a une diminution significative de sa quantité en milieu de gavage (entre R4 et R12) suivie d'une augmentation significative en fin de gavage (entre R12 et R22) mais moindre qu'à R4 ( $p<0,0001$ ) (Figure 2). Les analyses des gènes ATF4 et ASN impliqués dans la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4 montrent une augmentation significative de leurs expressions au cours du gavage ( $p<0,0001$  pour chaque gène respectivement). Le développement de la stéatose hépatique semble ainsi s'accompagner d'une activation de la voie eIF2 $\alpha$ -ATF4.

**Figure 2.** Analyse Western blot de la protéine eIF2 $\alpha$  dans le foie au cours du gavage. Les blots représentent le rapport entre la protéine phosphorylée et la quantité totale de protéine. ( $n=12$ ; a, b, c signifient que les valeurs des moyennes sont significativement différentes à  $p<0,05$ ).



**Tableau 2.** Effets du gavage sur l'expression relative des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, le stress cellulaire et l'autophagie dans le foie (n=32, moyenne  $\pm$  SEM) ; ns : non significatif, \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$

	Expression relative			P value
	R4	R12	R22	
<b>Métabolisme des lipides</b>				
HMGCR	4,00 $\pm$ 0,35 a	5,44 $\pm$ 0,54 a	7,76 $\pm$ 0,92 b	***
CYP51A	1,89 $\pm$ 0,27 a	2,68 $\pm$ 0,39 b	1,59 $\pm$ 0,16 a	*
DHCR7	3,01 $\pm$ 0,35	4,57 $\pm$ 0,58	3,46 $\pm$ 0,54	ns
SOAT1/ACAT	1,53 $\pm$ 0,15 a	3,63 $\pm$ 0,31 b	8,50 $\pm$ 0,78 c	****
VLDLR	1,65 $\pm$ 0,19 a	5,00 $\pm$ 1,01 b	9,15 $\pm$ 0,74 c	****
LDLR	1,43 $\pm$ 0,22 a	3,07 $\pm$ 0,27 b	4,67 $\pm$ 0,41 c	****
APOB	2,02 $\pm$ 0,22 a	4,39 $\pm$ 0,38 b	10,32 $\pm$ 0,96 c	****
<b>Stress cellulaire et autophagie</b>				
ASN	1,83 $\pm$ 0,25 a	8,13 $\pm$ 0,97 b	13,07 $\pm$ 1,52 c	****
ATF4/CREB2	1,39 $\pm$ 0,14 a	4,14 $\pm$ 0,34 b	7,87 $\pm$ 0,69 c	****
SQSTM1/P62	1,58 $\pm$ 0,21 a	3,43 $\pm$ 0,33 b	6,30 $\pm$ 0,57 c	****
ATG8/LC3	3,40 $\pm$ 0,59 a	9,97 $\pm$ 0,97 b	23,08 $\pm$ 2,10 c	****
ATG9	1,28 $\pm$ 0,17 a	4,04 $\pm$ 0,46 b	6,62 $\pm$ 0,86 c	****

Des gènes impliqués dans le processus de macroautophagie cellulaire SQSTM1 (sequestosome 1), ATG8/LC3 (autophagy related gene 8) et ATG9 (autophagy related gene 9) ont été analysés afin de savoir si le gavage induisait ou non son activation. On observe une augmentation significative de l'expression des gènes SQSTM1, ATG8 et ATG9 au cours du gavage. ATG8 et ATG9 sont connus chez la levure pour être associés au nombre d'autophagosomes formés (Zhuang *et al.*, 2017). Le développement de la stéatose hépatique semble impacter le processus d'autophagie chez le canard mulard.

## CONCLUSION

D'un point de vue moléculaire, l'établissement de la stéatose hépatique chez le canard mulard semble se caractériser par une modification du métabolisme du

cholestérol d'une part, et l'induction de processus autophagiques d'autre part. Les analyses de corrélations réalisées permettent d'envisager l'identification de nouveaux marqueurs du développement de la stéatose hépatique chez le canard mulard en lien avec le métabolisme du cholestérol, sous réserve de validation ultérieure.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions le personnel technique de l'INRA Artiguères pour l'élevage, le gavage et l'abattage des animaux à la station expérimentale de Benquet. Nous remercions également Emilie Bonin pour l'analyse du Fluidigm (Genotoul, GeT-PlaGe : plateforme de génomique et transcriptomique Toulouse, France).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Babilé, R. *et al.*, (1996) 2<sup>ème</sup> JRA, Bordeaux, 12-13 Mars. P107–110  
 Baeza, E., *et al.*, (2013) INRA Productions Animales, 26(5), 403–414  
 Bénard G. *et al.*, (1998) 3<sup>ème</sup> JRA, Bordeaux, 27-28 oct. p49–52  
 Bruhat, A. *et al.*, (2015) médecine/sciences, 31(12), 1057–1060  
 Chartrin, P. *et al.*, (2006) Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 145(3), 390-396  
 Cuervo, A.M. (2004) Mol. Cell. Biochem. 263, 55–72  
 Davail, S. *et al.*, (2003) Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 134(4), 707-715  
 Hermier, D. *et al.*, (1999) Poultry Science, 78, 1398–1406  
 Hermier, D. *et al.*, (2003) Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 135(4), 663-675  
 Min, H.-K. *et al.*, (2012) Cell Metabolism, 15(5), 665–674.  
 Mizushima, N. *et al.*, (2011) Cell, 147(4), 728–741.  
 Tavernier, A. *et al.*, (2017) Molecular and Cellular Biochemistry, 424(1-2), 147–161  
 Walrand, S. *et al.*, (2008) Nutrition Clinique et Métabolisme, 22(4), 161–167.  
 Zhu, L. H. *et al.*, (2011) Poultry Science, 90(1), 107–117  
 Zhuang, X., *et al.*, (2017) Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(3), E426–E435



# INTEREST IN FOOD PROTEINS TO STIMULATE THE SYNTHESIS OF FATTY LIVER « FOIE GRAS » IN OVERFED MULE DUCKS

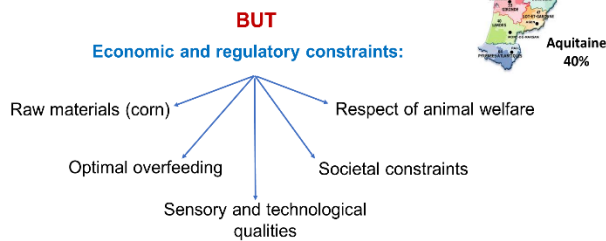
TRACY PIOCHE

tracy.pioche@univ-pau.fr

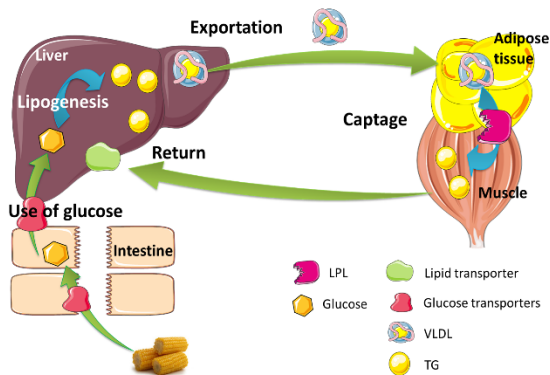
## Context

### Foie gras today...

France is the first world producer of foie gras (20 000 t / year)



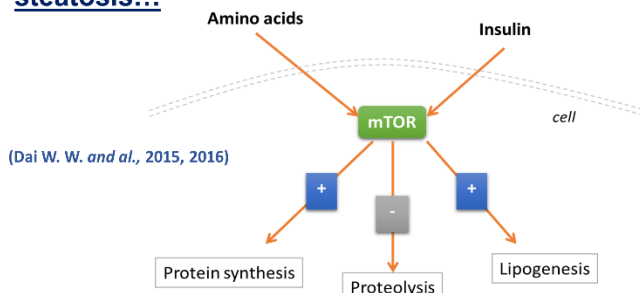
### Obtaining foie gras : hepatic steatosis



It is an accumulation of lipids in the liver resulting from an imbalance between export of lipids from the liver to peripheral tissues and a re-uptake of lipids by the liver. This is a phenomenon totally **reversible** and **non pathological** obtained by overfeeding of the ducks.

Overfeeding is based on a natural mechanism of migratory birds which store lipids in their livers. It makes it possible to obtain a liver of size 10 times higher.

### Links between proteins/amino acids and hepatic steatosis...



Amino acids and proteins as soon as insulin have the ability to stimulate lipid synthesis and inhibit mechanisms of cell degradation *via* activation of mTOR pathway. This has been demonstrated in rainbow trout hepatocytes.

## Objectives and issue

### Two objectives

Understand :

- Mechanisms of action of amino acids on the synthesis, export and re-uptake of lipids by the liver
- Impact of amino acids and proteins on the mechanisms of degradation and cellular stress *via* activation of the mTOR pathway

### One issue

The ultimate purpose is to find **new nutritional strategies** in order to :

- Optimize the production of fatty liver
  - formation of foie gras on mule ducks (reduction of feeding time / amount of feed)
- Protect liver cells from cell degradation mechanisms
  - mortality and melting rate

## Technical uses

### Zootechnical measures

- Liver weight
- Mortality rate
- Melting rate
- Hedonic test



### Analysis

- Histology
- HPLC
- Plasma data
- Gene expressions (qPCR)
- Protein analysis (Western blot)
- MicroRNA
- Electron microscopy
- Enzymatic activity

## Me and my academic background



**2009** : Scientific baccalaureate profil SVT – Lycée Faustin Fléret, Guadeloupe

**2012** : Licence Biochemistry-Biology – University of Antilles Guyane, Guadeloupe

**2015** : Master 1 Human Nutrition and Health – University of Bordeaux, Bordeaux  
 Internship in CBMN lab in Bordeaux (2 months)  
 Study of the stability of liposomes in the face of oxidation of lipids

**2016** : Master 2 Human Nutrition and Health – University of Bordeaux  
 Internship in INRA of St Pée-sur-Nivelle (6 months)  
 Role of autophagy in glucose and lipid metabolisms control in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)





# INTEREST OF AMINO ACIDS TO STIMULATE HEPATIC STEATOSIS IN MULE DUCKS

## Main objectives

Understand:

- Mechanisms of action of amino acids on synthesis, export and re-uptake of lipids by the liver.
- Impact of amino acids and proteins on the mechanisms of degradation and cellular stress via activation of the mTOR pathway.

## Issues

The ultimate purpose is to find **new nutritional strategies** in order to:

- Optimize the « foie gras » production
- Protect liver cells from cell degradation mechanisms

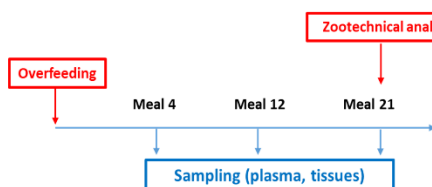


## First experiment

Experimental design:

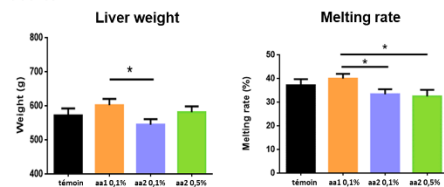
→ Branched chain amino supplementation during overfeeding on mule ducks

Tested doses:  
- aa 1 at 0.1%  
- aa 2 at 0.1%  
- aa 2 at 0.5%  
- control group



Sampling are performed 2 hrs. after meal

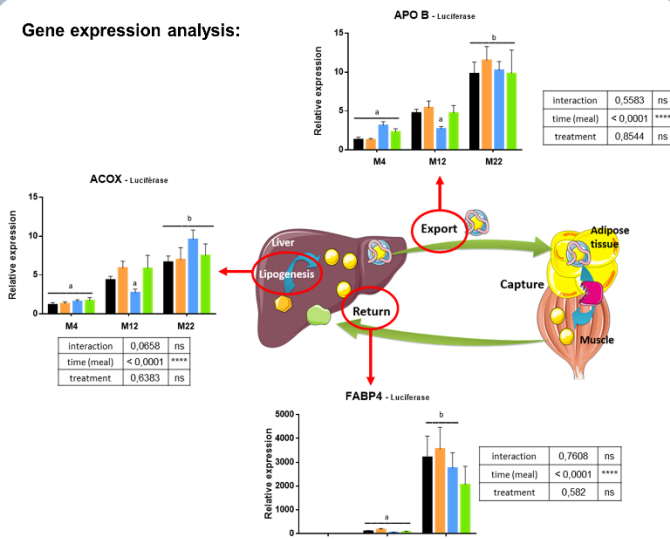
Zootechnical results:



No significant differences were observed on the liver weight between treated group compared to the control one.

Groups supplemented with aa2 had a better melting rate compare to aa1 group but it was no significant compare to control group.

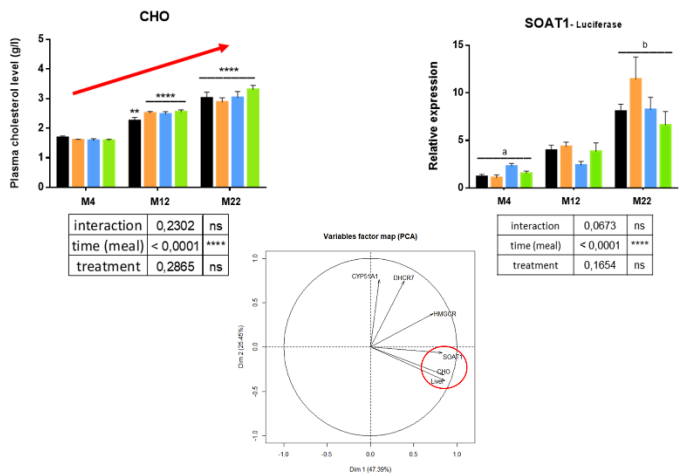
Gene expression analysis:



No significant effects of the treatment were noted on supplemented groups compare to the control one.

A significant effect of overfeeding on the expression of genes involved in key mechanisms of "foie gras" synthesis was observed.

Interesting results:



There is a significant increase of plasma cholesterol level during overfeeding.

Correlation analyzes showed a close correlation between liver weights, plasma cholesterol levels, and level of expression of SOAT (gene involved in cholesterol esters synthesis from cholesterol).

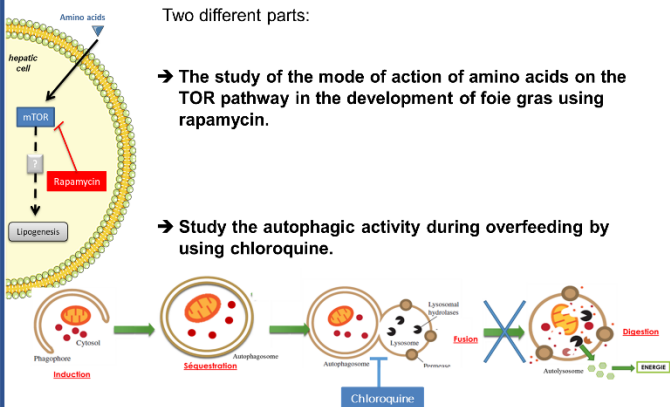
Cholesterol level seems to be a predictive marker of « foie gras » development

## Second experiment

Two different parts:

→ The study of the mode of action of amino acids on the TOR pathway in the development of foie gras using rapamycin.

→ Study the autophagic activity during overfeeding by using chloroquine.



## Outlooks

- Finish the protein analysis on the 1<sup>st</sup> experiment
- Do protein and gene expression analyzes on the 2<sup>nd</sup> experiment and also electron microscopy analysis
- Choose a protein source according to its amino acid profile and its strategic interest to do a 3<sup>rd</sup> experiment similar to the first one.
- Redaction of articles and manuscript
- A participation in the 13th Journées de la Recherche Avicole and Palmipèdes Foie Gras Tours 20/21 March 2019 is scheduled for an oral communication

## Trainings

Documentary research and scientific publication  
Research ethics and scientific integrity  
Cross-border doctorates 2017  
« La thèse de ma marraine » 2018, 3<sup>rd</sup> place  
Cambridge test: First Certificate in English  
Pedagogical training: teaching instruction manual



## Résumé

L'objectif principal de cette thèse était de poursuivre les investigations menées sur les mécanismes sous-jacents au développement du foie gras chez le canard mulard. Ce processus appelé stéatose hépatique et induit par le gavage nécessite d'être davantage étudié afin de contribuer à l'optimisation du gavage.

Une étude cinétique de l'expression des gènes en lien avec la stéatose hépatique, le métabolisme intermédiaire et le stress cellulaire chez le canard mulard a permis de mettre en évidence, outre la forte mobilisation des métabolismes glucidique et lipidique, une induction significative de la voie de signalisation de l'insuline mTOR et l'activation de mécanismes de protection cellulaire au sein des hépatocytes leur permettant de lutter contre l'apport accru d'amidon apporté par le gavage. Parmi ces différents mécanismes protecteurs, l'autophagie a fait l'objet d'une étude poussée chez des canards gavés dont la stéatose a été à peine induite comparés à des canards non gavés. Les mesures de flux autophagique (LC3-II) ont montré que le gavage induisait une inhibition du processus autophagique dans les hépatocytes de canards mulards dès la phase précoce du développement de la stéatose hépatique. Cette même étude a permis de constater que les mécanismes associés au stress cellulaires tels que le stress oxydant, le stress du réticulum endoplasmique ou encore l'apoptose ne se sont pas induits dès le début du développement de la stéatose hépatique mais bien plus tardivement. Il en est de même pour l'impact du gavage sur la voie mTOR.

Par ailleurs, l'étude cinétique a également permis de mettre en évidence l'induction significative du métabolisme du cholestérol corrélé au gain de poids de foie des canards au cours du gavage. Ces résultats ont suscité l'intérêt de rechercher des biomarqueurs plasmatiques du développement de la stéatose hépatique en lien avec le métabolisme du cholestérol parmi les microARNs. Ainsi, le miRNome plasmatique du canard a été séquencé et a permis de définir les microARNs les plus différentiellement exprimés dans le plasma des canards mulards mais également de déceler des microARNs (miR-122, miR-107 et miR-194) candidats comme potentiels biomarqueurs utilisables pour le suivi du développement du foie gras.

L'ensemble de ces travaux contribue à l'avancée de la recherche sur la compréhension des mécanismes de l'établissement de la stéatose hépatique chez le canard mulard.

Mots clés : *stéatose hépatique, canard mulard, gavage, métabolismes, autophagie, microARNs*



