RÉSUMÉ *ABSTRACT*

Recherche de biomarqueurs sanguins de la plasticité lipidique chez le porc et le poulet

La production de viande à moindre coût nécessite de disposer d'animaux robustes, efficaces, capables de s'adapter aux contraintes d'élevage. Ceci requiert l'évaluation de la capacité de l'animal à constituer et restituer ses réserves énergétiques. Ce travail de thèse a donc pour objectif d'identifier de potentiels biomarqueurs sanguins en lien avec la composition corporelle. Pour cela, deux espèces monogastriques sont étudiées, le porc et le poulet. Au sein de chaque espèce, les animaux de deux lignées génétiques (sélection divergente sur la Consommation Moyenne Journalière Résiduelle chez le porc et sur la proportion de gras abdominal chez le poulet) ont reçu des régimes alimentaires contrastés (riches en lipides et en fibres vs. riches en amidon) mais isoprotéiques et isoénergétiques. Les paramètres plasmatiques et le transcriptome du sang ont été étudiés en réponse à ces régimes alimentaires.

Les métabolites et hormones plasmatiques sont affectés par le régime chez le porc alors que ces paramètres sont affectés par le régime et la lignée chez le poulet. L'analyse du métabolome associée aux mesures ciblées des concentrations en métabolites et hormones montre que l'association de plusieurs paramètres sanguins explique entre 37 et 75% de la variabilité de la masse adipeuse chez le porc ou le poulet. Pour les deux espèces, le transcriptome du sang est plus affecté par la lignée génétique que par le régime alimentaire. Les porcs et les poulets nourris avec un régime riche en lipides et en fibres, surexpriment le gène codant la forme hépatique d'une enzyme mitochondriale : CPT1A. En résumé, ce travail montre que le transcriptome sanguin peut être utile pour étudier les variations de phénotypes de façon dynamique tout au long de la vie de l'animal et pour mettre en évidence des biomarqueurs qui pourront être utilisés dans de futurs schémas de sélection.

Mots-clefs : porc, poulet, composition corporelle, efficacité alimentaire, sang, métabolome, hormones, transcriptome, biomarqueurs

Blood biomarkers research of lipid plasticity in pigs and chicken

Meat production at a lower cost requires robust and efficient animals able to adapt to different rearing conditions. This requires assessing animal's abilities to store and restore its energy reserves. The objective of the current thesis was to identify potential blood markers of body composition. Two monogastric species were studied, pig and chicken. For each species, animals of two genetic lines (divergent selection on Residual Feed Intake in pigs and abdominal fat proportion in chicken) received two diets contrasted in energy sources (high vegetable oils and fibers vs. rich in starch) but isoproteic and isoenergetic. Plasma parameters and the blood transcriptome were studied in response to those diets.

Plasma metabolites and hormones were affected by the diet in pigs whereas those parameters were affected by the diet and the genetic lines in chickens. Metabolome analysis, associated with targeted measurement of metabolites and hormones concentrations, shows that the combination of several blood parameters explained between 37 and 75% of the variability of body fat in pig or chicken. For both species, the blood transcriptome was more affected by the line than by the diet. Pigs and chickens fed a diet rich in lipids and fibers, overexpressed the gene encoding the hepatic form of a mitochondrial enzyme: CPT1A. In summary, this work supports the potential use of blood transcriptome to study variations of phenotypes in a dynamic way throughout the life of the animal and to highlight biomarkers for future selection process.

Keywords: *pig, chicken, body composition, feed efficiency, blood, metabolome, hormones, transcriptome, biomarkers*

AGROCAMPUS OUEST • Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
65 rue de Saint-Brieuc – CS84215 – F-35042 Rennes Cedex
Tél. : 02 23 48 50 00
www.agrocampus-ouest.fr

Recherche de biomarqueurs sanguins de la plasticité lipidique chez le porc et le poulet

Thèse **B-247 — 2016-2** • JÉGOU Maëva

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

AGRO CAMPUS OUEST

Maëva JÉGOU • **26 janvier 2016**

Thèse AGROCAMPUS OUEST
sous le label de l'Université de Bretagne Loire
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST
Spécialité Biologie et Agronomie

ÉCOLE DOCTORALE • Vie-Agro-Santé (VAS)
LABORATOIRE D'ACCUEIL • UMR INRA - AGROCAMPUS OUEST
Physiologie, environnement et génétique pour l'animal
et les systèmes d'élevage (PEGASE)

Recherche de biomarqueurs sanguins de la plasticité lipidique chez le porc et le poulet

Lucile MONTAGNE
Professeur, AGROCAMPUS OUEST, UMR INRA – AO, PEGASE / *présidente*

Claire ROGEL-GAILLARD
Directrice de recherche, INRA Jouy-en-Josas / *rapporteur*

Khadija OUGUERRAM
Maître de conférences, Université de Nantes / *rapporteur*

Geneviève CORRAZE
Chargée de recherche, INRA St Pée-sur-Nivelle / *examinatrice*

Isabelle LOUVEAU
Chargée de recherche, UMR INRA – AO, PEGASE / *directrice de thèse*

Élisabeth BAÉZA
Chargée de recherche, INRA Tours / *co-encadrante*

N° ordre : 2016-2

N° Série : B-247

THÈSE / AGROCAMPUS OUEST

Sous le label de l'Université Européenne de Bretagne

Pour obtenir le diplôme de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT SUPÉRIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES, AGRO-ALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE

Spécialité : Biologie et Agronomie

École Doctorale : Vie - Agro – Santé

Présentée par :

Maëva JÉGOU

Recherche de biomarqueurs sanguins de la plasticité lipidique chez le porc et le poulet

Soutenue le 26 janvier 2016 devant la commission d'Examen

Composition du jury :

Pr. Lucile MONTAGNE, Agrocampus Ouest, Rennes	Présidente
Dr. Claire ROGEL-GAILLARD, INRA, Jouy-en-Josas	Rapporteure
Pr. Khadija OUGUERRAM, Université de Nantes, Nantes	Rapporteure
Dr. Geneviève CORRAZE, INRA, St Pée-sur-Nivelle	Examinatrice
Dr. Isabelle LOUVEAU, INRA, Rennes	Directrice de thèse
Dr. Élisabeth BAÉZA, INRA, Tours	Co directrice de thèse

« Dans la vie rien est à craindre, tout est à comprendre. »

Marie Curie.

Á mes parents, Á ma sœur, Á mon oncle,

pour leur soutien infaillible et indéfectible.

Á Brieuc, Á Christophe,

pour m'avoir pourvue d'une incomparable résistance.

Remerciements

Il m'est difficile de ne pas me laisser submerger par ces belles dernières années de mon cursus passées à l'INRA de Saint-Gilles en très bonne compagnie. Donc pour faire bref, et même très bref : Merci à toutes les personnes que j'ai croisées de près ou de loin à l'INRA. Et pour faire un peu plus long :

Je remercie les membres de mon jury de thèse, Claire Rogel-Gaillard, Khadija Ouguerram Lucile Montagne, et Geneviève Corraze d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie Jaap Van Milgen de m'avoir accueillie au sein de l'unité Pegase et de la considération qu'il porte aux doctorants. Je remercie Michel Duclos de m'avoir accueillie au sein de l'unité Recherche Avicole lors des « journées doctorants ». Je remercie le département INRA PHASE et la région Bretagne pour m'avoir octroyé une bourse de doctorat. Je remercie les membres du projet ANR FatInteger, dirigé par Florence Gondret, dans lequel mon travail de thèse s'intégrait en partie et qui a permis le financement des expériences réalisées.

Je remercie les membres de mon comité de thèse Thierry Fest, Florence Gondret, Sandrine Lagarrigue, Florence Aubry, Isabelle Louveau et Élisabeth Baéza pour les échanges qui ont eu lieu lors de ces deux comités et qui ont été constructifs pour ma thèse.

Je remercie très chaleureusement Isabelle Louveau qui m'a encadrée pendant ces trois années. Je suis très heureuse d'avoir bénéficié de tes connaissances, de ta disponibilité, de ta patience, de tes conseils, tant sur le travail que sur des questions de science en général, ou même sur des évènements personnels, de ta diplomatie et de ta bienveillance. Je ne sais pas si c'est un effet thèse, mais c'est fou ce que l'on murit et ce que l'on s'épanouit pendant cette fenêtre d'âge. J'espère pouvoir retenir et mettre en pratique un maximum de choses que tu m'as apportées tant sur le plan des connaissances que sur la prise de conscience de ce qu'est une thèse. Auparavant, j'étais sceptique quand tu me disais qu'une thèse n'était pas que des compétences scientifiques ; je vois désormais ce que tu voulais dire et j'ai bien intégré l'idée. Tu m'as toujours encouragée et poussée dans la bonne direction. Merci beaucoup Isabelle.

Je remercie également très chaleureusement Élisabeth Baéza qui m'a co-encadrée pendant ces trois années. Je te remercie de m'avoir fait bénéficier de tes connaissances, de ta spontanéité, de ta disponibilité, de tes conseils, de ta bienveillance, de m'avoir fait prendre de l'assurance et de m'avoir encouragée et poussée dans la bonne direction. Merci beaucoup Élisabeth.

Je remercie toute l'équipe croissance et métabolisme dirigée par Florence Gondret, j'ai passé de très bons moments parmi vous et je me suis sentie bien dans cette équipe ou chacun s'est rendu disponible lors de questions éventuelles pendant toute la durée de ma thèse.

Je remercie Christine Tréfeu et Annie Vincent tout d'abord professionnellement parlant car c'est avec vous que j'ai effectué la majeure partie des manips pour ma thèse. Et ensuite merci humainement parlant car vous m'avez apporté un grand soutien. Je n'oublierai pas toutes ces conversations touchant à tous les domaines possibles lors de la pause café ou de la pause méridienne (nous avons dû refaire le monde au moins deux fois et sur tous les sujets, merci beaucoup de votre présence). Merci également à Sandrine Tacher. Merci de m'avoir fait partager votre quotidien. Merci Christine d'avoir prêté une oreille attentive à « tous ».

Je remercie Christine Le Nézet et Laurence Thébault pour leur disponibilité et leur aide lorsque je suis allée chercher du secours pour les documents administratifs. Je remercie également Emilie Bernard, pour son aide et pour ses « trucs et astuces » de la documentation. Je remercie Henri Flageul, même si percer le mystère d'une grave erreur du complément reste entier. Merci à Jean-Yves Dourmad, Ludovic Brossard, Florence Garcia-Launay et Rémy Delagarde d'avoir enrichi mes connaissances sur « les origines » de l'INRA. Merci également à Éric Roussel (que je croisais lorsque je saturais mes récepteurs nicotiniques), pour ces conversations ou l'on mêlait politique, religion, société, musique, lecture… en toute quiétude.

Merci aux doctorants, et stagiaires, une énumération totale serait imparfaite, je vous remercie tous sans exception et je tiens à faire un clin d'œil particulier à, Hélène Romé (ou va-t-on l'an prochain ?), Florence Loisel, Paulo Henrique Reis Furtado Campos, Cindy Le Bourgot, Tiago Pansar Alves, Joao Gabriel Rossini Almeida, Magdalena Arevalo Turrubiarte, Marcolino Miguel et Alessandra Nardina Tricia Rigo Monteiro (Alessandrita je viens bientôt), pour tous les moments passés ensemble. L'INRA est source de belles rencontres et de très belles amitiés.

Merci à ceux qui sont « passé(e)s » par le bureau « ex secrétaires PL », Raquel Melchior, Geoffrey Mantis, Raphaëlle Tigeot, Clément Cirot, Clémence Panzuti. Et un grand merci aux filles du bureau Ana Isabel Roca Fernandez, Élise Vanbergue, Rosa Castellano (et par extension merci à Alberto Conde qui nous rendait visite de temps en temps) qui ont contribué au maintien de mon équilibre. C'était très enrichissant de partager les contraintes et joies de chacun(e)s. Merci Ana-Isabel de m'avoir apporté ton expérience et ton recul par rapport à une philosophie de vie qui était très différente de ma vision des choses. Tu m'as beaucoup apporté et tu continues de m'apporter ton positivisme et ta joie de vivre aujourd'hui, merci Ana.

Merci à l'unité ADNC, car avant la thèse il y avait le stage de M2 et le fameux concours VAS qui m'a permis de réaliser ces trois années au sein de Pegase. Quand je repense à ma fin de stage de M2, c'est toujours avec beaucoup d'émotion. Merci à Isabelle Le Huërou-Luron et à Cindy Le Bourgot pour ces discussions pendant ma thèse, et pour votre soutien (Cindy, le concours de *ma thèse en 180 secondes* est pour toi en 2016).

Merci aux collègues doctorants que j'ai rencontré lors de la formation Doctoriales® de Bretagne 2015. Cette formation était vraiment géniale. Et au-delà du fait que ça m'ait confortée dans mon orientation professionnelle, la finale du concours de *MT en 180 secondes* a été une expérience exceptionnelle, et m'a donné un regain de force.

Merci au personnel de l'Unité Recherches Avicoles que j'ai pu rencontrer lors des journées doctorants/post-doctorants, et pendant les congrès. Merci à Frédéric Hérault et Pascale Le Roy mes « compatriotes poulet » de Pegase avec qui j'ai beaucoup apprécié discuter (et rire).

Merci aux doctorants que j'ai pu rencontrer dans le cadre du Youth Program de l'EPC qui m'ont fait prendre conscience que l'on ne fait pas une thèse de la même façon partout, et qui ont élargi mon ouverture d'esprit.

Merci à mes amis, et merci à mes amies proches Clémentine Stéfani, Marion Girard, Marion Roussel, Jeanne Jansens, Coralie Le Vaillant, Cécile Pierre de la Brière, Julie Sitbon. Un merci particulier à Jeanne Guihot d'avoir été .présente presque quotidiennement. Je ne sais pas comment le formuler pour que cela soit digne de l'amitié que tu m'apport-ais/-es[/-eras oups ça on ne peut pas le savoir mais ça faisait chouette (ou hibou)]. Jeanne tu m'as « sauvé la mise » plus d'une fois, tu es l'homéostasie de ma conscience, merci d'avoir été et d'être là.

Un très grand merci à Catherine ma maman, Gilles mon père, Séverine ma sœur et Jean-François mon oncle. Un petit mot vaut mieux qu'un long discours, on revient de loin, sans vous je ne serais pas moi. Vous m'avez toujours soutenue, encouragée et eu confiance en moi quoi qu'il advienne ce qui m'a menée ici. Merci à mes cousins Erwann et Ewen d'être là.

C'est un peu frustrant car même dans ces remerciements il faut me limiter. Ce serait une erreur d'essayer de remercier individuellement chacun et chacune d'entre vous au risque d'oublier de mentionner certaines personnes, alors que j'ai vraiment apprécié vous avoir rencontré à l'INRA, ou grâce à l'INRA, lors d'une réunion, autour d'un café, à la cantine, lors d'un déplacement, dans un couloir, lors d'un pot de départ ou encore à la photocopieuse. Merci d'avoir fait que cette expérience restera pour moi enveloppée de très bons sentiments.

Publications et communications scientifiques

Publications scientifiques dans périodique à comité de lecture

Baéza E., Gondret F., Chartrin P., Le Bihan-Duval E., Berri C., Gabriel I., Narcy A., Lessire M., Métayer-Coustard S., Collin A., **Jégou M.**, Lagarrigue S. and Duclos M.J., 2015. The ability of lean or fat chickens to synthesize and store lipids is not altered by the dietary energy source. Animal: an international journal of animal bioscience, **9**,.1643-1652

Baéza E., **Jégou M.**, Gondret F., Lalande-Martin J., Tea I., Le Bihan-Duval E., Berri C., Collin A., Métayer-Coustard S., Louveau I., Lagarrigue S. and Duclos M.J., 2015. Pertinent plasma indicators of the ability of chickens to synthesize and store lipids. Journal of Animal Science **93**, 107-116

Jégou M., Gondret F., Lalande-Martin J., Tea I., Louveau I., 2015. NMR-based metabolomics highlights differences in plasma metabolites in pigs exhibiting diet-induced differences in adiposity. European Journal of Nutrition, doi 10.1007/s00394-015-0932-z

Jégou M., Gondret F., Vincent A., Tréfeu C., Gilbert H., Louveau I., 2016. Whole blood transcriptomics is relevant to identify molecular changes in response to genetic selection for feed efficiency and nutritional status in the pigs. PloS One, doi 10.1371/journal.pone.0146550

Communications au niveau national

Gondret F., Lalande-Martin J., Louveau I., **Jégou M.**, Tea I., van Milgen J., Gilbert H., 2014. Composition corporelle et caractéristiques métaboliques de porcs en croissance à efficacité alimentaire contrastée et nourris avec des régimes plus ou moins riches en fibres et en lipides. Journées de la Recherche Porcine (Paris, France). Présentation orale GF.

Jégou M., Vincent A., Gondret F., Louveau I., 2015. Recherche d'indicateurs moléculaires sanguins de la variation de l'adiposité corporelle par une approche transcriptomique chez le porc en croissance. Journées de la Recherche Porcine (Paris, France). Présentation orale **JM**.

Jégou M., Louveau I., Gondret F., Lalande-Martin J., Tea I., Le Bihan-Duval E., Berri C., Désert C., Lagarrigue S., Duclos M. J., Collin A., Metayer-Coustard S., Baéza E., 2015. Les métabolites plasmatiques peuvent-ils être des marqueurs du dépôt de gras dans les tissus périphériques chez le poulet. Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras (Tours, France). Présentation orale **JM**.

Baéza E., Gondret F., Chartrin P., Le Bihan-Duval E., Berri C., Gabriel I., Narcy A., Lessire M., Métayer-Coustard S., Collin A., **Jégou M.**, Lagarrigue S., Duclos M. J., 2015. La capacité de stockage des lipides par des poulets maigres ou gras n'est pas influencée par la source d'énergie de l'aliment. Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras (Tours, France). Communication affichée.

Jégou M., 2015. Présentation lors de la finale régionale du concours « Ma thèse en 180 secondes » (Rennes, France). Présentation orale **JM**.

Communications au niveau international

Gondret F., Louveau I., Vincent A., Le Naou T., **Jégou M.**, van Milgen J., Gilbert H., 2013. Responses of adipose tissue to feed efficiency: effects of genetics, diet, and feed restriction. 64th Annual Meeting of the European Association for Animal Production (Nantes, France). Présentation orale GF.

Jégou M., Louveau I., Gondret F., Lalande-Martin J., Tea I., Le Bihan-Duval E., Berri C., Lagarrigue S., Duclos M.J., Baéza E., 2014. Can plasma metabolites predict fat deposition in peripheral tissues of chicken? XIV European Poultry Conference (Stavanger, Norway). Présentation orale **JM**.

Baéza E., Chartrin P., Collin A., Métayer S., Berri C., Gabriel I., Narcy A., Lessire M., **Jégou M.**, Le Bihan-Duval E., Lagarrigue S., Gondret F., and Duclos M.J., 2014. Performance, carcass traits and meat quality of genetically fat and lean broilers are unaffected by dietary energy source. XIVth European Poultry Conference (Stavanger, Norway). Présentation orale DMJ.

Jégou M., Vincent A., Gondret F., Louveau I., 2015. Divergent selection for residual feed intake influences whole blood transcriptomic profile in growing pigs. ASAS Midwestern section meeting (Des Moines, IA, USA). Présentation orale LI.

Formations

Communication et recherche scientifique

Maîtrise de l'information scientifique : Chercher, Veiller, Mémoriser - 22 janvier 2013, 6 heures, Rennes

Communication scientifique en anglais et français : Rédaction d'articles, communication orale - 13 au 17 mai 2013, 21 heures, Rennes

Accompagner et réussir une thèse à l'INRA, Ecole des encadrants et des doctorants - 28 au 31 mai 2013, 28 heures, Sainte-Foy-lès-Lyon

Savoir accueillir un participant anglophone lors d'un colloque - 24 au 26 juin 2013, 18 heures, Le Rheu

Écriture et présentation d'articles scientifiques - 25 août 2013, 4 heures, Nantes

Analyses statistiques de données d'expression microarray - 9 au 11 Septembre 2013, 16 heures, Rennes

Enjeux de la recherche et formation agronomique - 15 au 18 octobre 2013, 32 heures, Rennes

Anatomie du porc - 29 novembre 2014, 4 heures, Saint-Gilles

« Découverte de l'entreprise »

Visite de **Lactalis R&D** - 28 novembre 2013, 8 heures, Retiers

Visite de **InVivo Nutrition et Santé Animale** - 4 septembre 2014, 8 heures, Saint Nolff

Les Doctoriales® de Bretagne 2015 - 16 au 19 février 2015, 54 heures, Rennes

Invitation au rassemblement biennal « **Veilleurs pour l'Ille-et-Vilaine** » - 4 mai 2015, 4 heures, Rennes

Table des matières

Liste des abbréviations……5

Liste des figures……...……7

Liste des tableaux……9

Liste des annexes……12

INTRODUCTION 13

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 16

CHAPITRE 1 - LE METABOLISME ENERGETIQUE CHEZ LES MONOGASTRIQUES 17

1. Le métabolisme des lipides chez les monogastriques 17

1.1 Absorption et transport des lipides 17

1.2 Synthèse et stockage des lipides dans les tissus 17

1.3 La mobilisation des lipides par la lipolyse 19

2. Le métabolisme des glucides 19

2.1 Absorption et transport des glucides 19

2.2 Stockage des glucides 20

3. Régulation hormonale du métabolisme énergétique *21*

CHAPITRE 2 - LES BIOMARQUEURS SANGUINS 24

1. Définition et intérêt d'identifier des biomarqueurs 24

2. Les caractéristiques du sang 25

3. Les méthodes utilisées pour l'identification de biomarqueurs 26

3.1 Démarche 26

3.2 Les approches à haut-débit 27

3.2.1 – Le transcriptome sanguin 27

3.2.1.1 Description de l'approche transcriptomique 27

3.2.1.2 Les ARN sanguins, nouvelle classe de biomarqueurs 28

3.2.2 – Le protéome sanguin 29

3.2.3 – Le métabolome sanguin 30

4. Les biomarqueurs sanguins associés à la variation de masse grasse 31

CHAPITRE 3 - MODELES ANIMAUX DE L'ETUDE 33

1.Deux espèces monogastriques : le porc et le poulet 33

2. Porcs sélectionnés sur la CMJR chez le porc 33

2.1 Présentation du programme de sélection conduit à l'INRA 33

2.2 Croissance et composition corporelle 34
2.2.1 Performances de croissance 34
2.2.2 Composition de la carcasse 35
2.2.3 Caractéristiques des tissus musculaires et adipeux 35
2.3 Statut métabolique et hormonal des porcs sélectionnés sur la CMJR 35
3. Sélection sur le taux de gras abdominal chez le poulet 36
3.1 Présentation du programme de sélection 36
3.2 Croissance et composition corporelle 37
3.2.1 Performances de croissance 37
3.2.2 Composition de la carcasse 37
3.2.3 Caractéristiques des tissus musculaires et adipeux 38
3.3 Métabolisme énergétique 38
3.3.1 Glycémie et insulinémie 38
3.3.2 Lipides plasmatiques 39
3.3.3 Les hormones thyroïdiennes et les facteurs de croissance IGF 39
3.4 Métabolisme protéique 40
4. Influence du régime alimentaire sur la composition corporelle 40
4.1 Effet d'une alimentation riche en lipides et fibres chez les monogastriques 41
4.2 Effet d'une alimentation riche en glucides chez les monogastriques 42

QUESTIONS DE RECHERCHE 43

MATERIELS ET METHODES 45

CHAPITRE 1 - STRATEGIE EXPERIMENTALE 46
1. Le dispositif expérimental chez le porc 46
1.1 Les animaux 46
1.2 Les prélèvements sanguins 46
1.3 Composition corporelle 47
2. Le dispositif expérimental chez le poulet 47
2.1 Les animaux 47
2.2 Les prélèvements sanguins 48
2.3 Composition corporelle 48
3. Etude du transcriptome sanguin 49
3.1 Transcriptome sanguin chez le porc 49
3.1.1 Caractéristiques de la puce à ADN 49

3.1.2 Acquisition des données d'expression 49
3.1.3 Analyse statistique des données d'expression 50
3.2 Transcriptome des PBMCs chez le poulet 50
3.2.1 Extraction des ARN 50
3.2.2 Caractéristiques de la puce à ADN 50
3.2.3 Marquage et hybridation des ARN 50
3.2.4 Réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) 51
3.2.5 Acquisition des données d'expression 52
3.2.6 Analyses statistiques des données d'expression 52
3.2.7 Analyse fonctionnelle 52

RESULTATS 53

CHAPITRE 1 - PARAMETRES PLASMATIQUES INDICATEURS DE LA VARIATION DE MASSE GRASSE 54

1. Variation des paramètres plasmatiques liés à des différences d'engraissement corporel induites par le régime alimentaire chez le porc 54

1.1 Mesures des paramètres plasmatiques avant la mise en place du régime expérimental 54
1.2 Composition corporelle des animaux 54
1.3 Résumé de l'article 1 55
1.4 Mesure de corrélations entre les paramètres plasmatiques et la composition corporelle 68

2. Variation des paramètres plasmatiques liés à des différences d'engraissement corporel induites par le régime alimentaire chez le poulet 68

2.1 Mesures des paramètres plasmatiques avant la mise en place du régime expérimental 68
2.2 Composition corporelle des animaux 68
2.3 Mesure des paramètres plasmatiques après la mise en place du régime expérimental 69
2.4 Mesure de corrélations entre les paramètres plasmatiques et la composition corporelle 81

CHAPITRE 2 - EXPLORATION DU TRANSCRIPTOME SANGUIN DU PORC ET DU POULET EN REPONSE A LA LIGNEE ET AUX REGIMES ALIMENTAIRES 82
1. Résumé de l'article 3 82
2.Corrélation entre la formule sanguine et les paramètres tissulaires 100
3.Lien entre le transcriptome sanguin et les transcriptomes tissulaires 100
4. Le transcriptome des PBMCs chez le poulet 102
4.1 Effet de la sélection sur le transcriptome des PBMCs 102
4.2 Effet de la sélection génétique sur le transcriptome des PBMCs 102
4.3 Effet du régime alimentaire sur le transcriptome des PBMCs 103
DISCUSSION GENERALE 104
1. L'INTERACTION ENTRE LE GENOTYPE ET L'ALIMENTATION A-T-ELLE PERMIS D'ACCROITRE LA VARIABILITE D'ENGRAISSEMENT CORPOREL ? 105
2. VARIATIONS DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DES HORMONES ET DES METABOLITES 107
2.1 Effets de la source énergétique du régime sur la glycémie, l'insulinémie et les acides aminés 107
2.2 Effets du régime alimentaire sur le métabolisme lipidique 108
2.3 Effets de la source énergétique du régime alimentaire sur le métabolisme protéique...
2.4 Les paramètres plasmatiques affectés par la variation de génotype 110
2.4.1 Chez le porc 110
2.4.2 Chez le poulet 110
2.5 Les potentiels biomarqueurs plasmatiques de la masse grasse 111
2.5.1 Mise en évidence des corrélations chez le porc 111
2.4.1 Mise en évidence des corrélations chez le poulet 112
2.4.2 Les paramètres sanguins à retenir chez le porcs et le poulet 113
3 LE TRANSCRIPTOME : UN OUTIL POTENTIEL DE CARACTERISATION DU PHENOTYPE ? 113
3.1 Le transcriptome sanguin : une source de biomarqueurs chez le porc ? 113
3.2 Le transcriptome sanguin : une source de biomarqueurs chez le poulet ? 116
3.3 Le transcriptome sanguin source d'information de variations alimentaires 116
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 119
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 122
ANNEXES……...……...141

Liste des abréviations

AA	Acide Aminé
ADF	Acid detergent fiber ou fibres insolubles dans des détergents acides
ADFI	Average daily feed intake
AGL	Acide gras libre
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNmi	micro ARN
ATGL	Triacylglycérol lipase
BH	Benjamini Hochberg
CMJR	Consommation moyenne journalière résiduelle
CPT1A	Carnitine palmitoyl transférase 1A
Cy3-CTP	Cynanine 3-Cytidine 5'-triphosphate
DAVID	Database for annotation and visualization and integrated discovery
DE	Différemment exprimé
FABP-A	Fatty acid binding protein A
GMQ	Gain moyen quotidien
GPX3	Glutathione peroxydase 3
IC	Indice de consommation
IGF	Insulin-like growth factor
ISU	Iowa State University
LCN2	Lipocalin 2
LD	Longissimus dorsi

LDL	Lipoprotéine de faible densité
LHS	Lipase hormono-sensible
LPL	Lipoprotein lipase
PBMC(s)	Peripheral blood mononuclear cell(s)
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RIN	RNA integrity number
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
TA	Tissu adipeux
TASC	Tissu adipeux sous-cutané
TG	Triglycérides
UTR	Untranslated region
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité

Liste des figures

Introduction

Figure 1. L'environnement nutritionnel influence le phénotype de l'individu à plusieurs échelles de l'organisme.

Synthèse bibliographique

Figure 2. Absorption des lipides chez les monogastriques.
Figure 3. Voies de synthèse des triglycérides.
Figure 4. Nombre d'articles contenant les termes biomarqueur(s), marqueur(s) dans le titre ou le résumé sur Pubmed.
Figure 5. Échanges entre les organes et le sang.
Figure 6. Étapes clés pour l'identification de biomarqueurs.
Figure 7. Méthodologies associées à l'étude des ADN, des protéines et des métabolites caractérisant les différents niveaux des systèmes biologiques.
Figure 8. Les différents types d'ARN connus au sein de la cellule.
Figure 9. Représentation des différentes étapes d'une étude métabolomique.
Figure 10. Représentation de la CMJR.
Figure 11. Évolution de la moyenne de la mesure de l'épaisseur du gras dorsal mesuré par ultrason chez le porc en croissance sélectionné sur la CMJR (6ième générations de sélection).

Question de recherche

Figure 12. Liens complexes entre phénotypes, paramètres plasmatiques et environnement nutritionnel.
Figure 13. Identification des bases biologiques et des biomarqueurs moléculaires permettant d'accroître la robustesse et d'améliorer la production animale.

Matériels et Méthodes

Figure 14. Schéma expérimental chez le porc. LF : régime pauvre en lipides et riche en amidon, HF : régime riche en fibres et en lipides.
Figure 15. Récapitulatif des mesures effectuées dans le plasma sanguin des porcs et des poulets.

Figure 16. Schéma expérimental chez le poulet. LF : régime pauvre en lipides et riche en amidon, HF : régime riche en fibres et en lipides.

Résultats

Figure 17. Représentation du graphique de dispersion des individus par analyse en composante principale chez les porcs âgés de 132 jours (n=12/groupes).

Figure 18. Cercle de corrélation de l'analyse en composante principale des paramètres plasmatiques chez le porc (n=12/groupes) à 132 jours d'âge.

Figure 19. Représentation du graphique de dispersion des individus par analyse en composante principale chez les poulets âgés de 63 jours (n=12/groupes).

Figure 20. Cercle de corrélation de l'analyse en composante principale des paramètres plasmatiques chez les poulets âgés de 63 jours (n=12/groupes).

Publication 1

Figure 1. ^{1}H NMR data from pigs with low or high residual feed intake (RFI) and fed a low-fat, low-fibre (LF) or high-fat, high-fibre (HF) diet.

Figure 2. The main discriminating plasma metabolites for pigs with low or high residual feed intake (RFI) fed a low-fat, low-fibre (grey) or high-fat, high-fibre (black) diet (n = 12/group).

Publication 2

Figure 1. PLS-DA of the ^{1}H NMR data of fat (HF) and lean (LF) lines.

Figure 2. Plasma metabolomics analysis determined at 63 d of age in chickens from fat (HF) and lean (LF) lines (L) and fed with two growing diets (D) exhibiting low (LL) or high (HL) lipid content for 3 h after 12 h of feed withdrawal (n = 12).

Publication 3

Figure 1. Comparison of microarray and qPCR data for eight genes in pigs divergently selected for low or high residual feed intake (RFI).

Figure 2. Comparison of microarray and qPCR data for three genes in pigs fed the HF or LF diet.

Discussion

Figure 21. Comparaison des valeurs d'expression de 8 gènes quantifiés par qPCR chez les porcs sélectionnés sur la CMJR.

Liste des tableaux

Synthèse bibliographique

Tableau 1. Concentration des cellules sanguines chez le porc, l'humain, les rongeurs et le poulet.

Tableau 2. Mesure de l'expression de gènes dans le compartiment sanguin chez des individus ou animaux présentant une différence de masse grasse.

Tableau 3. Concentration plasmatique des métabolites et hormones chez le porc sélectionnés pour la CMJR (n=24/groupe) à 74 jours d'âge.

Tableau 4. Masse corporelle et poids relatif au poids vif des tissus adipeux et musculaires des porcs sélectionnés pour la CMJR ayant reçu soit un régime riche en glucides (LF) soit un régime riche en gras et en fibres (HF ; n=12/groupes).

Tableau 5. Gènes ayant été validés par qPCR qui sont à la fois différemment exprimés dans le sang et dans l'un des tissus chez le porc.

Tableau 6. Gènes ayant été validés par qPCR qui sont à la fois différemment exprimés dans le sang et dans l'un des tissus chez le porc.

Tableau 7. Corrélation des valeurs d'expression des gènes dans le sang et dans les tissus chez les porcs sélectionnés sur la CMJR et nourris avec un régime HF ou LF (n=24 par conditions).

Tableau 8. Nombre de gènes différemment exprimés dans les cellules mononucléaires du sang chez les poulets sélectionnés sur le taux de gras abdominal (gras versus maigre) nourri avec un régime riche en fibres et en lipides (HF) ou un régime riche en glucides (LF).

Tableau 9. Analyse fonctionnelle des processus biologiques et des fonctions moléculaires par représentation des principales ontologies de gènes affectés par la sélection des poulets gras ou maigres.

Tableau 10. Classement des 10 gènes (P<0,01) avec les ratios d'expression les plus élevés identifiés dans les PBMCs chez les poulets sélectionnés sur le taux de gras abdominal.

Tableau 11. Classement des 10 gènes (P<0,01) avec les ratios d'expression les plus élevés identifiés dans les PBMCs chez les poulets nourris avec un régime riche en fibres et en lipides (HF) ou riche en glucides (LF).

Discussion

Tableau 12. Récapitulatif de l'effet du régime sur les paramètres plasmatiques chez le porc et le poulet.

Tableau 13. Mesure de l'expression de gène dans le compartiment sanguin en lien avec une variation de la masse grasse.

Publication 1

Table 1 Composition of the low-fat, low-fibre (LF) and the high-fat, high-fibre (HF) diets during the growing and finishing periods.

Table 2 Body weight and adipose tissue mass relative to body weight in pigs with low or high residual feed intake (RFI) and fed a low-fat, low-fibre (LF) or high-fat, high-fibre (HF) diet (n = 12/group).

Table 3 Significance of the effects of diet and line on plasma metabolites identified by ^{1}H NMR spectroscopic analysis.

Table 4 Plasma concentrations of metabolites and hormones in pigs with low or high residual feed intake (RFI) and fed a low-fat, low-fibre (LF) or high-fat, high-fibre (HF) diet (n = 12/group).

Table 5 Significant correlation between perirenal, subcutaneous adipose tissue mass relative to body weight and plasma levels of metabolites and hormones (n = 48).

Publication 2

Table 1. Effect of line (fat and lean) and diet (HL and LL) on the feed consumption during the experimental period and body composition of chickens at 63 d of age (% BW; mean $\pm$ SE; n = 12).

Table 2. Plasma concentrations of metabolites and hormones measured at 20 d of age in chickens from fat and lean lines and fed with the same starting diet (mean $\pm$ SE; n = 10).

Table 3. Plasma concentrations of metabolites and hormones measured at 63 d of age in chickens from fat and lean lines and fed with two different growing diets exhibiting low (LL) or high (HL) lipid content for 3 h after 12 h of feed withdrawal (mean $\pm$ SE; n = 12).

Table 4. Results of the multivariate (PLS-DA) and univariate analyses of ^{1}H NMR data

Table 5. Plasma metabolomics analysis determined at 63 d of age in chickens from fat and lean lines and fed with two different growing diets exhibiting low (LL) or high (HL) lipid content for 3 h after 12 h of feed withdrawal (n = 12).

Table 6. Significant correlations between the proportion of abdominal fat, fat situated at the top of external face of the thigh (FTET) or Pectoralis major muscle relative to body weight and plasma parameters (n = 48).

Table 7. Multiple regression model for adipose and muscle tissues using whole plasmatic parameters data (n = 48).

Publication 3

Table 1. Composition of low-fat, low-fiber (LF) or high-fat, high-fiber (HF) diets given to pigs during the growing and finishing periods.

Table 2. Blood cell count in pigs with low or high residual feed intake (RFI) fed a low-fat, low-fiber (LF) or high-fat, high-fiber (HF) diet.

Table 3. Number of genes differentially expressed in blood of pigs divergently selected for low or high residual feed intake (RFI) fed a low-fat, low-fiber (LF) or high-fat, high-fiber (HF) diet.

Table 4. Relevant GO biological processes in blood as affected by selection for RFI.

Table 5. Top-ranked genes with fold changes in expression greater than |2| identified in the whole blood of pigs divergently selected for low or high residual feed intake (RFI).

Table 6. Differentially expressed genes in pigs fed diets with contrasted energy source and nutrients.

Liste des annexes

Annexe I

Caractéristiques et composition des régimes chez le porc en période de croissance (74 à 102 jours) ou de finition (102 à 132 jours).

Annexe II

Caractéristiques et composition des régimes chez le poulet de 21 à 63 jours.

Annexe III

Article : "Dietary energy sources affect the partition of body lipids and the hierarchy of energy metabolic pathways in growing pigs differing in feed efficiency." de Gondret et al. (2014).

Annexe IV

Article : "The ability of lean or fat chickens to synthesize and store lipids is not altered by the dietary energy source." de Baéza et al. (2015).

Annexe V

Droites de corrélation entre l'expression des sondes DE dans le sang et l'expression de cette même sonde dans les tissus.

Annexe VI

Coefficient de corrélation (r) entre le nombre des cellules sanguines et les paramètres de croissance de l'animal.

Annexe VII

S1 Table. Primer sequences used for analysis of gene expression by qPCR.

Annexe VIII

S2 Table. Probes expressed in blood affected by the interaction line x diet, of pigs selected for low or high residual feed intake (RFI) fed a low-fat, low-fiber (LF) or high-fat, high-fiber (HF) diet.

Annexe IX

Sondes différemment exprimées dans les PBMCs en fonction de l'interaction entre la lignée et le régime alimentaire pour les poulets sélectionnés sur le taux de gras abdominal nourris avec un régime LF ou HF.

Introduction

L'adiposité corporelle et la répartition des lipides dans l'organisme sont des préoccupations constantes en production animale (Sillence, 2004), car ces éléments contribuent à l'optimisation de la production d'animaux devant être robustes, efficaces et capables de s'adapter aux contraintes d'élevage. Il est nécessaire de produire des animaux maigres pour répondre à la demande des producteurs, des abattoirs et des consommateurs. En effet, concernant la production porcine, les producteurs sont pénalisés quand le poids de la carcasse ou l'épaisseur de lard dorsal, dépassent les seuils définis par les abattoirs. L'efficacité d'utilisation de l'aliment est moindre chez les animaux gras comparés aux animaux maigres. Or, l'alimentation est un facteur clé des performances économiques et environnementales du système d'élevage. Le coût de l'alimentation représente plus de 60% du coût total de production chez le porc et plus de 70% du coût de production chez le poulet (synthèse Agreste 2015/261). Par conséquent, il est nécessaire d'améliorer l'efficacité d'utilisation des aliments. Cette amélioration peut être obtenue par la combinaison de la sélection génétique d'animaux plus efficaces, de la gestion de la ration alimentaire adaptée aux besoins de l'animal et d'une amélioration des conditions d'élevage qui permet d'optimiser la production de viande et des sous-produits d'origine animale à moindre coût. L'ajustement de la composition du régime alimentaire en fonction des besoins de l'animal doit s'intégrer dans les schémas de développement durable. L'animal et l'humain partageant une grande partie de leurs ressources alimentaires, l'utilisation de coproduits de céréales tels que les drêches de blé, permet de nourrir les animaux de rente avec des aliments qui sont non digestibles pour l'humain (Woyengo et al., 2014). L'utilisation de coproduits à des fins économiques et environnementales nécessite de disposer d'animaux capables de s'adapter aux variations des ressources alimentaires. Cela nécessite une meilleure connaissance des mécanismes d'adaptation de l'animal. En effet, les animaux selon leurs besoins en énergie vont soit la stocker sous forme de lipides soit l'utiliser en cas de moindre disponibilité alimentaire.

Pour explorer la dynamique de la flexibilité énergétique, il est nécessaire de disposer d'outils peu invasifs et surtout qui ne nécessitent pas l'abattage de l'animal. Ainsi, le sang constitue un compartiment d'étude intéressant. En effet, il est en contact avec tous les organes de l'organisme, il est sensible aux variations environnementales et il est relativement facile à prélever (Liew et al., 2006). Des cellules et de nombreuses molécules circulent dans le sang, telles que des hormones ou des métabolites. Certains paramètres plasmatiques sanguins sont déjà utilisés en biochimie médicale, car ils signent un dysfonctionnement du métabolisme

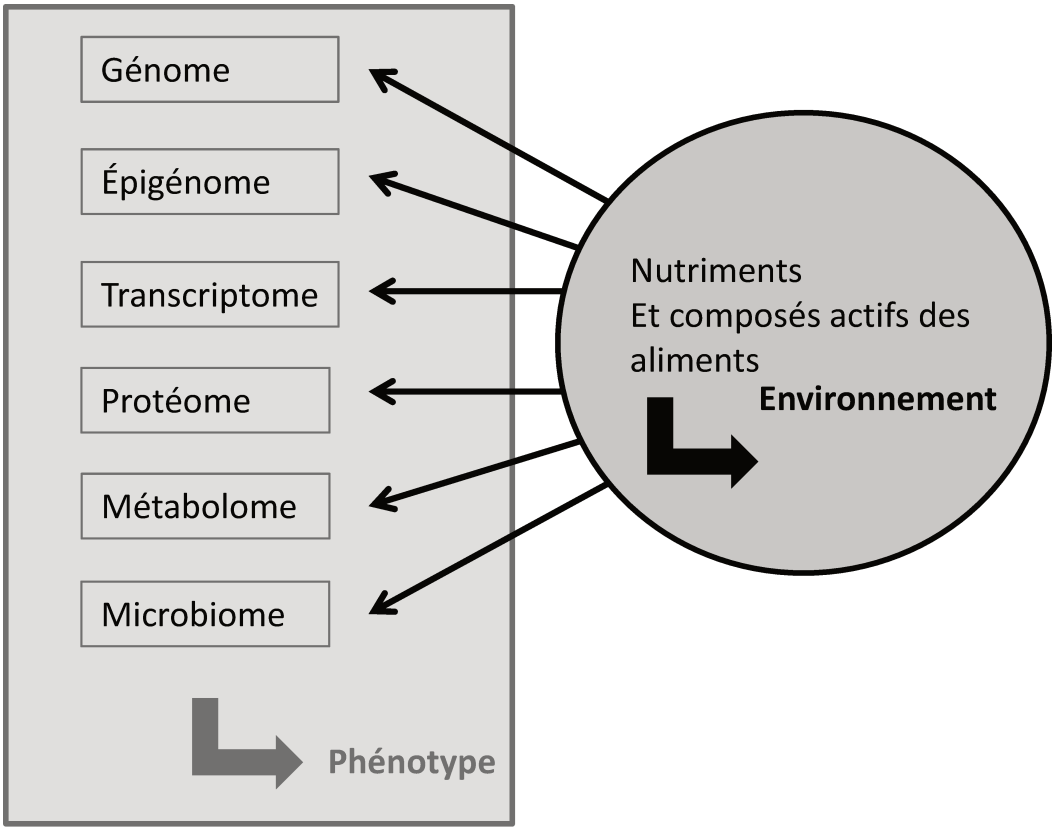


Figure 1. L'environnement nutritionnel influence le phénotype de l'individu à plusieurs échelles de l'organisme (Sales et al., 2014).

d'un individu entraînant une pathologie. Par exemple, la glycémie est utilisée pour le diagnostic du diabète depuis plusieurs années. L'identification de marqueurs plasmatiques à différentes échelles (hormones, métabolites,…) en lien avec la variation de la masse grasse est activement étudiée chez l'humain. Plus récemment, l'analyse des niveaux d'expression des gènes exprimés dans le sang a permis de révéler que certains gènes pouvaient être des marqueurs moléculaires potentiels des caractères phénotypiques ou permettaient le diagnostic et/ou le suivi de pathologies (Mohr et Liew, 2007). Il a ainsi été montré que l'expression des gènes des cellules sanguines peut refléter des variations de masse grasse chez l'humain (Ghosh et al., 2010 ; Berisha et al., 2011 ; O'Grada et al., 2014) et le rongeur (Konieczna et al., 2014 ; Rees et Hay, 2014 ; Diaz-Rua et al., 2015). Le génome du rongeur et celui de l'humain montrent des similarités mais également des différences (Szymanska et al., 2012), ce qui renforce l'intérêt de considérer d'autres espèces animales pour identifier des biomarqueurs liés à des variations de masse grasse (Martin et al., 2013). Le premier objectif de ce travail de thèse est d'étudier les modifications d'hormones et de métabolites circulants en réponse à une variation de masse grasse en considérant deux espèces monogastriques, le porc et le poulet, sélectionnées de façon divergente pour des caractères clés en production animale (efficacité alimentaire pour le porc, adiposité abdominale pour le poulet) et confrontés à des régimes de sources énergétiques contrastées (soit riche en glucides soit riche en fibres et en lipides).

Dans un deuxième temps, il s'agira de rechercher si parmi l'ensemble des transcrits (transcriptome) présents dans le sang, certains peuvent être informatifs de la variation de la masse grasse chez le porc et chez le poulet, ce qui équivaut à s'interroger sur l'interaction entre le phénotype et l'environnement (alimentation) **(Figure 1)**. Les transcrits qui seraient différemment exprimés à la fois chez ces deux espèces phylogénétiquement distantes, permettraient d'identifier des marqueurs génériques de la variation de masse grasse.

Ce travail de thèse comprend tout d'abord une synthèse bibliographique qui permettra de spécifier les bases du fonctionnement du métabolisme énergétique chez les animaux monogastriques, de définir la notion de biomarqueurs et de présenter les deux modèles animaux sur lesquels nous nous sommes appuyés pour répondre aux questions de recherche qui sont ensuite décrites. Après une description de la partie expérimentale, les résultats obtenus seront présentés en grande partie sous forme d'articles scientifiques publiés et ils feront l'objet d'une discussion. Enfin, les principales conclusions et les perspectives de ce travail de thèse seront présentées.

Synthèse bibliographique

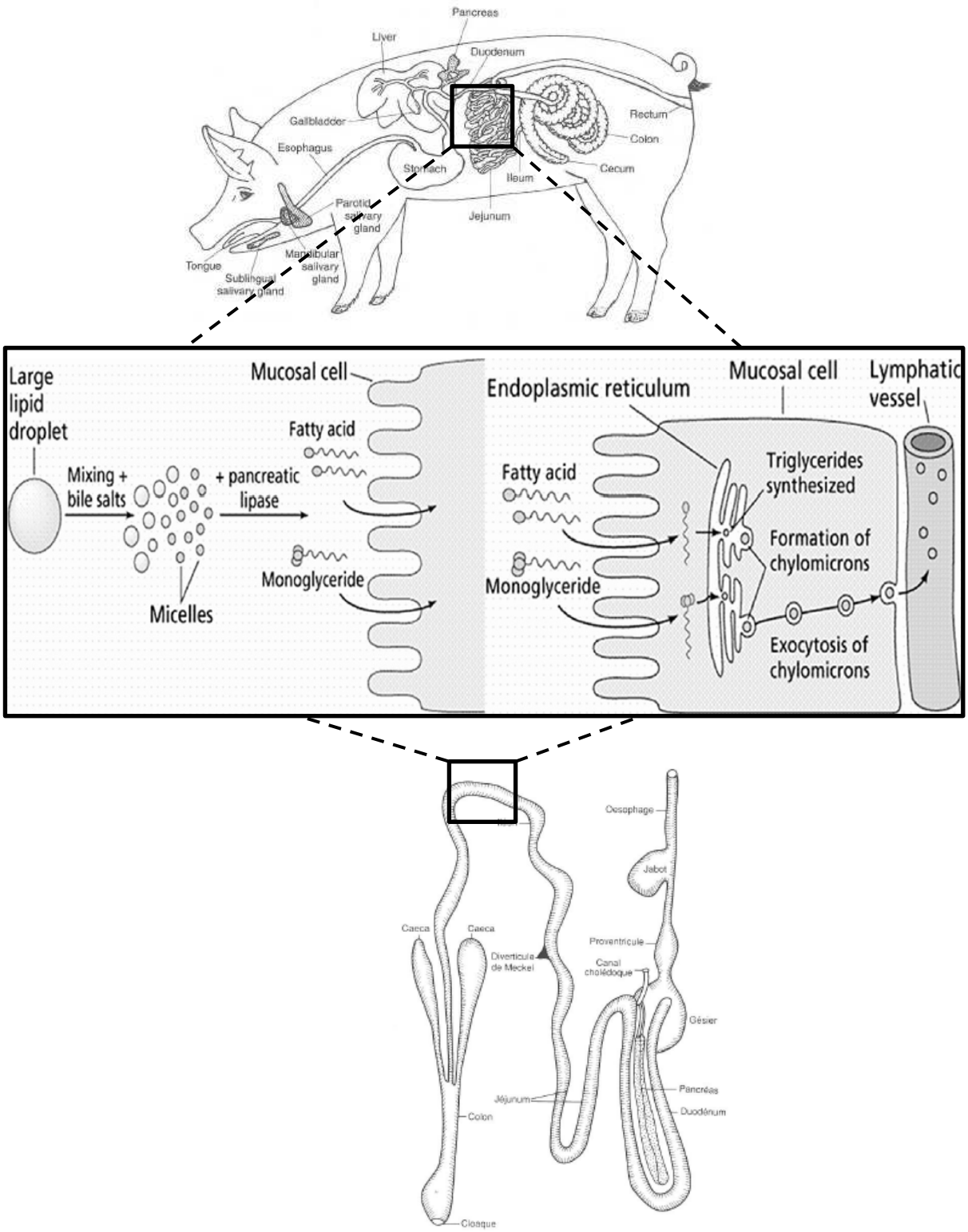


Figure 2. Absorption des lipides chez les monogastriques. (Larbier et Leclercq, 1992 ; Yen et al., 2001 ; Kerr et al., 2015).

Chapitre 1 - Le métabolisme énergétique chez les monogastriques

Les animaux monogastriques ont besoin de stocker l'énergie sous forme de lipides pour faire face aux périodes hypoglycémiantes ou d'une demande en énergie élevée (intervalle entre deux repas, période de jeûne, effort physique intense, etc.). Ces réserves énergétiques sont essentiellement stockées au niveau des différents tissus adipeux de l'organisme. Outre son rôle dans le stockage de l'énergie afin de maintenir l'homéostasie de l'animal, le tissu adipeux blanc a un rôle de soutien des organes, d'isolant thermique et a également un rôle endocrine et paracrine qui ne sera pas développé ici.

1. Le métabolisme des lipides chez les monogastriques

1.1 Absorption et transport des lipides

L'aliment destiné aux animaux est généralement un mélange de matières premières de diverses origines et de composition chimique complexe. Les processus de digestion et d'absorption, mécaniques via les contractions musculaires des organes impliqués dans la digestion, chimiques via l'activation de propeptides enzymatiques ont lieu dans tout le tube digestif. L'absorption des nutriments comprenant les lipides s'effectue au niveau de l'intestin grêle **(Figure 2)**. Après absorption dans l'entérocyte, les acides gras à chaines courtes vont pouvoir passer directement dans le sang ; les monoglycérides à longue chaine sont ré-estérifiés avec une seconde longue chaine d'acide gras permettant la formation de diglycérides, qui sont à nouveau estérifiés formant ainsi des triglycérides (Kerr et al., 2015). Les triglycérides néosynthétisés sont ensuite associés avec le cholestérol, les esters de cholestérol, les phospholipides et certaines protéines (le complexe lipide-protéine est appelé lipoprotéine, la protéine est appelée apolipoprotéine) permettant la formation de chylomicrons (appelés portomicrons chez l'oiseau) qui vont passer de l'intestin dans la lymphe pour ensuite rejoindre la circulation sanguine afin d'être captés par les tissus. Comme pour les mammifères, plusieurs apolipoprotéines ont été décrites chez les espèces aviaires, cependant leur rôle n'est pas encore clairement défini (Walzem, 1996 ; Sato et al., 2009).

1.2 Synthèse et stockage des lipides dans les tissus

Les réserves énergétiques sont stockées sous forme de triglycérides dans les adipocytes (Grégoire et al., 1998). Ces triglycérides sont accumulés dans les adipocytes de deux manières ; soit par la lipogenèse de novo à partir de précurseur non-lipidique (à partir des

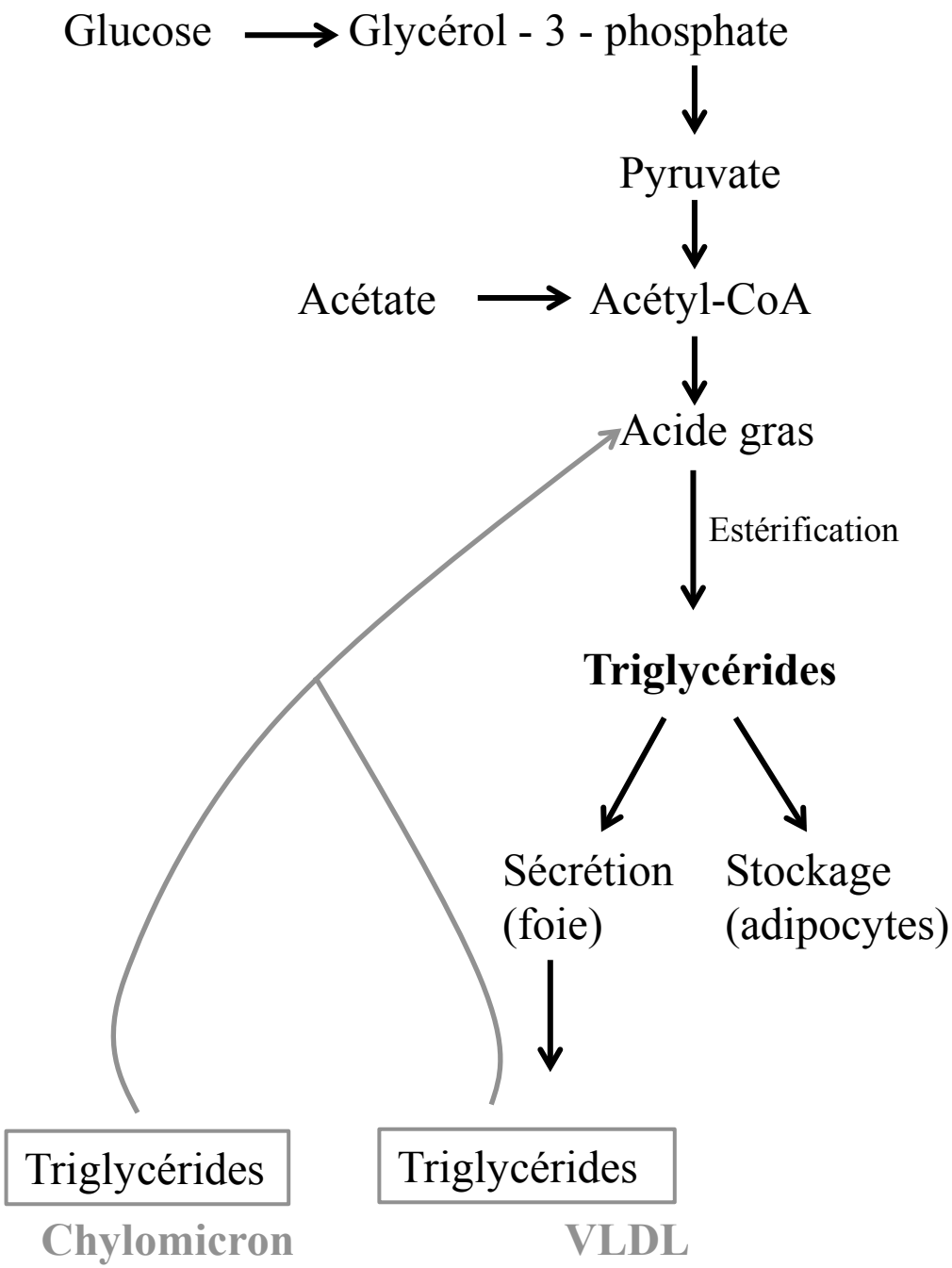


Figure 3. Voies de synthèse des triglycérides.

glucides) ; soit à partir de la capture d'acides gras plasmatiques circulants (Krogdahl, 1985). Le glucose est un précurseur non-lipidique majeur des acides gras. En effet, chez le porc, l'oiseau, ou l'humain, le précurseur de la synthèse des acides gras provient essentiellement du catabolisme du glucose via la glycolyse. La glycolyse correspond à la voie de dégradation du glucose en pyruvate dans le cytoplasme des cellules. Le pyruvate peut ensuite être transformé en acétyl-CoA. Cet acétyl-CoA va ensuite permettre par plusieurs réactions enzymatiques la synthèse d'acides gras de novo. La lipogenèse va avoir lieu de façon majoritaire au niveau du tissu adipeux chez le porc, la capacité lipogénique des adipocytes étant très élevée (O'Hea et Leveille, 1968a), alors qu'elle a lieu essentiellement au niveau du foie chez le poulet (Leveille et al., 1975), la capacité lipogénique des adipocytes étant très faible (O'Hea et Leveille, 1968b).

Dans les périodes de disponibilité et d'excès alimentaires, l'énergie est stockée sous forme de triglycérides **(Figure 3)** ; les triglycérides forment la gouttelette lipidique des adipocytes. Seuls les adipocytes déjà différenciés sont capables de les accumuler. Le tissu adipeux renferme presque la totalité des triglycérides de l'organisme, les triglycérides représentent plus de 95% de la fraction lipidique qui constitue ces tissus (Girard et al., 1988). Ils sont essentiels dans le stockage de l'énergie car ils permettent un apport énergétique par unité de poids qui est important (deux fois plus important que celui des glucides).

L'accrétion du tissu adipeux s'effectue en fonction du développement de l'animal et de ses besoins. Chez le porc et le poulet, les tissus adipeux sont répartis selon plusieurs dépôts. Chez le porc, les tissus adipeux se développent d'abord au niveau sous-cutané, puis mésentérique et périrénal, intermusculaire et enfin intramusculaire (Henry, 1977). Ces dépôts représentent environ 20% de la masse grasse corporelle chez un porc conventionnel de 90 kg en poids carcasse lors de l'abattage (Daumas, 2010). Chez le poulet, le plus important est le tissu adipeux abdominal suivi du tissu adipeux du cou, des cuisses, du dos et viscéral. Ces dépôts représentent environ 20% de la masse grasse corporelle chez un poulet de chair standard contenant entre 150 et 220 g de lipides par kilogramme de poids corporel lors de l'abattage. Le squelette et la peau contiennent respectivement 15 et 19% des lipides corporels (Scanes, 2015).

1.3 La mobilisation des lipides par la lipolyse

La lipolyse est due à l'action de lipases présentes dans le cytoplasme des adipocytes qui sont activées par l'adrénaline et la noradrénaline, qui correspondent à des hormones médullo-surrénaliennes ou transmetteurs provenant des terminaisons sympathiques dans le tissu adipeux blanc (Gardan, 2007). Les trois enzymes clés de la lipolyse sont la triacylglycérol lipase (ATGL) la lipase hormono-sensible (LHS) et la mono-acylglycérol lipase (MGL). L'ATGL contrôle l'hydrolyse des triacylglycérols en diacylglycérols, la LHS contrôle l'hydrolyse des diacylglycérols en monoacylglycérols, et la MGL permet la libération du troisième acide gras en dégradant le monoacylglycérol en glycérol. Une interaction entre la LHS et la FABP4 (fatty acid binding protein, aussi connue sous le nom de FABP-A) a été démontrée (Shen et al., 1999). La FABP4 favoriserait l'action de la LHS. Les acides gras libres libérés lors de la lipolyse se lient à la FABP4 cytosolique et peuvent ensuite être ré-estérifiés avec le glycérol-3-phosphate pour être diffusés dans le plasma où ils pourront se lier à l'albumine, ou être oxydés dans les mitochondries. Les acides gras libérés par la lipolyse sont donc utilisables par les autres cellules de l'organisme à des fins énergétiques.

2. Le métabolisme des glucides

2.1 Absorption et transport des glucides

Les polysaccharides provenant de l'alimentation vont être dégradés en glucose (glucide majeur circulant chez le porc et le poulet) par des polysaccharidases (Breves et al., 2007). Le glucose est une source énergétique importante pour le métabolisme énergétique de la majorité des cellules. Les principaux sucres présents dans le régime alimentaire sont présents sous forme de diholoside tel que le saccharose (une molécule de glucose et une molécule de fructose), le lactose (une molécule de glucose et une molécule de galactose) et le maltose (deux molécules de glucose) ou sous forme d'oses simples tels que le glucose et le fructose (Havel, 2005). C'est pourquoi, l'absorption du glucose, du galactose et du fructose au niveau intestinal est abordée ci-après. Le glucose est le précurseur de nombreux glucides et c'est un composant de nombreuses macromolécules telles que les glycoprotéines, les protéoglycanes et les sphingolipides. Le glucose et le galactose présents dans la lumière intestinale au niveau de l'intestin grêle vont être transportés par des récepteurs spécifiques du glucose, qui sont des glycoprotéines exprimées exclusivement dans la bordure en brosse des entérocytes de l'intestin grêle et qui ont une haute affinité pour les monosaccharides. L'entrée du glucose et du galactose au sein de l'entérocyte fait appel à un transport actif car il nécessite de l'ATP.

L'absoption et le transport des glucides chez les mammifères ont été détaillés ci-dessous, des précisions sont apportées lorsque des différences sont observées avec les oiseaux.

L'entrée du glucose et du galactose s'effectue par le pôle apical de l'entérocyte grâce au récepteur Na+/glucose co-transporteur 1 : SGLT1 (transport actif), présent au niveau de l'intestin grêle (Shirazi-Beechey et al., 2011). La régulation de la translocation de ce récepteur sur la membrane des entérocytes est essentielle pour l'apport du glucose dans l'organisme et éviter la malabsorption du glucose. La sortie du glucose ou du galactose au niveau du pôle basal de l'entérocyte vers la circulation générale s'effectue grâce à un transporteur Na+-indépendant GLUT2 (diffusion facilitée). Le fructose va être absorbé par l'entérocyte grâce au transporteur Na+-indépendant : GLUT5 (Thorens, 1996), qui transporte le fructose de la lumière intestinale vers l'entérocyte par gradient de concentration. Le fructose après accumulation dans l'entérocyte va quitter la cellule par son pôle basal et être libéré dans le sang grâce au transporteur GLUT2. Comparé aux mammifères, le poulet présente une hyperglycémie (glycémie deux fois plus élevée), cependant, le métabolisme des glucides chez le poulet montre de nombreuses similarités avec celui des mammifères (Simon et al., 2011). Les concentrations plasmatiques de glucose sont identiques chez le poulet et le canard à l'âge adulte (Rideau et Métayer-Coustard, 2012). Une étude menée chez de jeunes poulets a montré que la glycémie varie de 1,56 à 3,30 g/L (Scanes, 2008). Les récepteurs au glucose diffèrent entre le porc et le poulet, le récepteur GLUT4 insulinosensible par exemple n'a pas été répertorié chez les espèces aviaires (Seki et al., 2003). Ceci peut être la conséquence d'un manque de spécificité d'anticorps permettant l'identification de ce récepteur, ou à l'absence de ce récepteur chez le poulet ou oiseau étant donné qu'aucune séquence orthologue à la séquence codant GLUT4 chez l'humain n'est observé dans le génome du poulet sur la base de donnée Ensembl.

2.2 Stockage des glucides

Le glucose est essentiellement stocké dans le foie et les muscles sous la forme d'un polymère de glucose, le glycogène. L'hydrolyse du glycogène hépatique permet la libération de glucose dans le sang qui sera disponible pour les autres organes (le cerveau, le cœur et les muscles squelettiques) ou la synthèse de lipides. Le glucose musculaire va être converti en ATP par la voie de la glycolyse ou de la néoglucogenèse, la production de cet ATP va permettre la contraction du muscle (Matsuhisa et al., 1998). Les adipocytes ont également la capacité de capter le glucose (Etherton et al., 1981), ce qui va permettre la synthèse de lipides au sein

même de l'adipocyte et accroître la quantité de tissu adipeux chez le porc, et plus faiblement chez le poulet.

3. Régulation hormonale du métabolisme énergétique

L'insuline par son action directe sur la glycémie joue un rôle clé dans le métabolisme énergétique. Les axes somatotropes (GH, IGF-I) et thyréotrope (triiodothyronine, thyroxine) sont également impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique. D'autres hormones telles que la leptine ou la ghréline, vont avoir un rôle sur la prise alimentaire ce qui pourra avoir un impact sur le métabolisme énergétique.

L'insuline est une hormone qui régule la concentration du glucose dans le sang. Cette hormone est synthétisée par les cellules β-pancréatiques. Suite à la prise d'un repas, la glycémie augmente, l'insuline va alors favoriser la glycogenèse dans le foie et les muscles et la lipogenèse dans le tissu adipeux en stimulant le métabolisme du glucose et en diminuant la néoglucogenèse et la lipolyse (Louveau et Gondret, 2004). L'insuline régule la concentration du glucose à l'intérieur de la cellule, elle induit la capture du glucose et son oxydation. Cette hormone stimule la lipogenèse hépatique de novo chez le poulet et la synthèse de VLDL. L'homéostasie glucidique reste une question à élucider chez le poulet. En effet, les bases biologiques permettant d'expliquer la forte glycémie basale sans modification de l'insulinémie chez le poulet en comparaison des mammifères (Simon et al., 2011) ne sont pas encore connues (Scanes, 2015).

L'hormone de croissance (GH) est synthétisée de façon pulsatile au niveau de l'hypophyse. Cette hormone a été largement étudiée chez les animaux de rente au vu de ses effets sur leur croissance (Paris et al., 2006). Les principaux tissus placés sous le contrôle de la GH sont le muscle, le tissu adipeux, le foie et le tissu osseux. La biosynthèse de l'IGF-I est modulée par la GH (Louveau et Bonneau, 2001), qui a des effets localisés sur les tissus. Il y a une relation positive entre la concentration plasmatique de la GH et la concentration plasmatique de l'IGF-I, qui sont connus pour stimuler de nombreux processus anaboliques. Ce facteur de croissance est notamment synthétisé par les hépatocytes, les cellules musculaires, le foie, le muscle et le tissu adipeux. Il est présent dans la circulation sanguine où il est lié à des protéines de liaison (IGFBPs). Ces protéines forment un complexe stable avec l'IGF-I qui permet son transport dans la circulation générale et elles contrôlent également la distribution, la fonction et l'activité de l'IGF-I (Hossner et al., 1997). Une administration d'IGF-I chez le poulet réduit la

quantité de gras abdominal (Buyse et Decuypere, 1999) et l'expérience inverse, c'est-à-dire l'inhibition de l'IGF-I induit une augmentation de la masse grasse.

Les hormones thyroïdiennes sont synthétisées et stockées dans la glande thyroïde. La triiodothyronine (T3) participe à la régulation de la croissance, du développement ainsi que du métabolisme et de la température corporelle (Mullur et al., 2014). La triiodothyronine est produite par la déiodination de la thyroxine (T4). La triiodothyronine circule dans le plasma, liée à la globuline ou à la préalbumine. Cette hormone est la plus active des hormones thyroïdiennes. La thyroxine (T4) circule dans le plasma sanguin soit associée à la TBG (Thyroid Binding Globulin), soit libre où elle va pouvoir être déiodinée pour être transformée en triiodothyronine, ce qui explique une plus forte concentration plasmatique de T4 que de T3. Les mécanismes de synthèse et de sécrétion de ces deux hormones sont équivalents chez les mammifères et les espèces aviaires (McNabb, 1992). Les hormones thyroïdiennes vont également avoir un impact sur le métabolisme énergétique via la stimulation du métabolisme des glucides (Mullur et al., 2014). L'altération des hormones thyroïdiennes peut influencer le métabolisme énergétique vu que l'augmentation des hormones thyroïdiennes facilite le stockage du glycogène hépatique, et une diminution de celles-ci induit une réduction du glycogène et du glucose plasmatique. Il a en effet été montré que la T3 stimulait la néoglucogenèse notamment dans les cas d'hyperthyroïdie et qu'une hypothyroïdie induisait une réduction de la glycogenèse (Comte et al., 1990).

Chez le porc tout comme chez le rongeur ou chez l'humain, la leptine, découverte en 1994 (Zhang et al., 1994), est une hormone synthétisée par les adipocytes qui agit comme un agent lipostatique, qui par envoi d'un signal à l'hypothalamus permet l'arrêt de la prise alimentaire. La concentration plasmatique de leptine est proportionnelle à la masse de tissus adipeux. La présence de la leptine chez le poulet a été (et est encore à ce jour) controversée (Wylie, 2011), des études démontrant la présence ou l'absence de la leptine chez le poulet (Taouis et al., 1998 ; Sharp et al., 2008). Plus récemment, Dakovic et al., (2014) ont démontré la disparition de la séquence codant le gène de la leptine et donc l'absence de leptine chez le poulet et plus généralement chez les volailles domestiques.

La ghréline a été identifiée comme ligand naturel du récepteur des secrétagogues de l'hormone de croissance chez le rat (Kojima et al., 1999). Cette hormone est synthétisée au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle. Chez les mammifères, cette hormone a un rôle orexigénique. Une injection de ghréline au niveau central ou périphérique induit une

augmentation de la prise alimentaire chez le rat (Wren et al., 2001) ou chez la souris (Tschöp et al., 2000). La ghréline est aussi présente chez les porcs, les volailles, les bovins et les ovins (van der Lely et al., 2004). La concentration plasmatique de la gréline augmente lors de périodes de jeûne et la prise alimentaire restaure un niveau basal de ghréline. Contrairement à l'humain et aux rongeurs, l'injection de ghréline chez le poulet induit une diminution de la prise alimentaire (Furuse et al., 2001).

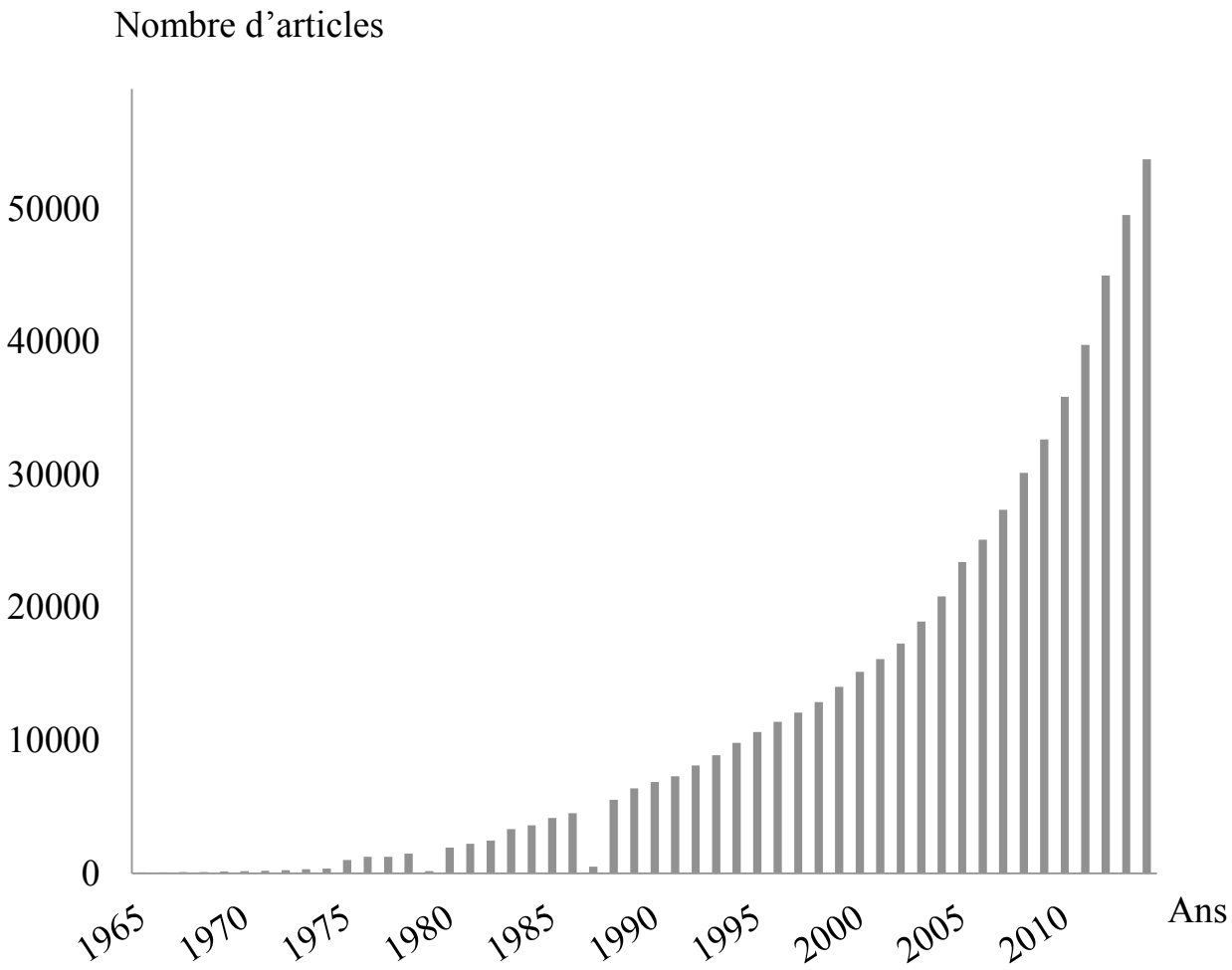


Figure 4. Nombre d'articles contenant les termes biomarqueur(s), marqueur(s) dans le titre ou le résumé sur Pubmed.

Chapitre 2 - Les biomarqueurs sanguins

Le concept de biomarqueur est apparu tôt dans le domaine de la médecine. Par exemple, la glycémie, dosée depuis 1877 dans le sang (Bernard, 1877), est un marqueur reconnu pour caractériser le diabète. Les biomarqueurs sont également utilisés en productions animales pour la gestion génétique des populations, pour l'élaboration de schémas de sélection et pour l'étude de mécanismes liés à une variation phénotypique. Des marqueurs sanguins en lien avec des variations de l'engraissement corporel ont déjà été utilisés pour améliorer les schémas de sélection chez le poulet et le porc (Whitehead et Griffin, 1986 ; Bunter et al., 2005 ; Bunter et al., 2010). L'utilité du biomarqueur en production animale apparait dans les situations ou les données classiques sont peu informatives vis-à-vis du caractère étudié ou très coûteuses à obtenir, ou dont la mesure nécessite l'abattage préalable des animaux. La notion de marqueurs est apparue vers 1950. Une recherche par mots clés réalisée sur l'outil de recherche bibliographique Pubmed permet d'observer que le nombre d'études comportant le terme biomarqueur dans le titre ou dans le résumé a considérablement augmenté à partir des années 2000 (**Figure 4**). Ceci coïncide avec l'avènement des nouvelles technologies notamment avec le séquençage complet du génome humain (2003), et de manière plus large, avec les avancées dans les techniques d'analyses à haut-débit dans le domaine de la biologie moléculaire (séquençage d'ADN à haut-débit, puces à ADN, perfectionnement des méthodologies d'analyses en protéomique et en métabolomique). Ces avancées technologiques ont permis le perfectionnement de la recherche de biomarqueurs.

1. Définition et intérêt d'identifier des biomarqueurs

Selon un groupe de travail du « National Institutes of Health » (Biomarkers Working Group, 2001), un biomarqueur est défini comme « une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques, de processus pathologiques, ou de réponses pharmacologiques en réponse à une intervention thérapeutique ». Il est nécessaire que ces biomarqueurs soient fiables, précis et de préférence peu invasifs. Les biomarqueurs peuvent avoir différentes origines et ne sont pas nécessairement des molécules biologiques. Par exemple, les mesures effectuées par la thermographie infrarouge permettent de quantifier le stress thermique chez les volailles (Mignon-Grasteau et al., 2014). La mesure d'épaisseur de gras dorsal (chez le porc) par échographie ou lors de l'abattage sont des biomarqueurs de variations de masse grasse. Les techniques d'imageries tel que l'absorptiométrie biphotonique à rayon X, la tomodensitométrie, l'imagerie par résonnance magnétique nucléaire ou

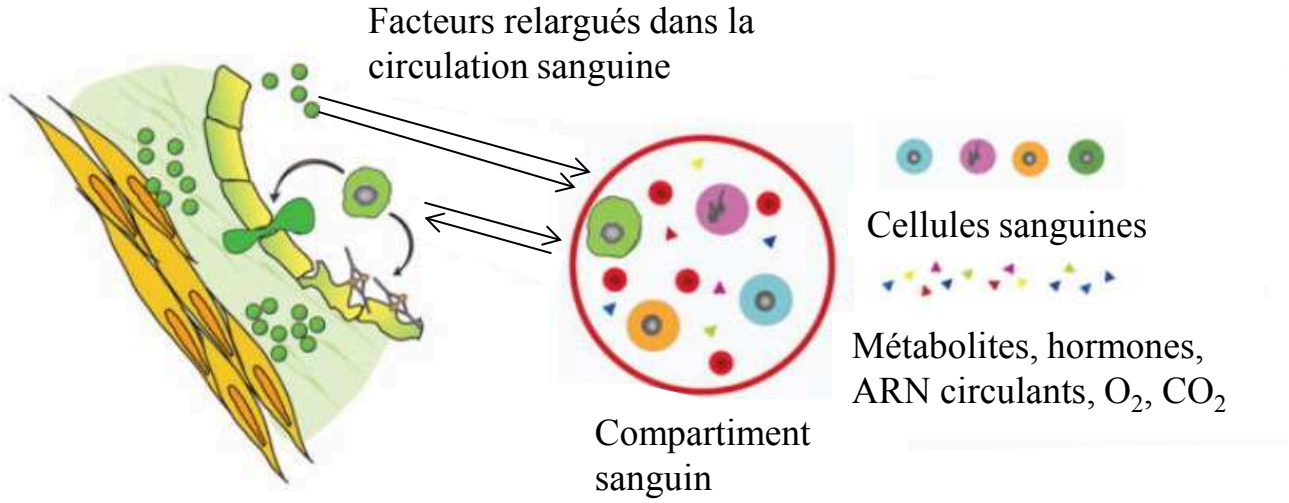


Figure 5. Échanges entre les organes et le sang (adapté de Pascual et al., 2010).

Tableau 1. Concentration des cellules sanguines chez le porc, l'humain, les rongeurs et le poulet.

Références	Espèces	Leucocytes totaux ($10^3.mm^{-3}$)	Neutrophiles ($10^3.mm^{-3}$)	Lymphocytes ($10^3.mm^{-3}$)	Monocytes ($10^3.mm^{-3}$)	Érythrocytes totaux ($10^6.mm^{-3}$)	Plaquettes ($10^3.mm^{-3}$)
Friendschip et al., 1984	Porc	22,20	7,40	11,10	1,50	7,00	430*
Ambayya et al., 2014	Humain	7,72	5,53	3,32	0,76	5,24	246
Ameri et al., 2011	Rat	9,59	1,13	8,48	0,18	8,74	1073
Ameri et al., 2011	Souris	9,23	1,58	6,63	0,33	9,50	1353,7
Samour, 2006	Poulet	5,7	4	2,7	0,5	3,2	18

*Badimon et al., 1988

l'échographie (Scholz et al., 2015) ont permis de définir des paramètres anatomiques, physiologiques ou moléculaires sur des porcs vivants (tomographie) afin d'estimer le pourcentage de masse maigre, le poids et la composition tissulaire (Font-i-Furnols et al., 2015). Cependant, ces méthodes d'évaluation de la composition corporelle nécessitent l'acquisition d'un matériel qui est onéreux et trop invasif. En effet, l'utilisation de ces appareils nécessite une immobilisation totale de l'animal qui est obtenue par anesthésie. Les fluides corporels (sang, urine, salive…) sont des compartiments optimaux pour l'identification des biomarqueurs pouvant être des molécules circulantes dans ces fluides, en comparaison des biomarqueurs nécessitant une biopsie tissulaire ou un matériel trop onéreux (scanner…).

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes spécifiquement intéressés aux biomarqueurs du compartiment sanguin. Il peut être souligné qu'un volume d'échantillon de sang peut être prélevé en quantité suffisante sans avoir besoin d'anesthésier l'animal contrairement aux prélèvements qui sont réalisés par biopsie dans les tissus comme par exemple le foie, le muscle, ou encore le tissu adipeux. De plus, les prélèvements sanguins peuvent être réalisés à différents temps afin d'effectuer des cinétiques de variation des paramètres sanguins, la cathétérisation de ces animaux étant possible.

2. Les caractéristiques du sang

Le sang a une composition complexe et hétérogène. C'est un tissu conjonctif spécialisé, composé de cellules (les éléments figurés) réparties dans un liquide (le plasma). L'ensemble est véhiculé dans les vaisseaux sanguins. Le sang assure le transport des nutriments et de l'oxygène de tous les organes, ce qui permet la régulation de leurs fonctions (**Figure 5**). Le sang se sépare en trois phases distinctes, une phase plasmatique (55%) et deux phases cellulaires comprenant les érythrocytes (globules rouges ou hématies, 45%), et les leucocytes (globules blancs) et les plaquettes (thrombocytes, 2%). Les thrombocytes chez le poulet représentent environ 70% des cellules mononucléaires sanguines (Seliger et al., 2012). La quantification des différents types cellulaires permet d'obtenir la formule sanguine également appelée numération sanguine ou hémogramme qui diffère selon les espèces. Le nombre de leucocytes est plus élevé chez le porc que chez l'humain, le rongeur ou le poulet, ce qui est dû à une population lymphocytaire et monocytaire plus élevée (**Tableau 1**). La concentration plaquettaire est le paramètre qui varie le plus dans les différentes espèces. Le nombre d'érythrocytes totaux est du même ordre de grandeur chez l'humain, le porc et le poulet.

Chaque type cellulaire se caractérise par sa morphologie et sa ou ses fonctions. Chez les oiseaux, les érythrocytes et les thrombocytes sont nucléés. Par conséquent, les outils permettant d'effectuer les hémogrammes chez les mammifères n'étaient pas appropriés pour les effectuer chez les volailles. Une étude récente (Seliger et al., 2012) a permis de montrer que la formule sanguine pouvait à présent être déterminée de façon répétable, précise et sur un grand nombre d'échantillons et en peu de temps chez le poulet par cytométrie en flux. Chez les mammifères, et les oiseaux, les leucocytes sont nucléés. Différents types de leucocytes se distinguent en fonction de la taille et de la forme de leur noyau, les leucocytes granulocytes qui sont eux même séparés en trois catégories, les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles et les leucocytes agranulocytes séparés en deux catégories, les lymphocytes eux même pouvant être divisés en lymphocytes B et T et les monocytes. Les leucocytes sont impliqués dans la réponse immunitaire et les plaquettes dans l'hémostase grâce à leurs propriétés d'adhérence et d'agrégation, dans l'angiogenèse, l'inflammation et la réaction immunitaire innée. Les érythrocytes représentent la fraction la plus importante des cellules sanguines chez les mammifères et chez les oiseaux. Ces cellules sont impliquées dans le transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone. Les érythrocytes aviaires diffèrent des mammifères par la présence d'un noyau et de mitochondries. Ces cellules sont également plus larges chez les espèces aviaires et sont de forme ovale (diamètre long de 12,5 µm, diamètre court de 6,8 µm, épaisseur de 3,2 µm) que chez les mammifères (diamètre de 7 à 8 µm, épaisseur de 2 µm chez l'humain). La durée de vie moyenne des érythrocytes est plus faible chez le poulet que chez les mammifères, 39,7 ± 3,3 jours vs. 85,6 ± 10,5 jours (Röhme, 1981). Parmi les différences entre les mammifères, les oiseaux et les rongeurs, le pourcentage en hémoglobine est plus élevé chez le porc et le poulet que chez l'humain et les rongeurs. Les thrombocytes des espèces aviaires sont l'équivalent des plaquettes chez les mammifères (Schmaier et al., 2011). Ils diffèrent des plaquettes par la présence de leur noyau. Ce sont les plaquettes qui permettent l'hémostase.

3. Les méthodes utilisées pour l'identification de biomarqueurs

3.1 Démarche

Même s'il n'existe pas de procédure standard pour qu'un paramètre (gène, protéine, métabolite) soit qualifié de biomarqueur, la mise en évidence d'un biomarqueur peut se décomposer en quatre étapes (Rifai et al., 2006) : une étape de découverte des potentiels biomarqueurs par des approches ciblées ou non ciblées, une étape de qualification qui va

	Nombre de biomarqueurs potentiels	Nombre d'individus
Découverte Identifier les biomarqueurs potentiels	>1000	10
Qualification Confirmer l'abondance des potentiels biomarqueurs dans le sang	30~100	10
Vérification Détermination de la spécificité du biomarqueur potentiel	10	100
Validation Déterminer la sensibilité, la spécificité du biomarqueur	4~10	>1000

Figure 6. Étapes clés pour l'identification de biomarqueurs (Rifai et al., 2006).

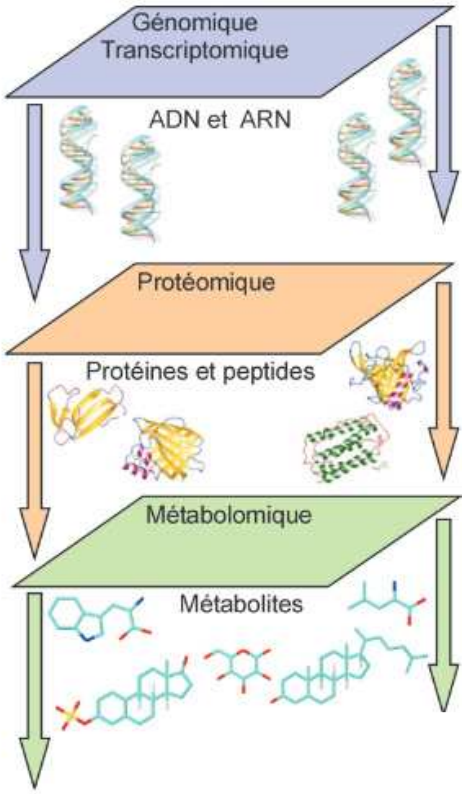


Figure 7. Méthodologies associées à l'étude des ADN, des protéines et des métabolites caractérisant les différents niveaux des systèmes biologiques.

permettre de confirmer qu'il y a un différentiel du biomarqueur selon les candidats, une étape de vérification pour évaluer la spécificité des potentiels biomarqueurs et une étape de validation du biomarqueur sur un grand nombre d'échantillons par des approches ciblées afin de vérifier sa spécificité et sa sensibilité (**Figure 6,** Rifai et al., 2006).

3.2 Les approches à haut-débit

Depuis une quinzaine d'années, le développement des approches « omique » permet l'analyse du phénotype de l'animal ou du patient à différents niveaux d'organisation biologique de façon non ciblée sur les processus cellulaires ou métaboliques impliqués dans la réponse à une pathologie, à une thérapie ou à une variation environnementale telle que la nutrition **(Figure 7)**. Selon la molécule étudiée, il existe quatre domaines d'études « omiques », la génomique (ADN), la transcriptomique (ARNm), la protéomique (protéines) et la métabolomique (métabolites). Concernant l'amélioration de l'efficacité des productions animales, les approches « omiques » ont permis d'explorer la façon dont le génotype va être influencé par un levier alimentaire, ce qui correspond aux études de nutrigénomiques (Afman et Muller, 2012 ; Sales et al., 2014). Depuis quelques années, l'impact de la nutrition sur la transcription des gènes, l'expression des protéines ainsi que sur des métabolites a été étudié par des approches transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques. Ces approches peuvent être considérés comme "nouveaux outils" afin d'appréhender finement les mécanismes en étudiant de façon simultanée un plus grand nombre de paramètres, pour améliorer la santé humaine ou les performances de production des animaux (Kussmann et al., 2006 ; Ordovas Munoz, 2013).

Identifier des biomarqueurs par des techniques d'analyse à haut-débit est laborieux car les technologies disponibles sont complexes et peuvent générer plusieurs dizaines de milliers de signaux, ce qui requiert la gestion minutieuse des données ainsi que l'utilisation d'outils de bio-informatique qui aient été eux-mêmes validés. De plus, la validation scientifique et technique des biomarqueurs ainsi que le choix de la méthode statistique la plus pertinente, est sujet à controverse (McDermott et al., 2013).

3.2.1 – Le transcriptome sanguin

3.2.1.1 Description de l'approche transcriptomique

Le transcriptome correspond donc à l'ensemble des ARNm (transcrits), au sein d'une cellule. L'ADN (acide désoxyribonucléique) correspond au support de l'information génétique, qui

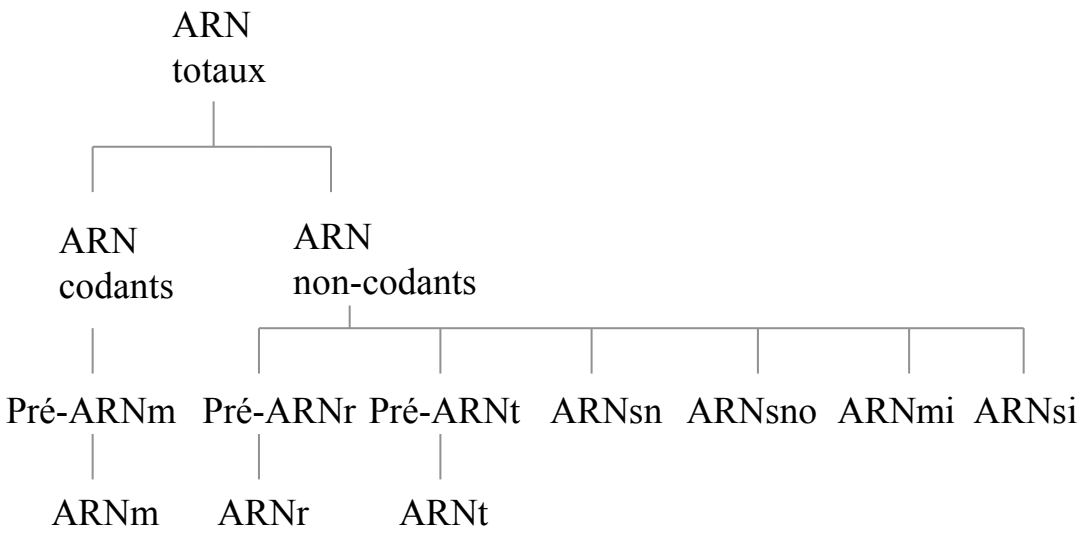


Figure 8. Les différents types d'ARN connus au sein de la cellule. ARNm, ARN messagers ; ARNr, ARN ribosimiques ; ARNt, ARN de transferts, ARNsn, ARN nucléaire ; ARNsno ; ARN nucléolaires ; ARNmi, microARN ; ARNsi, ARN interférents.

est identique au sein de toutes les cellules de l'organisme. Cet ADN est transcrit en différents types d'ARN, dans le noyau de la cellule

Pendant ces deux dernières décennies, les puces à ADN ont été la principale technologie pour analyser le transcriptome d'un individu. Ces puces à ADN permettent l'étude de l'expression des gènes (Tuggle et al., 2007). La technologie des puces à ADN a cependant des limites liées aux multiples produits des gènes ainsi qu'à la faible expression de certains gènes. Les technologies de séquençage à haut-débit offrent de nouvelles méthodes pour l'analyse du transcriptome (Mortazavi et al., 2008 ; Buermans et den Dunnen, 2014). L'une de ses technologie est le séquençage dit de « seconde génération » (NGS, « Next Generation Sequencing »). La technologie NGS regroupe plusieurs méthodes (RNA-seq, ChIP-seq, methyl-seq, DNase-seq) qui sont utilisées selon la question biologique posée (Metzker, 2010). La méthode de RNA-seq permet de quantifier les ARN codants, non codants et de petite taille (Wang et al., 2009), elle est reconnue aujourd'hui comme étant plus sensible dans la détection des transcrits que les techniques de puces à ADN (Mooney et al., 2013 ; Nault et al., 2015).

3.2.1.2 Les ARN sanguins, nouvelle classe de biomarqueurs

L'existence d'acides nucléiques dans le sang a été décrite par Mandel et Metais (1948). L'utilisation des acides nucléiques comme outil de diagnostic en oncologie a été proposée pour la première fois en 1977. L'existence d'ARN extracellulaires est connue depuis longtemps (Stroun et al., 1978). La concentration plasmatique d'ARN est de 144 ng/mL chez l'humain (Kamm et Smith, 1972). Les ARN sont complexés à d'autres molécules afin d'augmenter leur résistance au RNases. Les ARN circulants sont encore largement inexplorés en dehors de la recherche en oncologie et ils représentent une source potentielle de biomarqueurs. Les ARNmi ont été mis en évidence dans le milieu extracellulaire (Gilad et al., 2008). Il a été initialement suggéré que les ARN présents au niveau du sang résultaient des processus de lyses des cellules libérant ainsi leur contenu cytoplasmique comprenant les ARN. Or les cellules sanguines nucléées sont aussi capables de sécréter les ARN (Turchinovich et al., 2011). Les ARN peuvent donc provenir de cellules d'autres organes ou des cellules sanguines. On distingue deux grandes classes d'ARN, les ARN codants qui correspondent aux ARN messagers (ARNm) (i.e. correspondent à des gènes qui ont une fonction déterminée ; 4% des ARN totaux) codent pour des gènes qui peuvent s'exprimer au sein de la cellule et les ARN non-codants qui correspondent aux ARN ribosomaux, ARN de transferts, et à des ARN de petite taille (ARNsn, ARNsno, ARNmi, ARNsi) (**Figure 8**).

Certains ARN non codants sont impliqués dans la régulation de l'expression de certains gènes, c'est le cas pour certains microARN (ARNmi) qui sont des ARN constitués d'une vingtaine de nucléotides. Certains ARNmi peuvent réprimer ou induire la transcription et/ou la traduction de certains gènes via leur fixation sur les régions 3'- ou 5'-UTR des ARN messagers. Les ARNmi sont importants pour une variété de fonctions, et notamment pour la communication cellulaire. Chez l'humain, 2588 ARNmi matures sont répertoriés (http://www.mirbase.org/), contre 411 chez le porc et 994 chez le poulet. Les ARNmi contenus dans les fluides biologiques représentent de nouvelles pistes prometteuses pour l'identification de biomarqueurs chez l'humain (Baulande et al., 2014) et probablement chez les animaux de rente malgré la non exhaustivité des ARNmi référencés.

Á l'issue des progrès réalisés en biotechnologie, des ARN de haute qualité peuvent être isolés à partir du sang total des animaux ou des cellules périphériques mononucléaires du sang (PBMC, peripheral blood mononuclear cell). Le principal inconvénient d'utiliser le sang total comme source d'ARN est l'interférence avec les nombreux transcrits qui codent pour la globine (Li et al., 2008 ; Wright et al., 2008). L'utilisation du sang total est toutefois moins contraignante que celle des PBMCs (Asare et al., 2008). L'étude sur les PBMCs nécessite la séparation des différents types cellulaires sanguins, en isolant les cellules anucléés ou polynucléés des cellules mononuclées. Ainsi chez les mammifères, les cellules mononuclées isolées correspondent aux leucocytes agranulocytes (les lymphocytes et les monocytes) et aux leucocytes agranulocytes. Chez les espèces aviaires, les PBMC correspondent aux leucocytes et aux thrombocytes, bien que les érythrocytes soient mononuclées ces cellules n'en font pas parties. La procédure d'isolement des PBMCs représente une source de variabilité (Whitney et al., 2003 ; Debey et al., 2006). Dans les minutes qui suivent le prélèvement sanguin, le profil d'expression des gènes des PBMCs change de façon significative via l'induction et la dégradation des transcrits. De plus, ajouter une étape de purification, afin de ne conserver que les PBMCs, peut altérer l'expression des transcrits. C'est pourquoi, des études sur la façon d'effectuer les prélèvements sanguins dans le but d'analyser l'expression des transcrits de façon optimale ont été réalisées (Asare et al., 2008).

3.2.2 – Le protéome sanguin

Le protéome se réfère à l'ensemble des protéines d'un organisme, d'un tissu ou d'une cellule dans des conditions données. Au niveau sanguin, les protéines du plasma ou du sérum sont étudiées (Anderson et Anderson, 1977 ; Anderson, 2014). Concernant les protéines sériques,

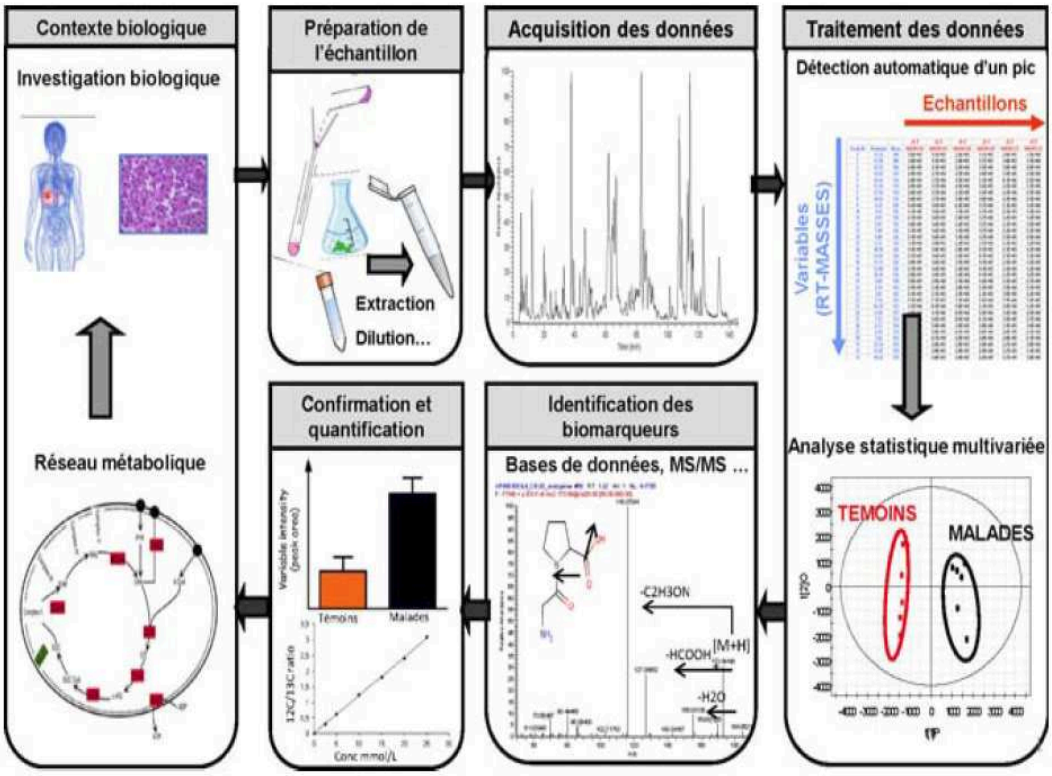


Figure 9. Représentation des différentes étapes d'une étude métabolomique (Cochereau et Junot, 2013).

la coagulation du sang entraine un biais concernant les protéines présentes. Le protéome d'un individu est complexe car les protéines sont nombreuses au sein d'un organisme. Il est difficile de déterminer un nombre de protéines chez l'humain (Kim et al., 2014), ceci est dû aux nombreuses formes protéiques et aux variants (épissage des gènes et des protéines, modifications post-traductionnelles…). Différents outils permettent l'identification des protéines d'un échantillon. Classiquement, les méthodes d'analyse protéomique sont basées sur la spectrométrie de masse. Les protéines de l'échantillon sont séparées sur un gel d'électrophorèse puis identifiées par spectrométrie (Steen et Mann, 2004). La protéomique s'intéresse à trois aspects, l'expression, la structure et la fonction des protéines. En comparaison avec la transcriptomique, la protéomique permet de mesurer le produit fonctionnel des gènes. Une exploration du protéome sanguin a été réalisée afin de mettre en évidence des marqueurs de pathologie notamment en oncologie (Birse et al., 2015). L'ensemble des protéines du compartiment sanguin est difficile à identifier. Ceci est dû à la forte abondance de certaines protéines comme l'albumine (55%) et à l'hétérogénéité des protéines. Une modification environnementale (par exemple une modification du régime alimentaire) peut induire des changements de synthèse protéique directement dans le sang ou alors au niveau d'un organe qui peut libérer ces protéines dans le sang.

3.2.3 – Le métabolome sanguin

Le métabolome représenterait in fine l'expression fonctionnelle des gènes (Coen et al., 2004). L'émergence des études de métabolomique est récente puisque cette approche est apparue dans les années 1990 suite aux progrès technologiques dans les domaines d'analyse à haut-débit en terme de technique, et de la chimie analytique, ainsi qu'à l'essor de la bio-informatique pour le traitement des données (Whitfield et al., 2004 ; Gibney et al., 2005). La métabolomique est l'étude du métabolome, qui permet l'analyse non ciblée des métabolites d'un échantillon dans le but de les identifier et de les quantifier. Les métabolites identifiés sont des molécules organiques de petites tailles (<1500 Da) présentes dans le tissu ou le fluide biologique d'intérêt dans des conditions données. Après avoir déterminé la question de recherche et exploré le contexte de l'étude, les échantillons sont prélevés et préparés, ce qui permet l'obtention de données sous forme de spectre, l'attribution de chaque spectre est ensuite réalisée quand le métabolite est connu, puis les données sont analysées pour rendre possible l'identification de biomarqueurs **(Figure 9)**.

Tableau 2. Mesure de l'expression de gènes dans le compartiment sanguin chez des individus ou animaux présentant une différence de masse grasse.

Références	Espèce	Tissu	Méthode	Gènes	Variation de l'expression de gènes
Díaz-Rúa et al., 2015	Rat	PBMC	Microarray	CPT1A	Maigre<Gras
Berisha et al., 2011	Homme	Sang total	Microarray	LCN2	Maigre<Gras
Ghanim et al., 2004	Homme	Sang total	qPCR	MMP9	Maigre<Gras
				MIF	Maigre<Gras
				NFκB	Maigre<Gras
				IL-6	Maigre<Gras
Catalan et al., 2015	Homme	PBMC	qPCR	LCN2	Maigre<Gras
				CHI3L1	Maigre<Gras
				SPP1	Maigre<Gras
				RARRES2	Maigre<Gras
Caimari et al., 2014	Rat	PBMC	Microarray	CPT1A	Maigre<Gras
				APO48r	Maigre<Gras

CPT1A, « carnitine palmitoyltransferase 1A » ; LCN2, « lipocalin 2 » ; MMP9 « metalloproteinase 9 » ; MIF, « migration inhibitor factor » ; NFκB, « nuclear factor κB » ; IL-6, « interleukin 6 » ; CHI3L1, « chitinase 3 like protein 1 » ; SPP1, « osteopontin » ; RARRES2, « chemerin » ; PPARG, « peroxisome proliferator-activated receptor gamma », APO48R, apolipoprotein B48 receptor ; FASN, « fatty acid synthase »

Il existe deux approches pour effectuer l'étude du métabolome, le profilage métabolomique et l'analyse par empreinte globale. Le profilage métabolique est une approche ciblée qui va permettre d'identifier la présence ou l'absence d'un métabolite au sein d'un échantillon, alors que la métabolomique par empreinte globale est une méthode sans a priori.

Les métabolites d'un échantillon peuvent être identifiés par résonnance magnétique nucléaire (RMN). Cette technique permet l'identification des molécules grâce aux noyaux atomiques qui les constituent. Ces analyses de RMN présentent plusieurs avantages. L'intensité du signal est proportionnelle à la concentration de protons présents dans la molécule. Cette technique est robuste et très reproductible (Marion, 2013). De plus, elle ne requiert pas (ou peu) de préparation des échantillons et elle n'est pas destructive pour les échantillons. Ceci permet de générer un profil métabolique des fluides corporels qui restent intacts (Keun et Athersuch, 2011). L'acquisition des spectres est rapide, ce qui permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons dans une journée.

4. Les biomarqueurs sanguins associés à la variation de masse grasse

Certains métabolites plasmatiques (glucose, leptine) ont déjà pu être décrits comme marqueur. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux marqueurs pouvant être mis en évidence par étude transcriptomique. La recherche de biomarqueurs peu invasifs est effectuée dans de nombreux domaines de la médecine et notamment en nutrition qui visent à prévenir des pathologies associées aux régimes alimentaires (Ghosh et al., 2010 ; Berisha et al., 2011 ; O'Grada et al., 2014). Les études de transcriptome sanguins, pour identifier les voies métaboliques impliquées dans les variations de la masse grasse ont été essentiellement menées chez l'humain et le rongeur. La variation de régime alimentaire a un impact sur la masse grasse d'un individu. Cependant, peu d'études dites « omiques » vont permettre d'observer des variations d'expression de gènes au niveau sanguin qui soient liées aux variations du régime alimentaire (de Mello et al., 2012) pouvant induire des variations de la masse grasse. Par la mesure d'expression des gènes dans le sang total, des études récentes ont montré un lien entre métabolisme, inflammation et nutrition où l'identification des voies biologiques associées à une augmentation de masse grasse a été réalisée (**Tableau 2**). Les liens entre immunité et obésité ont été étudiés et différentes études ont pu mettre en évidence que le profil d'expression des gènes des PBMCs reflétait la quantité de gras périrénal et pouvaient être représentatifs du statut inflammatoire induit par l'obésité (Ghanim et al., 2004 ; Yamaoka et al., 2012 ; Yamaoka et al., 2013 ; Catalan et al., 2015). Les marqueurs

proinflammatoires tel que MMP9, MIF, NFκB, IL-6 (Ghanim et al., 2014), LCN2, CHI3L1, SPP et RARRES2 (Catalan et al., 2015) sont sous-exprimés chez les individus maigres par rapport aux individus obèses. Une étude réalisée chez l'humain montre que le transcriptome des cellules sanguines périphériques reflète le transcriptome du tissu adipeux (O'Grada et al., 2014). En effet, de fortes similarités ont été observées entre les groupes fonctionnels de gènes différentiellement exprimés pour ces deux tissus. L'expression des gènes différemment exprimés à la fois dans les PBMCs et dans le tissu adipeux incluant TLR4, NLRP3 et CASP1, impliqués dans le métabolisme inflammatoire et celui des acides aminés étaient significativement (r=0,57-0,63) corrélée entre ces deux tissus (O'Grada et al., 2014). Dans plusieurs études, le gène codant la CPT1A a été associé à la variation de la masse grasse. Il s'agit de la forme hépatique de la carnitine palmitoyl transférase 1A (CPT1A), impliquée dans la β-oxydation des acides gras (Lyvers Peffer et al., 2007). De même, le gène codant la lipocaline 2 (LCN2) également connue sous le nom de « neutrophil gelatinase associated lipocalin » (NGAL) est associé à des variations de la masse adipeuse induite par une variation de régime alimentaire. La protéine qui est codée par ce gène est impliquée dans de nombreux métabolismes dont l'homéostasie lipidique (Jin et al., 2011). Chez la souris, une étude montre que l'augmentation de la masse grasse induite par un régime hypercalorique est associée à une augmentation de la lipocaline 2 sérique (Guo et al., 2013). Toutefois, la concentration de cette protéine sérique est certainement influencée par la sécrétion de lipocaline 2 par différents tissus (Cowland et Borregaard, 1997) dont le tissu adipeux (Guo et al., 2013). Le gène APO48R est également différemment exprimé dans une autre étude, une sous expression de ce gène est observée chez les rongeurs les plus maigres (Caimari et al., 2014). Les études menées à ce jour chez l'humain ou le rongeur ont permis d'identifier des gènes qui sont liés avec la variation de la masse grasse, il est intéressant de savoir si ces mêmes gènes sont liés à des variations de la masse grasse chez l'animal de rente.

Chapitre 3 - Modèles animaux de l'étude

1. Deux espèces monogastriques : le porc et le poulet

Pour produire des animaux s'inscrivant dans les schémas de développement durable, tout en diminuant le coût de production, différents schémas de sélections ont été menés chez les animaux de rente pour améliorer l'efficacité alimentaire et réduire l'engraissement corporel. Notre étude porte sur deux modèles expérimentaux de sélection divergente l'un sur la consommation moyenne journalière résiduelle chez le porc (Gilbert et al., 2007) et l'autre sur le taux de gras abdominal chez le poulet (Leclercq, 1983). L'étude de ces deux espèces, phylogénétiquement éloignées permettra l'identification de marqueurs sanguins génériques par des comparaisons inter-espèces.

2. Porcs sélectionnés sur la Consommation Moyenne Journalière Résiduelle chez le porc

2.1 Présentation du programme de sélection conduit à l'INRA

Le concept de la consommation moyenne journalière est apparu au début des années 40 pour limiter le coût de l'alimentation dans la production de volaille, puis dans la production bovine (Koch et al., 1963) et enfin dans la production porcine (Foster et al., 1983). L'efficacité de l'utilisation de l'aliment par les animaux est classiquement évaluée par le rapport entre le gain de poids de l'animal et sa consommation alimentaire pendant une période donnée. La consommation alimentaire résiduelle est définie comme la différence entre la prise alimentaire réelle et la consommation alimentaire prédite à partir des besoins nutritionnels pour la croissance (Koch et al., 1963). La sélection sur une faible consommation moyenne journalière résiduelle permet d'améliorer l'efficacité de l'animal sans affecter ses capacités de production (Kennedy et al., 1993).

Une sélection sur la CMJR a débuté à l'INRA en 2000. Trente portées ont été obtenues à partir de 30 verrats. Ainsi à partir de 115 mâles candidats, 2 lignées ont permis d'effectuer une sélection divergente sur la consommation moyenne journalière résiduelle. Les deux lignées ont été maintenues avec 6 verrats et 35 à 40 truies sélectionnés par lignée et par génération. Les portées étaient obtenues soit à partir de semence fraîche (première portée P1) ou de semence congelée (deuxième portée P2). La sélection sur le poids a été effectuée chez les mâles, alors qu'aucune sélection n'a été effectuée chez les femelles, chaque mère ayant été remplacée par une fille. Les verrats et les truies ont été choisis parmi la première portée P1.

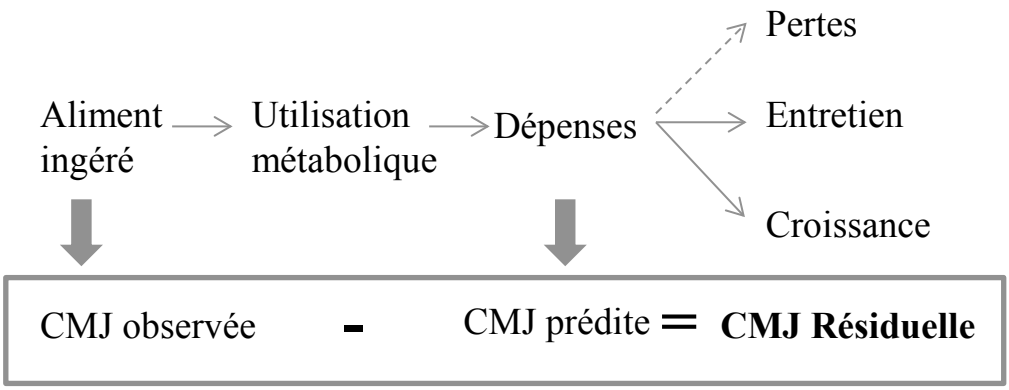


Figure 10. Représentation de la CMJR (Gilbert et al., 2007, Faure Cohades 2013).

Tous les animaux ont été élevés dans la même station expérimentale, puis ont été répartis en fonction de la lignée et du sexe en lots de 8 à 12 animaux dans des enclos équipés d'un distributeur individuel d'aliment.

Les animaux de la portée P1 correspondent actuellement aux animaux ayant une consommation moyenne journalière résiduelle faible (CMJR-). Cette CMJR a été mesurée sur les animaux nourris ad libitum de 35 à 95 kg de poids vif. La consommation journalière a été mesurée par le distributeur électronique d'aliment ce qui a permis de calculer l'indice de consommation. Les deux caractères utilisés pour calculer la prédiction de nourriture ingérée étaient le gain de poids moyen quotidien des porcs entre 35 et 95 kg de poids vif et l'épaisseur de lard dorsal estimée par échographie correspondant à la moyenne de six points de mesure. Une équation de régression linéaire multiple permettant la prédiction de la consommation journalière résiduelle a ainsi pu être déterminée **(Figure 10)** (Gilbert et al., 2007 ; Faure Cohades, 2013).

Pour les animaux de la deuxième portée (P2), les mesures d'indice de consommation, de gain moyen quotidien et de consommation alimentaire ont été effectuées de 28 à 107 kg pour chaque lignée. Des mesures ont été effectuées après abattage des animaux telles que, le poids de carcasse, la taille de la carcasse, l'épaisseur de gras dorsal correspondant à la moyenne de trois points de mesures et le poids de la tête. Le poids du jambon, de la longe, du ventre, de l'épaule et de gras dorsal ont également été mesurés sur une demi-carcasse après découpe. Une seconde équation correspondant à une régression linéaire multiple de la consommation journalière résiduelle a ainsi été déterminée (Gilbert et al., 2007). Á ce jour, on compte 9 générations de sélections sur la CMJR. Suite aux calculs d'héritabilité de différents caractères au sein de ces deux portées, il a été démontré que les porcs pouvaient être sélectionnés en fonction de leur consommation moyenne journalière résiduelle sans avoir d'impact sur les performances de croissance des porcs (Gilbert et al., 2007).

2.2 Croissance et composition corporelle

2.2.1 Performances de croissance

Les effets de la sélection sont observés dès la période de post-sevrage (de 8 à 24 kg de poids vif). Á cette période de croissance, les porcs ayant une forte CMJR (CMJR+) ont une consommation moyenne journalière et un gain de poids plus élevés que les porcs ayant une faible CMJR (CMJR-) (Barea et al., 2010). Comme attendu, les porcs CMJR+ ont un indice de consommation moins élevé que les animaux ayant une CMJR- (Barea et al., 2010 ; Le

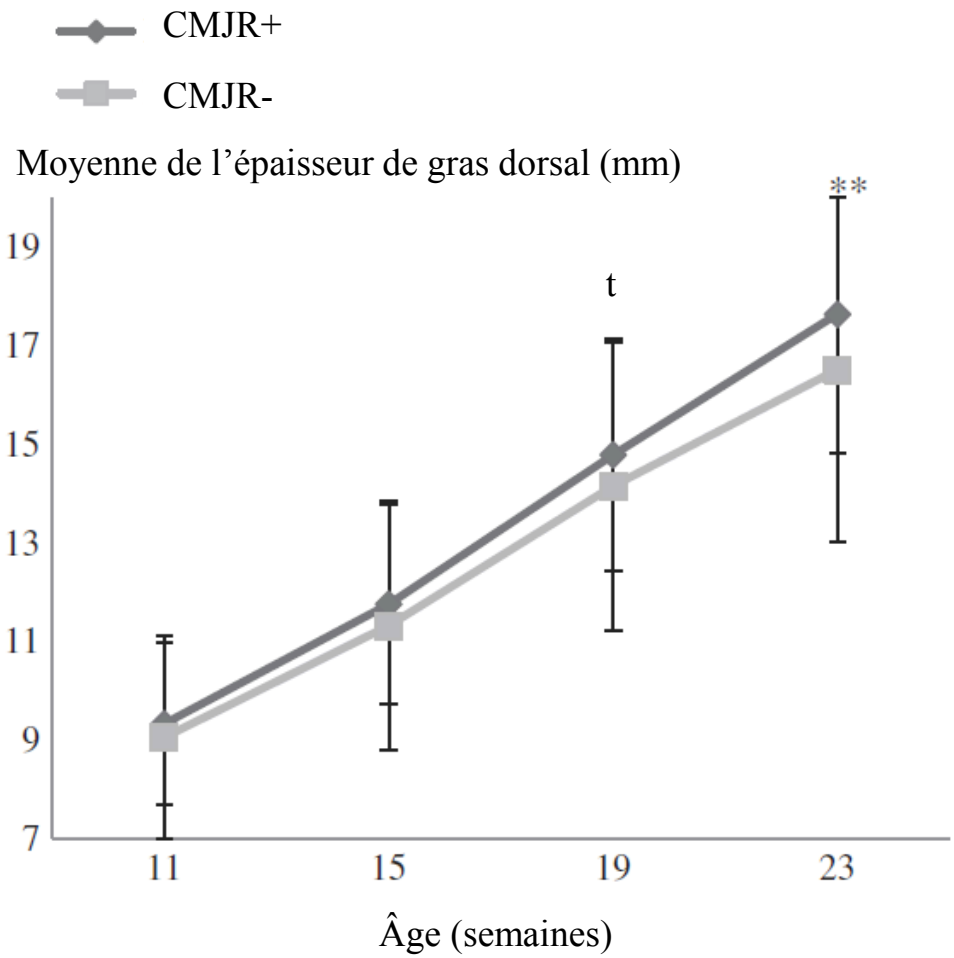


Figure 11. Évolution de la moyenne de la mesure de l'épaisseur du gras dorsal mesuré par ultrason chez le porc en croissance sélectionné sur la CMJR (6ième générations de sélection), ** P<0,01 ; t P<0,1 (Faure et al., 2013).

Naou et al., 2012 ; Faure et al., 2013). Pendant la période de croissance (de 24 à 68 kg de poids vif), la consommation moyenne journalière est également plus élevée et l'indice de consommation moins élevé chez les porcs CMJR+ que chez les porcs CMJR- (Barea et al., 2010) sans effet sur le gain de poids. Ceci a également été observé pendant la période de croissance-finition (30 à 108 kg de poids vif ; Faure et al., 2013) et souligne la moindre efficacité alimentaire des porcs sélectionnés pour une CMJR élevée.

2.2.2 Composition de la carcasse

Les deux lignées présentent les mêmes proportions de muscle fessier. Les porcs CMJR- ont une proportion de longe et d'épaule plus élevée et une proportion de tissus adipeux sous-cutané et périrénal moins élevée que les porcs CMJR+ (Faure et al., 2013 ; Le Naou et al., 2012). Globalement, la proportion de viande maigre est plus élevée et la proportion de gras est moins élevée pour les porcs CMJR- que pour les porcs CMJR+ (Lefaucheur et al., 2011). L'adiposité diffère significativement entre les lignées à partir de 133 jours d'âge (**Figure 11** ; Faure et al., 2013). Plus la CMJR est faible, plus l'animal est maigre. En effet, la diminution de la CMJR est corrélée génétiquement avec la diminution du gras corporel (Gilbert et al., 2007).

2.2.3 Caractéristiques des tissus musculaires et adipeux

Les tissus adipeux et musculaires ont été étudiés sur différentes génération de sélection. Les concentrations de glycogène et de lipides dans le muscle sont affectées par la sélection. Une concentration plus élevée en glucose plasmatique issu de l'hydrolyse du glycogène est observée dans le muscle longissimus chez les porcs CMJR- vis-à-vis des porcs CMJR+ (Faure et al., 2013). Le niveau de gras intramusculaire du muscle longissimus est moins élevé chez les porcs CMJR- que chez les porcs CMJR+ (Faure et al., 2013 ; Lefaucheur et al., 2011). Les porcs CMJR- ont une épaisseur de tissu adipeux sous-cutané (TASC) moins élevée que les porcs CMJR+ qui est associé à un stockage de lipides moins important au niveau de ce tissu. Les adipocytes du tissus adipeux sous-cutané sont de plus petite taille chez les porcs CMJR- (Le Naou et al., 2012).

2.3 Statut métabolique et hormonal des porcs sélectionnés sur la CMJR

Les porcs CMJR- (6ième et de la 7ième génération de sélection sur la CMJR) de 115 kg de poids vifs ont une plus faible concentration plasmatique de triglycérides que les porcs CMJR+ (Le Naou et al., 2012). Les concentrations plasmatiques de glucose et de lactate ne diffèrent pas

entre les lignées. De même, les concentrations plasmatiques hormonales en IGF-I, T3, T4, insuline ne diffèrent pas entre les lignées (Le Naou et al., 2012). Concernant la concentration plasmatique de leptine, aucune différence entre lignées n'est observée à environ 110 kg de poids vif chez des porcs à l'état nourri (Le Naou et al., 2012). Cette concentration est plus élevée chez les porcs CMJR+ (4ième génération de sélection sur la CMJR) de 106 kg de poids vif à l'état nourri (Lefaucheur et al., 2011).

Les concentrations plasmatiques des protéines totales et de l'urée ne diffèrent pas entre les lignées (Le Naou et al., 2012). De plus, l'activité des enzymes hépatiques ou musculaires impliquées dans le catabolisme des acides aminés ne diffère pas entre les lignées. Malgré la variation de masse musculaire entre les deux lignées, le métabolisme protéique ne semble pas être affecté. Les activités spécifiques des enzymes lipogéniques (la « fatty acid synthase », l'enzyme malique, et la glucose 6 phosphate dehydrogénase) ne diffèrent pas entre les lignées dans le TASC (Le Naou et al., 2012) et dans le tissu adipeux périrénal (Gondret et al., 2014).

3. Sélection sur le taux de gras abdominal chez le poulet

3.1 Présentation du programme de sélection

Le programme de sélection pour le taux de gras abdominal chez le poulet de chair a été élaboré par Leclercq, (1988). La première génération de poulet (F1) comptait 23 coqs et 68 poules distribués dans 23 cages. Les animaux provenaient de six origines différentes afin d'avoir une diversité génétique la plus importante possible. Ces reproducteurs formaient la génération F0. Quatre mâles par mère de cette génération ont été abattus à l'âge de 63 jours. Le gras abdominal a été prélevé et pesé. La moyenne du poids des individus et de la proportion de gras abdominal a été calculée pour chacune des 68 familles. Les animaux ont ensuite été classés en animaux gras et animaux maigres en fonction de leur poids de gras abdominal et de leur poids vif. Quatorze coqs par lignée ont été conservés pour la génération F0 et F1 et quinze pour les générations suivantes. Cinq poules ont été placées dans chaque cage. Les deux lignées sont actuellement maintenues avec vingt coqs de chaque génération par lignée. La proportion de gras abdominal est un caractère très héritable. Le programme de sélection était basé sur le taux de gras abdominal chez les mâles car le nombre de femelles nécessaire pour effectuer cette sélection aurait été plus important (un mâle permet de féconder 4 femelles). De plus, les femelles sont toujours plus grasses que les mâles (Leclercq, 1988). Le programme de sélection a été conduit sur sept générations successives. L'intervalle de temps moyen entre deux générations était de 9 mois. Il n'y a pas de différence de poids vif

entre lignées car seule la proportion de gras abdominal a été sélectionnée. La divergence sur le gras abdominal est apparue très tôt dans le programme de sélection. Il semble difficile d'avoir une masse de gras abdominal au-delà de 40 grammes par kg de poids vif chez des poulets de chair âgés de 63 jours. Lors de la septième génération de sélection, l'écart standard de la lignée grasse vis-à-vis de la lignée maigre était d'un facteur 2. Par ailleurs, la divergence entre lignées était significative mais moins prononcée chez les femelles que chez les mâles. Le programme de sélection a été arrêté à la génération de reproducteurs F6 pour fournir la génération F7. Un nombre représentatif de poulets a été conservé au sein de chaque lignée en tant que reproducteurs pour les générations suivantes et les modifications de performances de croissance et de composition corporelle ont été limitées chez ces reproducteurs. Cette sélection chez le poulet a permis la réalisation de nombreux travaux en lien avec l'adiposité des animaux et a servi de modèle à une sélection sur l'adiposité chez le canard (Zheng et al., 2014).

3.2 Croissance et composition corporelle

3.2.1 Performances de croissance

Les poulets en croissance ont un poids corporel similaire à l'âge de 63 jours (environ 2 060 g en moyenne calculé pour les sept premières générations, Leclercq, 1988). Cependant, les poulets de la lignée grasse ont une vitesse de croissance plus élevée pendant les premières semaines suivant l'éclosion, alors que les poulets adultes âgés de 35 jours issus de la lignée maigre montrent un poids vif plus élevé que les poulets de la lignée grasse (Leclercq, 1988). La consommation d'aliment, la valeur en énergie métabolisable du régime alimentaire et les besoins d'entretien de l'animal ne diffèrent pas entre les lignées (Géraert et al., 1988).

3.2.2 Composition de la carcasse

Á l'âge de 63 jours, la quantité de gras abdominal est deux fois plus élevée chez les poulets de la lignée grasse que chez les poulets de la lignée maigre (Leclercq, 1988). La différence de gras abdominal au sein des deux lignées est constante (environ 20 g de gras abdominal par kg de poids vif). Une étude récente indique respectivement un pourcentage de gras abdominal de 4,7 et 2,1% chez les poulets des lignées grasse et maigre, respectivement (Jlali et al., 2012). La quantité de gras déposé entre les muscles de la cuisse est également deux fois plus important chez les poulets de la lignée grasse que chez les poulets de la lignée maigre (Ricard et al., 1982). La sélection sur le gras abdominal induit une augmentation de la teneur en lipides de la carcasse qui est 1,4 fois plus élevée à l'âge de 63 jours (Simon et Leclercq,

1982). Une étude longitudinale a montré que la différence de gras abdominal entre les lignées était significative à partir de l'âge de 28 jours et que cette différence était maximale à l'âge de 63 jours.

Pour la même quantité d'aliment et d'énergie métabolisable ingérée, la distribution de l'énergie entre le dépôt de gras et de protéines diffère entre les lignées. Le dépôt de protéines est plus important et celui du gras est moins important chez les poulets de la lignée maigre comparés aux poulets de la lignée grasse (Géraert et al., 1988). Ceci est en accord avec le rendement en viande relatif au poids de la carcasse plus important chez les poulets de la lignée maigre (Ricard et Touraille, 1988 ; Berri et al., 2005).

3.2.3 Caractéristiques des tissus musculaires et adipeux

La concentration de glycogène musculaire est plus élevé dans le muscle pectoral chez les poulets de la lignée grasse que chez les poulets de la lignée maigre (Berri et al., 2005). De plus, la concentration de glycogène du muscle pectoral chez les poulets de la lignée maigre est inversement corrélée à la quantité de gras abdominal. La teneur en protéines de l'aliment affecte la concentration de glycogène dans le muscle chez les poulets de la lignée maigre alors qu'elle n'a pas d'effet chez les poulets de la lignée grasse (Jlali et al., 2012). Le diamètre et le nombre d'adipocytes du gras abdominal est plus élevé pour les poulets de lignée grasse que pour les poulets de la lignée maigre (Simon et Leclercq, 1982 ; Hermier et al., 1989). La sélection sur la quantité de gras abdominal n'affecte pas la teneur en lipides des muscles de la cuisse et du muscle pectoral (Ricard et al., 1983 ; Berri et al., 2005). La composition des lipides intramusculaires de la cuisse (triglycérides, phospholipides, cholestérol et acides gras libres) est similaire pour les deux lignées (Ricard et Leclercq, 1984).

3.3 Métabolisme énergétique

3.3.1 Glycémie et insulinémie

La glycémie et l'insulinémie plasmatique diffèrent en fonction de la lignée. Lors de la troisième génération, à l'état nourri ou à jeun, les poulets de la lignée grasse âgés de 14 jours avaient une glycémie et une insulinémie plus élevée que les poulets de la lignée maigre (Leclercq, 1988). Pour la génération F4, à l'état nourri ou à jeun, les poulets de la lignée grasse avaient une glycémie moins élevée que les poulets de lignée maigre (Simon et Leclercq, 1982 ; Leclercq et al., 1984). Entre les âges de 35 à 56 jours, concernant la quatrième génération de sélection, la glycémie plasmatique atteint un niveau similaire chez les

poulets des deux lignées après avoir été nourris à volonté ou par alimentation forcée, après 16 heures de mise à jeun ; alors que l'insulinémie est plus élevée chez les poulets de la lignée grasse (Simon et Leclercq, 1982). Á l'âge de 119 jours, la diminution de la glycémie post-prandiale est plus rapide chez les poulets de la lignée grasse. Après avoir été re-nourris à volonté après une période de mise à jeun, les réserves hépatiques de glycogène sont plus rapidement rétablies chez les poulets de la lignée grasse que chez les poulets de la lignée maigre (Simon et Leclercq, 1985). Le statut physiologique des poulets de la lignée grasse semble être proche du statut pré-obèse observé chez les mammifères et caractérisé par une hyperinsulinémie. Cependant, la résistance à l'insuline n'a pas été observée chez les poulets de la lignée grasse (Simon et Leclercq, 1985).

3.3.2 Lipides plasmatiques

Quel que soit le statut nutritionnel (nourri ou à jeun), les concentrations de lipides totaux et de lipoprotéines plasmatiques sont plus élevées chez les poulets de la lignée grasse que chez les poulets de la lignée maigre, suggérant une lipogenèse hépatique plus active chez les poulets de la lignée grasse (Hermier et al., 1984 ; Leclercq et al., 1984). Aucune différence entre lignées n'a été observée pour le cholestérol et les acides gras libres circulants. Ceci a été confirmé par la mesure des acides gras synthétisés de novo chez des poulets âgés de 105 jours (Saadoun et Leclercq, 1986). Dans le gras abdominal, l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) exprimée par cellule ne diffère pas entre les lignées et ceci quel que soit le statut nutritionnel. Cependant, les poulets de la lignée grasse montrent une activité de la LPL plus importante que les poulets de la lignée maigre pour la totalité du gras abdominal (Hermier et al., 1989).

3.3.3 Les hormones thyroïdiennes et les facteurs de croissance IGF

Á l'état nourri, pendant la phase de croissance, les poulets de la lignée maigre ont une concentration plus élevée en triiodithyronine (T3) et plus faible en thyroxine (T4) que les poulets de la lignée grasse (Leclercq et al., 1988). Cette différence disparait lorsque les poulets atteignent leur maturité sexuelle. Aucune différence entre lignées n'est observée à l'éclosion ou à l'âge adulte. Une supplémentation en T3 de l'aliment diminue la proportion de gras abdominal dans les deux lignées de façon équivalente, la concentration en T3 après 24 heures de mise à jeun est plus élevée chez les poulets de la lignée maigre que chez les poulets de la lignée grasse (Swennen et al., 2006). Cependant, aucune différence entre les lignées n'a été observée pour les concentrations en T4 aux âges de 7, 21, 35 et 63 jours (Byerly et al.,

2009) et une faible augmentation de T3 a été observée chez les poulets de la lignée grasse âgés de 7 jours. Á l'état nourri et à jeun, les poulets de la lignée grasse ont une concentration plasmatique plus élevée en IGF-I et IGF-II que les poulets de la lignée maigre, alors qu'aucune différence n'est observée pour leurs protéines de transport (Beccavin et al., 1999). Ceci pourrait en partie expliquer la vitesse de croissance supérieure des poulets de la lignée grasse.

3.4 Métabolisme protéique

Les poulets de la lignée grasse ont un niveau plasmatique moins élevé en acides aminés glucogéniques (alanine, thréonine, glutamate et arginine) et un niveau plus élevé en acides aminés soufrés que les poulets de la lignée maigre (Géraert et al., 1987). Ces derniers ont également un niveau plasmatique plus élevé en lysine, acide glutamique, histidine et sérine et une plus faible concentration en acides aminés ramifiés, aromatiques, et soufrés et en arginine que les poulets de la lignée grasse (Leclercq et al., 1993). Aucune différence entre les lignées n'a été observée pour la concentration plasmatique en aspartate, glycine, alanine ou acides aminés totaux. Il est possible que l'insulinémie plus élevée chez les poulets de la lignée grasse favorise le captage des acides aminés glucogéniques par le foie pour la lipogenèse. Les poulets de la lignée grasse ont une concentration plasmatique en urée plus élevée que les poulets de la lignée maigre ce qui suggère un catabolisme protéique plus élevé (Géraert et al., 1988). Cependant, la concentration plasmatique en acide urique est similaire entre les deux lignées ce qui suggère une absence de différence en termes d'oxydation des protéines (Swennen et al., 2006).

4. Influence du régime alimentaire sur la composition corporelle

Lorsque l'on propose différents régimes en termes d'apport nutritionnels à un porc ou à un poulet, l'animal va consommer l'aliment qui lui permettra de faire face à ses besoins énergétiques (Rose et Kyriazakis, 1991). Le régime alimentaire est dans cette thèse un levier qui pourrait interagir avec l'effet de la lignée au sein des deux espèces. Il s'agit d'observer si une modification de la source énergétique (lipides vs. glucides) sans modification de l'apport calorique et protéique, a un impact sur la composition corporelle, traduisant ou non, l'adaptation d'un animal sélectionné à son alimentation. L'humain et l'animal sont en compétition concernant la disponibilité des ressources alimentaires. L'utilisation de coproduits, non digestible par l'humain, permettrait de limiter cette compétition pour ces

ressources. Nous étudierons dans un premier temps l'effet d'une alimentation riche en lipides et en fibres puis d'une alimentation riche en glucides, chez les monogastriques.

4.1 Effet d'une alimentation riche en lipides et fibres chez les monogastriques

L'ingestion de fibres alimentaires induit un état de satiété plus rapide chez l'animal (Langhans 1999). Les fibres alimentaires vont également influencer le temps de présence du chyme à l'intérieur de l'organisme. En effet, ces fibres induisent une augmentation du volume du chyme ce qui réduit à la fois la satiété et le temps de transit. Les fibres vont avoir un impact à la fois sur la digestion de l'aliment, l'absorption des nutriments et le métabolisme de l'animal. Les glucides contenus dans les fibres ne sont pas digérés dans l'intestin grêle. Ils vont passer dans le gros intestin où ils seront dégradés par la microflore intestinale. Elles vont aussi induire une sécrétion plus importante de fluides tels que la salive, le suc pancréatique ou encore la bile (Zebrowska et al., 1983). Parallèlement à l'augmentation de ces sécrétions, le poids des organes sécréteurs est également augmenté. Ainsi le poids de l'estomac et la longueur du caecum et du colon sont plus élevés chez les animaux ayant reçu une supplémentation en fibres (Jorgensen et al., 1996). L'activité péristaltique de l'intestin est également plus élevée (5 à 6 fois plus rapide) lorsque le régime est enrichi en fibres. Celles-ci vont également réduire l'absorption des nutriments (Rainbird et Low, 1984). Chez la truie gravide, l'ajout de fibres induit une augmentation de la concentration plasmatique d'acides gras à chaine courte et d'acides gras libres (Yde et al., 2011). Cependant, une étude menée chez les porcs sélectionnés sur la CMJR a montré que quelle que soit la lignée, une variation de la teneur en fibres du régime alimentaire n'affectait pas la concentration plasmatique des métabolites (Montagne et al., 2014). De même, les concentrations plasmatiques de cholestérol total et libre, de LDL et de triglycérides ne sont pas influencées par un régime riche en fibres et en lipides (4% de fibres et de lipides) chez le porc (Kreuzer et al., 2002). L'ajout de lipides dans un régime riche en fibres n'a pas d'effet sur la digestibilité de l'énergie chez le porc (Myer et Combs, 1991). Lorsque l'alimentation des animaux est riche en lipides, la synthèse de lipides de novo est souvent faible et les acides gras alimentaires sont utilisés par le foie puis par le tissu adipeux par l'action de la liproprotéine lipase, c'est également le cas chez l'humain (Frayn et Macdonald, 1996). Chez le poulet, l'incorporation de lipides dans le régime alimentaire ne modifie pas la masse grasse corporelle, qui est principalement influencée par le niveau protéique de la ration alimentaire. Le dépôt de la masse grasse s'effectue par dépôt des acides gras captés dans l'alimentation, c'est pour cela que les acides

gras présent dans les tissus sont fortement corrélé avec les acides gras présent dans le régime alimentaire (Fisher, 1984 ; Lessire, 1995).

4.2 Effet d'une alimentation riche en glucides chez les monogastriques

Chez un animal nourri avec un régime riche en céréales et pauvre en lipides, la majeure partie des lipides déposés dans les tissus provient d'une synthèse de novo des acides gras à partir des glucides. Ces derniers sont également une source d'énergie pour l'activité musculaire. Une diminution des glucides dans la ration alimentaire va, chez le porc, induire une modification de la concentration en glycogène dans le muscle (Bee et al., 2006). Changer la source énergétique du régime alimentaire en augmentant la proportion de glucides en comparaison du niveau de lipides, induit une augmentation de stockage du glycogène dans le muscle plutôt qu'un dépôt de lipides, qui est en accord avec des études qui montrent que la lipogenèse est affectée par un régime riche en gras et pauvre en glucides (Hillgartner et al., 1996 ; Rosebrough et al., 1999). L'augmentation de glucides dans le régime alimentaire réduit la dégradation protéique (Fulks et al., 1975). Lors de l'ajout de maïs cireux induisant une quantité plus importante d'amidon dans l'alimentation chez le porc, une diminution de l'épaisseur de gras dorsal au niveau de la 10ième côte est observé (Swantek et al., 1996). L'ajout de glucides dans le régime alimentaire augmente le poids de la carcasse mais n'a pas d'effet sur la masse grasse ou sur la masse maigre (Camp et al., 2003).

L'effet d'une supplémentation en glucides chez le poulet est peu documenté. Il existe cependant une interaction entre la composition du régime expérimental et l'origine génétique pour le dépôt de gras abdominal. Les poulets nourris avec un régime à faible teneur en protéines et riche en énergie présentent une quantité de gras abdominal plus élevée que les poulets nourris avec un régime riche en protéines et à faible teneur en énergie (Swennen et al., 2006). Cet effet du régime est plus prononcé pour les poulets issus de la lignée grasse.

Questions de recherche

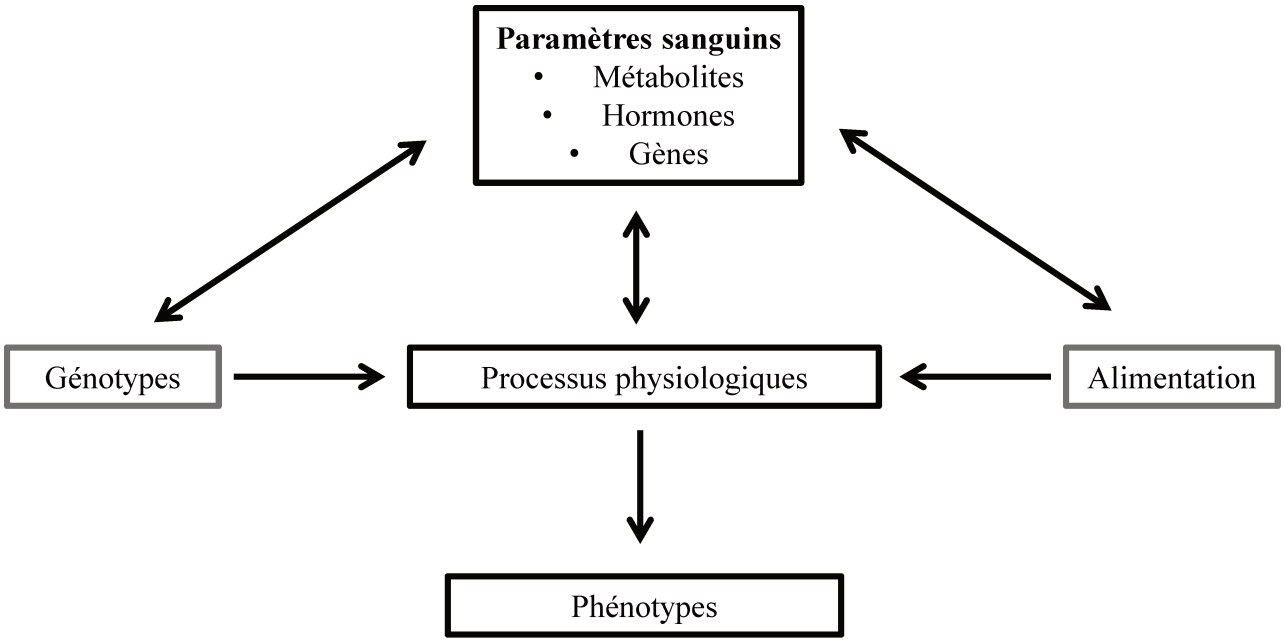


Figure 12. Liens complexes entre phénotypes, paramètres plasmatiques et environnement nutritionnel (adapté de Minihane et al., 2013).

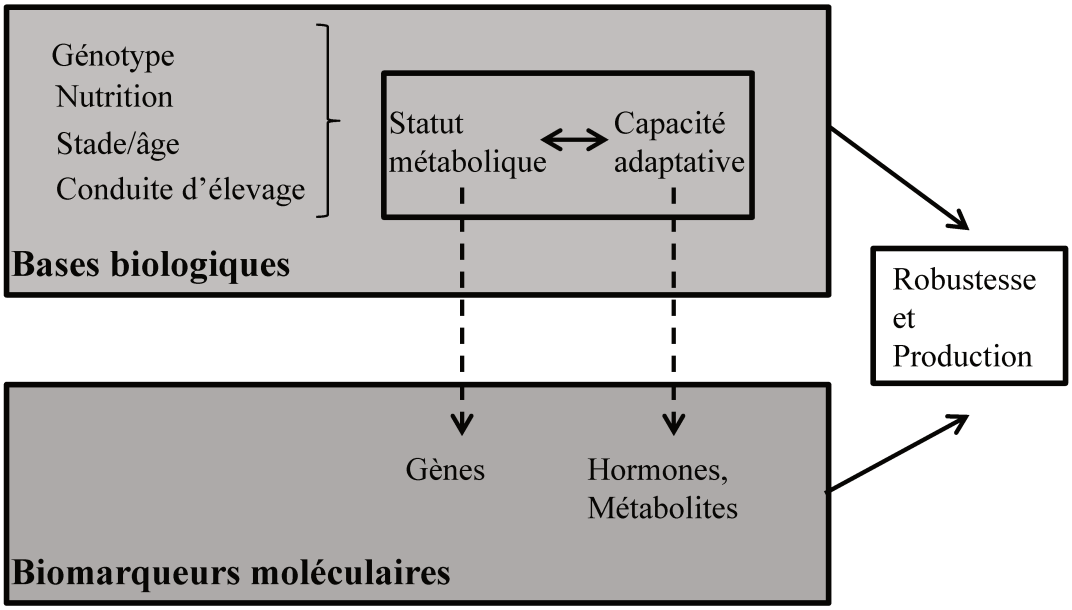


Figure 13. Identification des bases biologiques et des biomarqueurs moléculaires permettant d'accroître la robustesse et d'améliorer la production animale.

La synthèse bibliographique met en évidence qu'une augmentation ou une diminution de tissu adipeux chez le porc et chez le poulet induit des modifications de paramètres circulants tels que des hormones ou des métabolites. C'est pourquoi dans un premier temps, nous avons exploré les **relations entre les paramètres hormonaux et métaboliques du sang et les variations de phénotypes tissulaires chez le porc et le poulet (Figure 12).**

Cette synthèse bibliographique a également montré l'intérêt croissant pour les informations apportées par le compartiment sanguin. Cependant, au vu des outils technologiques disponibles actuellement, encore peu de travaux à l'échelle « omique » se focalisent sur la possibilité d'utiliser le sang comme un compartiment informatif et intégratif, le sang pouvant être le reflet de changements au niveau du tissus. De plus, des échantillons de sang peuvent être facilement prélevés sans anesthésie de l'animal. Un volume permettant de nombreuses analyses peut être collecté sans nuire au métabolisme de l'animal. Par ailleurs, la relative facilitée de collecte permet d'effectuer des cinétiques de réponse à un régime alimentaire ou à des variations environnementales qui auraient un effet sur le phénotype de l'animal. **En cas de modifications d'une partie des caractères lipidiques mesurés, le transcriptome sanguin serait-il informatif de ces modifications en permettant d'identifier de nouveaux biomarqueurs d'intérêt de la plasticité lipidique ? (Figure 13).**

Afin de répondre à ces questions, la stratégie expérimentale utilisée a été de comparer les lignées génétiques de deux espèces phylogénétiquement éloignées et d'utiliser le levier alimentaire afin d'induire des variations de masse grasse pour ces animaux. Chez le porc comme chez le poulet, les animaux étaient issus de lignées d'une sélection génétique expérimentale. Les porcs étaient sélectionnés de façon divergente sur leur consommation moyenne journalière résiduelle et les poulets étaient issus de lignées divergentes stabilisées sur la proportion de gras abdominal. Afin d'accroître la variabilité d'engraissement corporel, deux régimes alimentaires contrastés pour la source en énergie ont été distribués à chaque lignée.

Matériels et Méthodes

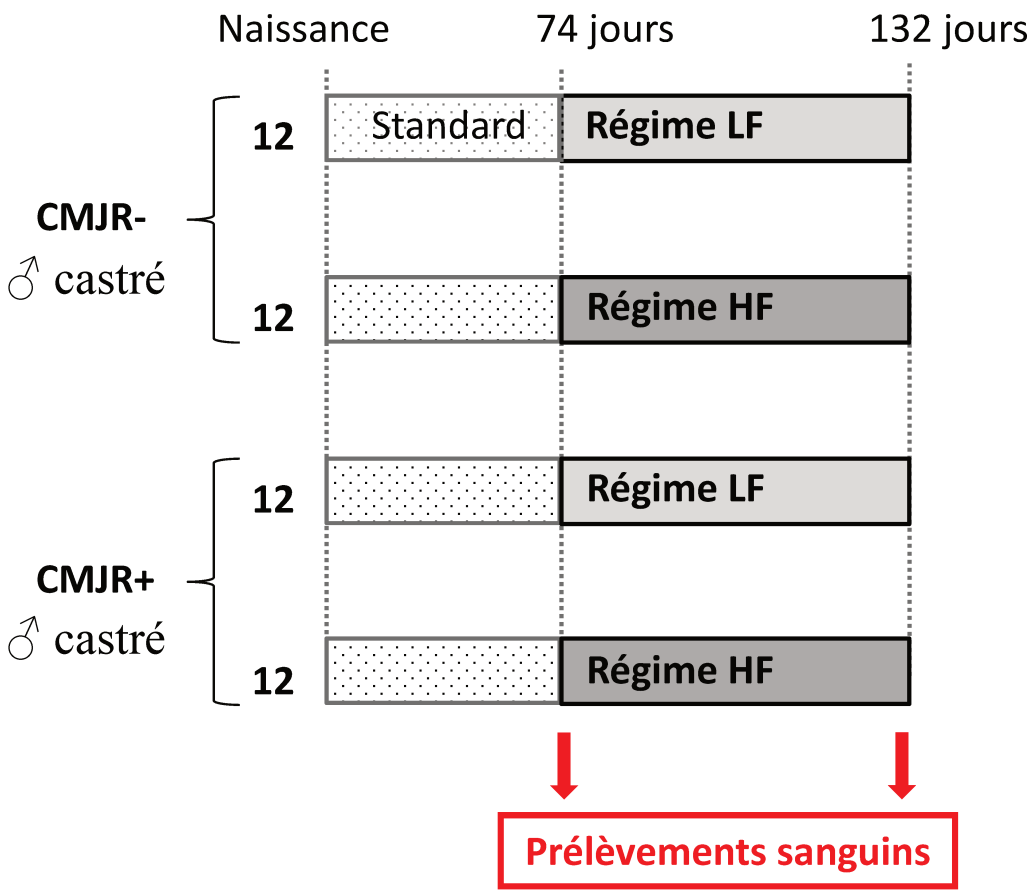


Figure 14. Schéma expérimental chez le porc. LF: régime pauvre en lipides et riche en amidon, HF : régime riche en fibres et en lipides.

Chapitre 1 - Stratégie expérimentale

Cette partie complète les informations fournies dans la partie « Matériels et Méthodes » des articles scientifiques ou manuscrits présentés dans la partie « Résultats ». Elle présente notamment la stratégie expérimentale utilisée et l'approche transcriptomique mise en œuvre pour répondre aux questions de recherche de ce travail de thèse.

1. Le dispositif expérimental chez le porc

1.1 Les animaux

Dans cette expérience, 48 porcs mâles castrés de race Large White issus d'une expérience de sélection divergente sur la CMJR (génération 8) ont été utilisés (n=24/lignée ; **Figure 14**). Les animaux sont nés au sein d'une unité expérimentale de l'INRA (UE1372 GenESI) répartie sur deux sites, Le Magneraud, et Rouillé. Ils ont été castrés la semaine suivant leur naissance. Afin de maximiser le nombre de pères représentés, au moins deux frères par portée ont été retenus, sans dépasser deux couples de frères par père. Le dernier critère pour le choix des animaux était de conserver les porcs âgés de 21 jours qui avaient le poids le plus proche du poids moyen de la portée. Ils ont ensuite été transférés sur le site de l'INRA de Saint-Gilles (UMR1348 Pegase) le jour du sevrage à l'âge de 27±1,9 jours et placés dans deux cases collectives. Les porcs ont reçu un même régime standard à volonté jusqu'à l'âge de 74 jours. Puis, deux régimes alimentaires ont été comparés pendant la période de croissance-finition. Les porcs de chaque lignée ont été placés dans des cases individuelles permettant la mesure de la consommation alimentaire, et ils ont reçu soit un régime HF riche en fibres (par ajout de paille de blé) et en matières grasses (par ajout d'huile de soja et de colza), soit un régime LF riche en glucides (par ajout d'amidon de maïs), pendant 10 semaines (de 74 à 132 jours). La pesée des refus a été effectuée toute les deux semaines pendant la distribution du régime expérimental. Les régimes expérimentaux étaient isocaloriques et isoénergétiques. Ils sont détaillés en **Annexe I.** Le régime croissance correspond au régime distribué à volonté aux porcs pendant 6 semaines à partir de 74 jours, puis le régime finition a été distribué à volonté jusqu'à leur abattage par électronarcose et exsanguination deux heures après leur dernier repas.

1.2 Les prélèvements sanguins

Des échantillons de sang ont été prélevés soit par prise de sang au niveau de la veine jugulaire avant la mise en place du régime expérimental à l'âge de 74 jours sur des animaux nourris,

Dosages par méthodes **standards**

Insuline	Glucose
T3	Lactate
T4	β-Hydroxybutyrate
IGF-I*	Urée
Leptine*	Acide urique
	Homocystéine **

*Uniquement chez le porc
**Uniquement chez le poulet

Méthodes **haut débit**

Transcriptome : puce à ADN
Métabolome : spectroscopie RMN ^{1}H

Figure 15. Récapitulatif des mesures effectuées dans le plasma sanguin des porcs et des poulets.

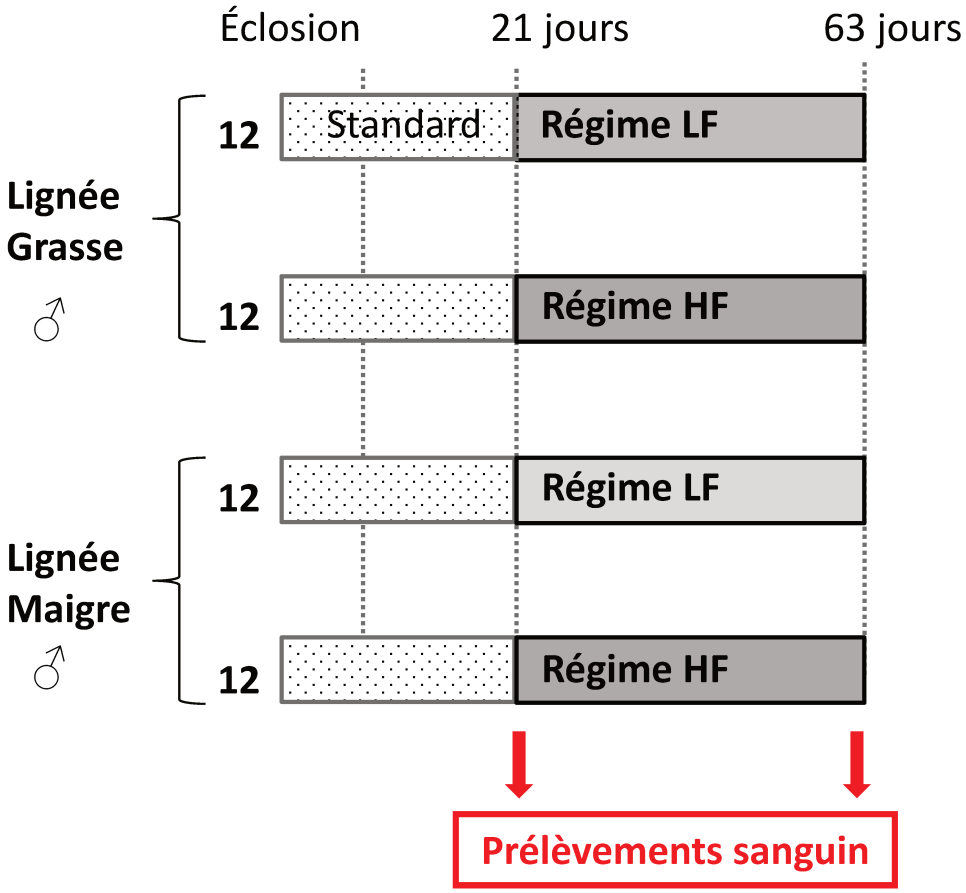


Figure 16. Schéma expérimental chez le poulet. LF: régime pauvre en lipides et riche en amidon, HF : régime riche en fibres et en lipides.

soit lors de la saignée qui a été réalisée lors de l'abattage pour les animaux à l'état nourri et âgés de 132 jours. Les échantillons de sang ont été placés dans des tubes contenant un anticoagulant (héparine ou EDTA) puis agités pour la préparation des plasmas, puis ont été traités en fonction des analyses biochimiques réalisées par la suite puis placés à -20°C pour les dosages de paramètres plasmatiques de façon ciblée, ou à -70°C pour l'analyse du métabolome par H^1 RMN. Concernant les échantillons de sang prélevés pour l'analyse du transcriptome sanguin (uniquement réalisés à l'âge de 132 jours), ils ont été prélevés dans des tubes contenant de l'EDTA (Laboratoires Terumo, Guyancourt, France) et ont ensuite été placés dans des tubes sur un tampon de lyse provenant du kit Nucleospin 8 RNA (Macherey-Nagel, Lyon, France), en respectant la proportion d'un volume de sang pour un volume de tampon. Ces échantillons ont ensuite été placés à -70°C. Le dosage des métabolites (phospholipides, triglycérides, glucose, β-hydroxybutyrate, triiodothyronine totale et libre, thyroxine, cholestérol total, urée) et hormones (insuline, leptine, IGF-I) plasmatiques, de façon ciblée, a été réalisé sur les échantillons de sang aux âges de 74 et 132 jours. Le dosage des métabolites par approche non ciblée (H^1 RMN) a été effectué à l'âge de 132 jours uniquement **(Figure 15).**

1.3 Composition corporelle

Après abattage des animaux, les tractus digestif, respiratoire et urogénital ont été retirés de la carcasse. L'épaisseur de gras dorsal a ensuite été mesurée sur la carcasse entre la troisième et la quatrième côte (CGM Sydel, Lorient, France). Le tissu adipeux périrénal a été prélevé puis pesé. La poitrine, la longe et le muscle longissimus ont été prélevés puis pesés après 24 heures de ressuyage. Le pourcentage du poids relatif des tissus prélevés, au poids corporel de l'animal a ensuite été calculé.

2. Le dispositif expérimental chez le poulet

2.1 Les animaux

Dans cette expérience, 48 poulets mâles issus d'une expérience de sélection sur la quantité de gras abdominal ont été utilisés (n=24/lignée ; **Figure 16**). La phase expérimentale s'est déroulée au sein du Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours (INRA, UE1295). Les poussins ayant des poids trop élevés ou trop faibles ont été éliminés. Pour une même lignée, les animaux ont été sélectionnés en respectant un nombre équivalent de poussins issus de la même famille. Le nombre de pères est maximisé en conservant les descendants de 16 pères

différents de chaque lignée. Deux régimes ont été comparés à partir de l'âge de 21 jours (n=24 par régime). Les poulets de chaque lignée ont reçu soit un régime HF riche en fibres (par ajout de cellulose) et en matières grasses (par ajout d'huile de soja et de colza) soit un régime LF riche en glucides (par ajout d'amidon de maïs) pendant 42 jours (de 21 à 63 jours). Les régimes expérimentaux étaient isoprotéiques et isoénergétiques. Ils sont détaillés en **Annexe II.** Les animaux ont été abattus par décapitation et exsanguination.

2.2 Les prélèvements sanguins

Des échantillons de sang ont été prélevés au niveau de la veine alaire avant la mise en place du régime expérimental à l'âge de 21 jours, ou au niveau du sinus occipital avant l'abattage des animaux âgés de 63 jours. Les animaux ont été nourris trois heures avant l'abattage. Les échantillons de sang ont été placés dans des tubes contenant un anticoagulant (héparine ou EDTA) puis agités pour la préparation des plasmas, puis ont été traités en fonction des analyses biochimiques réalisées par la suite puis placés à -20°C pour les dosages de paramètres plasmatiques de façon ciblée, ou à -70°C pour l'analyse du métabolome par H^1 RMN. Les prélèvements sanguins réalisés à l'âge de 63 jours pour effectuer l'analyse du transcriptome ont été placés avec un anticoagulant (EDTA) puis ils ont été placés sur une solution de Ficoll (densité 1,077) puis centrifugés (720 g, 10 min). Les cellules mononucléaires (PBMCs) ont été prélevées puis placés à -70°C. Les dosages des métabolites et hormones plasmatiques ont été effectués sur les échantillons de sang aux âges de 21 et 63 jours (phospholipides, triglycérides, glucose, β-hydroxybutyrate, triiodothyronine totale, thyroxine, cholestérol total, acides gras libres, acide urique, urée, insuline). Les dosages de l'homocystéine et des métabolites par approche non ciblée (H^1 RMN) ont été effectués à l'âge de 63 jours uniquement.

2.3 Composition corporelle

Après abattage des animaux, les muscles Pectoralis major et Sartorius, le gras abdominal et le gras situé sur la partie haute de la partie externe de la cuisse ont été prélevés et pesés. Le pourcentage du poids relatif des tissus prélevés, au poids corporel de l'animal a ensuite été calculé.

3. Etude du transcriptome sanguin

L'étude du transcriptome sanguin a été réalisé grâce à des puces 60K considérées comme représentative du génome entier, soit du porc, soit du poulet. Les analyses ont été réalisées à partir d'ARN extraits des cellules de sang total chez le porc, soit à partir des PBMCs chez le poulet.

3.1 Transcriptome sanguin chez le porc

3.1.1 Caractéristiques de la puce à ADN

La puce pangénomique porcine (60K) correspond à la puce commerciale 44K (soit 43603 oligonucléotides 60-mers ; GPL16524, Agilent Technologies France, Massy, France) qui a été enrichie avec 16702 oligonucléotides correspondant à des oligonucléotides exprimées dans le muscle squelettique (3419 oligonucléotides), le tissu adipeux (9532 oligonucléotides) et le système immunitaire (3751 oligonucléotides).

3.1.2 Acquisition des données d'expression

Les étapes d'extraction, de marquage des ARN et d'hybridation à la puce sont décrites dans l'article «Whole blood transcriptomics is relevant to identify molecular changes in response to genetic selection for feed efficiency and nutritional status in the pig ». Le logiciel d'analyse de données, Feature Extraction (Agilent), a permis d'extraire les données à partir des images obtenues à l'issu du scan des puces pangénomiques porcines. Un spot correspond à un signal lumineux qui est observé grâce à la liaison de l'ARN marqué à la sonde (ou oligonucléotide). Ainsi, plusieurs informations sont délivrées : la localisation des spots sur la puce, le classement d'un pixel entre signal et le bruit de fond, les données qualitatives (diamètre, surface et pourcentage de pixels saturés par un spot) et semi-quantitatives (intensité du signal et bruit de fond). Les données obtenues ont d'abord été filtrées à partir de deux critères, le contrôle qualité des spots (bruit de fond, diamètre du spot, saturation du spot et uniformité du spot) et la conservation du spot s'il est présent dans 80% des échantillons d'une condition (10 porcs/12). Á l'issue de cette étape de filtration, 37113 spots (ce qui équivaut à 37113 sondes) ont été retenus. Ces sondes ont ensuite été normalisées afin de corriger les effets liés à l'expérimentation (qualité du dépôt, de l'ARN, du marquage…). La normalisation s'effectue par la transformation des valeurs d'expression en logarithme de base 2, puis par le centrage médian des échantillons (toutes les médianes se retrouvent à 0).

3.1.3 Analyse statistique des données d'expression

L'ensemble des analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel (R Development Core Team, 2008). Les 37113 spots obtenus à la suite de la normalisation et du centrage médian des échantillons ont été utilisés pour les analyses statistiques. Les données ont été soumises à une analyse de variance considérant l'effet de la lignée du régime et de l'interaction lignée × régime.

3.2 Transcriptome des PBMCs chez le poulet

3.2.1 Extraction des ARN

Les ARN totaux ont été extraits à partir de PBMCs chez les poulets âgés de 63 jours selon le protocole d'extraction au Trizol (Invitrogen), contenant du phénol permettant la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques, du thiocyanate de guanidium afin de disloquer les membranes plasmiques et dénaturer les protéines et du β-mercaptoéthanol permettant de rompre les ponts disulfures afin de maintenir les protéines à l'état dénaturé. Les ARN extraits ont été quantifiés par spectrophotométrie au Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Illkirch, France). La qualité des ARN a été déterminée par la mesure du RIN (RNA integrity number) par l'utilisation du kit Agilent RNA 6000 Nano utilisant une technologie de micro-puce qui est ensuite lue par le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies France, Massy, France). Les rapports d'absorption 260/280 et 260/230 avaient une valeur supérieure à 1,8. Le RIN moyen était de 8,4 avec des valeurs comprises entre 7,4 à 9,6.

3.2.2 Caractéristiques de la puce à ADN

La puce pangénomique utilisée chez le poulet (60K) correspond à une puce commerciale 44K (soit 43553 oligonucléotides 60-mers ; Agilent earray) qui a été enrichie avec 9399 sondes provenant de la base de donnée Ensembl codant pour le poulet et qui n'étaient pas représentées sur la puce commerciale, 740 oligonucléotides (répétés 5 fois ; 711 gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, 29 gènes de réponse au stress), 5821 sondes présentes dans une base de donnée de santé animale (European Animal Disease Genomic Networks of Excellence).

3.2.3 Marquage et hybridation des ARN

Les ARN (150 ng) extraits à partir de chaque échantillon de PBMCs ont été marqués individuellement avec un fluorochrome, la Cyanine 3-CTP (Cy3), à l'aide du kit Low Input Quick Amp Labeling One-color (Agilent Technologies). Les ARN ont été générés en deux

étapes par l'utilisation d'une T7 polymérase qui simultanément amplifie l'ARN cible et incorpore la Cy3-CTP. Les sondes marquées ont ensuite été purifiées à l'aide du kit RNeasy mini elute (Qiagen, Hilden, Germany), puis hybridées. La réaction d'hybridation a été effectuée pendant 17 heures à 65°C dans des chambres d'hybridation contenant 150 ng d'ARN marqué Cy3-CTP par hybridation avec l'utilisation du kit Gene Expression Hybridization (Agilent). Les puces ont ensuite été retirées des chambres d'hybridation (désassemblage), nettoyées et scannées à 3 µm/pixel de résolution par l'Agilent DNA Microarray Scanner G2505C.

3.2.4 Réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)

L'expression des gènes codant la carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été évaluée par qPCR. L'ADN complémentaire a été synthétisé à partir d'un µg d'ARN totaux en utilisant le kit « High Capacity cDNA Reverse transcription » (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les séquences des sondes codant la CPT1A (sens : 5'-CCCTGAAAATGCTGCTTTCCTA-3' et anti-sens 5'-TGGTGCCTGCAGAAAGTTTG-3') et la GAPDH (sens : 5'-GCTAAGGCTGTGGGGAAAGT-3' et anti-sens : 5'-TCAGCAGCAGCCTTCACTAC-3') ont été déterminées par le logiciel Primer Express 3.0 (Applied Biosystem). L'efficacité de ces deux paires de sondes a été déterminée à partir de sept mesures (de 6,4 à $1,6.10^{-03}$ ng d'ADNc) provenant d'un pool d'ADNc de l'ensemble des échantillons. L'efficacité de la CPT1A était de 1,89 et celle de la GAPDH était de 1,87. La réaction d'amplification a été effectuée en duplicat dans 12,5 µL avec 1 ng d'ADNc dans une solution constituée de la sondes sens (5 µM) de la sonde antisens (5 µM) et le tampon de PCR 1X (Fast SYBR® Green Master Mix, Applied Biosystems). Le thermocycleur StepOnePlus Real Time PCR (Applied Biosystem) a été utilisé. Les conditions des cycles de PCR correspondaient à : 2 min à 50°C ; 20 sec à 95°C suivit par 40 cycles de dénaturation à 95° pendant 3 sec et une hybridation à 60°C pendant 30 sec. La spécificité de l'amplicon a été confirmée par l'analyse des courbes de dissociation. L'expression du gène codant la GAPDH ne diffère pas en fonction de la lignée et du régime, et ce gène a été utilisé comme gène de référence afin de normaliser les valeurs d'expression de la CPT1A. Outre la CPT1A, aucun autre gène n'a été mesuré par qPCR suite à la faible quantité d'ARN disponible.

3.2.5 Acquisition des données d'expression

Comme pour le traitement des données du porc, le logiciel d'analyse de données, Feature Extraction (Agilent), a permis d'extraire les données à partir des images obtenues à l'issue du scan des puces pangénomiques du poulet. Les données ont été filtrées à partir de deux critères, le contrôle qualité du spot (bruit de fond) et la conservation du spot s'il est présent dans 80% des échantillons d'une condition (10 poulets/12). Á l'issue de cette étape de filtration, 36932 spots (ce qui équivaut à 36932 sondes) ont été retenus. Ces sondes ont ensuite été normalisées par transformation des valeurs d'expression en logarithme de base 2, puis par centrage médian des échantillons.

3.2.6 Analyses statistiques des données d'expression

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel (R Development Core Team, 2008). Les 36932 spots obtenus à la suite de la normalisation et du centrage médian des échantillons ont été utilisés pour les analyses statistiques. Les données ont été soumises à une analyse de variance considérant l'effet de la lignée du régime et de l'interaction lignée × régime.

3.2.7 Analyse fonctionnelle

Les données d'expression variant entre les groupes expérimentaux ($P<0,01$) avec un ratio d'expression supérieur à 1,2 (et inférieur à 1/1,2) entre les groupes ont été utilisées pour effectuer l'analyse fonctionnelle. La liste des gènes DE a été étudiée par une analyse d'enrichissement d'ontologie de gènes appartenant à des processus biologiques et à des fonctions moléculaires grâce à une interface web (http://david.abcc.ncifcrf.gov), « database for annotation visualization and integrated discovery » (DAVID) (Huang da et al., 2009b, 2009a). Étant donné le faible nombre de gènes DE en fonction du régime, le regroupement de gènes n'a été effectué que pour l'effet de la lignée. La liste de gènes DE entre les poulets de la lignée grasse et de la lignée maigre a été divisée en deux listes en fonction de leur sous- et de leur surexpression. L'analyse de ces deux listes a ensuite été effectuée sur le logiciel DAVID à partir des « official gene symbols ». Les ontologies GO_terms_FAT ont été sélectionnées en ne conservant que les plus spécifiques. Les P-values issues des groupes de gènes enrichis ont été calculées par le test exact de Fisher, en utilisant l'annotation « Gene Symbol » de la puce 60K en référence. Les principaux termes GO des processus biologiques ou fonctions moléculaires des groupes de gènes ont été retenus lors d'un score d'enrichissement supérieur à 1,3 et une P-value, corrigée par le test de Benjamini et Hochberg, supérieure à 0,1.

Résultats

Tableau 3. Concentration plasmatique des métabolites et hormones chez le porc sélectionnés pour la CMJR (n=24/groupe) à 74 jours d'âge.

	CMJR-	CMJR+	Effet lignée
Métabolites			
Cholestérol total (mmol/L)	1,99 ± 0,09	1,58 ± 0,09	<0,001
Phospholipides (mmol/L)	1,16 ± 0,06	0,84 ± 0,06	<0,001
Triglycérides (mmol/L)	0,57 ± 0,05	0,43 ± 0,05	0,003
β-Hydroxybutyrate (µmol/L)	26 ± 2	25 ± 3	0,058
Urée (mmol/L)	4,14 ± 0,30	4,35 ± 0,41	0,568
Glucose (mmol/L)	7,00 ± 0,42	6,29 ± 0,19	0,032
Lactate(mmol/L)	9,0 ± 1,3	7,2 ± 1,1	0,136
Hormones			
Insuline (µUI/mL)	29 ± 4	25 ± 2	0,187
Leptine (µg/L)	1,01 ± 0,14	1,07 ± 0,22	0,847
TT3 (nmol/L)	1,48 ± 0,12	1,40 ± 0,09	0,430
T4 (nmol/L)	66,1 ± 2,7	64,3 ± 2,3	0,463
IGF-I (µg/L)	103 ± 14	100 ± 11	0,797

Moyennes ± SEM
TT3 : Triiodothyronine totale
T4 : Thyroxine
IGF-I : Insulin like growth factor I

Chapitre 1 - Paramètres plasmatiques indicateurs de la variation de masse grasse

La première étape de mon travail a consisté à analyser différents paramètres plasmatiques et à rechercher le lien avec la composition corporelle des animaux et en particulier les dépôts adipeux. Ce travail a abouti à deux articles. Le premier concerne les résultats de mesure des paramètres plasmatiques par dosage biochimique standard et par H1 RMN, ainsi que les corrélations entre les paramètres plasmatiques et les mesures tissulaires chez le porc, cet article est intitulé « NMR-based metabolomics highlights differences in plasma metabolites in pigs exhibiting diet-induced differences in adiposity, European Journal of Nutrition » qui sera identifié « article 1 ». Le second concerne les résultats de mesures des paramètres plasmatiques par dosage biochimique standard et par H1 RMN, ainsi que les corrélations entre les paramètres plasmatiques et les mesures tissulaires chez le poulet, cet article est intitulé « Pertinent plasma indicators of the ability of chickens to synthesize and store lipids, Journal of Animal Science » qui est identifié « article 2 ». Pour chaque espèce les résultats complémentaires aux articles sont présentés.

1. Variation des paramètres plasmatiques liés à des différences d'engraissement corporel induites par le régime alimentaire chez le porc

1.1 Mesures des paramètres plasmatiques avant la mise en place du régime expérimental

La concentration des paramètres plasmatiques a été déterminée chez les porcs âgés de 74 jours avant la mise en place du régime expérimental (**Tableau 3**). Á ce stade, les concentrations plasmatiques de phospholipides (P<0,001), de cholestérol (P<0,001), de triglycérides (P<0,01) et de glucose (P<0,05) sont plus élevées chez les porcs CMJR- que chez les porcs CMJR+. Les concentrations plasmatiques de β-hydroxybutyrate, Urée, insuline, IGF-I, T3, T4, et de leptine ne diffèrent pas entre les deux lignées (P>0.1).

1.2 Composition corporelle des animaux

La mesure de la composition corporelle a été effectuée lors de l'abattage des animaux. Les poids du TASC et du TA périrénal relatifs au poids vif de l'animal ne sont pas influencés par la lignée. Les porcs ayant reçu le régime HF sont plus maigres que les porcs ayant reçu le régime LF (P<0,001) dans les deux lignées. Concernant la masse maigre des animaux, les poids de la longe et du muscle Longissimus dorsi (LD) relatifs au poids vif de l'animal sont

Tableau 4. Masse corporelle et poids relatif au poids vif (PV) des tissus adipeux et musculaires des porcs sélectionnés pour la CMJR ayant reçu soit un régime riche en carbohydrates (LF) soit un régime riche en gras et en fibres (HF ; n=12/groupes).

	CMJR-		CMJR+		Effets	
	LF	HF	LF	HF	Lignée	Régime
Poids vif final (PV), kg	82,7 ± 1,3	72,8 ± 1,7	77,8 ± 1,2	69,0 ± 2,0	0,009	<0,001
TA périrénal, % PV	0,8 ± 0,03	0,6 ± 0,03	0,8 ± 0,04	0,5 ± 0,03	0,468	<0,001
TASC, % PV	5,7 ± 0,3	4,0 ± 0,2	5,9 ± 0,3	4,1 ± 0,2	0,419	<0,001
Poitrine, %PV	8,8 ± 0,2	8,4 ± 0,1	9,2 ± 0,2	8,4 ± 0,2	0,258	<0,001
Longe, % PV	20,1 ± 0,2	19,9 ± 0,1	18,8 ± 0,2	19,0 ± 0,2	<0,001	0,855
LD, % PV	4,4 ± 0,1	4,4 ± 0,1	3,9 ± 0,1	4,1 ± 0,1	<0,001	0,382

Aucun effet de l'interaction lignée × régime (P>0,10) n'a été observé
TA : Tissu adipeux
TASC : Tissu adipeux sous-cutané
LD : Longissimus Dorsi

plus élevés chez les porcs CMJR- que chez les porcs CMJR+ **Tableau 4**. Les résultats de composition corporelle ont été détaillés précédemment (Gondret et al., 2014) **Annexe III**.

1.3 Résumé de l'article 1

En comparaison des résultats de mesures plasmatiques réalisées sur les porcs âgés de 74 jours, l'effet de la lignée persiste après la mise en place du régime expérimental pour les concentrations en phospholipides et en cholestérol alors que les concentrations plasmatiques en glucose et en triglycérides ne diffèrent plus entre les deux lignées chez les porcs âgés de 132 jours (P>0.1).

Les principaux résultats de l'article 1, qui correspondent aux mesures des paramètres plasmatiques chez les porcs âgés de 132 jours, montrent que l'approche non-ciblée par résonnance magnétique nucléaire met en évidence un effet marqué du régime. Les niveaux plasmatiques de créatinine lysine, créatine, tyrosine, proline, histidine, lysine, phénylalanine et de formate sont moins élevés (P<0,05) alors que le niveau de VLDL-LDL est plus élevé (P<0,001) chez les porcs ayant reçu un régime HF que chez les porcs ayant reçu un régime LF. Les concentrations plasmatiques de β-hydroxybutyrate, de leptine, de glucose, d'insuline et d'urée sont moins élevées (P≤0,05) chez les porcs ayant reçu un régime HF que chez les porcs ayant reçu un régime LF. Les concentrations plasmatiques de leptine, de créatine et d'urée sont positivement corrélées avec la masse relative au poids vif de tissu adipeux. Ces résultats permettent de conclure que des métabolites associés aux métabolismes énergétique et protéique sont impliqués dans la réponse à un régime alimentaire riche en fibres et en lipides. Une combinaison d'indicateurs de la variation de la masse grasse a été déterminée.

Article 1

Eur J Nutr
DOI 10.1007/s00394-015-0932-z

ORIGINAL CONTRIBUTION

NMR-based metabolomics highlights differences in plasma metabolites in pigs exhibiting diet-induced differences in adiposity

Maëva Jégou[1,2] · Florence Gondret[1,2] · Julie Lalande-Martin[3] · Illa Tea[3] · Elisabeth Baéza[4] · Isabelle Louveau[1,2]

Received: 25 February 2015 / Accepted: 16 May 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract
Purpose A better understanding of the control of body fat mass and distribution is required for both human health and animal production. The current study investigates plasma parameters in response to changes in body fat mass.
Methods Pigs from two lines divergently selected for residual feed intake were fed diets contrasted in energy sources and nutrients. Between 74 and 132 days of age, pigs ($n = 12$ by diet and by line) received isoproteic and isoenergetic diets, either rich in starch (LF) or in lipids and fibres (HF). At the end of the feeding trial, plasma samples were analysed by ^{1}H NMR spectroscopy and standard hormonal and biochemical assays.
Results Pigs fed the HF diet had lower ($P < 0.01$) perirenal and subcutaneous adipose tissue relative masses than pigs fed the LF diet. Metabolomic approach showed a clear discrimination between diets, with lower ($P < 0.05$) plasma levels of creatinine–lysine, creatine, tyrosine, proline, histidine, lysine, phenylalanine and formate but higher ($P < 0.001$) plasma VLDL-LDL levels in HF pigs than in LF pigs. Plasma concentrations of triglycerides were higher ($P < 0.001$), while plasma concentrations of β-hydroxybutyrate, leptin, glucose, insulin and urea were lower ($P \leq 0.05$) in HF pigs than in LF pigs. Plasma levels of leptin, creatine and urea were positively correlated ($r = 0.3$, $P < 0.05$) with relative adipose tissue masses.
Conclusion These data indicate that metabolites associated with energy and protein metabolism were involved in the response to a high-fat, high-fibre diet. Relevant plasma indicators of metabolic flexibility related to changes in body adiposity were then proposed.

Keywords Amino acids · Fatness · High-fibre diet · Leptin · NMR spectroscopy

✉ Isabelle Louveau
isabelle.louveau@rennes.inra.fr

[1] INRA, UMR1348 Pegase, 35590 Saint-Gilles, France

[2] Agrocampus Ouest, UMR1348 Pegase, 35000 Rennes, France

[3] Faculté des Sciences et Techniques, UMR CNRS 6230 CEISAM Bât 9, 2 Rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 3, France

[4] INRA, UR 83 Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly, France

Introduction

A better understanding of the control of body fat mass and distribution is required for both human health and animal production. In humans, the increase in the prevalence of obesity throughout the world highlights the need to prevent this disturbance that is associated with an increased risk of developing metabolic disorders [1] (OECD obesity update 2012; http://www.oecd.org/dataoecd/1/61/49716427.pdf). In meat-producing animals, the lean-to-fat ratio influences production efficiency and meat quality traits [2]. Therefore, it is important to evaluate the pattern of changes in metabolism that are associated with variation in adiposity.

Analysis of blood gives an overview of the homeostatic state of the organism and could provide easily accessible biomarkers to monitor the onset of various metabolic disorders. Advances in high-throughput technologies offer new opportunities to investigate the relationships between blood traits and body adiposity. Recent studies have shown differential expressions of several genes in blood peripheral cells that are associated with lipid handling in rats [3] and that are correlated with the development of visceral adiposity in humans [4]. Plasma proteomic profiles have

Published online: 22 May 2015

been also related to early signs of diabetes in pigs used as a biomedical model and fed diets with different fatty acid contents [5]. NMR-based metabolomics is another emergent wide tool [6] including in pigs [7], which is fast and reliable to evaluate multiparametric metabolic responses. Several studies have demonstrated the feasibility of associating specific metabolite profiles to body fat distribution in healthy non-obese and obese subjects [8, 9].

To clarify the metabolic pathways associated with body fat plasticity and find relevant indicators of body fat mass, it is important to conduct well-controlled experimental studies involving genetically and/or dietary-induced differences in adipose tissue mass and associating both wide and targeted metabolic approaches able to reveal modifications in several plasma parameters. Recent findings highlighting similarities but also differences between rodent and human genome [10] reinforce the interest to investigate other experimental animals for metabolic research [11]. This includes the pig which is omnivorous and presents strong anatomical and physiological similarities with human [12–14]. Therefore, investigation of plasma parameters of pigs exhibiting differences in fat deposition may be very helpful in this context. In a recent study, we used an experimental strategy combining genetics and nutrition to induce marked differences in adiposity [15]. This study was based on the use of pigs divergently selected for residual feed intake (RFI) and fed diets with contrasted energy sources and nutrients. The RFI is a measure of feed efficiency that comprises typically the difference between the observed feed intake and the feed intake predicted from growth and maintenance requirements [16]. Irrespective of selection line, pigs fed a high-fat, high-fibre diet had a lower body fat mass when compared with pigs fed an isoenergetic low-fat, low-fibre diet [15]. The current study was undertaken to highlight changes in plasma hormones and metabolites by global and standard biochemical approaches and to determine the relationships between plasma parameters and body adiposity.

Materials and methods

Animals and diets

The experiment was performed in compliance with the European Union legislation and has been approved by a local ethics committee in animal experimentation (Rennes; France; authorization #07-2012). The pig lines and feeding trials used in the current study have been previously described [15]. Briefly, a total of 48 purebred French Large White castrated male pigs in the course of a divergent selection experiment for RFI ($n = 24$ per line) were considered. From 74 ± 3 days of age and an average body weight (BW) of 22.6 ± 0.5 kg to 132 days of age, pigs were housed in full slatted-floor isolated pens. Within each line, they were randomly assigned to one of the two dietary groups ($n = 12$ per diet) and fed ad libitum either a low-fat, low-fibre (LF) diet or a high-fat, high-fibre (HF) diet, considering coarsely ground insoluble fibres as a diluent of energy in the HF diet. The HF diet was formulated by the partial replacing of cereals (wheat and barley) in the LF diet by wheat straw (11.5 %) and a mixture of rapeseed and soya oils (7.5 %) [15]. Each diet had the same crude protein and metabolizable energy contents (Table 1). Growing and finishing diets were successively distributed to pigs along growth (transition at approximately 112 days of age) to reduce nitrogen environmental waste.

At the end of the feeding trial, all pigs were killed by electronarcosis and jugular exsanguination 2 h after their first morning meal, in the experimental slaughterhouse at INRA. The average BW of pigs was 75.6 ± 1.1 kg (80.2 ± 1.0 kg for the LF group and 70.9 ± 1.3 kg for the HF group). All adipose tissue around kidney (perirenal adipose tissue) was collected as a surrogate of visceral adiposity and weighed. The dorsal subcutaneous adipose tissue (SCAT) was excised from the carcass 1 day after death and weighed. The weights of these two adipose tissues were then expressed relative to pig BW (Table 2). Blood samples were collected from the jugular vein in dedicated tubes on heparin or EDTA, according to later measurements. Plasma was immediately prepared by centrifugation (2500×g) for 10 min at 4 °C. Plasma samples were divided into aliquots and then stored at −70 or −20 °C for later analyses.

Table 1 Composition of the low-fat, low-fibre (LF) and the high-fat, high-fibre (HF) diets during the growing and finishing periods

	Growing diets[a]		Finishing diets[a]	
	LF	HF	LF	HF
Chemical composition (%)				
Fat	2.1	7.0	2.2	7.4
Starch	42.6	30.8	48.5	36.2
Crude protein	17.4	17.3	13.4	13.1
Neutral detergent fibres	12.8	17.7	11.5	18.3
Acid detergent fibres	3.8	8.5	3.5	7.9
Nutritional value (%)				
Metabolizable energy (MJ/kg)	12.9	12.9	12.9	12.9

The detailed dietary composition of the diets has been described previously [15]

[a] For each dietary group, the growing diet was distributed to pigs during 6 weeks from 76 days of age, and the finishing diet was distributed thereafter and until slaughter

Table 2 Body weight and adipose tissue mass relative to BW in pigs with low or high residual feed intake (RFI) and fed a low-fat, low-fibre (LF) or high-fat, high-fibre (HF) diet ($n = 12$/group)

	LF				HF				Effect[a]	
	Low RFI		High RFI		Low RFI		High RFI		Diet	Line
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM		
BW[b] (kg)	82.7	1.2	77.7	1.2	72.8	1.7	69.0	2.0	<0.001	<0.01
Perirenal adipose tissue[c]	0.83	0.03	0.83	0.04	0.59	0.03	0.54	0.03	<0.001	0.467
SCAT[c]	5.7	0.2	5.9	0.3	3.9	0.2	4.1	0.2	<0.001	0.419

[a] There was no interaction ($P > 0.10$) between genetic line (low or high RFI) and diet (LF or HF) for any analysed traits

[b] Body weight

[c] Adipose tissue masses at the perirenal and subcutaneous (SCAT) locations are expressed as a per cent of body weight

^{1}H NMR spectroscopic analysis

Plasma samples (200 µL) were placed in a mixture (400 µL) of H_2O/D_2O (90/10 % volume) in a 5-mm NMR tube. High-resolution NMR spectra of all plasma samples were recorded on a Bruker Avance DRX-500 spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany), operating at 500.13 MHz and equipped with a cryogenic probe. ^{1}H NMR spectra were acquired at 303 K using the NOESYPR1D (1D nuclear Overhauser effect spectroscopy with water pre-saturation) pulse sequence (RD-90°-t_1-90°-t_m-90°-acquire) with a relaxation delay (RD) of 4 s, a mixing time (t_m) of 150 ms and a fixed t_1 delay of 20 µs. Water suppression was achieved by pre-saturation during the relaxation delay and mixing time. Each spectrum consisted of 256 free induction decays (FIDs) collected into 32 k complex data points with a spectral width of 12 ppm and an acquisition time of 2 s. Data were processed using Topspin™ software (Bruker) with one level of zero-filling and Fourier transformation after multiplying FIDs by an exponential line broadening function of 0.3 Hz. The ^{1}D NMR spectra were manually phase- and baseline-corrected and referenced to the chemical shift of the α-glucose at δ 5.235.

Chemometric data analysis

^{1}H NMR spectra were transferred to the AMIX™ software (version 3.8.4, Bruker). The bin area method was used to segment the spectra between 0.6 and 8.5 ppm using the intelligent variable size bucketing tool. The spectral region containing water (4.4–5.1 ppm) was excluded. A total of 100 buckets, consequently 100 variables, were defined manually and covered 99.5 % of the spectrum. Bin areas generated a matrix which was normalized by dividing each integrated segment by the total area of the spectrum that generated a new matrix to perform statistical analyses.

First, a package developed in the R environment was used for a univariate approach based on ANOVA for each variable, and discriminating variables were uncovered through a supervised univariate approach with t tests and boxplots [17]. After mean-centring and auto-scaling, the data matrix was subjected to multivariate statistical analyses using SIMCA-P + 12.0 software (Umetrics, Umeå, Sweden). Principal component analysis (PCA) was used first for outlier detection. Then, the ^{1}H NMR data set was handled using a supervised method such as projections to latent structure by partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The PLS-DA uses prior class information (diets and lines) to optimize the separation between sample classes [18]. Grouping in the data set was visualized on the first three-dimensional plots, called the score plots, while the loading plot was used to visually identify the variables driving the separation between classes. The predictive ability of the PLS-DA models was validated using the values of Q^2, R^2Y and R^2X parameters. The R^2 score represents the variance of the NMR data towards the class of each group. The Q^2 score is a cross-validated R^2 which reflects the model's potential for predicting class membership [19]. The statistical significance of the R^2Y and Q^2 parameters was estimated through a response permutation test, where the Y matrix is randomly permuted 999 times when the X matrix is fixed [20]. Finally, a P value was generated from a cross-validated analysis of variance (CV-ANOVA) [20]. Loading plot from PLS-DA models was used to identify the variables driving the separation between classes, i.e. the metabolites which could be potential biomarkers. In the current study, four criteria were used to validate the PLS-DA models: (1) $Q^2 > 0.5$, (2) CV-ANOVA <0.05, (3) response permutation test and (4) visual analysis of the boxplots and $P < 0.05$ for the metabolites arising from the coefficient plot and VIP. The PLS-DA models were considered predictive if three out of these four criteria were correct.

Plasma hormone assays

All samples were analysed in duplicate in a single batch. Plasma insulin concentrations were measured using a RIA kit (INSULIN-CT; IBA Molecular, Orangeburg, NY, USA). The intra-assay CV was less than 3 % at 72.3 µUI/mL. Plasma leptin concentrations were quantified using the multispecies RIA kit (Immunodiagnostic System, St. Charles, MO, USA) previously validated for use in porcine plasma [21]. The intra-assay CV was less than 4 % at 4 µg/L. Plasma concentrations of total ghrelin were quantified using a RIA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc.; Karlsruhe, Germany) that has been used previously in pigs [22]. The intra-assay CV was 8 % at 220 pg/mL. Plasma concentrations of total triiodothyronine (TT3) and total thyroxin (TT4) were determined using enzymatic immunoassays (ST AIA-PACK T3 or T4, TOSOH; Tessenderlo, Belgium). The intra-assay CV was less than 7 % at 1.1 nmol/L for TT3 and at 28.8 nmol/L for TT4. Plasma IGF-I concentrations were determined using a double-antibody RIA after an acid–ethanol extraction [23]. The intra-assay CV was 12 % at 553 µg/L.

Plasma metabolite assays

Plasma concentrations of target metabolites were determined by enzymatic colorimetric methods in a Konelab 20 analyser (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). For plasma glucose (Glucose RTU™), lactate (Lact PAP), triglycerides (TG PAP 1000), total cholesterol (Cholesterol RTU™), urea (UREA UV 250), kits were obtained from bioMérieux (Marcy-l'Etoile, France). For plasma phospholipids and β-hydroxybutyrate, kits were obtained from SOBIODA (Montbonnot-Saint-Martin, France) and Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France), respectively. Intra-assay CVs were less than 5 % for all metabolites.

Statistical analyses

Except metabolomics data that were subjected to specific packages as described above, all data were analysed using R 3.0.2 statistical software [24]. Data were processed by ANOVA using the linear model procedure considering the fixed effects of the line, the diet and the line x diet interaction. All data are presented as means with SEM values. Differences were considered significant at $P \leq 0.05$, whereas $0.05 < P < 0.10$ was considered as a trend. Linear regression analyses were performed to assess the relationships between subcutaneous adipose tissue (SCAT) or perirenal fat mass, each relative to BW, as a dependent variable, and plasma parameters as independent variables. The association between plasma parameters and relative fat mass was considered significant at $P \leq 0.05$ and with an absolute value of correlation coefficients (r) above 0.3. In addition, stepwise multiple linear regression analysis was performed with the regsubset function of the leaps package of R to show plasma parameters having the highest influence on the variations of relative fat masses.

Results

Body fat phenotype

There was no interaction ($P > 0.10$) between line and diet for BW and body fat percentage relative to BW (Table 2). Irrespective of line, pigs fed the HF diet were lighter ($P < 0.001$) than pigs fed the LF diet at the same age at slaughter. Relative percentages of perirenal and subcutaneous adipose tissues were lower ($P < 0.001$) in pig fed the HF diet than pigs fed the LF diet, in both lines. Irrespective of diet, pigs selected for a low RFI were heavier ($P < 0.01$) than pigs selected for a high RFI.

Metabolome-wide approach

Using ^{1}H NMR spectroscopy, 24 buckets among 110 were clearly identified in porcine plasma. The PCA and PLS-DA models did not show any significant effects of pig lines on data projection (not shown). Irrespective of line, the supervised PLS-DA (Fig. 1a) indicated a good discrimination of the two dietary groups by the metabolomics plasma profiles with good predictive values ($Q^2 = 0.53$, $R^2Y = 0.68$, $R^2X = 0.75$). The CV-ANOVA ($P < 0.001$) and permutation test (Fig. 1c) also indicated the robustness of the model. The most discriminating metabolites between HF and LF diets were creatine, a mix of creatinine and lysine, proline, histidine, tyrosine, formate, a mix of VLDL and LDL, lysine and phenylalanine (Fig. 1b). Plasma levels of creatine, creatinine–lysine, proline, histidine, tyrosine, lysine, phenylalanine and formate were lower ($P < 0.05$), whereas plasma levels of the mix of VLDL-LDL were greater ($P < 0.001$) in pigs fed the HF diet than in pigs fed the LF diet.

Further analysis indicates that apart from these highly discriminant metabolites, other metabolites were also found to be different between the different groups (Fig. 2; Table 3). Irrespective of line, plasma acetone level was higher ($P < 0.05$) in pigs fed the HF diet than in pigs fed the LF diet. Irrespective of diet, plasma choline and LDL levels were higher ($P < 0.05$) in the low RFI line than in the high RFI line. Finally, plasma levels of acetate, alanine, betaine, citrate, glutamine, HDL, isoleucine, lactate, leucine, methionine, succinate and threonine did not differ

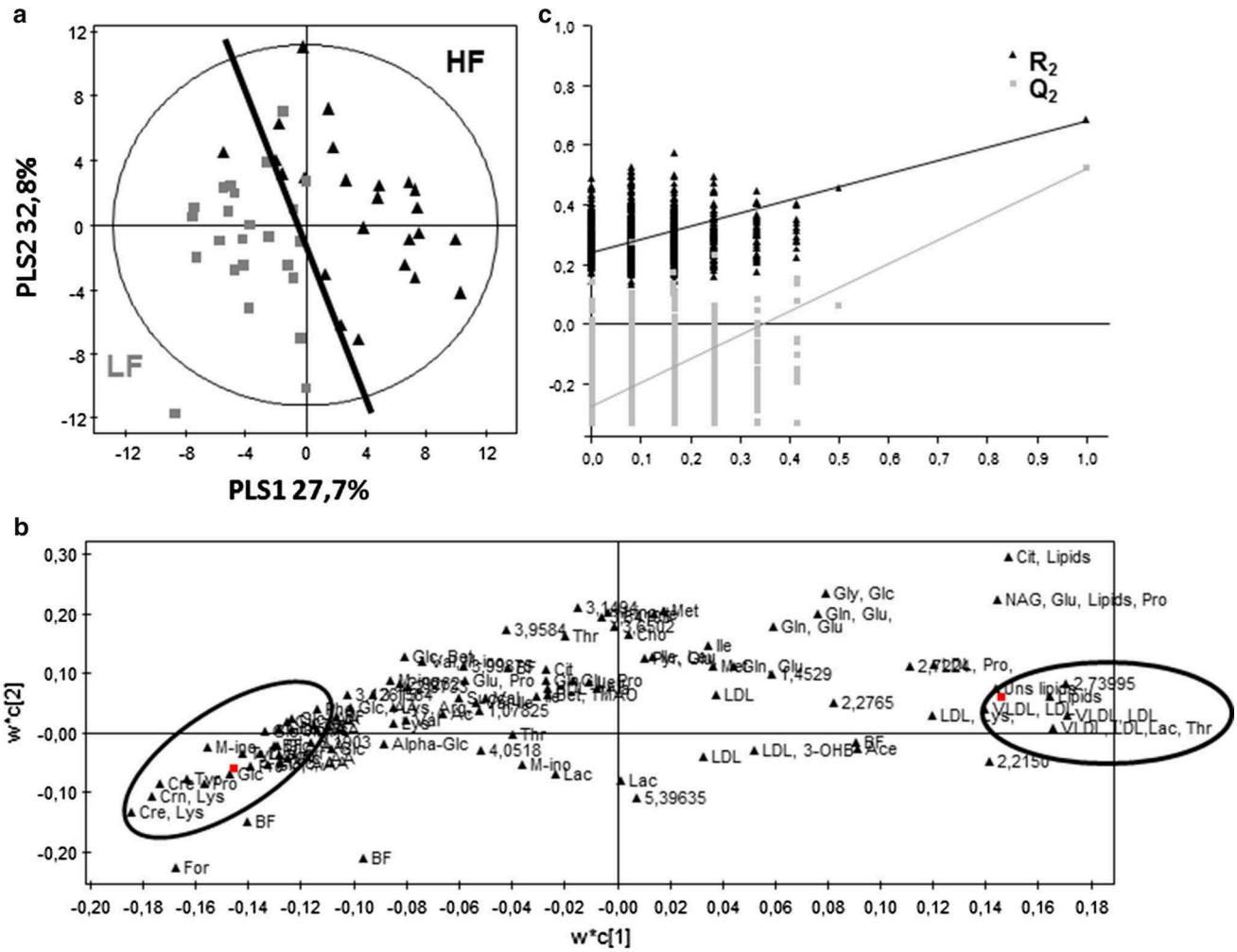


Fig. 1 ^{1}H NMR data from pigs with low or high residual feed intake (RFI) and fed a low-fat, low-fibre (LF) or high-fat, high-fibre (HF) diet. Score plot of the PLS-DA representing the two principal PLS axes (**a**). Loading plot of PLS-DA (**b**). The main discriminating metabolites were surrounded. (**c**) Results from the response permutation test (999 permutations)

($P > 0.1$) between the two dietary groups and between the two lines.

Targeted plasma metabolites and hormones

No interactions ($P > 0.10$) were observed between lines and diets for plasma metabolite and hormone concentrations. Irrespective of line, plasma concentrations of glucose tended to be lower ($P = 0.10$) in pigs fed the HF diet than in pigs fed the LF diet (Table 4). Lower plasma concentrations of β-hydroxybutyrate and urea ($P < 0.01$) were also observed in HF pigs compared with LF pigs. Plasma concentrations of triglycerides were higher ($P < 0.001$) in pigs fed the HF diet than in pigs fed the LF diet. Plasma concentrations of cholesterol, phospholipids and lactate did not differ ($P > 0.1$) between the two dietary groups. Regarding hormones, plasma concentrations of insulin and leptin were lower ($P < 0.001$) in pigs fed the HF diet than in pigs fed the LF diet (Table 4). Plasma concentrations of TT3, TT4, IGF-I and ghrelin did not differ ($P > 0.10$) between the two dietary groups.

Irrespective of diet, plasma concentrations of total cholesterol and phospholipids were greater ($P < 0.001$) in the low RFI pigs than in the high RFI pigs, but the other measured metabolites did not differ between the two lines. The low RFI pigs tended ($P = 0.06$) to have a higher plasma ghrelin concentration than the high RFI pigs. There was no significant difference between lines for other plasma hormone concentrations.

Relationships between plasma hormones or metabolites and adipose tissue mass

Correlations were established between plasma traits and perirenal adipose tissue or SCAT proportions in pig body (Table 5). Positive correlations ($P \leq 0.05$) were observed

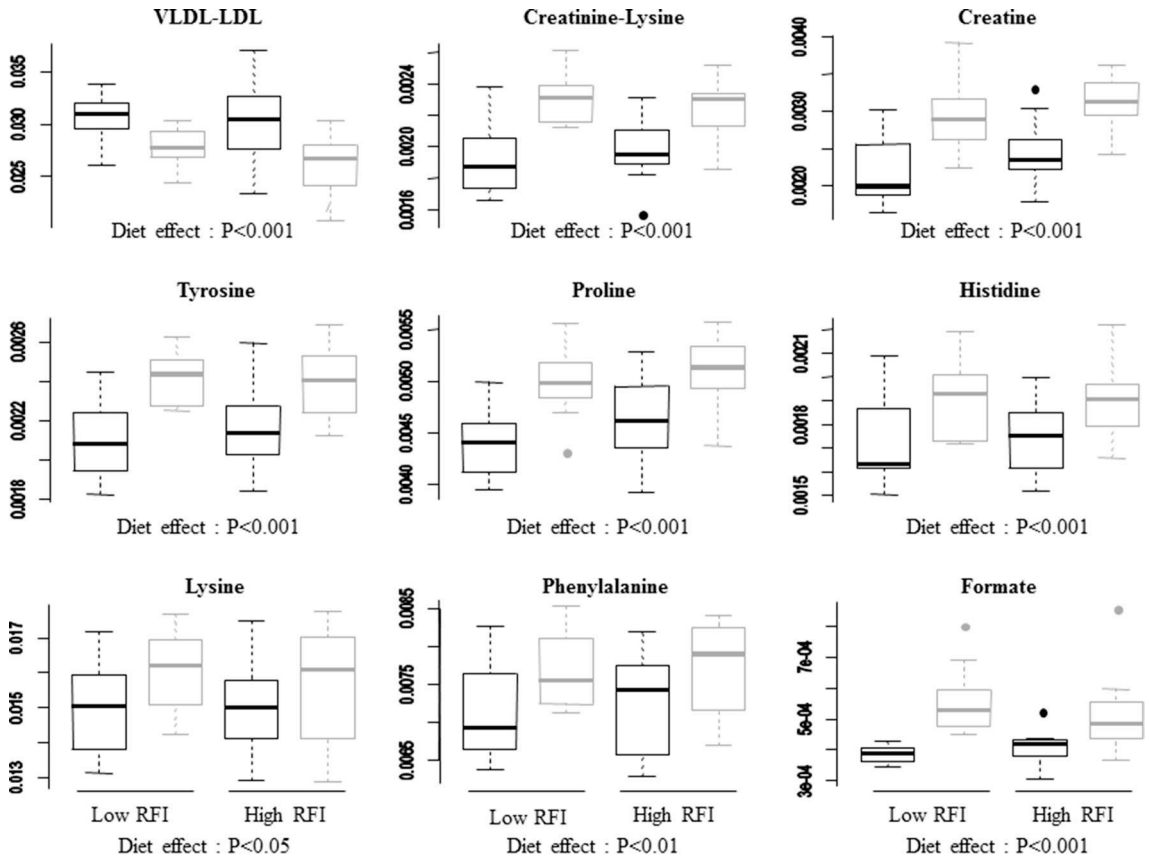


Fig. 2 The main discriminating plasma metabolites for pigs with low or high residual feed intake (RFI) fed a low-fat, low-fibre (*grey*) or high-fat, high-fibre (*black*) diet ($n = 12$/group). ANOVA showed a significant effect for diet but not for line. There was no interaction ($P > 0.10$) between genetic line and diet. P value was indicated for each metabolite

between the relative mass of both adipose tissues and plasma concentrations in urea, β-hydroxybutyrate, glucose, leptin, insulin, creatinine–lysine, tyrosine, proline, histidine, creatine and formate. A negative correlation ($P < 0.05$) was observed between the relative mass of both adipose tissues and triglycerides, and VLDL-LDL. In addition, a positive correlation ($P < 0.05$) was observed between the relative mass of perirenal fat and TT4, and a negative correlation ($P < 0.05$) was observed between the relative mass of perirenal fat and TT3; conversely, TT3 and TT4 plasma concentrations were not correlated with SCAT proportion. No significant correlation ($P > 0.1$) was observed between relative fat mass and phospholipids and total cholesterol (not shown).

Stepwise linear regression analyses highlighted that a combination of glucose, phospholipids, leptin and creatine variables explained 69 % of the total variability in perirenal adipose tissue mass relative to BW. Leptin and creatine represented more than 40 % of the variability among those 69 % explained by the model. Furthermore, the combination of glucose, leptin, IGF-I and tyrosine explained 65 % of the total variability in the relative SCAT mass. Leptin, glucose and tyrosine represented more than 50 % of variability among those 65 %.

Discussion

The current study clearly indicates that the difference in adipose tissue mass induced by the distribution of isoenergetic and isoproteic diets differing in feed energy sources and nutrients was associated with changes in several plasma metabolites and hormones. Whereas residual feed intake (RFI), a measure of feed efficiency, has been shown to be genetically correlated with body fatness [16] and associated with differences in energy use in tissues [25], there were almost no effects of lines on body adiposity and plasma metabolite profiles (except plasma cholesterol) in the current study. In addition, there were no interactions between diet and line for any traits studied. Irrespective of line, there was a marked decrease in BW and body fat content with the HF diet. This observation is in agreement with previous studies showing a negative effect of fibre inclusion in high-fat diet on adiposity in pigs [26, 27] and rats [28].

Table 3 Significance of the effects of diet and line on plasma metabolites identified by ^{1}H NMR spectroscopic analysis

Metabolites	Diet effect[a]	Line effect[a]
Acetate	0.095	0.262
Acetone	<0.05 (HF > LF)	0.941
Ala	0.851	0.181
Betaine	0.514	0.635
Choline	0.916	<0.05 (low RFI > high RFI)
Citrate	0.507	0.931
Creatine	<0.001 (HF < LF)	0.110
Creatinine–lysine	<0.001 (HF < LF)	0.991
Formate	<0.001 (HF < LF)	0.740
Gln	0.501	0.247
HDL	0.513	0.479
His	<0.001 (HF < LF)	0.970
Ile	0.393	0.263
Lactate	0.566	0.521
LDL	0.311	<0.05 (low RFI > high RFI)
Leu	0.798	0.989
Lys	<0.05 (HF < LF)	0.643
Met	0.365	0.224
Phe	<0.01 (HF < LF)	0.701
Pro	<0.001 (HF < LF)	0.153
Succinate	0.138	0.787
Thr	0.628	0.105
Tyr	<0.001 (HF < LF)	0.732
VLDL-LDL	<0.001 (HF > LF)	0.239

[a] $n = 24$ by group. Pigs selected for a low or high residual feed intake (RFI) were fed a low-fat, low-fibre (LF) or high-fat, high-fibre (HF) diets. *P* values for the main fixed effects of line and diet after ANOVA were shown together with a summary of the variation between groups

The adverse effect of fibre inclusion was partly explained by fibre properties, and pigs fed the HF diet had a lower average daily feed intake than pigs fed the LF diet because of earlier satiety, as discussed extensively previously [15]. The metabolites identified using a combination of ^{1}H NMR spectroscopy with standard biochemical analyses indicate that changes not only in lipid and carbohydrate metabolisms, but also in protein metabolism occurred in response to diets.

Feeding pigs a diet that contains both high-fat and high-fibre contents led to an increase in plasma triglyceride (TAG) concentrations but did not affect plasma phospholipid and cholesterol concentrations when compared with feeding a low-fat, low-fibre diet. With regard to lipid transport, NMR spectroscopy highlighted an increase in VLDL-LDL levels as one of the most discriminating features between HF and LF pigs, with no dietary-associated difference in circulating HDL and LDL levels. These findings suggest that changes in plasma content of TAG are attributable not only to variations in chylomicrons and their remnants in the postprandial period but also to a rapid secretion of VLDL by the liver in the HF diet. These differences could result from the greater fat content of the HF diet compared with the LF diet and to the presence of insoluble fibres in this diet. Available data in the literature on the specific effects of fibres with regard to the plasma lipid-related traits are still controversial. Increasing fibre content of diets fed to growing pigs has been shown to increase both plasma TAG and cholesterol concentrations [29]. In contrast, it has been demonstrated that pigs acutely fed a diet enriched in insoluble or soluble fibres had lower postprandial plasma TAG concentrations [30]. In rats, the addition of fibre to a high-fat diet also reduced these concentrations [28]. In the current study, the increase in both circulating TAG and VLDL may be an adaptive response of the liver to provide energy to peripheral tissues. Indeed, it has been suggested that part of ingested lipids in HF pigs might be sequestered into viscera rather than directly available for adipose tissues growth [15]. Another argument in favour of a decrease in feed energy availability when fed diet rich in fibres is the observed changes in the plasma concentrations of β-hydroxybutyrate between HF and LF pigs. The production of ketone bodies is initiated to make available energy that is stored as fatty acids in the liver. In the present study, the lower plasma concentration of β-hydroxybutyrate observed with the HF diet may sign for a variation in the hepatic oxidation of fatty acids. Previous studies have suggested that insoluble fibres induce fatty acid oxidation in the liver of mice [31] and pigs [27]. Altogether, these findings support the view that the HF diet can drive different metabolic changes at the hepatic level. Similar conclusions have been drawn in rats for resistant starch consumption in the context of a high-fat diet [28].

Moreover, metabolomic results highlighted a decrease in plasma creatine and creatinine concentrations in pigs fed the HF diet compared with those fed the LF diet. Creatine is an amino acid derivative, which represents an energy shuttle in muscles [32], and creatinine is the degradation product of creatine. A previous study based on ^{1}H NMR approach has also highlighted lower levels of plasma creatine in gestating sows fed high-fibre diet [33] and postulated plasma creatine concentration as an indicator of the level of glucose–glycogen interchange in skeletal muscle. The current decrease in creatine and creatinine plasma levels in HF pigs suggests lower activities of glycogenolysis and glycolysis in the HF pigs compared with the LF pigs. This fits with the observation of a lower glucokinase activity in the liver and reduced hexokinase to citrate synthase ratio in muscle observed in the same pigs [15]. In the present study, other evidence for modifications in carbohydrate metabolism as induced by feeding a high-fat, high-fibre

Table 4 Plasma concentrations of metabolites and hormones in pigs with low or high residual feed intake (RFI) and fed a low-fat, low-fibre (LF) or high-fat, high-fibre (HF) diet ($n = 12$/group)

	LF				HF				Effect[a]	
	Low RFI		High RFI		Low RFI		High RFI		Diet	Line
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM		
Metabolites										
Cholesterol[b] (mmol/L)	2.58	0.08	2.09	0.13	2.55	0.09	2.04	0.08	0.694	<0.001
Phospholipids (mmol/L)	1.40	0.04	1.11	0.07	1.40	0.05	1.17	0.05	0.531	<0.001
TAG (mmol/L)	0.45	0.04	0.38	0.03	0.75	0.08	0.73	0.11	<0.001	0.511
β-hydroxybutyrate (μmol/L)	46	4	42	4	34	3	33	2	0.002	0.413
Urea (mmol/L)	4.84	0.26	4.36	0.41	3.14	0.22	3.19	0.37	<0.001	0.507
Glucose (mmol/L)	8.32	0.54	8.87	1.05	7.79	0.36	7.22	0.39	0.100	0.989
Lactate (mmol/L)	9.9	1.4	10.0	1.6	10.1	1.5	8.8	1.8	0.739	0.686
Hormones										
Insulin (μUI/mL)	110	18	126	16	75	8	51	68	<0.001	0.824
Leptin (μg/L)	2.94	0.17	2.70	0.23	2.15	0.17	1.89	0.15	<0.001	0.174
Ghrelin (pg/mL)	221	21	190	17	197	20	160	12	0.141	0.067
TT3 (nmol/L)	1.25	0.06	1.16	0.07	1.21	0.08	1.29	0.06	0.513	0.894
TT4 (nmol/L)	55.1	1.8	54.5	3.2	53.9	2.5	47.9	3.0	0.153	0.227
IGF-I (μg/L)	234	31	205	16	224	21	223	16	0.831	0.495

[a] There was no interaction ($P > 0.10$) between genetic line (low or high RFI) and diet (LF or HF) for any analysed parameters

[b] Plasma concentrations of total cholesterol

Table 5 Significant correlation between perirenal, subcutaneous adipose tissue mass relative to body weight and plasma levels of metabolites and hormones ($n = 48$)

	Adipose tissue			
	Perirenal		Subcutaneous	
	r[a]	P value	r[a]	P value
Metabolites				
β-hydroxybutyrate	0.52	<0.001	0.58	<0.001
Triglycerides	−0.32	0.03	−0.34	0.02
VLDL-LDL	−0.37	0.01	−0.44	0.002
Glucose	0.28	0.05	0.39	0.006
Urea	0.56	<0.001	0.63	<0.001
Creatinine–lysine	0.49	<0.001	0.48	<0.001
Tyr	0.43	0.002	0.46	0.001
Pro	0.39	0.006	0.42	0.003
His	0.29	0.049	0.30	0.04
Creatine	0.58	<0.001	0.54	<0.001
Formate	0.34	0.02	0.42	0.003
Hormones				
Leptin	0.63	<0.001	0.56	<0.001
Insulin	0.54	<0.001	0.49	<0.001
TT4	0.31	0.03	0.24	0.10
TT3	−0.31	0.03	−0.24	0.10

[a] r : square root of R^2 obtained from linear regression analysis

diet also comes from variation in insulin and glucose concentrations. Plasma concentration of glucose is one of the factors determining postprandial insulin concentration [34]. Therefore, the findings of lower insulin concentrations and slight decrease in postprandial glycaemia of HF pigs compared with pigs fed the LF diet further support the assumption that energy and carbohydrate availability was lower in those pigs compared with LF pigs. This idea agrees with a recent report indicating that intake of cereal dietary fibres results in an increased excretion of energy and impaired carbohydrate availability for small intestinal absorption in human [35]. However, two other studies did not report any clear effects of dietary fibres on the time-course levels of glucose and insulin after meal ingestion in the pig [33, 36].

Despite the same amount of crude proteins in the two experimental diets, lower plasma concentrations of different amino acids, namely histidine, lysine, phenylalanine, proline and tyrosine, were observed when pigs were fed the HF diet, which suggests diet-associated modification in protein metabolism. The observation of a lower plasma concentration of urea in HF pigs compared with LF pigs further corroborates this statement. This reduction in plasma urea concentration may be associated with a lower protein catabolism or alternatively with an increase in the efficiency of nitrogen utilization [37] when feeding a high-fat, high-fibre diet. Similarly to our results, hyperlipidaemia induced by a

high-fat diet was associated with a lower plasma level of tyrosine in rats [38, 39]. Tyrosine is formed from the essential amino acid phenylalanine, which could explain the lower plasma level of this latter amino acid in pigs fed the HF diet than in pigs fed the LF diet [40]. Moreover, tyrosine and phenylalanine are ketogenic and glucogenic amino acids. This suggests that those amino acids may be used as an energy source in pigs fed the HF diet. Conversely, the lack of dietary-associated effects on alanine and methionine is consistent with a recent study based on a high-fibre diet given in gestating sows [41].

In the current study, the relative weights of perirenal and subcutaneous adipose tissues were used as surrogates of adiposity in growing pigs. Indeed, it has been previously demonstrated that subcutaneous adipose tissue mass and the proportion of perirenal fat are good estimators of whole body lipid mass [42]. The findings that most plasma parameters which significantly correlated with relative perirenal adipose tissue mass were also correlated with the relative subcutaneous adipose tissue mass further support this statement. As expected, plasma leptin concentration explained the main part of variability in these relative fat masses. Leptin is primarily produced and secreted by adipocytes and is involved in the regulation of feed intake [43]. Our observations further support previous studies in pigs that have shown that serum leptin concentration was correlated with subcutaneous fat area percentage from different anatomical parts [44] or backfat thickness [45]. Similarly, leptin was strongly correlated with body and epididymal fat mass in mice [46]. In humans, plasma leptin concentration has also been considered as a good marker of adiposity in adults [47]. This study provides also evidence for a significant correlation between insulin and adipose tissue mass, which has been also reported in a previous study comparing body or epididymal fat weight and insulin concentration in mice [46].

On the opposite, the finding of a negative correlation between plasma concentrations of TAG or plasma levels of VLDL-LDL and the relative fat mass contrasts with available data in human studies. Indeed, TAG was positively correlated with visceral adipose tissue [8, 48]. These discrepancies may be related to the fact that the changes in plasma TAG levels observed in our study may not be of dietary origin as discussed above. The present study points also creatine as one of the best positively correlated plasma metabolites with perirenal fat mass. In the current study, positive correlation was observed between plasma creatine level and relative adipose tissue mass, whereas in many studies, creatine level was associated with muscle tissue mass variation. Similarly, a negative correlation between plasma creatine and lean meat percentage has been established in pigs [49], which suggests that a higher plasma creatine concentration is linked with a higher adiposity. Finally, several plasma parameters associated with protein metabolism were found to be correlated with adiposity. Associations between amino acid pattern and fat mass have been described in several other studies. Tyrosine, proline and histidine were positively correlated to relative adipose tissue mass. Similarly, tyrosine was identified as an indicator of fat deposition in pigs and in humans [9, 50] and as a robust marker of visceral adiposity in humans [9]. Serum concentrations of tyrosine were also found to be lower in lean than in genetically obese pigs [50]. Finally, plasma urea concentration in pigs was positively correlated with the relative adipose tissue mass as reported previously [51].

Correlations between single metabolites and relative fat mass highlight the importance of each metabolite to explain the variability of adipose tissue mass. However, it may be better to consider a combination of several metabolites rather than a single metabolite to identify plasma parameters accounting for adipose tissue mass variation in growing pigs as in other species. Stepwise analysis highlighted that a combination of metabolites, such as glucose, phospholipids, leptin and creatine variables, may account for the major part of variability in relative perirenal adipose tissue mass. Similarly, glucose, leptin, IGF-I and tyrosine accounted for the major part of total variability in the relative SCAT mass. According to these observations, glucose and leptin plasma concentrations could be the best plasma parameters to predict adipose tissue mass. However, further studies are required to confirm the accuracy of these traits to assess body fat changes.

In summary, the current study shows that diet-induced variation in adipose tissue mass was associated with plasma metabolic and hormonal modifications in pigs. The addition of fibres in the diet inhibited the effect of a classical diet-induced hyperlipidaemia. Furthermore, lipid, carbohydrate as well as protein metabolisms were affected by isoenergetic and isoproteic diets contrasted in energy sources, which underlined the interplay in energy and protein pathways in regulating energy homeostasis.

Acknowledgments The authors thank H. Gilbert (INRA, UMR1388 GenPhySE F-31326 Castanet Tolosan), and Y. Billon and A. Priet (INRA, UE1372 GenESI, Le Magneraud, F-17700 Surgères) for line selection, P. Roger and J. Delamarre (INRA, UMR Pegase) for animal care, G. Guillemois (INRA, UMR Pegase) for diet preparation, and J. Liger and J.F. Rouault (INRA, UMR Pegase) for animal slaughter procedures. They are also grateful to C. Tréfeu and S. Daré (INRA, UMR Pegase) for their help in sample collection and/or expert technical assistance. The current study was financially supported by the French National Research Agency (ANR-11-BSV7-004 FatInteger). M. Jégou was supported by a Ph.D. scholarship from INRA and the research fund of Région Bretagne (France).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Stevens GA, Singh GM, Lu Y, Danaei G, Lin JK, Finucane MM, Bahalim AN, McIntire RK, Gutierrez HR, Cowan M, Paciorek CJ, Farzadfar F, Riley L, Ezzati M (2012) National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. Popul Health Metr 10:22. doi:10.1186/1478-7954-10-22
2. Sillence MN (2004) Technologies for the control of fat and lean deposition in livestock. Vet J 167:242–257. doi:10.1016/j.tvjl.2003.10.020
3. Konieczna J, Sanchez J, van Schothorst EM, Torrens JM, Bunschoten A, Palou M, Pico C, Keijer J, Palou A (2014) Identification of early transcriptome-based biomarkers related to lipid metabolism in peripheral blood mononuclear cells of rats nutritionally programmed for improved metabolic health. Genes Nutr 9:366. doi:10.1007/s12263-013-0366-2
4. Yamaoka M, Maeda N, Nakamura S, Kashine S, Nakagawa Y, Hiuge-Shimizu A, Okita K, Imagawa A, Matsuzawa Y, Matsubara K, Funahashi T, Shimomura I (2012) A pilot investigation of visceral fat adiposity and gene expression profile in peripheral blood cells. PLoS ONE 7:e47377. doi:10.1371/journal.pone.0047377
5. te Pas MF, Koopmans SJ, Kruijt L, Calus MP, Smits MA (2013) Plasma proteome profiles associated with diet-induced metabolic syndrome and the early onset of metabolic syndrome in a pig model. PLoS ONE 8:e73087. doi:10.1371/journal.pone.0073087
6. Gibney MJ, Walsh M, Brennan L, Roche HM, German B, van Ommen B (2005) Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. Am J Clin Nutr 82:497–503
7. Xiao H, Wu MM, Shao FY, Tan BE, Li TJ, Ren WK, Yin J, Wang J, He QH, Yin YL, Hou YQ (2015) Metabolic profiles in the response to supplementation with composite antimicrobial peptides in piglets challenged with deoxynivalenol. J Anim Sci 93:1114–1123
8. Szymanska E, Bouwman J, Strassburg K, Vervoort J, Kangas AJ, Soininen P, Ala-Korpela M, Westerhuis J, van Duynhoven JP, Mela DJ, Macdonald IA, Vreeken RJ, Smilde AK, Jacobs DM (2012) Gender-dependent associations of metabolite profiles and body fat distribution in a healthy population with central obesity: towards metabolomics diagnostics. OMICS J Integr Biol 16:652–667. doi:10.1089/omi.2012.0062
9. Martin FP, Montoliu I, Collino S, Scherer M, Guy P, Tavazzi I, Thorimbert A, Moco S, Rothney MP, Ergun DL, Beaumont M, Ginty F, Qanadli SD, Favre L, Giusti V, Rezzi S (2013) Topographical body fat distribution links to amino acid and lipid metabolism in healthy obese women. PLoS ONE 8:e73445. doi:10.1371/journal.pone.0073445
10. Carninci P (2014) Genomics: mice in the ENCODE spotlight. Nature 515:346–347. doi:10.1038/515346a
11. Dodson MV, Hausman GJ, Guan L, Du M, Rasmussen TP, Poulos SP, Mir P, Bergen WG, Fernyhough ME, McFarland DC, Rhoads RP, Soret B, Reecy JM, Velleman SG, Jiang Z (2010) Lipid metabolism, adipocyte depot physiology and utilization of meat animals as experimental models for metabolic research. Int J Biol Sci 6:691–699
12. Spurlock ME, Gabler NK (2008) The development of porcine models of obesity and the metabolic syndrome. J Nutr 138:397–402
13. Litten-Brown JC, Corson AM, Clarke L (2010) Porcine models for the metabolic syndrome, digestive and bone disorders: a general overview. Animal 4:899–920. doi:10.1017/S1751731110000200
14. Nielsen KL, Hartvigsen ML, Hedemann MS, Laerke HN, Hermansen K, Bach Knudsen KE (2014) Similar metabolic responses in pigs and humans to breads with different contents and compositions of dietary fibers: a metabolomics study. Am J Clin Nutr 99:941–949
15. Gondret F, Louveau I, Mourot J, Duclos MJ, Lagarrigue S, Gilbert H, van Milgen J (2014) Dietary energy sources affect the partition of body lipids and the hierarchy of energy metabolic pathways in growing pigs differing in feed efficiency. J Anim Sci 92:4865–4877. doi:10.2527/jas.2014-7995
16. Gilbert H, Bidanel JP, Gruand J, Caritez JC, Billon Y, Guillouet P, Lagant H, Noblet J, Sellier P (2007) Genetic parameters for residual feed intake in growing pigs, with emphasis on genetic relationships with carcass and meat quality traits. J Anim Sci 85:3182–3188. doi:10.2527/jas.2006-590
17. Balayssac S, Déjean S, Lalande J, Gilard V, Malet-Martino M (2013) A toolbox to explore NMR metabolomic data sets using the R environment. Chemometr Intell Lab Syst 126:50–59. doi:10.1016/j.chemolab.2013.04.015
18. Barker M, Rayens W (2003) Partial least squares for discrimination. J Chemom 17:166–173. doi:10.1002/cem.785
19. Anderssen E, Dyrstad K, Westad F, Martens H (2006) Reducing over-optimism in variable selection by cross-model validation. Chemometr Intell Lab Syst 84:69–74. doi:10.1016/j.chemolab.2006.04.021
20. Eriksson L, Trygg J, Wold S (2008) CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS® models. J Chemom 22:594–600. doi:10.1002/cem.1187
21. Qian H, Barb CR, Compton MM, Hausman GJ, Azain MJ, Kraeling RR, Baile CA (1999) Leptin mRNA expression and serum leptin concentrations as influenced by age, weight, and estradiol in pigs. Domest Anim Endocrinol 16:135–143
22. Salfen BE, Carroll JA, Keisler DH (2003) Endocrine responses to short-term feed deprivation in weanling pigs. J Endocrinol 178:541–551
23. Louveau I, Bonneau M (1996) Effect of a growth hormone infusion on plasma insulin-like growth factor-I in Meishan and large white pigs. Reprod Nutr Dev 36:301–310
24. R Development Core Team (2008) R: a language and environment for statistical computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. http://www.R-project.org
25. Le Naou T, Le Floc'h N, Louveau I, Gilbert H, Gondret F (2012) Metabolic changes and tissue responses to selection on residual feed intake in growing pigs. J Anim Sci 90:4771–4780. doi:10.2527/jas.2012-5226
26. Sejersen H, Sorensen MT, Larsen T, Bendixen E, Ingvartsen KL (2013) Liver protein expression in young pigs in response to a high-fat diet and diet restriction. J Anim Sci 91:147–158. doi:10.2527/jas.2012-5303
27. Yan H, Potu R, Lu H, Vezzoni de Almeida V, Stewart T, Ragland D, Armstrong A, Adeola O, Nakatsu CH, Ajuwon KM (2013) Dietary fat content and fiber type modulate hind gut microbial community and metabolic markers in the pig. PLoS ONE 8:e59581. doi:10.1371/journal.pone.0059581
28. Polakof S, Diaz-Rubio ME, Dardevet D, Martin JF, Pujos-Guillot E, Scalbert A, Sebedio JL, Mazur A, Comte B (2013) Resistant starch intake partly restores metabolic and inflammatory alterations in the liver of high-fat-diet-fed rats. J Nutr Biochem 24:1920–1930. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.05.008
29. Ziemer CJ, Kerr BJ, Weber TE, Arcidiacono S, Morrison M, Ragauskas A (2012) Effects of feeding fiber-fermenting bacteria to pigs on nutrient digestion, fecal output, and plasma energy metabolites. J Anim Sci 90:4020–4027. doi:10.2527/jas.2012-5193
30. Leclere C, Lairon D, Champ M, Cherbut C (1993) Influence of particle size and sources of non-starch polysaccharides on postprandial glycaemia, insulinaemia and triacylglycerolaemia in pigs and starch digestion in vitro. Br J Nutr 70:179–188

31. Isken F, Klaus S, Osterhoff M, Pfeiffer AF, Weickert MO (2010) Effects of long-term soluble vs. insoluble dietary fiber intake on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. J Nutr Biochem 21:278–284. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.12.012
32. Brosnan JT, Wijekoon EP, Warford-Woolgar L, Trottier NL, Brosnan ME, Brunton JA, Bertolo RF (2009) Creatine synthesis is a major metabolic process in neonatal piglets and has important implications for amino acid metabolism and methyl balance. J Nutr 139:1292–1297. doi:10.3945/jn.109.105411
33. Yde CC, Westerhuis JA, Bertram HC, Bach Knudsen KE (2012) Application of NMR-based metabonomics suggests a relationship between betaine absorption and elevated creatine plasma concentrations in catheterised sows. Br J Nutr 107:1603–1615. doi:10.1017/s0007114511004909
34. Ellis PR, Roberts FG, Low AG, Morgan LM (1995) The effect of high-molecular-weight guar gum on net apparent glucose absorption and net apparent insulin and gastric inhibitory polypeptide production in the growing pig: relationship to rheological changes in jejunal digesta. Br J Nutr 74:539–556
35. Isaksson H, Landberg R, Sundberg B, Lundin E, Hallmans G, Zhang JX, Tidehag P, Knudsen KEB, Moazzami AA, Aman P (2013) High-fiber rye diet increases ileal excretion of energy and macronutrients compared with low-fiber wheat diet independent of meal frequency in ileostomy subjects. Food Nutr Res. doi:10.3402/fnr.v57i0.18519
36. Montagne L, Loisel F, Le Naou T, Gondret F, Gilbert H, Le Gall M (2014) Difference in short-term responses to a high-fiber diet in pigs divergently selected for residual feed intake. J Anim Sci 92:1512–1523. doi:10.2527/jas.2013-6623
37. Berschauer F, Close WH, Stephens DB (1983) The influence of protein:energy value of the ration and level of feed intake on the energy and nitrogen metabolism of the growing pig. 2. N metabolism at two environmental temperatures. Br J Nutr 49:271–283
38. Xu QY, Liu YH, Zhang Q, Ma B, Yang ZD, Liu L, Yao D, Cui GB, Sun JJ, Wu ZM (2014) Metabolomic analysis of simvastatin and fenofibrate intervention in high-lipid diet-induced hyperlipidemia rats. Acta Pharmacol Sin 35:1265–1273. doi:10.1038/aps.2014.72
39. Zhang Q, Wang G, Ma B, Dua Y, Zhu L, Wu D (2010) Metabonomic profiling of diet-induced hyperlipidaemia in a rat model. Biomarkers 15:205–216. doi:10.3109/13547500903419049
40. Lerner AB (1953) Metabolism of phenylalanine and tyrosine. Adv Enzymol Relat Subj Biochem 14:73–128
41. Yde CC, Bertram HC, Theil PK, Knudsen KE (2011) Effects of high dietary fibre diets formulated from by-products from vegetable and agricultural industries on plasma metabolites in gestating sows. Arch Anim Nutr 65:460–476
42. Kloareg M, Noblet J, Van Milgen J (2006) Estimation of whole body lipid mass in finishing pigs. Anim Sci 82:241–251. doi:10.1079/ASC200529
43. Barb CR (1999) The brain-pituitary-adipocyte axis: role of leptin in modulating neuroendocrine function. J Anim Sci 77:1249–1257
44. Suzuki K, Inomata K, Katoh K, Kadowaki H, Shibata T (2009) Genetic correlations among carcass cross-sectional fat area ratios, production traits, intramuscular fat, and serum leptin concentration in Duroc pigs. J Anim Sci 87:2209–2215. doi:10.2527/jas.2008-0866
45. Fabian J, Chiba LI, Kuhlers DL, Frobish LT, Nadarajah K, McElhenney WH (2003) Growth performance, dry matter and nitrogen digestibilities, serum profile, and carcass and meat quality of pigs with distinct genotypes. J Anim Sci 81:1142–1149
46. Steyn FJ, Xie TY, Huang L, Ngo ST, Veldhuis JD, Waters MJ, Chen C (2013) Increased adiposity and insulin correlates with the progressive suppression of pulsatile GH secretion during weight gain. J Endocrinol 218:233–244. doi:10.1530/joe-13-0084
47. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S et al (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. Nat Med 1:1155–1161
48. Hoenig MR, Cowin G, Buckley R, McHenery C, Coulthard A (2011) Low density lipoprotein cholesterol is inversely correlated with abdominal visceral fat area: a magnetic resonance imaging study. Lipids Health Dis 10:12. doi:10.1186/1476-511x-10-12
49. Rohart F, Paris A, Laurent B, Canlet C, Molina J, Mercat MJ, Tribout T, Muller N, Iannuccelli N, Villa-Vialaneix N, Liaubet L, Milan D, San Cristobal M (2012) Phenotypic prediction based on metabolomic data for growing pigs from three main European breeds. J Anim Sci 90:4729–4740. doi:10.2527/jas.2012-5338
50. He Q, Ren P, Kong X, Wu Y, Wu G, Li P, Hao F, Tang H, Blachier F, Yin Y (2012) Comparison of serum metabolite compositions between obese and lean growing pigs using an NMR-based metabonomic approach. J Nutr Biochem 23:133–139. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.11.007
51. Coma J, Zimmerman DR, Carrion D (1995) Relationship of rate of lean tissue growth and other factors to concentration of urea in plasma of pigs. J Anim Sci 73:3649–3656

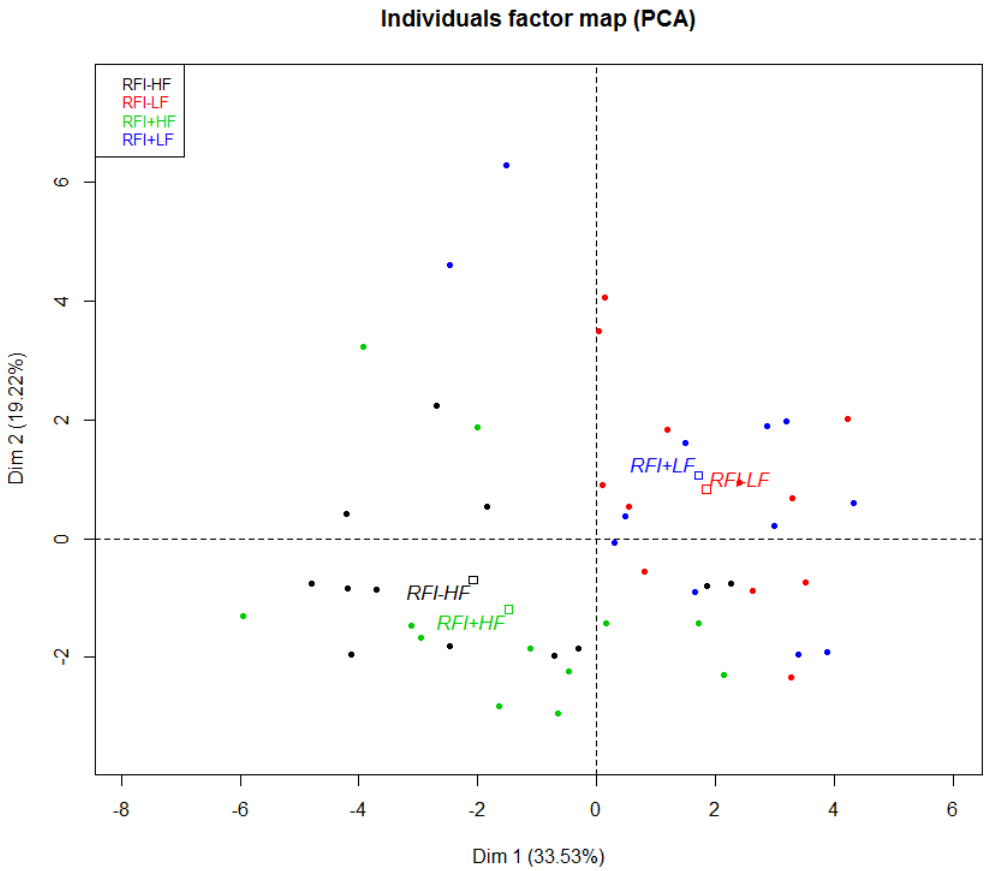


Figure 17. Représentation du graphique de dispersion des individus par analyse en composante principale chez les porcs âgés de 132 jours (n=12/groupes).

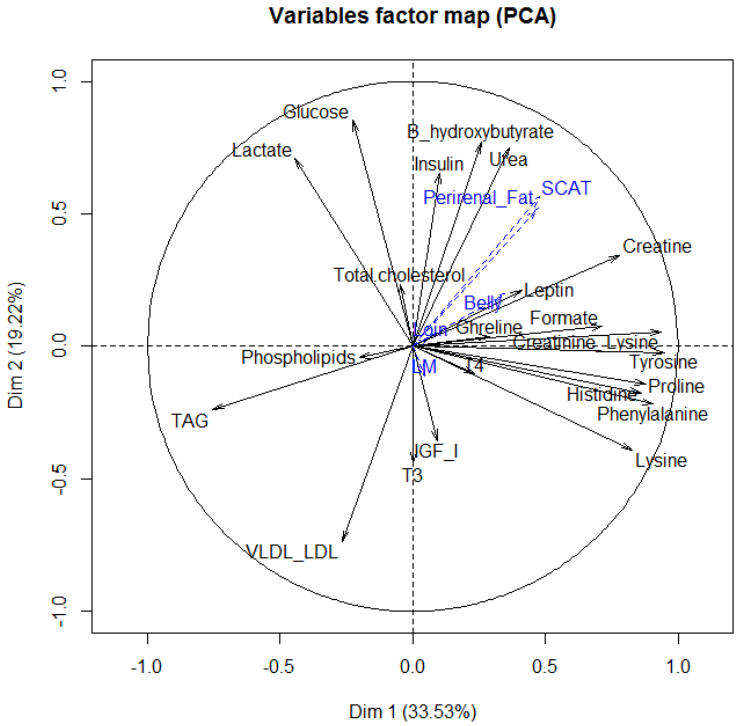


Figure 18. Cercle de corrélation de l'analyse en composante principale des paramètres plasmatiques chez les porcs âgés de 132 jours (n=12/groupes).

1.4 Mesure de corrélations entre les paramètres plasmatiques et la composition corporelle

Les corrélations entre les paramètres plasmatiques mesurés pour les porcs âgés de 74 jours et les variables tissulaires ont été calculées. Cependant, l'effet du régime sur les mesures tissulaires réalisées pour les porcs âgés de 132 jours ne nous ont pas permis de conserver ces résultats de corrélation.

Outre les résultats présentés dans l'article, une analyse en composante principale a été effectuée afin de déterminer si certains métabolites et/ou hormones permettaient d'expliquer les variables tissulaires mesurées. La représentation graphique de la distribution des individus fait l'objet de la **Figure 17** ainsi que le cercle des corrélations correspondant (**Figure 18**). La répartition des individus indique que 33,53% de la variabilité du modèle est expliqué par le régime alimentaire (axe 1) et 19,22% de la variabilité est expliqué par la lignée (axe 2). Les coefficients de corrélation ont été déterminés pour chaque paramètre dans l'article correspondant. Les droites de régression linéaires ayant permis de déterminer les coefficients de corrélation sont présentés en **Annexe IV**.

2. Variation des paramètres plasmatiques liés à des différences d'engraissement corporel induites par le régime alimentaire chez le poulet

2.1 Mesures des paramètres plasmatiques avant la mise en place du régime expérimental

Les paramètres plasmatiques ont été dosés avant la mise en place du régime expérimental pour les poulets âgés de 21 jours. Les résultats des mesures de ces paramètres sont présentés dans l'article 2. La concentration en phospholipides et en β-hydroxybutyrate tendent à être plus élevés ($P=0,06$), les triglycérides ($P<0,05$) et le glucose ($P<0,001$) sont plus élevés chez les poulets de la lignée maigre que de la lignée grasse. La concentration plasmatique de la T4 ($P<0,05$) est plus élevée pour les poulets de la lignée grasse que les poulets de la lignée maigre.

2.2 Composition corporelle des animaux

Le régime alimentaire n'a pas d'effet sur les performances de croissance et la composition corporelle des poulets âgés de 63 jours. L'activité des métabolismes glycolytique et oxydatif du foie est augmentée et le stockage du glycogène dans le foie et dans le muscle sartorius est

plus élevé chez les poulets âgés de 60 jours ayant reçu un régime riche en glucides. Aucune différence n'est observée en fonction du régime pour ces paramètres dans le muscle Pectoralis major (PM). Aucune différence de teneur en lipides du foie, du tissu adipeux abdominal et des muscles, n'est observée en fonction du régime. Les poulets de la lignée grasse ont une quantité de gras de muscle moins élevé que les poulets de la lignée maigre. L'activité des enzymes oxydatives dans le foie sont plus faibles pour les poulets de la lignée grasse que pour les poulets de lignée maigre, cependant la lignée n'affecte pas le métabolisme énergétique musculaire. La concentration en glycogène hépatique n'est pas affectée par la lignée alors que la concentration en glycogène et le potentiel glycolytique du muscle PM sont plus élevés pour les poulets de la lignée grasse que pour les poulets de la lignée maigre. En conclusion de ce qui est observé pour les mesures d'ordre zootechnique, la quantité de lipides stockés dans les muscles ou dans le tissu adipeux de la lignée grasse et de la lignée maigre, ne dépend pas de la source énergétique du régime alimentaire. Les résultats de composition corporelle ont été détaillés (Baéza et al., 2015) **Annexe V.**

2.3 Mesure des paramètres plasmatiques après la mise en place du régime expérimental

Principaux résultats

Les principaux résultats de l'article 2 mettent en évidence que l'analyse métabolomique a permis d'identifier la bétaine, la glutamine et l'histidine comme étant les métabolites les plus discriminants entre les groupes. La bétaine, l'acide urique, les triglycérides et les phospholipides étaient positivement corrélés ($P<0,05$, $r>0,3$) et la glutamine, l'histidine, T3, l'homocystéine et le β-hydroxybutyrate étaient négativement corrélés ($P<0,05$, $r<-0,3$) avec la masse relative au poids vif de gras abdominal et/ou de gras du coté externe du haut de cuisse. La combinaison des composés plasmatiques, AGL, cholestérol total, phospholipides, β-hydroxybutyrate, glutamine et méthionine, explique 74% de la variabilité du poids relatif du gras abdominal. La combinaison des concentrations plasmatiques en triglycérides et homocystéine expliquent 37% de la variabilité de la masse grasse relative de la partie externe du haut de cuisse. En conclusion de l'article 2, les paramètres sanguins impliqués dans le métabolisme des lipides, du glucose, et des acides aminés sont significativement corrélés au dépôt de gras chez le poulet en croissance pouvant en faire de potentiels marqueurs de l'adiposité.

Article 2

Published March 3, 2015

Pertinent plasma indicators of the ability of chickens to synthesize and store lipids[1]

E. Baéza,*[2] M. Jégou,†‡ F. Gondret,†‡ J. Lalande-Martin,§ I. Tea,§ E. Le Bihan-Duval,* C. Berri,* A. Collin,* S. Métayer-Coustard,* I. Louveau,†‡ S. Lagarrigue,†‡ and M. J. Duclos*

*INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France; †INRA, UMR1348 Physiologie, Environnement et Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Elevage (PEGASE), F-35590 Saint-Gilles, France; ‡Agrocampus-Ouest, UMR 1348 PEGASE, F-35590 Saint-Gilles, France; §Faculté des Sciences et Techniques, UMR CNRS 6230 CEISAM, BP 92208, 2 Rue de la Houssinière, F-44322 Nantes Cedex 3

ABSTRACT: Excessive deposition of body fat is detrimental to production efficiency. The aim of this study was to provide plasma indicators of chickens' ability to store fat. From 3 to 9 wk of age, chickens from 2 experimental lines exhibiting a 2.5-fold difference in abdominal fat content and fed experimental diets with contrasted feed energy sources were compared. The diets contained 80 vs. 20 g of lipids and 379 vs. 514 g of starch per kg of feed, respectively, but had the same ME and total protein contents. Cellulose was used to dilute energy in the high-fat diet. At 9 wk of age, the body composition was analyzed and blood samples were collected. A metabolome-wide approach based on proton nuclear magnetic resonance spectroscopy was associated with conventional measurements of plasma parameters. A metabolomics approach showed that betaine, glutamine, and histidine were the most discriminating metabolites between groups. Betaine, uric acid, triglycerides, and phospholipids were positively correlated ($r > 0.3$; $P < 0.05$) and glutamine, histidine, triiodothyronine, homocysteine, and β-hydroxybutyrate were negatively correlated ($r < -0.3$; $P < 0.05$) with relative weight of abdominal fat and/or fat situated at the top of external face of the thigh. The combination of plasma free fatty acids, total cholesterol, phospholipid, β-hydroxybutyrate, glutamine, and methionine levels accounted for 74% of the variability of the relative weight of abdominal fat. On the other hand, the combination of plasma triglyceride and homocysteine levels accounted for 37% of the variability of fat situated at the top of external face of the thigh. The variations in plasma levels of betaine, homocysteine, uric acid, glutamine, and histidine suggest the implication of methyl donors in the control of hepatic lipid synthesis and illustrate the interplay between AA, glucose, and lipid metabolisms in growing chickens.

Key words: chicken, energy metabolism, fat deposition, lipids, plasma markers, starch

© *2015 American Society of Animal Science. All rights reserved.* J. Anim. Sci. 2015.93:107–116
doi:10.2527/jas2014-8482

INTRODUCTION

In animal production, fat is usually considered to be a byproduct of very low commercial value. Moreover, fatty animals are less efficient in the conversion of feed during the rearing period and therefore do not contribute to the profitability of meat production. Then, breeders have selected chickens for many years for low carcass fatness. One of the main problems associated with this selection arises from the need to slaughter birds to measure the relative proportion of abdominal fat and to use collateral birds for breeding purposes. In addition, experimental lines have been divergently selected for low or high abdominal fat to increase our understanding of the genetic regulation of adiposity and energy metabolism in meat-type chickens (Leclercq, 1988). Beside genetics, diet composition may also influence body composition and tissue metabolisms, because

[1]The authors thank the staff of the INRA experimental poultry unit (UE1295 PEAT, Nouzilly, France) for producing and rearing animals and the technicians of the research units for measurements on birds, sample collection, and laboratory analyses. This project was supported by the French ANR FatInteger program (ANR-11-BSV7-0004).

[2]Corresponding author: baeza@tours.inra.fr

Received September 5, 2014.
Accepted November 7, 2014.

nutrient sensors in tissues regulate energy homeostasis (Hardie et al., 2012). To date, targeted approaches (see Baéza and Le Bihan-Duval, 2013, for review) and transcriptomic analyzes of different tissues (Lagarrigue et al., 2006; Bourneuf et al., 2006; Resnyk et al., 2013) have been performed in fat and lean lines eventually considering their nutritional status to unravel the relationships between body fatness and energy and protein metabolisms as well as the endocrine regulation of lipogenesis. Easily accessible fluids such as blood also offer opportunities to screen tissue metabolism interplay and to search some indicators of body fatness that may be later tested for selection procedure (Leclercq et al., 1987). Broader explorations of genetics and nutritional interaction effects have been recently challenged by the development of untargeted genomewide approach technologies on plasma such as metabolomics; this, however, has been rarely applied to chickens (Huber et al., 2010). That is why a metabolome-wide approach on plasma, associated with conventional blood biochemistry, was undertaken to provide indicators of energy metabolism adaptation when chickens of different genetics ability to synthesize and store lipids were faced with diets with contrasted energy sources.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

All experimental procedures were performed in accordance with the French national guidelines for the care and use of animals for research purposes (certificate of authorization to experiment on living animals number 7740, Ministry of Agriculture and Fish Products, and favorable notice of ethics committee of "Val de Loire," March 3, 2012). A total of 120 males from 2 experimental lines (60 per line) divergently selected on abdominal fat content (fat vs. lean; Leclercq, 1988) were obtained from the experimental unit Pôle Expérimental Avicole de Tours (INRA, Nouzilly, France) on the day of hatching. Chickens were reared together in a closed building (6.7 birds/m^2) and fed a starting diet (2,900 ME kcal/kg and 210 g CP/kg). At 21 d of age, 32 chickens per line of similar BW were distributed into 2 groups receiving 1 of the 2 experimental diets and placed in individual cages (60 by 45 by 60 cm per cage). To limit the genetic variation, 2 or 4 brothers from a same family (1 sire crossed with 1 dam) were equally distributed between the 2 dietary groups. The diets were isoenergetic and isoproteic but exhibited a low lipid (**LL**) or a high lipid (**HL**) content. Cellulose was used to dilute energy in the HL diet. The percentages of SFA, MUFA, and PUFA were similar in the HL and LL diets. The experimental growing diets (12.54 MJ ME/kg and 190 g CP/kg) were given from 21 to 63 d. At this age, 12 chickens per group were feed deprived for 12 h and then refed for 3 h before being sacrificed by decapitation and bleeding. The growth performance, body composition, and metabolic characterization of the liver, abdominal fat, and pectoralis major (**PM**) and sartorius (**SART**) muscles were reported by Baéza et al. (2014; Table 1).

At 20 d of age (early stage before distribution of experimental diets) and just before sacrifice, at 63 d of age, blood samples were collected in the occipital sinus in tubes containing EDTA or heparin and kept on ice. After centrifugation (2,000 × g for 10 min at 4°C), aliquots of plasma were stored at –20°C for later analyses of targeted plasma parameters or –80°C for proton nuclear magnetic resonance (**^{1}H NMR**)-based metabolomic investigations (only in 63-d-old chickens).

Targeted Plasma Parameters

Plasma triglyceride, total cholesterol, phospholipids, free fatty acids (**FFA**), glucose, lactate, uric acid, urea, and β-hydroxybutyrate were quantified by colorimetric enzymatic methods using a Konelab 20 analyzer (Thermo Scientific, Gometz le Châtel, France) and kits provided by Bio-Mérieux (Marcy-l'Etoile, France), Sobioda (Montbonnot, France), and Thermo Scientific (Villebon sur Yvette, France). Plasma insulin levels were determined by RIA as previously described (Simon et al., 1974). Triiodothyronine (**T3**) and thyroxin (**T4**) levels were determined by RIA as previously described (Van der Geyten et al., 2002). Plasma homocysteine level was quantified by ultra performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry within an injection interval of 2.05 min (isocratic mix at 0.6 mL/min with 60% acetonitrile and 40% water containing 0.1% formic acid; column Kinetex® XB-C18 1.7 µm 100 nm, 150 mm by 2.1 mm; Phenomex®, Torrance, CA; injection of 1 µL and oven temperature at 60°C) after a 2-step sample preparation (reduction followed by precipitation of the protein matrix) with the ClinMass® (Recipe®; Precision Instruments, Marseille, France).

Untargeted Plasma Metabolomics

For ^{1}H NMR spectroscopy, samples were prepared from a plasma volume of 150 µL and 450 µL of a mixture of H_2O/deuterium oxide (10/90% volume) added in a 5-mm nuclear magnetic resonance (**NMR**) tube. High-resolution NMR spectra of all blood plasma were recorded on a Bruker Avance DRX-500 spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany), operating at 500.13 MHz and equipped with a cryogenic probe. ^{1}H NMR spectra were acquired at 303 K using the 1-dimensional nuclear overhauser effect spectroscopy and pulse se-

quence comprising a relaxation delay (RD) of 4 s, a mixing time (t_m) of 150 ms and a fixed delay (t_1) of 20 µs. Water suppression was achieved by presaturation during the relaxation delay and mixing time at 90°C. Each spectrum consisted of 256 free induction decays (**FID**) collected into 32,000 complex data points with a spectral width of 12.10^{-6} m and an acquisition time of 2 s. Data were processed using Topspin software (Bruker) with 1 level of zero-filling and Fourier transformation after multiplying FID by an exponential line broadening function of 0.3 Hz. The 1-dimensional NMR spectra were manually phase and baseline corrected and referenced to the chemical shift of the α-glucose at δ 5.235.

Statistical and Chemometric Data Analyses

The experimental unit was the bird. There were 4 treatments representing a factorial 2, line and diet. The effects of line, diet, and their interaction on plasma targeted metabolites were tested by ANOVA (R 3.0.2 statistical software; R Development Core Team, 2004) and means were compared with a *t*-test and a significance level at $P < 0.05$.

^{1}H NMR spectra were transferred to the AMIX software (version 3.8.4; Bruker). The bin area method was used to segment the spectra between 0.6 and $8.5.10^{-6}$ m using the intelligent variable size bucketing tool. The spectral regions containing water (4.4–5.1) and EDTA signals (2.53–2.58, 2.68–2.70, 3.05–3.23, and 3.60–3.64) were excluded. One hundred ten buckets were manually defined and covered 99.5% of the spectrum. One bucket corresponded to 1 variable (part of 1 and more metabolites according to NMR signal assignment). Bin areas generated a matrix consisting of rows representing 48 samples and columns representing 110 variables. The data set was normalized by dividing each integrated segment by the total area of the spectrum. The new matrix thus obtained was subjected to statistical analyses. For metabolomics data, discriminating variables were first uncovered through a supervised univariate approach with *t*-tests and boxplots, using the R 3.0.2 software. After mean centering and autoscaling, the data matrix was subjected to several multivariate statistical analyses using SIMCA-P+ 12.0 software (Umetrics, Umeå, Sweden). Principal component analysis was used first. It is an unsupervised method that requires no prior knowledge of the data set and that describes the greatest amount of variance. Principal component analysis is useful for outlier detection and for finding patterns and trends. Therefore, the 1H NMR data set was then handled using a supervised method such as projections to latent structure by partial least squares–discriminant analysis (**PLS-DA**). The predictive feature of the PLS-DA models was validated using the values of three parameters: the predictive ability parameter (Q2) which reflects the model's potential for predicting class membership (Anderssen et al., 2006), the proportion of the total variance (i.e., the class of each experimental group) of the response variable explained by the model (R2Y) and the proportion of the total variance of the dependent variables that is explained by the model (R2X). The statistical significance of the R2Y and Q2 parameters was estimated through a response permutation test, where the Y matrix is randomly permuted 999 times when the X matrix is fixed (Eriksson et al., 2008). Finally, a *P*-value was generated from a cross-validated ANOVA (Eriksson et al., 2008). Loading plot, coefficient plot, and variable importance in the projection (**VIP**) from PLS-DA models were used to identify the metabolites driving the separation between classes. In this study, 4 criteria were used to validate the PLS-DA models: 1) $Q^2 > 0.5$, 2) CV-ANOVA < 0.05, 3) response permutation test, and 4) visual analysis of the boxplots and $P < 0.05$ for the metabolites arising from the coefficient plot and VIP. The PLS-DA models were considered predictive if 3 out of these 4 criteria were correct. In addition, the effect of line, diet, and their interaction were also tested on each metabolite by ANOVA (R 3.0.2. software) and a significance level at $P < 0.05$.

Finally, the relationships between body composition and plasma profile were analyzed by calculating simple linear regression analyses between the weights of abdominal fat; fat situated on the top of the external face of the thigh (**FTET**); PM and SART muscles, relative to body weight; and concentration of each metabolite or hormone (R 3.0.2. software). Data were then further tested using a stepwise multiple linear regression.

RESULTS

Feed Consumption and Body Composition

No interaction ($P > 0.10$) between diet and line was observed for the feed consumption and body composition of chickens. The diet had no effect on the feed consumption and body composition at 63 d of age ($P > 0.10$). Irrespective of the diet, lean chickens displayed lower ADFI ($P < 0.0001$) than fat chickens over the growth period considered. Lean chickens had higher muscle yield but lower carcass fatness than fat chickens ($P < 0.05$), as illustrated by the 63% reduction in abdominal fat proportion.

Targeted Plasma Parameters

At 20 d of age, chickens of the lean line had higher triglyceridemia (+21%; $P < 0.05$) and glycaemia

Table 1. Effect of line (fat and lean) and diet (high lipid [HL] and low lipid [LL]) on the feed consumption during the experimental period and body composition of chickens at 63 d of age (% BW; mean ± SE; n = 12)

Groups	ADFI 22–63 d, $g \cdot d^{-1}$ per chicken	Abdominal fat	Fat situated on the top of the thighs	Pectoralis major muscle	Sartorius muscle
Fat—LL	114 ± 8	3.5 ± 0.6	0.5 ± 0.1	4.2 ± 0.3	0.62 ± 0.06
Fat–HL	113 ± 10	3.3 ± 0.9	0.3 ± 0.1	4.2 ± 0.2	0.60 ± 0.04
Lean–LL	101 ± 9	1.1 ± 0.5	0.2 ± 0.1	4.4 ± 0.2	0.65 ± 0.06
Lean–HL	102 ± 5	1.4 ± 0.7	0.2 ± 0.2	4.4 ± 0.4	0.63 ± 0.07
Diet effect	0.88	0.77	0.18	0.88	0.28
Line effect	0.0001	0.0001	0.0004	0.025	0.04
Diet × line effect	0.71	0.26	0.17	0.75	0.89

(+12%; P = 0.0006) compared with the chickens of the fat line (Table 2). Plasma concentrations of phospholipids, β-hydroxybutyrate, total cholesterol, FFA, uric acid, and urea were not affected by the line. The lean chickens also exhibited lower concentrations of T4 (–20%; P = 0.03) than the fat chickens whereas T3 and insulin plasma concentrations did not differ between the 2 lines (Table 2).

At 63 d of age, the line had no effect on plasma levels of total cholesterol, phospholipids, FFA, lactate, urea, T3, and T4 (Table 3). The fat chickens had higher plasma levels of triglycerides (+31%; P = 0.02) and uric acid (+37%; P < 0.0001) but lower levels of glucose (–6%; P = 0.02), β-hydroxybutyrate (–20%; P = 0.006), insulin (–25%; P = 0.02), and homocysteine (–23%; P = 0.002) than the lean chickens. The diet had no effects on plasma levels of triglycerides, glucose, lactate, urea, T3, and T4 (Table 3). The chickens fed the LL diet had higher plasma levels of total cholesterol (+14%; P = 0.006), phospholipids (+16%; P = 0.0009), β-hydroxybutyrate (+28%; P = 0.002), and uric acid (+35%; P < 0.0001) and lower levels of FFA (–41%; P < 0.0001) and homocysteine (–15%; P = 0.04) than chickens fed the HL diet. For T3 and glucose plasma levels, there was an interaction between the line and diet. For T3 plasma level, the lean chickens fed the LL diet exhibited the highest value whereas the fat chickens fed the LL diet exhibited the lowest value (P < 0.05). For glucose plasma level, the lean chickens fed the HL diet exhibited the highest value and the fat chickens fed the HL diet exhibited the lowest value (P < 0.05).

Plasma Metabolomics Analysis

Table 4 summarizes the results of the multivariate (PLS-DA) and univariate analyses. All models were predictive except for the comparison between the fat–HL and lean–HL groups. The most predictive model was obtained for line comparison (fat–lean) as illustrated in Fig. 1 with the first 3 principal partial least squares (**PLS**) components having a good predictive value (Q^2 = 0.79 and R^2Y = 0.89; Table 4). The first and second PLS components clearly separated the 2 experimental chicken lines (Fig. 1A) with cross- validated ANOVA (P-value = 9 10^{-8}) response permutation test (Fig. 1C) indicating the robustness of the model. The metabolites mostly implicated in the line discrimination were glutamine, histidine, and betaine (Fig. 1B and 2). The lean chickens exhibited lower plasma levels in betaine, creatine, (**LDL**), methionine, praline, and threonine but higher plasma levels for glucose, glutamine, histidine, and lysine than fat chickens (Fig. 2; Table 5). For the diet effect, the most discriminating metabolites were lipids, LDL, and methionine (Fig. 2). The chickens fed the HL diet exhibited higher plasma levels for 10 metabolites and lower levels for acetoacetate, LDL, and betaine than chickens fed the LL diet (Fig. 2; Table 5). The diet and line had no effect on high-density lipoprotein (**HDL**) and very-low-density lipoprotein (**VLDL**) plasma levels.

Table 2. Plasma concentrations of metabolites and hormones measured at 20 d of age in chickens from fat and lean lines and fed with the same starting diet (mean ± SE; n = 10)

Parameters	Fat	Lean	Line effect
Total cholesterol, mg/L	1,244 ± 99	1,293 ± 103	0.29
Phospholipids, mg/mL	2.00 ± 0.27[b]	2.22 ± 0.19[a]	0.06
Triglycerides, mg/L	374 ± 53[b]	454 ± 112[a]	0.05
Free fatty acids, µmol/L	128 ± 27	135 ± 31	0.56
Glucose, mg/L	2,378 ± 118[b]	2,661 ± 180[a]	0.0006
Lactate, µmo/L	9,317 ± 1,724	9,738 ± 1,953	0.62
Uric acid, mg/L	88 ± 18	75 ± 30	0.25
β-hydroxybutyrate, µmol/L	461 + 114[b]	557 + 104[a]	0.06
Urea, mg/L	22.5 ± 3.6	23.1 ± 5.9	0.79
T3,[1] pmol/mL	2.72 ± 0.58	2.46 ± 0.46	0.27
T4,[1] pmol/mL	8.62 ± 1.74[a]	6.91 ± 1.60[b]	0.03
Insulin, microunits/mL	59.8 ± 35.0	60.5 ± 35.8	0.97

[a,b]Means within a row with different superscripts differ (P < 0.05).

[1]T3 = triiodothyronine; T4 = thyroxin.

An interaction ($P < 0.05$) between the line and diet was also found for choline, citrate, HDL, isoleucine, lysine, methionine, and valine (Table 5).

Regression Analyses between Plasma Parameters and Body Composition

Only significant associations are shown in Table 6. Results concerning the relative weights of abdominal fat and of FTET were rather similar except for β-hydroxybutyrate, which was associated to only abdominal fat. A positive correlation ($P < 0.05$) was found between the proportions of adipose tissues and plasma uric acid, phospholipid, triglyceride, and betaine levels. A negative correlation ($P < 0.05$) was found between the proportions of adipose tissues and plasma T3, homocysteine, glutamine, and histidine levels.

For muscles, significant relationships were observed between plasma parameters and the relative weight of PM muscle whereas the correlations were not significant for SART muscle. A positive correlation ($P < 0.05$) was observed between the relative weight of PM muscle and plasma T3, glutamine, and histidine levels. A negative correlation ($P < 0.05$) was observed between PM muscle and plasma phospholipid and triglyceride levels.

No significant correlation was observed between the relative weight of muscle or adipose tissues and plasma FFA, lactate, urea, glucose, total cholesterol, T4, insulin, and methionine levels.

Various combinations of 2 to 6 plasma parameters explained a significant ($P < 0.05$) part of the variation in body fat content. Plasma glutamine, total cholesterol, FFA, phospholipid, methionine, and β-hydroxybutyrate levels accounted for 74% of the variability of the relative weight of abdominal fat (Table 7). The relative contribution of each metabolite, respecting the previous order, was 44.54, 0.46, 4.89, 12.51, and 12.14%, respectively. Moreover, plasma triglyceride and homocysteine levels accounted for 37% of the variability of FTET (Table 7), with the relative contribution of each metabolite being 24.76 and 12.20%, respectively. Contrary to adipose tissues, multiple regression analyses did not improve the predictive power of plasma parameters in explaining the variation in the relative weights of PM or SART muscles.

DISCUSSION

Lean chickens had higher plasma levels of triglycerides at 20 d of age but lower triglyceridemia at 63 d of age than fat chickens. Blood samples were collected at 20 d without any feed withdrawal before whereas blood collection was performed in fasted–refed chickens at 63 d. The uptake of plasma lipids by peripheral tissues may be less efficient for lean chick-

Table 3. Plasma concentrations of metabolites and hormones measured at 63 d of age in chickens from fat and lean lines and fed with 2 different growing diets exhibiting low lipid (LL) or high lipid (HL) content for 3 h after 12 h of feed withdrawal (mean ± SE; $n = 12$)

Groups	Total cholesterol, mg/L	Phospholipids, mg/mL	Triglycerides, mg/L	Free fatty acids, µmol/L	Glucose, mg/L	Lactate, µmol/L	Homocysteine, µmol/L	β-hydroxybutyrate, µmol/L	Uric acid, mg/L	Urea, mg/L	Insulin, microunits/mL	T3,[1] pmol/mL	T4,[1] pmol/mL
Fat–LL	1,448 ± 252	2.33 ± 0.39	733 ± 241	69 ± 27	2,640 ± 250[ab]	6,937 ± 1,477	17.44 ± 3.06	552 ± 129	99 ± 16	36.8 ± 8.3	95.2 ± 30.7	2.18 ± 0.50[b]	13.84 ± 2.90
Fat–HL	1,345 ± 189	2.06 ± 0.23	691 ± 322	118 ± 24	2,480 ± 212[b]	6,881 ± 1,951	20.15 ± 5.42	451 ± 91	75 ± 13	32.1 ± 6.3	77.8 ± 30.6	2.62 ± 0.88[ab]	14.23 ± 3.98
Lean–LL	1,451 ± 196	2.25 ± 0.37	572 ± 203	67 ± 21	2,664 ± 266[ab]	6,336 ± 1,744	22.26 ± 6.43	712 ± 184	74 ± 28	34.0 ± 5.7	114.8 ± 50.2	3.13 ± 1.06[a]	11.62 ± 4.26
Lean–HL	1,201 ± 208	1.89 ± 0.25	524 ± 135	111 ± 19	2,784 ± 250[a]	6,678 ± 1,586	26.68 ± 7.46	536 ± 167	53 ± 15	32.2 ± 7.1	114.4 ± 44.6	2.61 ± 0.83[ab]	12.86 ± 4.18
Diet effect	0.006	0.0009	0.51	0.0001	0.78	0.77	0.04	0.002	0.0001	0.11	0.45	0.86	0.47
Line effect	0.25	0.16	0.02	0.51	0.023	0.41	0.002	0.006	0.0001	0.48	0.02	0.06	0.12
Diet × line effect	0.23	0.63	0.96	0.76	0.05	0.68	0.61	0.77	0.80	0.47	0.47	0.05	0.71

[a,b]Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

[1]T3 = triiodothyronine; T4 = thyroxin.

Table 4. Results of the multivariate (partial least squares–discriminant analysis) and univariate analyses of proton nuclear magnetic resonance data

Comparisons[1]	Number of samples	Model characteristics and validation[2]						Discriminating metabolites[3] (evolution first group vs. second; *P*-value)
		Number of axes	R^2X	R^2Y	Q^2	CV[2]-ANOVA	Permutation test	
Fat–LL/Fat–HL	11/12	2	0.42	0.87	0.67	6.3×10^{-4}	Yes	Lipids (↓; $\geq 4.9 \times 10^{-6}$), Met (↓; 3×10^{-8}), and LDL (↑; 2.2×10^{-6})
Lean–LL/Lean–HL	12/12	1	0.18	0.78	0.55	2.2×10^{-4}	No	Lipids (↓; $\geq 6.2 \times 10^{-4}$) and LDL (↑; $\geq 3.4 \times 10^{-4}$)
Fat–LL/Lean–LL	11/12	2	0.43	0.84	0.53	1.8×10^{-2}	No	Gln (↓; $\geq 4.5 \times 10^{-7}$), His (↓; $\geq 1.8 \times 10^{-5}$), and Bet (↑; $\geq 9.7 \times 10^{-3}$)
Fat–HL/Lean–HL	12/12	2	0.31	0.87	0.46	0.34	No	–
Fat/lean	23/24	3	0.47	0.89	0.79	9×10^{-8}	Yes	Gln (↓; $\geq 1.6 \times 10^{-9}$), His (↓; $\geq 7.5 \times 10^{-7}$), and Bet (↑; $\geq 9.9 \times 10^{-5}$)
LL/HL	23/24	3	0.51	0.87	0.74	5.3×10^{-9}	Yes	Lipids (↓; $\geq 8.4 \times 10^{-8}$), Met (↓; 8.5×10^{-5}), and LDL (↑; 2.3×10^{-6})

[1]LL = low lipid; HL = high lipid.

[2]R^2X = proportion of the total variance of the dependent variables that is explained by the model; R^2Y = response variable explained by the model; Q^2 = predictive ability parameter of the model.

[3]LDL = low-density lipoprotein; Bet = betaine; Met = methionine; Gln = glutamine; His = histidine; ↓ = decreased; ↑ = increased.

Table 5. Plasma metabolomics analysis determined at 63 d of age in chickens from fat and lean lines and fed with 2 different growing diets exhibiting low lipid (LL) or high lipid (HL) content for 3 h after 12 h of feed withdrawal (n = 12)

Metabolites	Line effect	Diet effect	Line × diet effect
Acetoacetate	ns[1]	0.004 (LL > HL)	ns
Acetone	ns	ns	ns
Alanine	ns	ns	ns
Betaine	0.0001 (lean < fat)	0.05 (LL > HL)	ns
Choline	ns	0.03 (LL < HL)	0.04
Citrate	ns	0.05 (LL < HL)	0.02
Creatine	0.01 (lean < fat)	ns	ns
Formate	ns	ns	ns
Fumarate	ns	ns	ns
Glucose	0.01 (lean > fat)	0.001 (LL < HL)	ns
Glutamine	0.0001 (lean > fat)	0.02 (LL < HL)	ns
Glutamate	ns	ns	ns
HDL[2]	ns	ns	0.02
Histidine	0.0001 (lean > fat)	ns	ns
Isoleucine	ns	ns	0.03
Lactate	ns	ns	ns
LDL[3]	0.007 (lean < fat)	0.0001 (LL > HL)	ns
Leucine	ns	ns	ns
Lysine	0.02 (lean > fat)	0.03 (LL < HL)	0.02
Methionine	0.05 (lean < fat)	0.0001 (LL < HL)	0.005
myo-Inositol	ns	0.0001 (LL < HL)	ns
Phenylalanine	ns	0.0001 (LL < HL)	ns
Proline	0.02 (lean < fat)	ns	ns
Pyruvate	ns	ns	ns
Succinate	ns	ns	ns
Threonine	0.05 (lean < fat)	0.03 (LL < HL)	ns
Tyrosine	ns	0.0001 (LL < HL)	ns
Valine	ns	ns	0.02
VLDL[4]	ns	ns	ns

[1]ns = not significant.

[2]HDL = high-density lipoprotein.

[3]LDL = low-density lipoprotein.

[4]VLDL = very-low-density lipoprotein.

ens than for fat chickens. However, we found no line effect on VLDL and HDL plasma levels at 63 d of age. Therefore, these data suggest a line effect on the composition of lipoproteins. Saez et al. (2012) showed that Pekin ducks exhibiting a high ability to store lipids in peripheral tissues had higher triglyceride content in VLDL than Muscovy ducks. The higher plasma level of LDL for fat chickens could not be induced by a lower ability of peripheral tissues for circulating lipid uptake as the highest amount of fatty tissue allowed the birds of this line to exhibit a higher activity of plasma lipoprotein lipase (Hermier et al., 1989). It suggests only that the amount of circulating lipids returning to the liver was higher for fat chickens. However, the lipid content of liver was similar for the 2 lines (Baéza et al., 2014). As previously reported (Baéza and Le Bihan-Duval, 2013), the plasma glucose level was higher for lean chickens at 21 and 63 d of age. This is a characteristic of lean birds that has been also described in ducks (Baéza et al., 2005). The fat birds have a higher capacity to metabolize glucose and synthesize glycogen related with higher insulin plasma level even if their ADFI is higher than that of lean chickens. In our study, the plasma insulin level did not differ between lines at 20 d of age whereas it was higher in lean chickens than in fat chickens at 63 d of age. This suggests that the postprandial kinetic was different between the 2 lines. Consistently, after a meal, a higher and faster increase in plasma insulin was reported in fat birds whereas the decrease was slower in lean birds (Baéza et al., 2005; Baéza and Le Bihan-Duval, 2013), which could explain a higher plasma level of insulin 3 h after the beginning of meal for lean chickens. The plasma level of β-hydroxybutyrate was also higher for lean chickens at 63 d of age, confirming their higher ability for liver lipid oxidation (Baéza et al., 2014) and partly explaining the lower carcass fatness for this line. Moreover, this parameter had a negative correlation

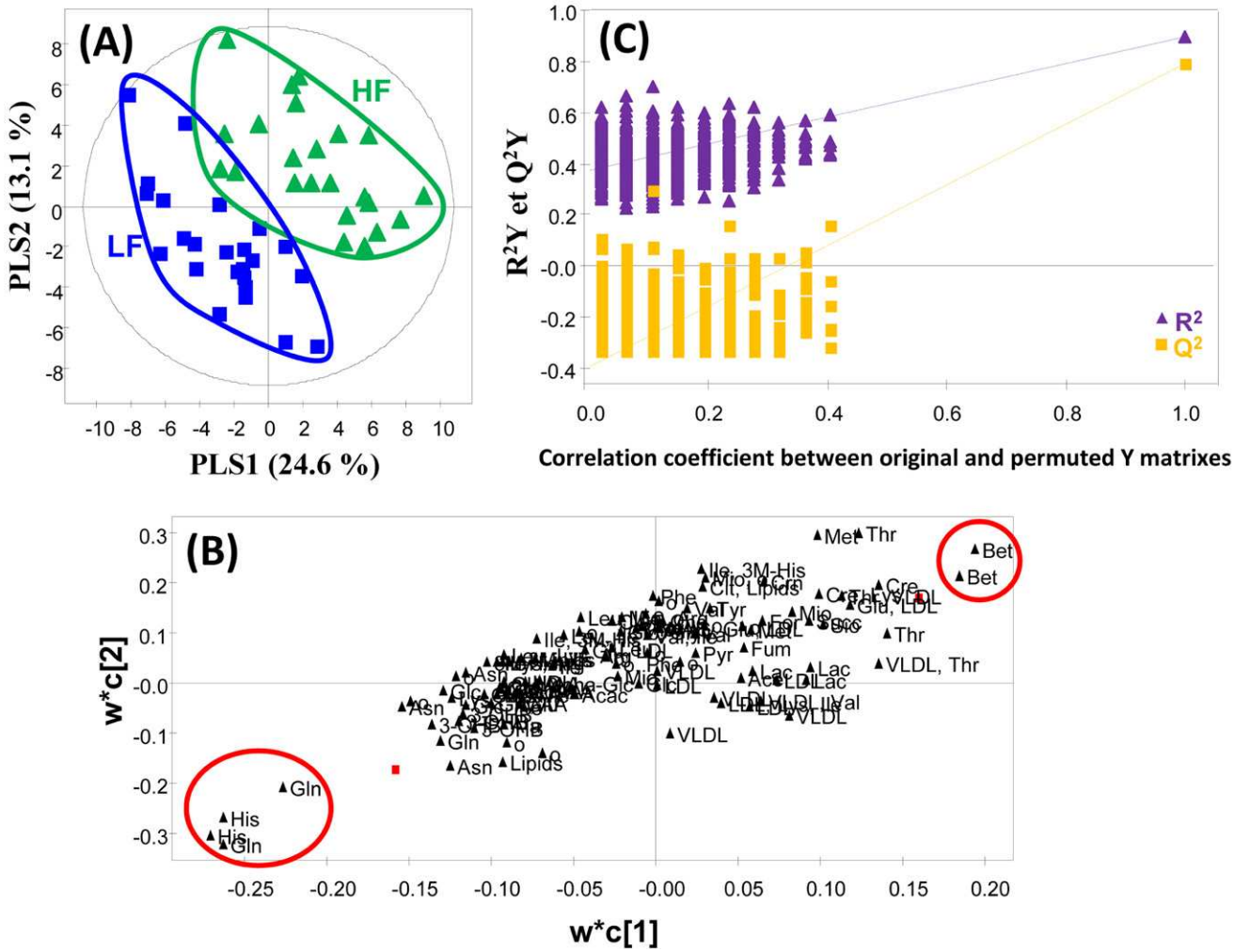


Figure 1. Partial least squares–discriminant analysis (PLS-DA) of the proton nuclear magnetic resonance data of fat (HF) and lean (LF) lines. (A) Score plot (distribution of individuals) of the PLS-DA along the 2 principal partial least squares (PLS) axes. (B) Loading plot (distribution of variables) of PLS-DA. The main discriminating metabolites are surrounded with a red line. (C) Results from the response permutation test (999 permutations). R^2X = proportion of the total variance of the dependent variables that is explained by the model; R^2Y = response variable explained by the model; Q^2 = predictive ability parameter of the model; W x C1 and W x C2 = loading plot of principal components 1 and 2; HDL = high-density lipoproteins; LDL = low-density lipoproteins; VLDL = very-low-density lipoproteins

with adipose tissues. Indeed, Skiba-Cassy et al. (2007) showed that in the fed state, lean chickens exhibited greater hepatic carnitine palmitoyltransferase 1 level and β-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase mRNA expressions in the liver than fat chickens. Resnyk et al. (2013) also found a higher expression of genes implicated in lipolysis in the abdominal fat of lean chickens than in that of fat chickens. The previously described lower T4 plasma level in lean chickens (Baéza and Le Bihan-Duval, 2013) was also observed in the present study at 20 d of age. Plasma T4 level could reflect the hypothalamic control of body composition for these lines (Byerly et al., 2009, 2010). The lower plasma levels of glutamine and histidine for fat chickens suggest that these AA may have been used to produce glucose. Furthermore, glutamine and histidine were highly negatively correlated with adipose tissues. Different studies have reported that fat chickens had lower plasma levels of glucogenic AA and higher levels of branched-chain and sulfur AA (Géraert et al., 1987; Leclercq et al., 1993). However, in our study, the plasma levels of others glucogenic AA (methionine, threonine, and proline) were higher for fat chickens. In this line, the plasma level of lysine was lower, suggesting its use to produce energy, whereas, the plasma level of creatine was higher, suggesting a higher hepatic synthesis of this AA to provide energy for muscles. Moreover, the plasma level of uric acid was higher and positively correlated to adipose tissue, suggesting a higher protein oxidation for fat chickens and explaining their lower muscle development. On the other hand, Alleman et al. (1999) found greater glutamate dehydrogenase activity in the livers of fasted fat chickens than in those of lean chickens. Finally, it seems that the metabolism of methionine was also affected, as lean chickens presented lower plasma me-

Table 6. Significant correlations between the proportion of abdominal fat, fat situated at the top of external face of the thigh (FTET), or pectoralis major muscle relative to body weight and plasma parameters (n = 48)

Plasma parameter	Adipose tissue				Muscle	
	Abdominal fat		FTET		Pectoralis major	
	r	P-value	r	P-value	r	P-value
Uric acid	0.43	<0.01	0.44	<0.01	–0.12	>0.1
Phospholipids	0.26	<0.1	0.38	<0.01	–0.31	<0.05
Triglycerides	0.47	<0.001	0.51	<0.001	–0.47	<0.001
β-hydroxybutyrate	–0.35	<0.05	–0.18	>0.1	0.17	>0.1
T3[1]	–0.38	<0.01	–0.41	<0.01	0.29	<0.05
Homocysteine	–0.47	<0.001	–0.43	<0.01	0.20	>0.1
Betaine	0.45	<0.01	0.36	<0.05	–0.20	>0.1
Glutamine	–0.67	<0.001	–0.45	<0.01	0.27	<0.1
Histidine	–0.71	<0.001	–0.52	<0.05	0.39	<0.01
LDL[2]	0.16	>0.1	0.30	>0.1	–0.26	>0.1

[1]T3 = triiodothyronine.

[2]LDL = low-density lipoproteins.

Table 7. Multiple regression model for adipose and muscle tissues using whole plasmatic parameters data (n = 48)

Parameter	Estimate[1]	P-value[1]	r^2
Abdominal fat			0.74
Intercept	4.4	0.07	
β-hydroxybutyrate	–0.003	<0.001	
Free fatty acids	–0.01	<0.01	
Glutamine	–0.001	<0.001	
Methionine	3,640	<0.001	
Phospholipids	3.0	<0.001	
Total cholesterol	–0.004	<0.001	
FTET[2]			0.37
Intercept	0.28	<0.05	
Triglycerides	0.0004	<0.001	
Homocysteine	–0.009	<0.01	

[1]Estimate and P-value of each parameter in the model established by exhaustive search.

[2]FTET = fat situated on the top of the external face of the thigh.

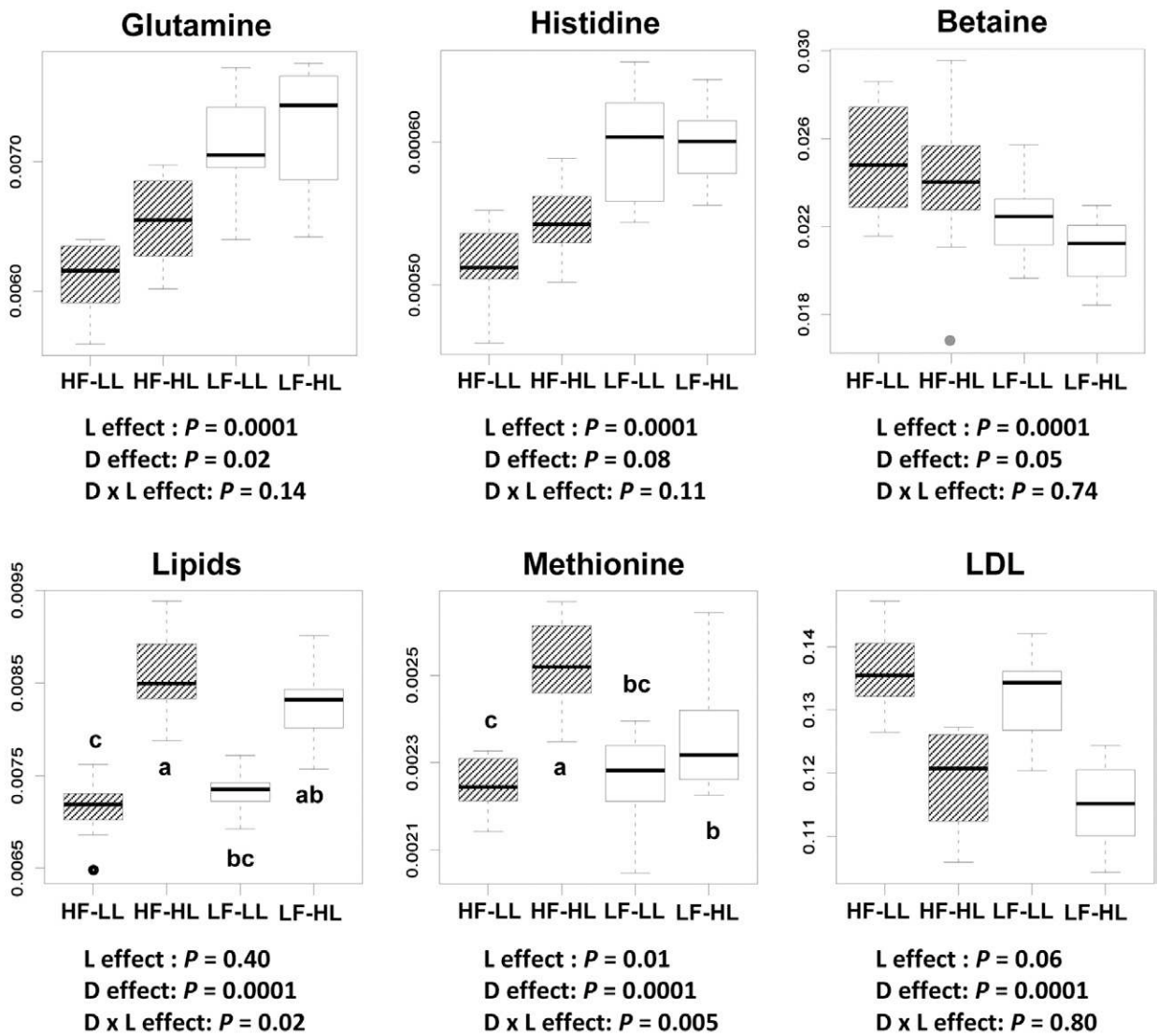


Figure 2. Plasma metabolomics analysis determined at 63 d of age in chickens from fat (HF) and lean (LF) lines and fed with two growing diets exhibiting low (LL) or high (HL) lipid content for 3 h after 12 h of feed withdrawal (n = 12). Boxplots of glutamine, betaine, methionine, histidine, lipids and low-density lipoproteins (LDL). a,c: differences between groups when the interaction between diet and line had a significant effect with $P < 0.05$.

thionine and betaine and higher homocysteine levels than fat chickens. Consequently, high body fatness is clearly related to a greater use of glucose toward lipid synthesis, a low ability for lipid oxidation, and a high ability for protein oxidation and the use of glucogenic AA toward lipid synthesis. Therefore, plasma parameters related to or resulted from these mechanisms will be pertinent indicators of body fatness.

Data on plasma parameters suggested an effect of diet on lipid and protein metabolisms. Even if the diet had no effect on VLDL and HDL plasma levels, the finding of higher plasma total cholesterol and phospholipids levels in chickens fed the LL diet compared with chickens fed the HL diet suggests that the lipid composition of lipoproteins was affected by the dietary energy source as diets were isoenergetic and isoproteic and had no effect on the amount of feed ingested. The LL diet providing lower levels of lipids reduced plasma level of FFA whereas the lipid oxidation seemed to be higher, as the plasma levels of β-hydroxybutyrate and acetoacetate, 2 ketone bodies, were higher. Indeed, Baéza et al. (2014) showed that the activity of oxidative enzymes was higher in the liver of chickens fed the LL diet by comparison with the chickens fed the HL diet. The lower plasma level of LDL induced by the LL diet suggests that peripheral tissues may exhibit a higher ability for circulating lipid uptake. Apart from lipids, discrimination between dietary groups was also clearly related to plasma methionine level. In addition, dietary groups also differed for plasma levels in lysine, phenylalanine, threonine, tyrosine, and glutamine. This indicated an effect of dietary nutrients on AA metabolism. In chickens fed the LL diet, these AA could have been used to produce glucose or ketone bodies. Indeed, lysine can be used to produce acetyl CoA that is implicated as citrate in the production of energy. Plasma levels of these 2 metabolites were also lower for chickens fed the LL diet. Moreover, the plasma level of uric acid was higher, suggesting a higher protein oxidation with the LL diet. Finally, the metabolism of methionine seems to be also affected, as chickens fed the LL diet had lower plasma levels of methionine, choline, and homocysteine and a higher level of betaine. Consequently, the LL diet stimulated lipid synthesis not only from carbohydrates but also from glucogenic AA and lipid oxidation. What is remarkable is that even if the dietary energy source had an effect on the energy and protein metabolisms of birds, within each line chickens exhibited the same body fatness.

The dietary source of energy affected both energy and protein metabolisms. These mechanisms will be further investigated with transcriptomic and targeted approaches (gene expression, signaling pathways, etc.) on different tissues (liver, muscle, and abdominal fat) and blood. Regarding the genetic ability to synthesize and store lipids in the peripheral tissues, lower plasma glucose and β-hydroxybutyrate levels can be considered good indicators. On the other hand, plasma levels of insulin and lipids depending on bird age, nutritional status, and/or postprandial delay should not be retained. The potential use of other plasma parameters such as methionine, betaine, glutamine, histidine, homocysteine, uric acid, and T4 as indicators of body fatness remains to be further investigated.

LITERATURE CITED

Alleman, F., A. Bordas, J.P. Caffin, S. Daval, C. Diot, M. Douaire, J.M. Fraslin, S. Lagarrigue and B. Leclercq. 1999. L'engraissement chez le poulet : aspects métaboliques et génétiques. INRA Prod. Anim. 12:257-264.

Anderssen, E., K. Dyrstad, F. Westad, and H. Martens. 2006. Reducing over-optimism in variable selection by cross-model validation. Chemom. Intell. Lab. Syst. 84:69–74.

Baéza, E., and E. Le Bihan-Duval. 2013. Chicken lines divergent for low or high abdominal fat deposition: A relevant model to study the regulation of energy metabolism. Animal 7(6):965–973.

Baéza E., N. Rideau, P. Chartrin, S. Davail, R. Hoo-Paris, J. Mourot, G. Guy, M.D. Bernadet, H. Juin, K. Méteau and D. Hermier. 2005. Canards de Barbarie, Pékin et leurs hybrides : aptitude à l'engraissement. INRA Prod. Anim. 18 (2):131-141.

Baéza E., P. Chartrin, A. Collin, S. Métayer-Coustard, C. Berri, I. Gabriel, A. Narcy, M. Lessire, M. Jegou, E., Le Bihan-Duval, S. Lagarrigue F. Gondret, and M.J. Duclos. 2014. Performance, carcass traits and meat quality of genetically fat and lean broilers are unaffected by dietary energy source. In proceedings XIVth WPSA European Poultry Conference, Stavanger, Norway, June 23-26, 2014: 4 p.

Bourneuf, E., F. Hérault, C. Chicault, W. Carre, S. Assaf, A. Monnier, S. Mottier, S. Lagarrigue, M. Douaire, J. Mosser, and C. Diot. 2006. Microarray analysis of differential gene expression in the liver of lean and fat chickens. Gene 372:162–170.

Byerly, M. S., J. Simon, L. A. Cogburn, E. Le Bihan-Duval, M. J. Duclos, S. Aggray, and T. E. Porter. 2010. Transcriptional profiling of hypothalamus during development of adiposity in genetically selected fat and lean chickens. Physiol. Genomics 42:157–167.

Byerly, M. S., J. Simon, E. Le Bihan-Duval, M. J. Duclos, L. A. Cogburn, and T. E. Porter. 2009. Effects of BDNF, T3 and corticosterone on expression of the hypothalamic obesity gene network in vivo and in vitro. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 296:R1180–R1189.

Eriksson, L., J. Trygg, and S. Wold. 2008. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS models. J. Chemometr. 22:594–600.

Géraert, P. A., B. Leclercq, and M. Larbier. 1987. Effects of dietary glucogenic amino acid supplementation on growth performance, body composition and plasma free amino acid levels in genetically lean and fat chickens. Reprod. Nut. Dev. 27(6):1041–1051.

Hardie, D. G., F. A. Ross, and S. A. Hawley. 2012. AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 13(4):251–262.

Hermier, D., A. Quignard-Boulange, I. Dugail, G. Guy, M. R. Salichon, L. Brigant, B. Ardouin, and B. Leclercq. 1989. Evidence of enhanced storage capacity in adipose tissue of genetically fat chickens. J. Nutr. 119:1369–1375.

Huber, M., L. P. L. Van de Vijver, H. Parmentier, H. Savelkoul, L. Coulier, S. Wopereis, E. Verheij, J. Van der Greef, D. Nierop, and R. A. P. Hoogenboom. 2010. Effects of organically and conventionally produced feed on biomarkers of health in a chicken model. Br. J. Nutr. 103:663–676.

Lagarrigue, S., F. Pitel, W. Carre, B. Abasht, P. Le Roy, A. Neau, Y. Amigues, M. Sourdioux, J. Simon, L. Cogburn, S. Aggrey, B. Leclercq, A. Vignal, and M. Douaire. 2006. Mapping quantitative trait loci affecting fatness and breast muscle weight in meat-type chicken lines divergently selected on abdominal fatness. Genet. Sel. Evol. 38(1):85–97.

Leclercq, B. 1988. Genetic selection of meat-type chickens for high or low abdominal fat content. In: B. Leclercq and C. C. Whitehead, editors, Leanness in domestic birds: Genetic, metabolic and hormonal aspects. Butterworths & Co, Ltd-INRA, London, UK. p. 25–40.

Leclercq, B., A. M. Chagneau, T. Cochard, S. Hamzaoui, and M. Larbier. 1993. Comparative utilization of sulphur-containing amino-acids by genetically lean or fat chickens. Br. Poult. Sci. 34(2):383–391.

Leclercq, B., J. Simon, and F. H. Ricard. 1987. Effects of selection for high and low blood plasma glucose concentration in chickens. Br. Poult. Sci. 28:557–565.

R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. www.R-project.org. (Accessed 20 May 2004).

Resnyk, C. W., W. Carré, X. Wang, T. E. Porter, J. Simon, E. Le Bihan-Duval, M. J. Duclos, S. E. Aggrey, and L. A. Cogburn. 2013. Transcriptional analysis of abdominal fat in genetically fat and lean chickens reveals adipokines, lipogenic genes and a link between hemostasis and leanness. BMC Genomics 14:557–583.

Saez, G., I. Savary-Auzeloux, E. Baéza, M. D. Bernadet, S. Davail, D. Durand, D. Bauchart, and D. Gruffat. 2012. Fractional apoB-VLDL hepatic synthesis rate in Muscovy and Pekin ducks fed ad libitum. Arch. Geflügelk. 76(1):S20–S25.

Simon, J., P. Freychet, and G. Rosselin. 1974. Chicken insulin: Radioimmunological characterization and enhanced activity in rat fat cells and liver plasma membranes. Endocrinology 95:1439–1449.

Skiba-Cassy, S., A. Collin, P. Chartrin, F. Médale, J. Simon, M. J. Duclos, and S. Tesseraud. 2007. Chicken liver and muscle carnitine palmitoyltransferase 1: Nutritional regulation of messengers. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 147:278–287.

Van der Geyten, S., I. Van der Eynde, I. B. Segers, E. R. Kuhn, and V. M. Darras. 2002. Differential expression of iodothyronine deiodinases in chicken tissues during the last week of embryonic development. Gen. Comp. Endocrinol. 128:65–73.

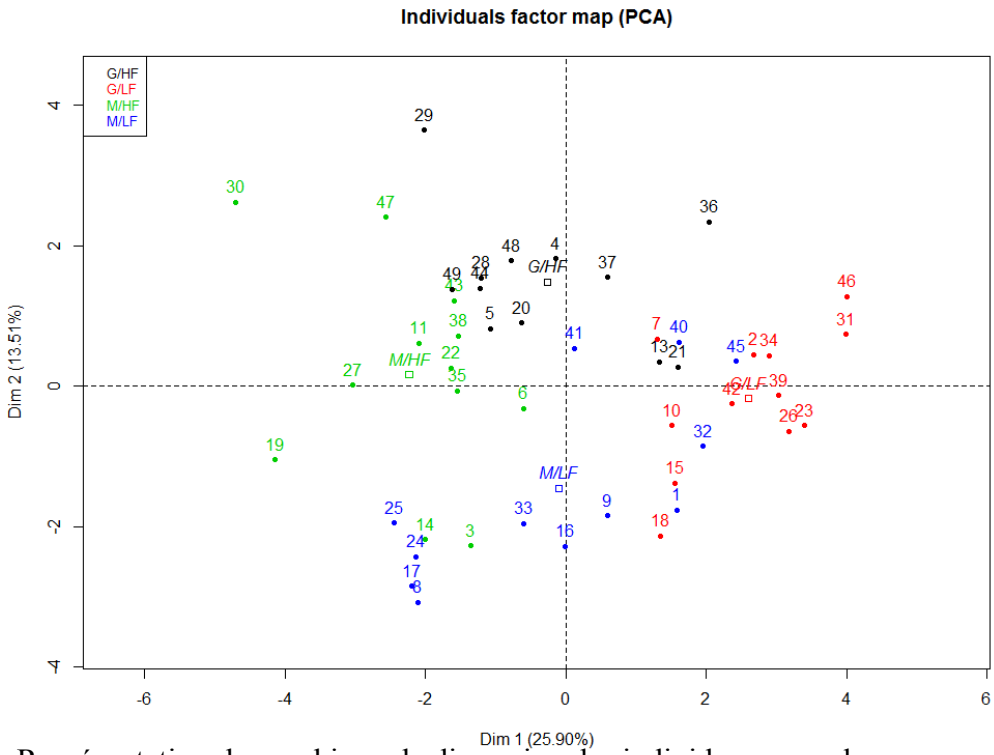


Figure 19. Représentation du graphique de dispersion des individus par analyse en composante principale chez les poulets âgés de 63 jours (n=12/groupes).

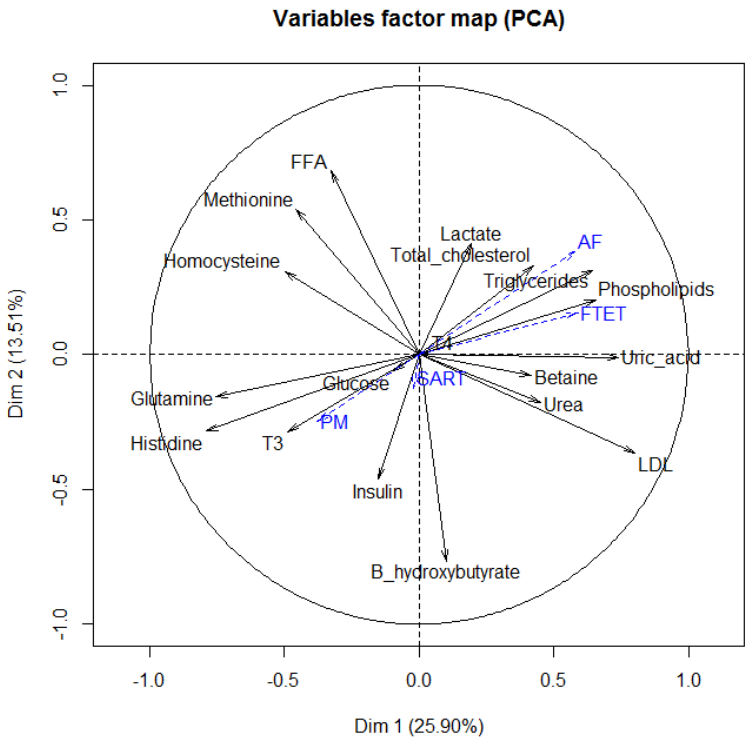


Figure 20. Cercle de corrélation de l'analyse en composante principale des paramètres plasmatiques chez les poulets âgés de 63 jous (n=12/groupes).

2.4 Mesure de corrélations entre les paramètres plasmatiques et la composition corporelle

Une analyse en composante principale a été effectuée afin de déterminer si certains métabolites et/ou hormones permettaient d'expliquer les variables tissulaires mesurées lors de l'abattage. La représentation graphique de la distribution des individus fait l'objet de la **Figure 19** ainsi que le cercle des corrélations correspondant (**Figure 20**). La répartition des individus indique que 25,90% de la variabilité du modèle est expliquée par la lignée (axe 1) et 13,51% de la variabilité est expliqué par le régime alimentaire (axe 2). Les coefficients de corrélation ont été déterminés pour chaque paramètre et sont présentés dans l'article 2.

Chapitre 2 - Exploration du transcriptome sanguin du porc et du poulet en réponse à la lignée et aux régimes alimentaires

La deuxième étape de mon travail a consisté à analyser le transcriptome sanguin des animaux et à rechercher des marqueurs potentiels de leur engraissement en réponse au régime alimentaire ou à leur type génétique. L'analyse du transcriptome sanguin chez le porc a permis la rédaction d'un article intitulé « Whole blood transcriptomics is relevant to identify molecular changes in response to genetic selection for feed efficiency and nutritional status in the pig, PloS One » identifié comme article 3. Les résultats obtenus à l'issu de l'analyse du transcriptome des PBMCs chez le poulet sont présentés dans ce chapitre.

1. Résumé de l'article 3

Les principaux résultats de l'article 3 montrent que la formule sanguine n'est pas influencée par le régime du porc malgré les différences de masse grasse entre les groupes expérimentaux. Les porcs CMJR- ont un nombre d'érythrocytes, une concentration en hémoglobine et une hématocrite plus élevés que les porcs CMJR+. Le nombre de gènes différemment exprimés observé pour l'effet de la lignée est plus important que le nombre de gènes DE pour l'effet du régime. L'analyse fonctionnelle des gènes montre que les gènes surexprimés chez les porcs CMJR- sont majoritairement associés à l'élongation traductionnelle. Les gènes sous-exprimés chez les porcs CMJR- sont majoritairement impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire, les processus anti-apoptotiques et l'organisation cellulaire. Les gènes surexprimés chez les porcs ayant reçu un régime HF (16 gènes) sont impliqués dans le système immunitaire, le métabolisme de la cellule, le métabolisme lipidique, le système érythropoïétique, la synthèse de l'ADN et l'embryogenèse. Les gènes sous-exprimés chez les porcs ayant reçu un régime HF (3 gènes) sont impliqués dans le métabolisme lipidique, la localisation de l'ARN, la phosphorylation des nucléotides. En conclusion, l'étude du transcriptome sanguin peut constituer un outil d'analyse pour étudier les variations phénotypiques de façon dynamique tout au long de la vie de l'animal. L'exploration du transcriptome sanguin chez les animaux de rente pourra permettre l'identification de biomarqueurs qui pourront être pris en compte dans les futurs schémas de sélection. La validation des marqueurs identifiés pendant cette étude doit être réalisée.

Article 3

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

Whole Blood Transcriptomics Is Relevant to Identify Molecular Changes in Response to Genetic Selection for Feed Efficiency and Nutritional Status in the Pig

Maëva Jégou[1,2], Florence Gondret[1,2], Annie Vincent[1,2], Christine Tréfeu[1,2], Hélène Gilbert[3,4,5], Isabelle Louveau[1,2]*

1 INRA, UMR1348 Pegase, Saint-Gilles, France, **2** Agrocampus Ouest, UMR1348 Pegase, Rennes, France, **3** INRA, UMR1388 GenPhySE, Castanet-Tolosan, France, **4** Université de Toulouse, INP, ENSAT, UMR1388 GenPhySE, Castanet-Tolosan, France, **5** Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR1388 GenPhySE, Toulouse, France

* isabelle.louveau@rennes.inra.fr

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Jégou M, Gondret F, Vincent A, Tréfeu C, Gilbert H, Louveau I (2016) Whole Blood Transcriptomics Is Relevant to Identify Molecular Changes in Response to Genetic Selection for Feed Efficiency and Nutritional Status in the Pig. PLoS ONE 11(1): e0146550. doi:10.1371/journal.pone.0146550

Editor: Ramona Natacha PENA i SUBIRÀ, University of Lleida, SPAIN

Received: September 18, 2015

Accepted: December 19, 2015

Published: January 11, 2016

Copyright: © 2016 Jégou et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All microarray data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Subserie accession number GSE70838 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE70838).

Funding: Maëva Jégou is supported by a PhD grant from INRA and Région Bretagne (France). This study was funded by the French National Research Agency (Agence Nationale de la Recherche ANR, ANR-11-BSV7-0004 FatInteger).

Abstract

The molecular mechanisms underlying feed efficiency need to be better understood to improve animal efficiency, a research priority to support a competitive and sustainable livestock production. This study was undertaken to determine whether pig blood transcriptome was affected by differences in feed efficiency and by ingested nutrients. Growing pigs from two lines divergently selected for residual feed intake (RFI) and fed isoproteic and isocaloric diets contrasted in energy source and nutrients were considered. Between 74 and 132 days of age, pigs (n = 12 by diet and by line) received a regular diet rich in cereals and low in fat (LF) or a diet where cereals where partially substituted by lipids and fibers (HF). At the end of the feeding trial, the total number of white blood cells was not affected by the line or by the diet, whereas the red blood cell number was higher ($P<0.001$) in low RFI than in high RFI pigs. Analysis of the whole blood transcriptome using a porcine microarray reveals a higher number of probes differentially expressed (DE) between RFI lines than between diets (2,154 versus 92 probes DE, $P<0.01$). This corresponds to 528 overexpressed genes and 477 underexpressed genes in low RFI pigs compared with high RFI pigs, respectively. Overexpressed genes were predominantly associated with translational elongation. Underexpressed genes were mainly involved in the immune response, regulation of inflammatory response, anti-apoptosis process, and cell organization. These findings suggest that selection for RFI has affected the immune status and defense mechanisms of pigs. Genes DE between diets were mainly related to the immune system and lipid metabolism. Altogether, this study demonstrates the usefulness of the blood transcriptome to identify the main biological processes affected by genetic selection and feeding strategies.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Production of efficient animals is an important issue for the livestock industry [1, 2] because this implies the reduction of the amount of feed resources needed to produce meat and contributes to reduce environmental wastes and emissions. Feed efficiency can be improved by breeding and feeding strategies. In recent years, residual feed intake (RFI) defined as the difference between the observed feed intake and the feed intake predicted from growth and maintenance requirements, has been studied as a measure of net feed efficiency in selection experiments [3]. Global performance differs between pigs selected for RFI, involving metabolism differences [4, 5] linked with gene expression variations in muscle [6]. The use of alternative feed resources (generally rich in fibers) that do not compete with food for humans is a challenge for the present and the future feeding strategies. However, interactions between RFI genotypes and these resources can affect body composition [7, 8]. An integrated approach combining genetics and nutrition is then necessary to get a better understanding of the complex biology underlying RFI and associated responses [9].

Peripheral blood is an accessible source of information. Indeed, the collection of blood samples is relatively easy compared to other tissues and does not alter the animal physiological status (anesthesia is unnecessary). It may further allow the investigation of kinetics of changes in different blood parameters. Advances in high-throughput technologies such as transcriptomics offer opportunities to answer complex biological questions. To date, genes expressed in peripheral blood cells have been shown to reflect physiological and pathological events occurring in different tissues [10, 11]. It has also been proposed that gene expression profiles from the whole blood or from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) can highlight biological processes related to the regulation of body composition in human [12] and rodent [13]. Therefore, the transcriptome analysis of whole blood is a relevant approach to better understand the molecular mechanisms underlying differences in RFI, to determine the possible relationships between blood traits and production traits, and more generally to identify easily accessible targets to monitor physiological changes in response to factors such as nutrition. The current study was undertaken to determine whether diets with contrasted nutrients and genetic selection for RFI affect the whole blood transcriptome profiles of growing pigs.

Materials and Methods

Ethics statement

The care and use of pigs were performed in compliance with the European Union legislation (directive 2010/63/EU). The current protocol was approved by the local Ethics Committee in Animal Experiment of Rennes, France (Comité Rennais d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale, CREEA, http://ethique.ipbs.fr/creeapresent.html; agreement N°07–2012). All animals were reared and killed in compliance with national regulations and according to procedures approved by the French veterinary Services at INRA Pegase facilities.

Animals, diets and slaughtering

The pig lines and feeding trials used in the current study have been previously described in details [14]. Briefly, a total of 48 purebred French Large White castrated male pigs in the course of a divergent selection experiment for RFI (8th generation of selection; n = 24 per line) were recruited. From 74 ± 3 days of age and an average body weight (BW) of 22.6 ± 0.5 kg, pigs were housed in full slatted-floor isolated pens. Within each line, they were randomly assigned to one of the two dietary groups (n = 12 per diet), and fed ad libitum either a low-fat, low-fiber (LF) diet or a high-fat, high-fiber (HF) diet. The two diets were mainly based on cereals (wheat and

barley) and soybean meal. The HF diet was formulated by the partial replacing of cereals in the LF diet by wheat straw (11.5%) and a mixture of rapeseed and soya oils (7.5%). Each diet provided the same crude protein and metabolizable energy contents (Table 1). Growing and finishing formula were successively distributed to pigs during their growth (transition around 112 days of age). All pigs were killed at the same age (132.0 ± 0.5 days of age; average BW of 75.6 ± 1.1 kg). The killing procedure included electronarcosis and jugular exsanguination, and was performed 2 h after the first morning meal to obtain animals in a post-prandial state, in the INRA experimental slaughterhouse (Saint-Gilles, France).

Final blood samples were taken at exsanguination at the end of the feeding trial (132 days of age). Blood was collected into EDTA Venosafe tubes (Laboratoires Terumo, Guyancourt, France). For samples dedicated to RNA extraction, one volume of blood sample was mixed with one volume of lysis buffer from the Nucleospin 8 RNA blood kit (Macherey-Nagel, Lyon, France). The obtained mixture was then stored at -70°C for later analyses.

Blood cell count

Whole blood cells can be separated into three categories. The first category refers to white blood cells (WBC), represented mainly by lymphocytes, monocytes and granulocytes. The two other categories refer to red blood cells (RBC) and platelet cells. Blood cell counts from those three categories were measured on whole blood samples taken at the end of the feeding trial using a hematology automatic cell counter calibrated for pigs (MS9-3, MELET SCHLOESING Laboratoires, Osny, France).

RNA extraction

Total RNA were extracted from whole blood samples at both ages using a commercial kit (Nucleospin blood kit, Macherey Nagel, Hoerdt, France) according to the manufacturer's instructions. Then, residual genomic DNA was removed from RNA samples by a DNase treatment (DNA-free kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in the presence of a RNase inhibitor (Thermo Scientific, Illkirch, France). Extracted RNA samples were quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Illkirch, France). The integrity of isolated RNA was assessed using the Agilent RNA 6000 Nano kit with an Agilent 2100

Table 1. Composition of low-fat, low-fiber (LF) or high-fat, high-fiber (HF) diets given to pigs during the growing and finishing periods.

Composition[a]	Growing formula[b]		Finishing formula[b]	
	LF	HF	LF	HF
Fat	2.1	7.0	2.2	7.4
Starch	42.6	30.8	48.5	36.2
Crude protein	17.4	17.3	13.4	13.1
Neutral detergent fibers	12.8	17.7	11.5	18.3
Acid detergent fibers	3.8	8.5	3.5	7.9
Metabolizable energy	12.9	12.9	12.9	12.9

[a]Details on diet composition can be found in Gondret et al. [14]. Nutrient content is expressed in g per 100 g of feed (as fed basis). Metabolizable energy content is expressed in MJ per kg of feed.

[b]A growing formula was distributed to pigs during 6 weeks from 76 days of age, while the finishing formula was provided thereafter and until slaughter.

Initial blood samples were collected from the jugular vein at 74 days of age on living pigs.

doi:10.1371/journal.pone.0146550.t001

Bioanalyzer (Agilent Technologies France, Massy, France). All samples met quality criteria. Ratios of A260/280 and A260/230 were greater than 1.8. Average RNA integrity number was of 9.2 with values ranging from 7.9 to 9.7.

RNA labeling and microarray hybridization

Transcriptomics analyses were performed using a custom porcine microarray (8x60K, GPL16524, Agilent Technologies France, Massy, France) containing 60,306 porcine probes and derived at 71% from the porcine commercial Agilent-026440 microarray (V2, 44K, GPL15007), the remaining 29% correspond to a set of probes enriched with immune system, muscle and adipose tissue genes. Total RNA (100 ng) extracted from each whole blood samples taken at the end of the feeding trial was labelled individually with Cy3, using the One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis kit (Agilent Technologies) and following the manufacturer's instructions. Briefly, fluorescent complementary RNA (cRNA) was generated by a two-step procedure using T7 RNA polymerase, which simultaneously amplified target and incorporated cyanine-labeled CTP. Samples were then purified with an RNeasy mini elute kit (Qiagen, Hilden, Germany). The hybridization reactions were performed for 17 h in Agilent's SureHyb hybridization chambers containing 600 ng of Cy3-labeled cRNA per hybridization using Agilent's Gene Expression Hybridization kit. Slides were disassembled, washed according to manufacturer's instructions, and scanned at 3 μm/pixel resolution using the Agilent DNA Microarray Scanner G2505C, and images were analyzed with Agilent Feature Extraction Software (version 10.7.3.1) using the GE1_107_Sep09 extraction protocol. All microarray data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus [15] and are accessible through GEO Subserie accession number GSE70838 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE70838).

Microarray data analysis

All analyses were performed using the R software version 3.0.2 [16]. Raw spot intensities were first submitted to quality filtration based on four criteria: background intensity value, diameter, saturation and uniformity of the spot. Positives and negative controls probes were those available in the Agilent-026440 microarray. Intensities of filtered spots were $\log_2$ transformed and median-centered. Altogether, 37,113 spots were finally retained for statistical analyses. Data were submitted to an analysis of variance considering the fixed effects of line, diet and their interaction. Data were then submitted to Benjamini and Hochberg (BH) multiple testing correction procedure. For the diet effect, no genes were found to be differentially expressed (DE) after application of the BH correction. Therefore, DE probes with a fold change (FC) cutoff higher than |1.1| between compared groups, and an uncorrected P-value below 0.01 after statistical analysis [17] were then selected for further functional analysis.

The lists of DE probes were investigated by an enrichment analysis of specific Gene Ontology (GO) terms for Biological Processes (BP), using the functional annotation clustering of Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) bioinformatics resources (http://david.abcc.ncifcrf.gov) [18, 19]. Due to the low number of genes found to be DE between the two dietary treatments, the functional annotation clustering was performed only for genes DE between RFI lines. The list of DE genes in low RFI *versus* high RFI pigs was divided into two lists according to their over- or under-expression. The two lists were then uploaded using the corresponding official gene symbol, when applicable, and obtained with DAVID Gene Accession Conversion Tool. The GO terms_FAT were selected, to filter the broadest terms without overshadowing the more specific ones. The P-values for enrichment were computed by a modified Fisher's exact test, using the *Homo sapiens* repository as

background. The main GOBP term was examined with an enrichment score >1.3 and P≤ 0.1 after Benjamini Hochberg correction. For DE genes exhibiting the greatest overexpression or underexpression between RFI lines (FC > |2|) and for DE genes involved in the response to diets, a manual editing of GOBP terms was also performed using the QuickGo web-based tool [20].

Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Expression of genes was further evaluated by qPCR. Final blood samples were used to validate transcriptomic results. Initial blood was used to investigate early expression of these genes. Complementary DNA was synthesized from 1 μg of total RNA, using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primers (S1 Table) were designed from porcine sequences using Primer Express software 3.0 (Applied Biosystems). For each primer pair, the amplification efficiency of qPCR reaction was identified using calibration curves generated with seven decreasing concentrations of cDNA from pooled RNA blood samples (obtained from 5.18 to 1^{E-3} ng RNA). Amplification reactions were performed in duplicate in 12.5 μL with 1 ng of reverse-transcribed RNA and both forward and reverse primers (5 μM each) in 1X PCR buffer (Fast SYBR® Green Master Mix, Applied Biosystems). A StepOnePlus Real Time PCR system (Applied Biosystems) was used. Thermal cycling conditions were as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 20 s, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 3 s, and annealing at 60°C for 30 s. Specificity of the amplification products was checked by dissociation curves analysis. This allows verifying that a single PCR product was produced. DNA topoisomerase 2-beta (*TOP2B*) and TATA-box-binding protein 1 (*TBP1*) genes were used as reference genes to calculate a normalization factor (NF) using geNorm algorithm [21]. For each gene, the normalized expression level N was calculated according to the formula developed by Pfaffl [22]:

$$N = E^{-\Delta Cq(sample-calibrator)}/NF$$

where E is calculated from the slope of calibration curve and Cq is the quantification cycle and calibrator is a pool of all blood samples. E was between 1.82 and 2.10 for all studied genes.

Statistical analyses for blood cell counts

Analysis of variance was used to determine the effects of line, diet and their interaction with the R software (version 3.0.2). A P<0.05 was retained for statistical significance, and a P<0.1 were considered as a tendency.

Results

Performance and blood cell count traits

Phenotypic performances have been described in detail in our previous study [14] and are briefly summarized here. Irrespective of diet, the gain-to-feed ratio was higher in low RFI pigs than in high RFI pigs; the sum of the main fatty pieces in the carcass (backfat and belly) was lower while the sum of lean pieces was higher in low RFI pigs compared with high RFI pigs. Irrespective of line, no significant difference was elicited in gain-to-feed ratio between pigs fed the HF or LF diet. Pigs fed the HF diet had a reduced BW at slaughter and their carcass fat content was lower (around 26%) than in pigs fed the LF diet. At slaughter, the total number of white blood cells was similar (P>0.1) in the different groups of pigs (Table 2). The numbers of monocytes and neutrophil granulocytes (neutrophils) did not differ between groups. The number of lymphocytes was similar in low and high RFI pigs but tended (P<0.1) to be higher in

Table 2. Blood cell count in pigs with low or high residual feed intake (RFI) fed a low-fat, low-fiber (LF) or high-fat, high-fiber (HF) diet.

	Low RFI		High RFI		Effects	
Traits	**LF**	**HF**	**LF**	**HF**	**Line**	**Diet**
WBC[a] (x1000.mm^{-3})						
Total WBC[a]	23.8 ± 1.2	24.9 ± 1.2	23.6 ± 0.7	25.7±1.0	NS	NS
Neutrophils	11.1 ± 0.8	10.6 ± 0.8	10.6 ± 0.4	12.0±0.8	NS	NS
Lymphocytes	12.1±0.6	13.7 ± 0.7	12.3 ± 0.5	13.1±0.6	NS	<0.1
Monocytes	0.56 ± 0.03	0.60 ± 0.04	0.63 ± 0.05	0.61±0.03	NS	NS
RBC[b] (x10^{6}.mm^{-3}) and associated parameters						
Total RBC[b]	8.14 ± 0.16	7.96 ± 0.19	7.24 ± 0.14	7.38±0.16	<0.001	NS
Hemoglobin, g/dL	12.8 ± 0.3	12.0 ± 0.3	11.4 ± 0.3	11.4±0.2	<0.001	NS
Hematocrit, %	47.1 ± 1.0	44.5 ± 1.1	42.8 ± 0.7	42.4±0.5	<0.001	<0.1

[a]WBC: white blood cell count.

[b]RBC: red blood cell count.

Values are means ± SEM (n = 12 pigs per diet and per line). P-value obtained from analysis of variance for the effects of line and diet. There was no significant line × diet interaction (P > 0.1). NS, not significant (P > 0.1).

doi:10.1371/journal.pone.0146550.t002

pigs fed the HF diet than in pigs fed the LF diet. The number of red blood cells and associated parameters (hemoglobin and hematocrit) were markedly higher (P<0.001) in low RFI pigs than in high RFI pigs. These traits did not differ between diets, except a tendency for low RFI pigs fed the HF diet having a lower hematocrit than low RFI pigs fed the LF diet.

RFI and diet effects on whole blood transcriptome

In whole blood taken at the end of the feeding trial, 2,075 probes corresponding to 1,005 genes were declared as DE ($P < 0.01$) between RFI lines and 82 probes corresponding to 45 genes were DE between pigs fed the HF and LF diets (Table 3). An interaction between line and diet ($P < 0.01$) was observed for 106 probes corresponding to 74 annotated genes. The detailed list of these corresponding genes can be found in supplementary file S2 Table.

RFI effects on whole blood transcriptome. Among the 2,075 DE probes ($P < 0.01$; adjusted P value ≤ 0.1 for 88% of the probes and ≤ 0.17 for the other probes) in response to RFI selection, 982 probes corresponding to 528 annotated unique genes were overexpressed whereas 1093 probes corresponding to 477 annotated genes were underexpressed in low RFI pigs compared with high RFI pigs. A large proportion of genes (83 to 90%) exhibited fold

Table 3. Number of genes differentially expressed in blood of pigs divergently selected for low or high residual feed intake (RFI) fed a low-fat, low-fiber (LF) or high-fat, high-fiber (HF) diet.

	Low RFI / High RFI[a]		HF / LF[b]	
DE genes[c]	**Overexpressed**	**Underexpressed**	**Overexpressed**	**Underexpressed**
Total number	528	477	39	6
FC[d] $\geq$ 1.5	44	65	8	-
FC[d] $\geq$ 2	10	17	2	-

[a]Low RFI versus high RFI ratio, overexpressed and underexpressed in low RFI compared with high RFI pigs.

[b]HF versus LF ratio, overexpressed and underexpressed in pigs fed the HF diet compared with pigs fed the LF diet.

[c]DE: Differentially expressed; P < 0.01.

[d]FC: Fold change ratio.

doi:10.1371/journal.pone.0146550.t003

changes in expression below |1.5| between the two lines (Table 3). Functional analysis revealed an overrepresentation of genes related to translational elongation among the overexpressed genes in the low RFI pigs compared with high RFI pigs (Table 4). Conversely, genes that were underexpressed in low RFI pigs compared with high RFI pigs shared GO terms associated to 8 different pathways: defense response, leukocyte activation, regulation of inflammatory response, negative regulation of molecular function, antigen processing and presentation, anti-apoptosis, positive regulation of immune system process and regulation of cell adhesion (Table 4).

Differentially expressed genes exhibiting the greatest overexpression or underexpression (FC > |2|) in low RFI pigs compared with high RFI lines (Table 5) were also considered to extend this global functional analysis. Among these eight genes having the greatest overexpression in the low *versus* high RFI lines, the majority had a documented role in the immune system (*IFITM1*, *SLPI*, *IL6ST*, and *TRAF6*); the other were mainly related to DNA organization (*NPM2*), translation (*EIF1B*), cellular homeostasis (*SLCO2B1*) and peptidase regulation (*WFDC2*). With respect to genes exhibiting the greatest underexpression in low RFI pigs

Table 4. Relevant GO biological processes in blood as affected by selection for RFI.

GO term[a]		Genes[b]
Overexpressed genes in low RFI line compared with high RFI line		
GO:0006414	Translational elongation	*RPSA*, *EEF1A1*, *RPL14*, *RPL15*, *RPL35*, *RPL23A*, *SELT*, *RPS3*, *RPS25*, *RPS18*, *RPL6*, *RPS13*, *RPL10*, *RPL10A*, *RPS21*, *UBA52*, *RPS23*
Underexpressed genes in low RFI line compared with high RFI line		
GO:0006952	Defense response	*KYNU*, *NMI*, *FGR*, *LY86*, *CCR1*, *CLU*, *TLR1*, *TLR2*, *CXCR2*, *PRDX1*, *IL10*, *IL10RB*, *BCL2*, *TAP1*, *CSF3R*, *NFATC4*, *CD24*, *THBS1*, *BLNK*, *F12*, *TLR10*, *PTGER3*, *LY96*, *BECN1*, *HCK*, *IL1RN*, *HLA-C*, *C4BPB*, *HLA-B*, *CD40*, *C4BPA*, *STAT3*, *CD84*, *CD83*, *CD55*, *CD19*, *HIST2H2BE*, *CLEC7A*, *CLEC5A*, *CD14*
GO:0045321	Leukocyte activation	*ZBTB32*, *BST2*, *TLR1*, *TLR2*, *CXCR2*, *CD40*, *TPD52*, *SKAP2*, *IL10*, *CBLB*, *PKNOX1*, *PSEN1*, *ULBP1*, *BCL2*, *BCL11A*, *MS4A1*, *ADAM17*, *BCL6*, *CLEC7A*, *CD24*, *SYK*, *BLNK*, *ADAM9*
GO:0050727	Regulation of inflammatory response	*F12*, *ADRB2*, *PTGS2*, *SERPINF1*, *TGM2*, *CMA1*, *BCL6*, *JAK2*, *CD24*, *IL10*
GO:0044092	Negative regulation of molecular function	*NF1*, *PKIG*, *NPR3*, *PKIA*, *PROX1*, *PDCD4*, *PSMB8*, *PSMB9*, *SH3BP5*, *SPRY2*, *ADRB2*, *PSEN1*, *PSME2*, *CDKN2D*, *RGS4*, *PSMA3*, *UBC*, *SORT1*, *JAK2*, *UBE2D1*, *BUB3*, *DHCR24*
GO:0019882	Antigen processing and presentation	*HLA-H*, *ULBP1*, *HLA-DRB3*, *HLA-A*, *ERAP1*, *HLA-C*, *CD1A*, *HLA-B*, *HLA-DOB*, *PSMB8*, *PSMB9*
GO:0006916	Anti-apoptosis	*BECN1*, *SPHK1*, *CLU*, *BIRC3*, *ANXA4*, *IL10*, *TNFSF13B*, *PSEN1*, *BCL2*, *CDKN2D*, *TGM2*, *UBC*, *ADAM17*, *THBS1*, *DHCR24*
GO:0002684	Positive regulation of immune system process	*CLU*, *TLR2*, *C4BPB*, *CD40*, *C4BPA*, *CD83*, *CBLB*, *CD55*, *CD19*, *TNFSF13B*, *PSEN1*, *ADAM17*, *BCL6*, *CD24*, *CLEC7A*, *THBS1*, *SYK*
GO:0030155	Regulation of cell adhesion	*VAV3*, *GSN*, *BCL2*, *NF1*, *CCDC80*, *TGM2*, *BCL6*, *JAK2*, *CD24*, *THBS1*, *TPM1*, *ADAM9*

[a]Gene ontology (GO) identification number and term of the biological process. Benjamini-Hochberg adjusted P-value varied from 0.1 and 8.10^{-05}.

[b]Unique genes included in each pathway.

doi:10.1371/journal.pone.0146550.t004

Table 5. Top-ranked genes with fold changes in expression greater than |2| identified in the whole blood of pigs divergently selected for low or high residual feed intake (RFI).

Gene symbol	Main biological process[a]	FC[b]	P-value[c]
Overexpressed genes in low RFI line compared with high RFI line			
IFITM1	GO:0009607 response to biotic stimulus	4.34	$2.6.10^{-04}$
NPM2	GO:0006338 chromatin remodeling	3.11	$3.5.10^{-04}$
EIF1B	GO:0006412 translation	2.51	$4.8.10^{-13}$
SLPI	GO:0045071 negative regulation of viral genome replication	2.33	$6.1.10^{-05}$
IL6ST	GO:0019221 cytokine-mediated signaling pathway	2.20	$1.3.10^{-03}$
WFDC2	GO:0010466 negative regulation of peptidase activity	2.16	$4.5.10^{-08}$
TRAF6	GO:0002726 positive regulation of T cell cytokine production	2.08	$1.4.10^{-06}$
SLCO2B1	GO:0006811 ion transport	2.04	$6.9.10^{-06}$
Underexpressed genes in low RFI line compared with high RFI line			
GPX3	GO:0006979 response to oxidative stress	-6.07	$1.3.10^{-06}$
HMG20A	GO:0006338 chromatin remodeling	-4.69	$1.2.10^{-08}$
CAPNS1	GO:0006508 proteolysis	-4.09	$3.1.10^{-07}$
OAZ3	GO:0043086 negative regulation of catalytic activity	-4.00	$1.1.10^{-06}$
NMI	GO:0045824 negative regulation of innate immune response	-3.49	$1.6.10^{-07}$
SERPINF1	GO:0016525 negative regulation of angiogenesis	-3.28	$3.8.10^{-08}$
HTRA1	GO:0030512 negative regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	-2.68	$1.1.10^{-09}$
NPR3	GO:0008217 regulation of blood pressure	-2.17	$1.4.10^{-07}$
CHIT1	GO:0006030 chitin metabolic process	-2.12	$4.6.10^{-07}$
SLA-DOA	GO:0019882 antigen processing and presentation	-2.12	$1.9.10^{-11}$

[a]The gene ontology (GO) term for biological process was manually obtained from the QuickGO web-based tool for each gene name.

[b]Fold change value is expressed as the expression ratio of low RFI pigs *versus* high RFI pigs. Ratio was inversed and preceded by a minus sign for value less than 1 (i.e., a ratio of 0.5 is expressed as -2).

[c]P-value obtained from analysis of variance for the effect of line. The highest P-value is reported when several probes are differentially expressed for a unique gene. Adjusted P-value varied from 0.05 and 1.10^{-09}.

doi:10.1371/journal.pone.0146550.t005

compared with high RFI pigs, their roles were also associated with immune system (*NMI*, *CHIT1*, *SLA-DOA*), oxidative process (*GPX3*, *CAPNS1*, *OAZ3*), DNA organization (*HMG20A*), angiogenesis and the control of blood volume (*SERPINF1*, *HTRA1*, *NPR3*).

Diet effects on whole blood transcriptome. The number of DE probes in response to diets was markedly lower than that observed in response to genetic selection (Table 3). Among the 82 DE probes between diets, 62 probes corresponding to 39 annotated genes were overexpressed, whereas 20 probes corresponding to 6 annotated genes were underexpressed in pigs fed the HF diet compared with pigs fed the LF diet. The majority of these genes (78%) had fold change in expression between the two diets below |1.5| (Table 3). As indicated in Table 6, among the 16 genes overexpressed in pigs fed the HF diet compared with pigs fed the LF diet, six genes were related to the immune system (*PR39*, *PMAP-23*, *CD5L*, *TCN1*, *PGLYRP1* and *HP*), three genes were involved in cellular metabolism such as collagen fiber assembly or cytoskeletal arrangement (*BGN*, *PLEK2*, *RASL11B*), two genes were involved in lipid storage (*CPT1A*, *LCN2*), two genes had a role in erythropoietic system (*EPOR*, *KLF1*), two genes had a role in DNA synthesis (*NOCL4*; *REXO2*) and one gene was involved in embryogenesis (*SHISA2*). Conversely, three genes were underexpressed in pigs fed the HF diet and were involved in lipid metabolism (*PSAP*), RNA localization (*RAE1*), and nucleotides phosphorylation (*NTPCR*).

Table 6. Differentially expressed genes in pigs fed diets with contrasted energy source and nutrients.

Gene symbol	Main biological process[a]	FC[b]	P-value[c]
Overexpressed genes in HF pigs compared with LF pigs			
PR39	GO:0042742 defense response to bacterium	3.06	$6.0.10^{-03}$
PMAP-23	GO:0042742 defense response to bacterium	2.84	$7.3.10^{-03}$
CD5L	GO:0006898 receptor-mediated endocytosis	1.72	$3.3.10^{-03}$
LCN2	GO:0006810 transport	1.61	$8.4.10^{-03}$
TCN1	GO:0015889 cobalamin transport	1.60	$9.2.10^{-03}$
BGN	GO:0019800 peptide cross-linking via chondroitin 4-sulfate glycosaminoglycan	1.53	$9.0.10^{-03}$
PGLYRP1	GO:0050728 negative regulation of inflammatory response	1.51	$8.1.10^{-03}$
EPOR	GO:0038162 erythropoietin-mediated signaling pathway	1.46	$5.5.10^{-03}$
HP	GO:0006508 proteolysis	1.46	$9.7.10^{-03}$
PLEK2	GO:0035556 intracellular signal transduction	1.33	$6.6.10^{-03}$
RASL11B	GO:0007264 small GTPase mediated signal transduction	1.29	$1.1.10^{-04}$
SHISA2	GO:0007275 multicellular organismal development	1.28	$8.3.10^{-04}$
NOC4L	GO:0042254 ribosome biogenesis	1.27	$1.0.10^{-03}$
KLF1	GO:0030218 erythrocyte differentiation	1.25	$6.4.10^{-03}$
CPT1A	GO:0032000 positive regulation of fatty acid β-oxidation	1.24	$1.8.10^{-03}$
REXO2	GO:0090305 nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis	1.21	$9.4.10^{-03}$
Underexpressed genes in HF pigs compared with LF pigs			
NTPCR	GO:0016311 dephosphorylation	-1.29	$4.9.10^{-03}$
RAE1	GO:0071407 cellular response to organic cyclic compound	-1.24	$5.2.10^{-03}$
PSAP	GO:0006629 lipid metabolic process	-1.20	$7.3.10^{-03}$

[a]The gene ontology (GO) term for biological process (BP) was manually obtained from the QuickGO web-based tool for each gene name.

[b]Fold change (FC) value is expressed as the expression ratio of pigs fed the HF (high fiber, high fat) diet versus pigs fed the LF (low fat low fiber) diet. FC is inversed and preceded by a minus sign for value less than 1 (i.e. a ratio of 0.5 is expressed as -2).

[c]P-value obtained from analysis of variance for the effect of diet. The highest P-value is reported when several probes are differentially expressed for a unique gene.

doi:10.1371/journal.pone.0146550.t006

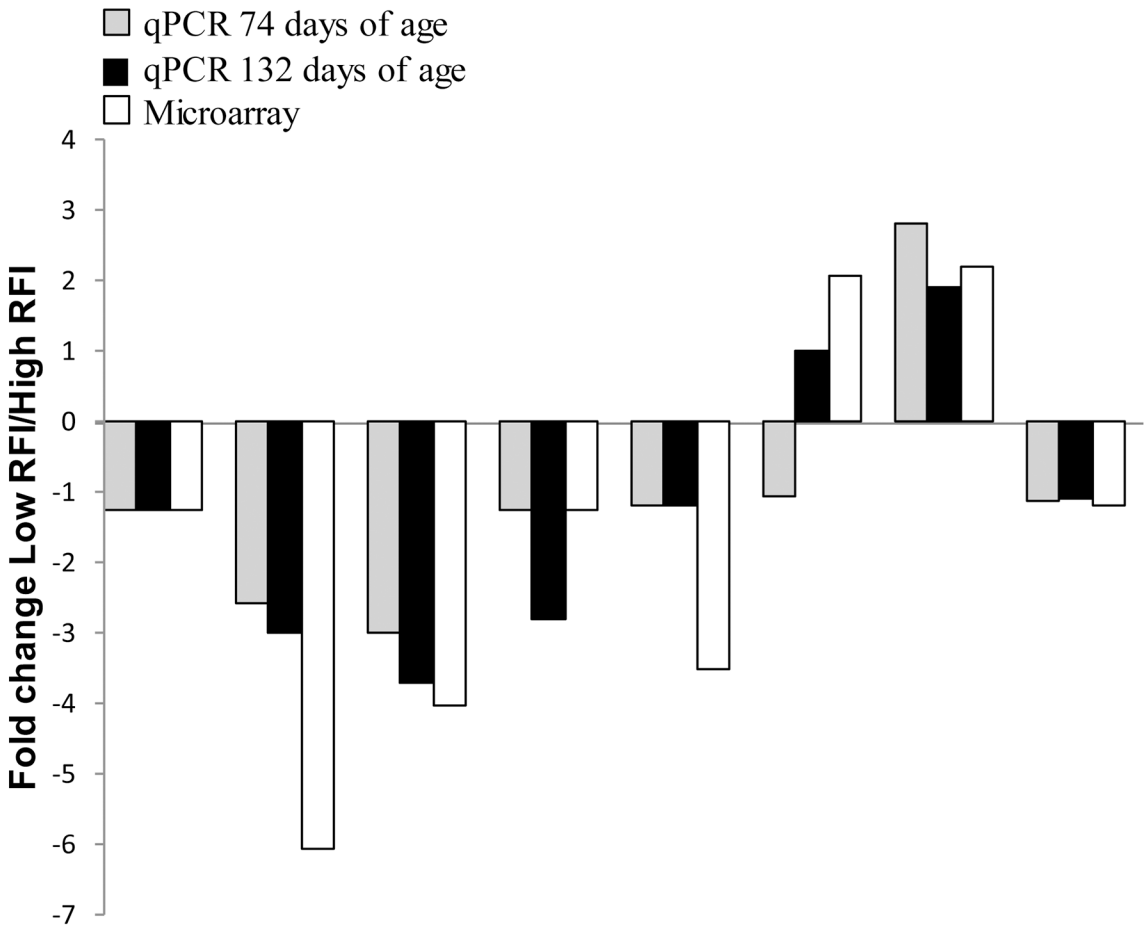
Data validation by qPCR analysis

The expression of eight genes identified as DE between RFI lines by transcriptome analysis was checked by qPCR (Fig 1). With the exception of *TRAF6* ($P = 0.16$), the range of difference ($P < 0.05$) in the expression of *CD40*, *GPX3*, *OAZ3*, *DGAT2*, *NMI*, *PSEN1* and *SLPI* genes was consistent with microarray analyses. Expressions of those eight genes were also determined in 74-day-old pigs (Fig 1). The differences in expression levels between RFI lines observed at 132 days of age were detected at the onset of the growing period for *CD40*, *GPX3*, *OAZ3*, *DGAT2* and *SLPI* genes ($P < 0.05$). For three other genes (*NMI*, *TRAF6*, *PSEN1*), there was no difference ($P > 0.1$) between low RFI and high RFI pigs at this early stage of growth.

Finally, the expression levels of three genes (*LCN2*, *CPT1A*, *PSAP*) identified as DE between pigs fed the two diets by transcriptome analysis were also determined by qPCR at 132 days of age (end of the feeding trial), and the range of difference was consistent ($P < 0.001$) with microarray analyses for *LCN2* and *CPT1A*, while *PSAP* expression by qPCR did not significantly differ ($P > 0.10$) between HF and LF pigs (Fig 2).

Discussion

The current study provides new evidence that the investigation of the expression of genes in whole blood allowed clear identification of biological pathways and indicator traits involved in



P-value	CD40	GPX3	OAZ3	DGAT2	NMI	TRAF6	SLPI	PSEN1
qPCR 74 days of age	*	**	**	*	>0.1	>0.1	*	>0.1
qPCR 132 days of age	***	***	***	**	*	>0.1	**	*
Microarray	**	***	***	**	***	***	***	**

Fig 1. Comparison of microarray and qPCR data for eight genes in pigs divergently selected for low or high residual feed intake (RFI). Transcriptomic differences between the two lines were validated by qPCR at 132 and 74 days of age (onset of the growing period). For values related to microarray, the highest P-value is reported when several probes are differentially expressed for a unique gene (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P<0.001). Fold change value is expressed as the expression ratio of low RFI to high RFI samples; ratio was inversed and preceded by a minus sign for value less than 1 (i.e., a ratio of 0.5 is expressed as -2). *CD40*, tumor necrosis factor receptor superfamily member 5; *GPX3*, glutathione peroxidase 3; *OAZ3*, ornithine decarboxylase antizyme 3; *DGAT2*, diacylglycerol O-acyltransferase 2; *NMI*, N-myc interactor; *TRAF6*, TNF receptor-associated factor 6; *SLPI*, secretory leukocyte peptidase inhibitor; *PSEN1*, presenilin 1.

doi:10.1371/journal.pone.0146550.g001

the response to genetics and nutrition strategies. To date, the majority of studies including a microarray analysis from whole blood or PBMC have been performed in adults exhibiting several disorders [23]. Therefore, the current study provides novel information on the response of blood transcriptome during growth. This study further supports the interest to use RNA extracted from whole blood which is easier to obtain compared with RNA extracted from PBMC which requires supplementary steps for cell isolation. In the current study, there was no significant difference in the numbers of lymphocytes, monocytes and neutrophils between the

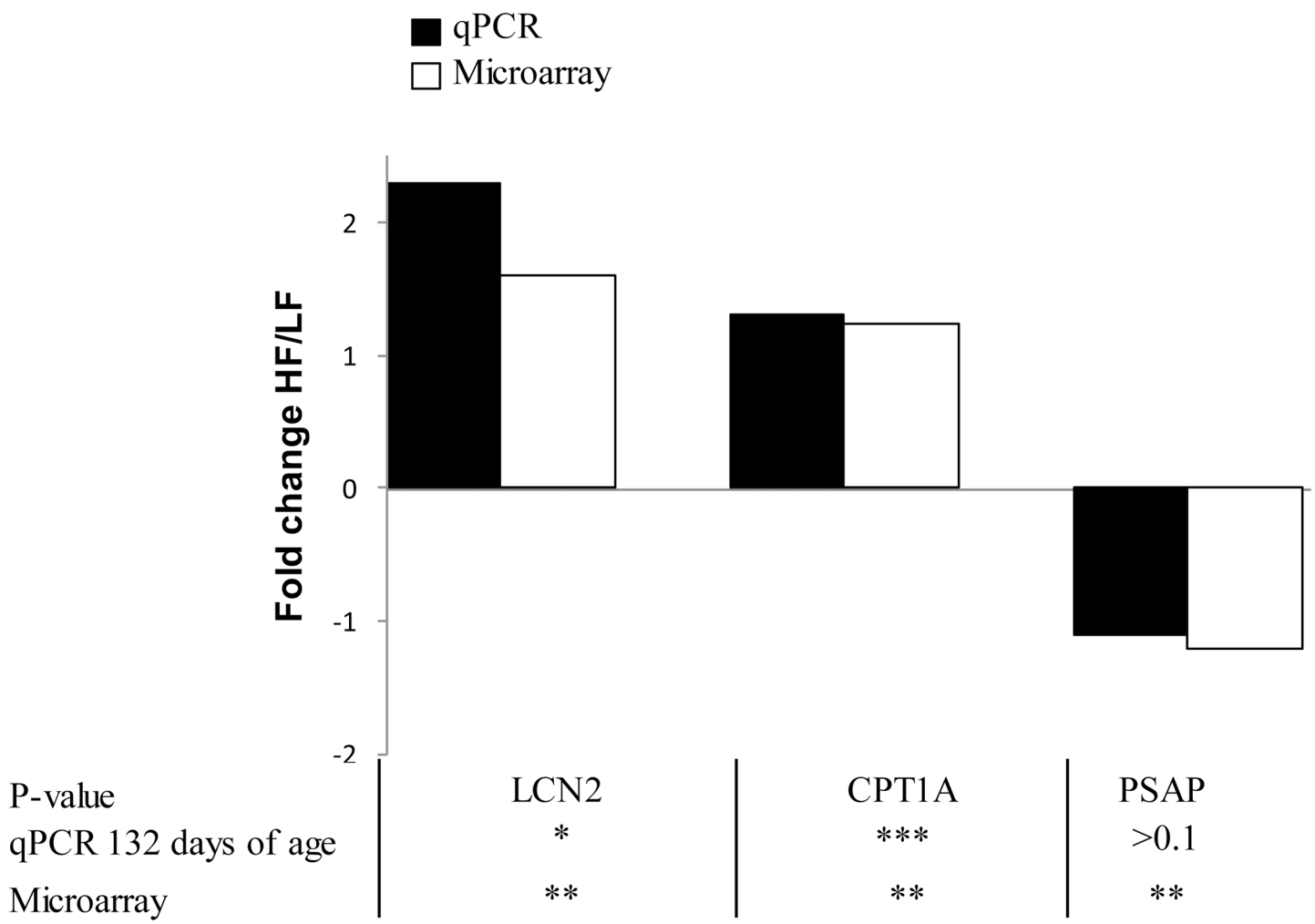


Fig 2. Comparison of microarray and qPCR data for three genes in pigs fed the HF or LF diet. For values related to microarray, the highest P-value is reported when several probes are differentially expressed for a unique gene (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001). Fold change value is expressed as the expression ratio of HF (high fiber high fat, n = 24) to LF (low fiber low fat, n = 24) diets; ratio was inversed and preceded by a minus sign for value less than 1 (i.e., a ratio of 0.5 is expressed as -2). *LCN2*, lipocalin 2; *CPT1A*, Carnitine palmitoyltransferase 1A; *PSAP*, prosaposin.

doi:10.1371/journal.pone.0146550.g002

experimental groups, so that identified DE genes after microarray analysis were not related to differences in the number of WBC. These observations differ from a recent study reporting a lower number of WBC, especially lymphocytes and monocytes, in Yorkshire pigs selected for low RFI compared with pigs selected for high RFI and considered at younger age (35–42 days) [24]. With respect to RBC, their total number was higher in low RFI than in high RFI pigs in the current study, while this number did not differ between the divergent RFI lines in the study of Mpetile et al. [24]. It is important to note that other parameters related to RBC were similarly affected by RFI selection in both studies, with higher hemoglobin plasma concentration and higher hematocrit percentage in low RFI pigs than in high RFI pigs. The current findings may reflect differences in intensity of selection, age of pigs considered for the measurement of blood cell traits or environmental stimuli during pig housing.

The current study clearly indicates that genetics has a greater impact on blood gene expression profiles than dietary treatment. In a rat model, genetic background has been shown to have a much larger impact on PBMC transcriptome than on heart transcriptome [25]. With

the current findings, it can be hypothesized that the identified DE genes in whole blood may reflect changes that occur in a similar manner in several tissues of the organism in response to genetic selection for RFI. Indeed, it has been shown that the expression of a large number of genes was shared among all tissues including blood cells [10].

The most important pathways shared by genes DE between RFI lines in the blood concern immunity and defense mechanisms. Most of these genes were underexpressed in low RFI pigs compared with high RFI pigs, although some of them (*IFITM1*, *SLPI*, and *IL6ST*) were rather overexpressed in low RFI pigs. For instance, the *CD40* gene coding for a TNF receptor superfamily member required for the B-cell function was found to exhibit a lower expression in the low RFI pigs compared with the high RFI pigs at both examined ages. The expression level of *PSEN1*, a gene participating to T cell activation, was decreased only in 132-day-old pigs. Conversely, the *SLPI* gene, coding for an antimicrobial protein having inhibitory effects that contribute to the immune response by protecting epithelial surfaces, was overexpressed in low RFI pigs at both ages. An overexpression of the *IL6ST* gene was also observed in low RFI pigs, a gene encoding a signal transducer shared by many cytokines including interleukin 6. Finding many genes related to immunity in the whole blood transcriptome is expected considering the fact that blood cells constitute one of the first lines of immune defense [10]. A recent study in pigs showing that peripheral blood transcriptome is a relevant source to identify genes related to the immune function responses and to predict the efficiency of individual's immune response further supports our data [26]. From the current data, it is however not possible to predict this efficiency of immune response in RFI pigs. It has been suggested that livestock animals selected for high production efficiency traits may be more vulnerable to diseases and stressors [27, 28]. Nevertheless, the few available data dealing with the inflammatory response of the two RFI lines do not allow a clear conclusion [29–30]. A lower level of basal inflammation, as indicated by reduced concentration of the acute phase protein haptoglogin, has been recently reported in low RFI pigs compared with high RFI pigs [29]. In response to an immune challenge induced by infection with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus [31], pigs selected for a low RFI compared with high RFI pigs had a greater immune response and their growth rate was less affected. Further studies are thus needed to confirm the higher capacity of low RFI pigs and to get a better understanding of the immune capacity and inflammatory response of the two RFI lines.

Genes associated with translational elongation were overexpressed in low RFI pigs compared with high RFI pigs, including *eiF1B* gene involved in translational initiation as one of the top overexpressed genes in the former pigs. Detectable expression of *eiF1B* gene has been previously demonstrated after microarray analyses in normal whole blood from Human patients [32]. An increase in the expression of genes encoding initiation and elongation factor subunits has been also recently reported in skeletal muscle of low RFI pigs of the sixth and seventh generations of the same selection experiment [6]. These findings may reflect a greater protein synthesis in low RFI pigs than in high RFI pigs, to support increased muscle gain in the former pigs during the growing period [5]. This remains to be further investigated. Indeed, translation initiation signaling proteins did not differ in skeletal muscle between low and high RFI lines [4, 33].

The expression of genes encoding gluthatione peroxidase 3 (*GPX3*) and ornithine decarboxylase antizyme 3 (*OAZ3*) was also found as DE in low *versus* high RFI pigs at both ages. The same genes have been previously reported to be DE in skeletal muscle between pigs of the former generations of selection [6]. Those two genes have a role in oxidative metabolism. *GPX3*, encoding an enzyme involved in the detoxification of hydrogen peroxide when reactive oxygen species were produced, accounts for the major antioxidant activity in the plasma. *OAZ3*, encoding an enzyme which is an inhibitor of ornithine decarboxylase, itself involved in the

anti-oxidant defense, converts ornithine in putrescine, the first step in the synthesis of polyamines that have antioxidant properties. These findings argue for a lower oxidative stress in low RFI pigs [34] and the expression of these genes may be considered as relevant indicators of RFI status in the pig.

Only few genes were found DE in whole blood samples collected from pigs fed the HF or LF diets, despite a large impact of the dietary treatment on growth and body composition of pigs from the two RFI lines [14, 35]. Between normal weight and diet-induced obese (cafeteria diet) rats, exhibiting large differences in body weight and adiposity index, the number of genes affected by the diet in PBMC (566 genes; [36]) was much higher than in the present study. The difference in the extent of the gene response between our study and the above-mentioned ones are unknown. This may be related to differences in nutrient composition or energy level of the diet. Alternatively, the difference may be related to the fact that an increase in adipose tissue mass occurred in those studies, whereas there was a decrease in the fat mass of pigs fed the HF diet compared with pigs fed the LF diet.

Despite the low number of genes DE in response to the HF compared with the LF diet, the current study highlighted differences in the expression of genes related to the immune system and lipid metabolism as shown reported in PBMC of miniature pigs fed a hyperlipidic diet *versus* hyperlipidic and hyperglucidic diet for 27 weeks [37]. Overexpressed genes in pigs fed the HF diet were mainly involved in host defense mechanism (*PR39*, *PMAP-23*, *CD5L*, *PGLYRP1*). With respect to lipid metabolism, two genes were also identified as DE in whole blood of pigs fed the two diets. The *CPT1A* (carnitine palmitoyl transferase 1A) gene, encoding an enzyme which is localized in the inner membrane of the mitochondria and participates to the entrance of fatty acids in the mitochondria for β-oxidation, was overexpressed in HF pigs compared with LF pigs. This may reflect a higher fatty acid oxidative capacity in blood cells of HF pigs, as observed in rats [38]. Other studies have shown that *CPT1A* gene expression in PBMC did not vary between overweight and control rats [39], or between obese and normal weight subjects in human [40]. Conversely, the expression of *CPT1A* was higher in overweight children than in normal weight children [41]. In our study, the fact that HF pigs were leaner and lighter than LF pigs [14] suggests no direct relationships between *CPT1A* expression in peripheral blood and changes in adipose tissue mass.

The gene encoding lipocalin 2 (LCN2) was also overexpressed in pigs fed the HF diet compared with pigs fed the LF diet. Lipocalin 2 also named neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) has been recently characterized as an adipokine playing putative roles in glucose and lipid metabolism [42, 43]. This adipokine shares structural similarities with fatty acid binding proteins and retinol-binding proteins. Recent studies have shown a higher LCN2 expression level in PBMC of adults exhibiting higher adiposity [44] and (or) higher body weight and body mass index [45]. With this contrasted findings, further studies are needed to determine whether there is a possible relationship between peripheral blood LCN2 expression and adipose tissue mass variation.

In summary, the current study based on the investigation of pigs selected for feed efficiency and fed two diets contrasted in energy sources indicate that transcriptomics analyses is an additional tool to study variations of phenotypes in a dynamic way throughout the life of the animal. It also supports the potential use of blood transcriptome to highlight biomarkers for future selection process in pig or in other species.

Supporting Information

S1 Table. Primer sequences used for analysis of gene expression by qPCR.
(DOCX)

S2 Table. Probes expressed in whole blood of pigs selected for low or high residual feed intake (RFI) fed a low-fat, low-fiber (LF) or high-fat, high-fiber (HF) diet, with significant interaction between line and diet.
(XLSX)

Acknowledgments

The authors thank Y. Billon and A. Priet (INRA, UE1372 GenESI, Le Magneraud, F-17700 Surgères) for line selection, B. Carrisant, H. Demay and J. Liger (INRA, UMR1348 Pegase) for blood sampling, and G. Guillemois (INRA, UMR1348 Pegase) for diet preparation. They are also grateful to E. Baéza (INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly) for her critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FG IL. Performed the experiments: MJ FG AV CT HG IL. Analyzed the data: MJ AV. Contributed reagents/materials/analysis tools: MJ AV CT. Wrote the paper: MJ FG HG IL.

References

1. Niemann H, Kuhla B, Flachowsky G. Perspectives for feed-efficient animal production. J Anim Sci. 2011; 89: 4344–4363. doi: 10.2527/jas.2011-4235 PMID: 21705634
2. Animal Task Force. Research & Innovation for a Sustainable Livestock Sector in Europe. An Animal Task Force White Paper. 2013 [27th of July 2015]; Available from: http://www.animaltaskforce.eu/Portals/0/ATF/documents%20for%20scare/ATF%20white%20paper%20Research%20priorities%20for%20a%20sustainable%20livestock%20sector%20in%20Europe.pdf. Assessed the 15th of September 2015.
3. Gilbert H, Bidanel JP, Gruand J, Caritez JC, Billon Y, Guillouet P, et al. Genetic parameters for residual feed intake in growing pigs, with emphasis on genetic relationships with carcass and meat quality traits. J Anim Sci. 2007; 85: 3182–3188. doi: 10.2527/jas.2006-590 PMID: 17785600
4. Le Naou T, Le Floc'h N, Louveau I, Gilbert H, Gondret F. Metabolic changes and tissue responses to selection on residual feed intake in growing pigs. J Anim Sci. 2012; 90: 4771–4780. doi: 10.2527/jas.2012-5226 PMID: 22871936
5. Faure J, Lefaucheur L, Bonhomme N, Ecolan P, Meteau K, Coustard SM, et al. Consequences of divergent selection for residual feed intake in pigs on muscle energy metabolism and meat quality. Meat Sci. 2013; 93:37–45. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.07.006 PMID: 22910803
6. Vincent A, Louveau I, Gondret F, Tréfeu C, Gilbert H, Lefaucheur L. Divergent selection for residual feed intake affects the transcriptomic and proteomic profiles of pig skeletal muscle. J Anim Sci. 2015; 93: 2745–2758. doi: 10.2527/jas2015-8928 PMID: 26115262
7. Montagne L, Loisel F, Le Naou T, Gondret F, Gilbert H, Le Gall M. Difference in short-term responses to a high-fiber diet in pigs divergently selected for residual feed intake. J Anim Sci. 2014; 92: 1512–1523. doi: 10.2527/jas.2013-6623 PMID: 24496835
8. Arkfeld EK, Young JM, Johnson RC, Fedler CA, Prusa K, Patience JF, et al. Composition and quality characteristics of carcasses from pigs divergently selected for residual feed intake on high- or low-energy diets. J Anim Sci. 2015; 93: 2530–2545. doi: 10.2527/jas2014-8546 PMID: 26020348
9. Herd RM, Arthur PF. Physiological basis for residual feed intake. J Anim Sci. 2009; 87 (14 Suppl): E64–E71. doi: 10.2527/jas.2008-1345 PMID: 19028857
10. Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, Dempsey AA. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. J Lab Clin Med. 2006; 147: 126–132. doi: 10.1016/j.lab.2005.10.005 PMID: 16503242
11. Mohr S, Liew CC. The peripheral-blood transcriptome: new insights into disease and risk assessment. Trends Mol Med. 2007; 13: 422–432. doi: 10.1016/j.molmed.2007.08.003 PMID: 17919976
12. Ghosh S, Dent R, Harper ME, Gorman SA, Stuart JS, McPherson R. Gene expression profiling in whole blood identifies distinct biological pathways associated with obesity. BMC Med Genomics. 2010; 3: 56. doi: 10.1186/1755-8794-3-56 PMID: 21122113

13. Diaz-Rua R, Keijer J, Caimari A, van Schothorst EM, Palou A, Oliver P. Peripheral blood mononuclear cells as a source to detect markers of homeostatic alterations caused by the intake of diets with an unbalanced macronutrient composition. J Nutr Biochem. 2015; 26: 398–407. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.11.013 PMID: 25660595

14. Gondret F, Louveau I, Mourot J, Duclos MJ, Lagarrigue S, Gilbert H, et al. Dietary energy sources affect the partition of body lipids and the hierarchy of energy metabolic pathways in growing pigs differing in feed efficiency. J Anim Sci. 2014; 92: 4865–4877. doi: 10.2527/jas.2014-7995 PMID: 25253805

15. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. Nucleic Acids Res. 2002; 30: 207–210. PMID: 11752295

16. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria2008; Available from: http://www.R-project.org.

17. Fu WJ, Stromberg AJ, Viele K, Carroll RJ, Wu G. Statistics and bioinformatics in nutritional sciences: analysis of complex data in the era of systems biology. J Nutr Biochem. 2010; 21: 561–572. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.11.007 PMID: 20233650

18. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature Protocols. 2009; 4: 44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211 PMID: 19131956

19. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res. 2009; 37: 1–13. doi: 10.1093/nar/gkn923 PMID: 19033363

20. Binns D, Dimmer E, Huntley R, Barrell D, O'Donovan C, Apweiler R. QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. Bioinformatics. 2009; 25: 3045–3046. doi: 10.1093/bioinformatics/btp536 PMID: 19744993

21. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 2002; 3: 18.

22. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001; 29: e45. PMID: 11328886

23. Pascual V, Chaussabel D, Banchereau J. A genomic approach to human autoimmune diseases. Annu Rev Immunol. 2010; 28: 535–571. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101221 PMID: 20192809

24. Mpetile Z, Young JM, Gabler NK, Dekkers JC, Tuggle CK. Assessing peripheral blood cell profile of Yorkshire pigs divergently selected for residual feed intake. J Anim Sci. 2015; 93: 892–899. doi: 10.2527/jas2014-8132 PMID: 26020867

25. Deans KJ, Minneci PC, Chen H, Kern SJ, Logun C, Alsaaty S, et al. Impact of animal strain on gene expression in a rat model of acute cardiac rejection. BMC Genomics. 2009; 10: 1471–2164. doi: 10.1186/1471-2164-10-280

26. Mach N, Gao Y, Lemonnier G, Lecardonnel J, Oswald IP, Estelle J, et al. The peripheral blood transcriptome reflects variations in immunity traits in swine: towards the identification of biomarkers. BMC Genomics. 2013; 14:894. doi: 10.1186/1471-2164-14-894 PMID: 24341289

27. Rauw WM, Kanis E, Noordhuizen-Stassen EN, Grommers FJ. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. Livest Prod Sci. 1998; 56: 15–33.

28. Prunier A, Heinonen M, Quesnel H. High physiological demands in intensively raised pigs: impact on health and welfare. Animal. 2010; 4: 886–898. doi: 10.1017/S175173111000008X PMID: 22444261

29. Mani V, Harris AJ, Keating AF, Weber TE, Dekkers JC, Gabler NK. Intestinal integrity, endotoxin transport and detoxification in pigs divergently selected for residual feed intake. J Anim Sci. 2013; 91: 2141–2150. doi: 10.2527/jas2012-6053 PMID: 23463550

30. Labussière E, Dubois S, Gilbert H, Thibault JN, Le Floc'h N, Noblet J, et al. Effect of inflammation stimulation on energy and nutrient utilization in piglets selected for low and high residual feed intake. Animal. 2015. doi: 10.1017/S1751731115000932

31. Dunkelberger JR, Boddicker NJ, Serão NVL, Young JM, Rowland RRR, Dekkers JCM. Response of pigs divergently selected for residual feed intake to experimental infection with the PRRS virus. Livest Sci. 2015; 177: 132–41.

32. Demirci H, Reed D, Elner VM. Tissue-based microarray expression of genes predictive of metastasis in uveal melanoma and differentially expressed in metastatic uveal melanoma. J Ophthalmic Vis Res. 2013; 8: 303–307. PMID: 24653816

33. Cruzen SM, Harris AJ, Hollinger K, Punt RM, Grubbs JK, Selsby JT, et al. Evidence of decreased muscle protein turnover in gilts selected for low residual feed intake. J Anim Sci. 2013; 91: 4007–4016. doi: 10.2527/jas2013-6413 PMID: 23739790

34. Grubbs JK, Huff-Lonergan E, Gabler NK, JC MD, Lonergan SM. Liver and skeletal muscle mitochondria proteomes are altered in pigs divergently selected for residual feed intake. J Anim Sci. 2014; 92: 1995–2007. doi: 10.2527/jas2013-7391 PMID: 24671593

35. Jégou M, Gondret F, Lalande-Martin J, Tea I, Baeza E, Louveau I. NMR-based metabolomics highlights differences in plasma metabolites in pigs exhibiting diet-induced differences in adiposity. Eur J Nutr. 2015 May 22. doi: 10.1007/s00394-015-0932-z

36. Caimari A, Oliver P, Rodenburg W, Keijer J, Palou A. Slc27a2 expression in peripheral blood mononuclear cells as a molecular marker for overweight development. Int J Obes (Lond). 2010; 34: 831–839. doi: 10.1038/ijo.2010.17

37. Takahashi J, Waki S, Matsumoto R, Odake J, Miyaji T, Tottori J, et al. Oligonucleotide microarray analysis of dietary-induced hyperlipidemia gene expression profiles in miniature pigs. PLos One. 2012; 7: e37581. doi: 10.1371/journal.pone.0037581 PMID: 22662175

38. Konieczna J, Sanchez J, van Schothorst EM, Torrens JM, Bunschoten A, Palou M, et al. Identification of early transcriptome-based biomarkers related to lipid metabolism in peripheral blood mononuclear cells of rats nutritionally programmed for improved metabolic health. Genes Nutr. 2014; 9: 366. doi: 10.1007/s12263-013-0366-2 PMID: 24343050

39. Oliver P, Reynes B, Caimari A, Palou A. Peripheral blood mononuclear cells: a potential source of homeostatic imbalance markers associated with obesity development. Pflugers Archiv: Eur J Physiol. 2013; 465: 459–468. doi: 10.1007/s00424-013-1246-8

40. Telle-Hansen VH, Halvorsen B, Dalen KT, Narverud I, Wesseltoft-Rao N, Granlund L, et al. Altered expression of genes involved in lipid metabolism in obese subjects with unfavourable phenotype. Genes Nutr. 2013; 8: 425–434. doi: 10.1007/s12263-012-0329-z PMID: 23296345

41. Sanchez J, Priego T, Pico C, Ahrens W, De Henauw S, Fraterman A, et al. Blood cells as a source of transcriptional biomarkers of childhood obesity and its related metabolic alterations: results of the IDEFICS study. J Clin Endocrinol Metab. 2012; 4: E648–E652.

42. Guo H, Bazuine M, Jin D, Huang MM, Cushman SW, Chen X. Evidence for the regulatory role of lipocalin 2 in high-fat diet-induced adipose tissue remodeling in male mice. Endocrinology. 2013; 154: 3525–3538. doi: 10.1210/en.2013-1289 PMID: 23885013

43. Wu G, Li H, Zhou M, Fang Q, Bao Y, Xu A, et al. Mechanism and clinical evidence of lipocalin-2 and adipocyte fatty acid-binding protein linking obesity and atherosclerosis. Diabetes Metab Res Rev. 2014; 30: 447–456. doi: 10.1002/dmrr.2493 PMID: 24214285

44. Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, Ramirez B, Valenti V, Moncada R, et al. Peripheral mononuclear blood cells contribute to the obesity-associated inflammatory state independently of glycemic status: involvement of the novel proinflammatory adipokines chemerin, chitinase-3-like protein 1, lipocalin-2 and osteopontin. Genes Nutr. 2015; 10: 460. doi: 10.1007/s12263-015-0460-8 PMID: 25869413

45. Berisha SZ, Serre D, Schauer P, Kashyap SR, Smith JD. Changes in whole blood gene expression in obese subjects with type 2 diabetes following bariatric surgery: a pilot study. PLos One. 2011; 6: e16729. doi: 10.1371/journal.pone.0016729 PMID: 21423737

Tableau 5. Gènes ayant été validés par qPCR qui sont à la fois différemment exprimés dans le sang et dans l'un des tissus chez le porc.

	Sang	TA Périrénal	TASC	Muscle LD	Foie
CD40	-	-	-		-
GPX3	--	-			-
NMI	--	-		--	--
OAZ3	--	-	--		--
PSEN1	-	-			-
SLPI	++			++	+
TRAF6	++	+	+	+	+

Gènes sur- (+) ou sous-exprimés (-) chez les porcs CMJR-/CMJR+, un signe correspond à un différentiel d'expression compris entre 1,2 et 2; deux signes correspondent à un différentiel d'expression supérieur à 4. Les cases indiquent qu'il n'y a pas de gènes différentiellement exprimé.

2. Corrélation entre la formule sanguine et les paramètres tissulaires

En plus des résultats présentés dans l'article une analyse de corrélation a été réalisée entre les paramètres plasmatiques mesurés à l'issue de la détermination des formules sanguines et les paramètres de composition corporelle ainsi que de performances de croissance. Aucun résultat significatif n'a été mis en évidence (**Annexe VI**).

3. Lien entre le transcriptome sanguin et les transcriptomes tissulaires

Parallèlement à l'analyse du transcriptome sanguin, les transcriptomes du tissu adipeux périrénal, sous-cutané, du foie et du muscle longissimus ont été analysés dans le laboratoire sur les porcs âgés de 132 jours. Les sondes différemment exprimées (DE, P<0,01, FC>|1,1|) dans le sang ont été comparées avec les listes de sondes DE dans les différents tissus pour l'effet du génotype. Parmi les 2075 sondes DE dans le sang, 1511 étaient également DE dans un ou plusieurs des 4 autres tissus. Parmi ces 1511 sondes DE dans le sang, 502 sondes étaient DE dans le tissu adipeux périrénal, 106 sondes étaient DE dans le TASC, 548 sondes étaient DE dans le foie et 16 sondes étaient DE dans le muscle LD. Parmi les 1511 sondes DE dans le sang, 336 sondes sont à la fois DE dans le tissu adipeux périrénal et dans le foie, 89 sondes sont DE dans le TASC et dans le foie, 102 sondes sont à la fois DE dans les tissus adipeux périrénal et sous-cutané, et 4 sondes correspondant à 4 gènes : SLA-1, NKIRAS1, OAZ3, TRAF6 sont DE dans tous les tissus. Concernant l'effet du régime, parmi les 82 sondes DE dans le sang (P<0,01, FC>1,1), 32 sondes sont DE dans le tissu adipeux périrénal, 18 sondes sont DE dans le TASC, 13 sondes sont DE dans le foie, 16 sondes sont DE dans le muscle LD. Parmi les 82 sondes DE dans le sang, 14 sondes sont à la fois DE dans les tissus adipeux périrénal et sous-cutané, 6 sondes sont DE à la fois dans le tissu périrénal et le foie, 5 sondes sont DE à la fois dans le TASC et le foie, 2 sondes l'une codant pour un gène (NTPCR) et l'autre codant pour un clone (OVRM10190D06) sont DE dans tous les tissus.

Onze gènes identifiés comme différentiels entre les deux génotypes (8 gènes) ou entre les deux régimes (3 gènes) par l'approche transcriptomique ont été quantifiés par qPCR. Parmi les 8 gènes DE en fonction du génotype 7 étaient également DE dans un ou plusieurs tissus (**Tableau 5**). En effet, le gène codant pour le tumor necrosis factor receptor superfamily member 5 (CD40) et le gène codant l'ornithine decarboxylase antizyme 3 (OAZ3) sont sous-exprimés chez les porcs CMJR- par comparaison avec les porcs CMJR+ dans le sang, les tissus adipeux périrénal et sous-cutané et le foie. Le gène codant la glutathione peroxydase 3

Tableau 6. Gènes ayant été validés par qPCR qui sont à la fois différemment exprimés dans le sang et dans l'un des tissus chez le porc.

	Sang	TA Périrénal	TASC	Muscle LD	Foie
CPTA1	+	+			
LCN2	+	++	--		

+/- : gènes sur- ou sous-exprimés chez les porcs alimentés avec le régime HF/porcs alimentés avec le régime LF, un signe correspond à un différentiel d'expression compris entre 1,2 et 2; deux signes correspondent à un différentiel d'expression supérieur à 4. Les cases indiquent qu'il n'y a pas de gènes différemment exprimé.

Tableau 7. Corrélation des valeurs d'expression des gènes dans le sang et dans les tissus chez les porcs sélectionnés sur la CMJR et nourris avec un régime HF ou LF (n=24 par conditions).

			TA périrénal	TASC	Foie	Muscle LD
Sang	CD40	P-value	***	>0,1	**	
		r	0,48	0,23	0,43	
	GPX3	P-value	***		***	
		r	0,63		0,57	
	NMI	P-value	***		***	***
		r	0,98		0,87	0,95
	OAZ3	P-value	***	***	***	
		r	0,91	0,92	0,98	
	PSEN1	P-value	>0,1		>0,1	
		r	0,22		0,08	
	SLPI	P-value			**	*
		r			0,42	0,34
	TRAF6	P-value	***	***	***	***
		r	0,86	0,88	0,96	0,95

Corrélation entre la sonde différemment exprimée dans le sang et la sonde équivalente différemment exprimée dans le tissus, ***p<0,001 ; **p<0,01 ; p<0,05.

(GPX3) est sous-exprimé chez les porcs CMJR- par comparaison avec les porcs CMJR+ dans le sang, le tissu adipeux périrénal et le foie. Le gène codant N-myc interactor (NMI) est sous-exprimé chez les porcs CMJR- par comparaison avec les porcs CMJR+ dans le sang, le tissu adipeux périrénal, le foie et le muscle LD. Le gène codant la presenilin 1 (PSEN1) est sous-exprimé chez les porcs CMJR- par comparaison avec les porcs CMJR+ dans le sang, le tissu adipeux périrénal et le foie. Le gène codant la secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) est surexprimé chez les porcs CMJR- par comparaison avec les porcs CMJR+ dans le sang, le foie et le muscle. Le gène codant le TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) est surexprimé chez les porcs CMJR- par comparaison avec les porcs CMJR+ dans le sang, le tissu adipeux périrénal et sous-cutané, le foie et le muscle LD. De même pour l'effet du régime, 2 des 3 gènes DE étaient également DE dans le tissu adipeux périrénal et/ou le TASC, le gène codant la CPT1A et la LCN2 (**Tableau 6**). Le gène codant la forme hépatique de la carnitine palmitoyl transférase 1A est surexprimé chez les porcs nourris avec le régime HF par comparaison avec les porcs nourris avec le régime LF dans le sang et dans le tissu adipeux périrénal. Le gène qui code pour la lipocaline 2 (LCN2) est surexprimé dans le sang chez les porcs nourris avec le régime HF par comparaison avec les porcs nourris avec le régime LF alors qu'il est sous-exprimé dans les tissus adipeux périrénal et sous-cutané.

Les corrélations entre les sondes codant les gènes validés par qPCR dans le sang total et les sondes ayant le même identifiant différemment exprimées dans les tissus ont été effectuées (**Tableau 7**). Une corrélation positive ($P<0,001$, $r>0,3$) est observée entre les gènes CD40, GPX3, NMI, OAZ3 et TRAF6 dans le sang et dans le tissu adipeux périrénal. Une corrélation positive ($P<0,001$, $r>0,3$) est observée entre les gènes OAZ3 et TRAF6 dans le sang et le TASC. Une corrélation positive ($P<0,01$, $r>0,3$) est observée entre les gènes CD40, GPX3, NMI, OAZ3, SLPI et TRAF6 dans le sang et le foie. Une corrélation positive ($P<0,05$, $r>0,3$) est observée entre les gènes NMI, SLPI, TRAF6 dans le sang et le muscle LD.

Tableau 8. Nombre de gènes différemment exprimés dans les cellules mononucléaires du sang chez les poulets sélectionnés sur le taux de gras abdominal (gras versus maigre) nourri avec un régime riche en fibres et en lipides (HF) ou un régime riche en carbohydrates (LF).

Gènes DE[a]	Maigres/ Gras		HF / LF	
	Surexprimés	Sous-exprimés	Surexprimés	Sous-exprimés
Nombre total	3347	3915	30	33
FC[b] ≥ 1,2	2978	3647	9	17
FC[b] ≥ 2	87	227	2	-

[a]DE: Différemment exprimés.
[b]FC: Fold change

Tableau 9. Analyse fonctionnelle des processus biologiques et des fonctions moléculaires par représentation des principales ontologies de gènes affectés par la sélection des poulets gras ou maigres.

Termes GO[a]		**n gènes**	**P-value ajustée BH[b]**
Gènes surexprimés chez les poulets maigres comparés aux poulets gras			
GO:0015031	« protein transport »	81	$8,6.10^{-07}$
GO:0000166	« nucleotide binding »	320	$7,4.10^{-08}$
GO:0030163	« protein catabolic process »	53	$4,4.10^{-04}$
GO:0006412	« translation »	71	$1.5.10^{-7}$
GO:0006915	« apoptosis »	37	$6,4.10^{-03}$
GO:0006091	« generation of precursor » metabolites and energy »	45	$3,3.10^{-04}$
GO:0043254	« regulation of protein complex assembly »	15	$8,4.10^{-2}$
Gènes Sous exprimés chez les poulets maigres comparés aux poulets gras			
GO:0001883	« purine nucleoside binding »	220	$4,9.10^{-03}$
GO:0008270	« zinc ion binding »	230	$1,7.10^{-03}$
GO:0046983	« protein dimerization activity »	51	$1,0.10^{-02}$

[a] Identifiant de l'ontologie des gènes (GO) et terme du processus biologique ou de la fonction moléculaire.
[b] P-value ajustée de Benjamini-Hochberg

4. Le transcriptome des PBMCs chez le poulet

4.1 Effet de la sélection sur le transcriptome des PBMCs

Dans les PBMCs obtenus suite aux prélèvements sanguins effectués avant l'abattage des animaux, 14187 sondes correspondant à 6657 gènes uniques sont différemment exprimés entre les poulets de la lignée grasse et ceux de la lignée maigre (P<0,01) et 102 sondes correspondant à 63 gènes uniques sont DE entre les poulets ayant été nourris avec un régime HF et ceux ayant été nourris avec un régime LF. Une interaction entre la lignée et le régime (P<0,01) est observée pour 89 sondes correspondant à 68 gènes uniques. La liste de ces sondes est présentée en Annexe V.

4.2 Effet de la sélection génétique sur le transcriptome des PBMCs

Parmi les 14187 sondes différemment exprimées (P<0,01) en réponse à la sélection sur le gras abdominal, 6883 sondes ce qui correspond à 3347 gènes uniques, sont surexprimées alors que 7304 sondes ce qui correspond à 3915 gènes uniques sont sous-exprimées chez les poulets de la lignée maigre (**Tableau 8**). L'analyse fonctionnelle réalisée à partir des gènes différemment exprimés, révèle que la surexpression des gènes chez les poulets de la lignée maigre est liée à 9 processus biologiques ou fonctions moléculaires : transport protéique, transport nucléotidique, catabolisme protéique, traduction, apoptose, métabolisme énergétique, assemblage des complexes protéiques (**Tableau 9**). Cette analyse fonctionnelle révèle également que la sous-expression des gènes chez les poulets de la lignée maigre est liée à 3 fonctions moléculaires : transport nucléotidique, transport d'ions, dimérisation des protéines. En plus de l'analyse fonctionnelle, les gènes DE avec les plus forts différentiels d'expression selon la lignée ont été identifiés (**Tableau 10**). Parmi les 10 gènes les plus fortement surexprimés chez les poulets de la lignée maigre, la majorité jouent un rôle dans le système immunitaire (IL1RL2, HVCN1, IL1R1, HCK, CD69) ; les autres gènes sont liés au métabolisme des lipides (ACOT9), de l'embryogenèse (TCTN1) ; ou n'ont pas encore de rôle identifié (SH3TC1 ; FAM70B ; FAM184A). Les 10 gènes les plus fortement sous-exprimés chez les poulets de la lignée maigre sont liés au système sanguin (APLN, RHAG), au métabolisme de la cellule (KCTD7, TPPP, BG2), à la prolifération cellulaire (WFDC1), à des cascades de signalisation cellulaire (APCDD1, JAKMIP1) ou n'ont pas encore de rôle identifié (IFI27L2, CXCL13L2).

Tableau 10. Classement des 10 gènes (P<0,01) avec les ratios d'expression les plus élevés identifiés dans les PBMCs chez les poulets sélectionnés sur le taux de gras abdominal.

Gene name	Description	Ratio[a]
Gènes surexprimés chez les poulets de la lignée maigre comparés à la lignée grasse		
SH3TC1	« SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1 »	20,0
IL1RL2	« Interleukin 1 receptor-like 2 »	7,7
FAM70B	« Family with sequence similarity 70, member B »	5,6
HVCN1	« Hydrogen voltage gated channel 1 »	3,8
IL1R1	« Interleukin 1 receptor, type I »	3,8
FAM184A	« Family with sequence similarity 184, member A, transcript variant X10 »	3,8
TCTN1	« Tectonic family member 1, transcript variant X5 »	3,3
HCK	« Hemopoietic cell kinase, transcript variant X5 »	3,2
CD69	« CD69 molecule »	3,2
ACOT9	« Acyl-CoA thioesterase 9 »	3,1
Gènes sous-exprimés chez les poulets de la lignée maigre comparés à la lignée grasse		
JAKMIP1	« Janus kinase and microtubule interacting protein 1 transcript variant X14 »	-4,1
APCDD1	« Adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	-4,2
TPPP	tubulin polymerization promoting protein, transcript variant X1 »	-4,2
IFI27L2	« Interferon, alpha-inducible protein 27-like 2 »	-4,4
KCTD7	« Potassium channel tetramerization domain containing 7 »	-4,7
APLN	« apelin »	-4,8
BG2	« Intestinal zipper protein »	-5,1
CXCL13L2	« Chemokine, transcript variant X3 »	-6,4
WFDC1	« WAP four-disulfide core domain 1 »	-6,9
RHAG	« Rh-associated glycoprotein »	-11,3

[a] ratio de la valeur d'expression des gènes différemment exprimés chez des poulets de la lignée maigre versus les poulets de la lignée grasse. Les ratios sont inversés et précédés d'un signe moins pour les valeurs d'expression inférieures à 1 (c.a.d. un ratio d'expression de 0,5 est indiqué -2).

4.3 Effet du régime alimentaire sur le transcriptome des PBMCs

Le nombre de sondes et par conséquent de gènes DE en fonction du régime est plus faible que pour l'effet de la lignée (**Tableau 8**). Parmi les 102 sondes différemment exprimées en réponse au régime alimentaire, 58 sondes soit 33 gènes uniques sont sous-exprimés et 30 gènes uniques sont surexprimés pour les poulets nourris avec un régime HF (**Tableau 8**). Les gènes différemment exprimés avec les plus forts différentiels d'expression en fonction du régime par comparaison de la valeur d'expression des gènes DE des poulets nourris avec un régime HF et les poulets nourris avec un régime LF sont présentés dans le **Tableau 11**. Les 10 gènes qui sont le plus fortement surexprimés chez les poulets nourris avec un régime HF ont un rôle dans le métabolisme lipidique (CPT1A, DECR1), la structure de l'ADN ou la transcription (SETBP1, ZMYND11, TNPO1, RRN3), le métabolisme de la cellule (MAGI1, ATP6V0D2, GNPTAB) et la protéolyse (TRIM59). Les 10 gènes qui sont le plus fortement sous-exprimés chez les poulets nourris avec le régime HF ont un rôle dans le métabolisme lipidique (DHCR24, ACSBG2, LSS), le métabolisme du glucose (GCK), le métabolisme de la cellule (CAPN1, HSPG, OCRL), le processus d'apoptose (MUDENG), le système immunitaire (SIRPA) et le système sanguin (PLEK).

Tableau 11. Classement des 10 gènes (P<0,01) avec les ratios d'expression les plus élevés identifiés dans les PBMCs chez les poulets nourris avec un régime riche en fibres et en lipides (HF) ou riche en carbohydrates (LF).

Gene name	Description	Ratio[a]
Gènes surexprimés chez les poulets nourris avec le régime HF		
TRIM59	« Tripartite motif containing 59 »	2,7
CPT1A	« Carnitine palmitoyltransferase 1A »	1,7
MAGI1	« Membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1, transcript variant X1 »	1,4
ATP6V0D2	« ATPase, H+ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d2 »	1,3
SETBP1	« SET binding protein 1, transcript variant X1 »	1,3
ZMYND11	« Anser cygnoides domesticus zinc finger, MYND-type containing 11 , transcript variant X5 »	1,2
DECR1	« 2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial »	1,2
TNPO1	« Transportin 1, transcript variant X5 »	1,2
GNPTAB	« N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, alpha and beta subunits , transcript variant X3 »	1,2
RRN3	« RRN3 RNA polymerase I transcription factor homolog »	1,2
Gènes sousexprimés chez les poulets nourris avec le régime LF		
DHCR24	« 24-dehydrocholesterol reductase »	-1,2
ACSBG2	« acyl-CoA synthetase bubblegum family member 2 »	-1,3
LSS	« lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase) »	-1,3
MUDENG	« MU-2/AP1M2 domain containing, death-inducing	-1,3
CAPN1	« breed Black-bone CAPN1 »	-1,3
HSPG	« mRNA for basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein precursor »	-1,3
OCRL	« oculocerebrorenal syndrome of Lowe, transcript variant X4 »	-1,3
GCK	« liver glucokinase »	-1,3
PLEK	« Pleckstrin »	-1,4
SIRPA	« signal-regulatory protein alpha »	-1,6

[a] ratio de la valeur d'expression des gènes différemment exprimés chez des poulets nourris par le régime HF versus les poulets nourris par le régime LF. Les ratios sont inversés et précédés d'un signe moins pour les valeurs d'expression inférieures à 1 (c.a.d. un ratio d'expression de 0,5 est indiqué -2).

Discussion générale

Ce travail de thèse visait à déterminer si le sang constitue une source d'information pertinente pour étudier différents phénotypes dans deux espèces phylogénétiquement éloignées, le porc et le poulet. Il est en effet relativement facile de prélever un échantillon sanguin en comparaison de prélèvements d'échantillons tissulaires. D'une part, la concentration des métabolites et hormones et plus largement le métabolome plasmatique ont été déterminés en réponse à des variations de masse grasse et d'efficacité alimentaire. Chez le porc, le régime alimentaire a induit une variation de la masse grasse alors que chez le poulet, cette différence de masse grasse est observée entre les deux lignées. Les effets des régimes alimentaires sur les concentrations des paramètres plasmatiques, et sur le métabolome sont différents chez le porc et chez le poulet. D'autre part, le transcriptome du sang a été déterminé chez le porc et le poulet. Á ce jour, peu d'études ont été réalisées sur le transcriptome sanguin des animaux de rente, en réponse à un régime alimentaire ou en réponse à la sélection génétique. Dans cette discussion, les réponses des deux espèces aux régimes alimentaires seront comparées. Tout d'abord, nous discuterons de l'existence possible d'une interaction entre le génotype et l'alimentation et de ses effets sur l'engraissement corporel. Puis les effets du régime et du génotype sur les paramètres circulants seront discutés. Enfin, l'utilisation du transcriptome sanguin comme outil potentiel de caractérisation du phénotype d'un animal sera discutée.

1. L'interaction entre le génotype et l'alimentation a-t-elle permis d'accroître la variabilité d'engraissement corporel ?

Nos résultats montrent que la distribution d'un régime riche en fibres et en matières grasses en comparaison avec un régime riche en glucides réduit l'engraissement corporel chez le porc en croissance quel que soit son génotype alors qu'il ne modifie pas la composition corporelle chez le poulet. Chez le porc en croissance, il a récemment été montré qu'un régime enrichi en fibres (4% contre un régime contrôle) atténue le dépôt de gras attendu lors de la distribution d'un régime riche en lipides (Yan et al., 2013). Les lipides du régime HF ingéré par le porc, puis les triglycérides circulants, pourraient en partie être séquestrés par un autre tissu.

Les poulets sont capables de synthétiser et de déposer des acides gras à partir des glucides ou de stocker directement les lipides apportés par le régime alimentaire, avec la même efficacité. Le niveau de lipides stockés dans les muscles (P. major et Sartorius) et dans les tissus adipeux (tissu abdominal et tissu situé à l'arrière des deux cuisses) ne varie pas en fonction de la source énergétique. En accord avec nos travaux, plusieurs études (Edwards et Hart, 1971 ;

Bartov et al., 1974 ; Griffiths et al., 1977) montrent qu'une variation de la source énergétique du régime alimentaire ne modifie pas la composition de carcasse des poulets. Á l'inverse, deux autres études (Carew et Hill, 1964 ; Carew et al., 1964) montrent que le remplacement des glucides par de l'huile de maïs de façon isocalorique augmente la masse grasse de la carcasse. Ceci suggère un dépôt de gras directement induit par une proportion de matière grasse plus importante dans le régime. Par ailleurs, la teneur en fibres, qui est plus importante dans le régime HF, n'a pas eu d'effet sur l'indice de consommation des poulets contrairement à ce qui est observé chez le porc. En effet, les porcs nourris avec un régime HF ont consommé moins d'aliment que les porcs nourris avec le régime LF. Cela suggère que les porcs nourris avec le régime HF ont atteint leur seuil de satiété plus rapidement (Kerr et Shurson, 2013). Par conséquent l'énergie ingérée est moins élevée chez les porcs nourris avec le régime HF. La propriété des aliments est alors importante à prendre en compte. Cela suggère que le principal déterminant des performances de croissance des porcs est l'énergie ingérée plutôt que l'énergie métabolisable du régime alimentaire (Quiniou et Noblet, 2012). L'ajout de fibres dans le régime HF a pu diminuer la digestibilité des lipides présents dans le régime, ce qui accentue la diminution de l'énergie ingérée du régime alimentaire (Noblet et Le Goff, 2001). Par ailleurs, l'absence de variation de l'indice de consommation chez le poulet pourrait être dû à une différence de comportement alimentaire entre les deux espèces, le poulet ajuste son énergie ingérée au niveau de ses besoins énergétiques (Larbier et Leclercq, 1992).

Au sein de chaque espèce, les deux lignées génétiques étudiées dans notre étude répondent de la même façon à la distribution des deux régimes, ce qui nous permet de conclure que nous n'avons pas mis en évidence d'interaction entre le génotype et l'alimentation. Ce résultat n'est pas conforme à ce qui a été suggéré précédemment chez le porc. Il a effectivement été indiqué que les porcs CMJR- auraient une meilleure capacité à faire face à un régime riche en fibres et faible en énergie que les porcs CMJR+ (Montagne et al., 2014). Dans notre étude, cette absence de différence entre lignées pourrait s'expliquer par une durée de distribution du régime expérimental plus longue (10 semaines dans notre étude contre 3 semaines dans l'étude précédente). La différence sur le type de fibres utilisées (paille de blé dans notre étude contre un mélange constitué de son de blé, pulpe de betterave déshydratée et coque de soja) pourrait aussi expliquer ce résultat. Chez le poulet, la forte différence de composition corporelle entre les deux lignées aurait pu être associée à une différence de réponse au régime alimentaire : les poulets de la lignée maigre ayant reçu un régime riche en lipides auraient pu être plus gras (Carrew et Hill 1964).

Tableau 12. Récapitulatif de l'effet du régime sur les paramètres plasmatiques chez le porc et le poulet.

	Porc	Poulet
	HF vs LF[a]	HF vs LF[a]
Masse grasse	↓	=
Phospholipides	=	↓
Triglycérides	↑	=
Glucose	↓	=
β-hydroxybutyrate	↓	↓
Cholestérol	=	↓
AGL	ND	↑
Acide urique	ND	↓
Urée	↓	=
Insuline	↓	=
T3 ; T4	=	=
Leptine	↓	ND
Homocystéine	ND	↑
VLDL-LDL	**↑**	**NDe**
LDL	**=**	**↓**
Créatine-lysine	**↓**	**NDe**
Créatine	**↓**	**=**
Tyrosine	**↓**	**↑**
Proline	**↓**	**=**
Histidine	**↓**	**=**
Lysine	**↓**	**↑**
Phénylalanine	**↓**	**↑**
Formate	**↓**	**=**
Bétaine	**=**	**↓**
Glutamine	**=**	**↑**
Méthionine	**=**	**↑**

[a] n=24 par régime. Les animaux ont reçu soit un régime riche en fibres et en lipides (HF) soit un régime riche en carbohydrates (LF), le sens de variation des concentrations ou des taux est indiqué par une flèche ($P<0,05$) en fonction du régime intra-espèces. Le caractère gras indique les métabolites les plus discriminants identifiés par RMN 1H. ND, non dosé ; NDe, non détecté.

2. Variations des concentrations plasmatiques des hormones et des métabolites

2.1 Effets de la source énergétique du régime sur la glycémie, l'insulinémie et les acides aminés

Les effets des régimes sur les concentrations plasmatiques des paramètres sanguins sont différents chez le porc et chez le poulet **(Tableau 12)**. Chez ce dernier, l'insulinémie et la glycémie ne sont pas affectées par le régime alimentaire. En revanche, chez le porc, la variation de régime alimentaire induit une modification du métabolisme des glucides. La concentration plasmatique du glucose, est moins élevée chez les porcs nourris avec le régime HF que chez les porcs nourris avec le régime LF ; ce qui suggère une moindre disponibilité du glucose pour des fins énergétiques. Ceci est en accord avec une étude menée chez l'humain qui montre que l'ingestion d'un régime riche en fibres, augmente la dépense énergétique et réduit la disponibilité du glucose et par conséquent son absorption par les entérocytes (Isaksson et al., 2013). Par ailleurs, deux autres études menées chez le porc ne montrent pas d'effet des fibres du régime alimentaire sur la glycémie et l'insulinémie (Yde et al., 2011 ; Montagne et al., 2014). La glycémie est l'un des facteurs déterminant de la cinétique postprandiale de l'insuline (Ellis et al., 1995). Dans notre étude, les porcs ayant reçu le régime HF ont une concentration en insuline plus faible que les porcs ayant reçu le régime LF.

En plus de l'insuline et du glucose, une variation de la créatinine pouvant être liée au métabolisme des glucides est observée chez le porc alors que ce paramètre n'est pas affecté par le régime alimentaire chez le poulet. Les porcs nourris avec le régime HF ont une concentration plasmatique moins élevée de créatinine, produit de dégradation de la créatine qui est une source d'énergie pour le muscle (Brosnan et al., 2009). Une étude montre une diminution du niveau plasmatique de créatine chez la truie gestante nourrie avec un régime riche en fibres (Yde et al., 2012) et suggère que la concentration plasmatique de créatine est un indicateur du niveau de l'échange glucose-glycogène des muscles squelettiques. La diminution des niveaux de créatine et créatinine pour les porcs nourris avec le régime HF en comparaison des porcs nourris avec le régime LF suggère une moindre glycolyse, ce qui corrobore la moindre activité enzymatique de la glucokinase, qui est une enzyme qui active le glucose cytoplasmique en glucose-6-phosphate, au niveau du foie de ces mêmes porcs (Gondret et al., 2014).

2.2 Effets du régime alimentaire sur le métabolisme lipidique

La variation de la source énergétique du régime alimentaire affecte le métabolisme lipidique chez le porc et le poulet. La concentration plasmatique en triglycérides est plus élevée chez les porcs ayant reçu un régime HF alors qu'elle n'est pas affecté chez le poulet. Un résultat similaire a été rapporté chez des porcs nourris avec un régime enrichi en fibres (20% contre 10% dans le régime contrôle) et dont la concentration plasmatique en triglycérides était également plus élevée (Ziemer et al., 2012). Cependant, une autre étude a montré que l'ajout de fibres dans l'alimentation chez le porc induisait une diminution de la concentration plasmatique de triglycérides en période postprandiale (Leclere et al., 1993), cette divergence de résultat pourrait s'expliquer par la durée de traitement par le régime expérimental qui était plus long dans notre étude. Chez le rat, l'ajout de fibres et de lipides dans le régime alimentaire diminue également cette concentration (Polakof et al., 2013). L'analyse par RMN révèle que le niveau de VLDL-LDL est plus élevé chez les porcs nourris avec le régime HF que chez ceux nourris avec le régime LF. Il est possible que ce régime augmente la sécretion de ces VLDL pour le transport des triglycérides vers les tissus périphériques. Les concentrations plasmatiques de phospholipides et de cholestérol ne sont pas influencées par le régime alimentaire chez le porc.

Chez le porc et le poulet, la distribution du régime HF diminue de la concentration plasmatique de β-hydroxybutyrate, qui pourrait être le reflet d'une moindre oxydation des lipides au niveau du foie. Une précédente étude a suggéré que l'ajout de fibres insolubles dans le régime alimentaire induit une oxydation des acides gras dans le foie chez la souris (Isken et al., 2010). Chez le porc, certains des paramètres plasmatiques identifiés ont un rôle dans le métabolisme énergétique hépatique. Les modifications de ce métabolisme sont observées lors de la distribution d'un régime alimentaire riche en fibres et en lipides chez le porc, et riche en amidon et en lipides chez le rat (Polakof et al., 2013). Outre la concentration plasmatique de LDL qui est moins élevée chez les poulets nourris avec le régime HF que chez les poulets nourris avec le régime LF, les concentrations plasmatiques de cholestérol total et de phospholipides sont également moins élevées chez les poulets HF que chez les poulets LF. Les LDL sont en partie responsables du transport inverse du cholestérol, c'est-à-dire du retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. De ce fait, nos résultats suggèrent soit une plus grande capacité à mobiliser le cholestérol des tissus périphériques chez les poulets LF que les poulets nourris avec le régime HF ou un moindre captage du cholestérol circulant par les tissus périphériques.

2.3 Effets de la source énergétique du régime alimentaire sur le métabolisme protéique

Le métabolisme protéique est affecté par une variation de source énergétique chez le porc et le poulet. Cependant, les molécules affectées diffèrent selon l'espèce. En plus de la créatinine, une diminution du niveau plasmatique de différents aminés, l'histidine, la lysine, la phénylalanine, la proline et la tyrosine a été observée chez les porcs nourris avec le régime HF comparés aux porcs nourris avec le régime LF. Parallèlement à la diminution du niveau plasmatique de ces acides aminés, une diminution de la concentration plasmatique en urée a été observée dans cette espèce. L'ensemble de ces observations suggère une diminution du catabolisme protéique ou une meilleure efficacité d'utilisation des acides aminés (Berschauer et al., 1983) chez les porcs nourris avec le régime HF. Une réduction du niveau de tyrosine a également été rapportée chez le rat nourri avec un régime hyperlipidique (Zhang et al., 2010 ; Xu et al., 2014). La tyrosine est formée à partir d'un autre acide aminé, la phénylalanine, ce qui expliquerait le plus faible niveau de cet acide aminé chez les porcs nourris avec le régime HF comparés aux porcs nourris avec le régime LF (Lerner, 1953). La tyrosine et la phénylalanine sont des acides aminés cétogéniques et glucogéniques. Ceci suggère que ces acides aminés peuvent être utilisés comme source d'énergie par les porcs nourris avec le régime HF.

Chez le poulet, les niveaux de méthionine et de glutamine plasmatiques sont plus élevés mais la concentration plasmatique de la bétaïne est plus faible chez les animaux nourris avec un régime HF qu'avec un régime LF. La bétaïne est une molécule impliquée dans le métabolisme de la méthionine, et elle peut avoir un impact sur le phénotype de l'animal. En effet, une supplémentation en bétaïne dans la ration alimentaire chez le poulet augmente la masse maigre et diminue la masse grasse (Zhan et al., 2006 ; Xing et al., 2011). La concentration plasmatique d'homocystéine est plus faible pour les poulets nourris avec un régime LF qu'un régime HF. Dans cette situation, la méthionine varie dans le même sens que l'homocystéine, mais d'une manière opposée à la bétaïne. Ceci suggère une conversion plus importante de la méthionine en bétaïne via l'homocystéine quand les poulets sont nourris avec le régime LF par rapport à ceux recevant le régime HF. La concentration d'acide urique plasmatique est plus élevée chez les poulets nourris avec un régime LF que chez les poulets nourris avec un régime HF. Cela reflète une plus forte dégradation des acides aminés chez les poulets ayant reçu le régime LF.

L'effet du régime alimentaire a induit de nombreuses modifications des paramètres plasmatiques chez le porc alors que chez le poulet on observe un effet plus modéré du régime alimentaire sur ces paramètres. Á l'exception du β-hydroxybutyrate, aucun autre métabolite n'est affecté de la même façon chez le porc et chez le poulet alors que ce sont les mêmes métabolismes (lipidique, glucidique et des acides aminés) qui sont affectés par la variation du régime alimentaire.

2.4 Les paramètres plasmatiques affectés par la variation de génotype

2.4.1 Chez le porc

Chez le porc, les concentrations plasmatiques de phospholipides et de cholestérol sont plus élevées chez les porcs CMJR- en comparaison des porcs CMJR+, aucun effet de la lignée n'est observé concernant les autres paramètres plasmatiques. Les mesures plasmatiques des phospholipides et du cholestérol n'ont pas été décrite dans la littérature concernant la sélection sur la CMJR chez le porc ce qui ne nous permet pas de discuter ces résultats.

2.4.2 Chez le poulet

La concentration de glucose plasmatique est plus faible pour les poulets de la lignée grasse que pour ceux de la lignée maigre comme cela a déjà été montré (Baéza et Le Bihan-Duval, 2013). Ceci pourrait être dû à un captage du glucose circulant plus rapide notamment au niveau hépatique et à une synthèse de glycogène et/ou de triglycérides plus importante pour les poulets de la lignée grasse. Chez le poulet, une insulinémie moins élevée est observée pour les poulets de la lignée grasse comparés aux poulets de la lignée maigre. Cette différence pourrait être liée à une décroissance post-prandiale plus rapide de l'insuline plasmatique chez les poulets de la lignée grasse comparés aux poulets de la lignée maigre (Baéza et Brillard, 2005 ; Baéza et Le Bihan-Duval, 2013).

La concentration plasmatique de triglycérides et le niveau de lipoprotéines LDL sont plus élevés pour les poulets de la lignée grasse que pour ceux de la lignée maigre, alors que les niveaux plasmatiques de VLDL et HDL (données non présentées) et les concentrations de cholestérol et de phospholipides ne diffèrent pas entre les deux lignées. Chez le poulet, il a déjà été montré que l'activité de la lipoprotéine lipase était plus élevée dans la lignée grasse que dans la lignée maigre (Hermier et al., 1989). Le niveau plasmatique plus élevé de LDL dans la lignée grasse ne résulterait pas d'une moindre absorption des lipides par les tissus périphériques. Ceci suggère un retour plus important des lipides circulants vers le foie pour

les poulets de la lignée grasse comparés à ceux de la lignée maigre. La concentration plasmatique de β-hydroxybutyrate est plus faible chez les poulets de la lignée grasse ce qui suggère une moindre cétogenèse des poulets de cette lignée en comparaison avec les poulets de la lignée maigre.

Chez le poulet, deux acides aminés glucogéniques, la glutamine et l'histidine font partis des acides aminés qui discriminent le mieux les lignées. Ceci est cohérent avec de précédentes études qui montrent une modification des niveaux plasmatiques d'AA glucogéniques chez les poulets de la lignée grasse (Baéza et Le Bihan-Duval, 2013). Cela suggère que, outre l'utilisation d'acides aminés pour la synthèse de protéines notamment dans le muscle, la glutamine et l'histidine peuvent être utilisées pour la synthèse de glucose. Les poulets de la lignée grasse présentent une concentration de bétaïne et un niveau de méthionine circulants plus élevés et des niveaux de glutamine et d'histidine circulants plus faible que la lignée maigre. Une plus faible concentration plasmatique de l'homocystéine est également observée dans la lignée grasse par rapport à la lignée maigre. Ces résultats suggèrent une implication du métabolisme de la méthionine dans la variation de la masse grasse chez le poulet. Enfin, la concentration d'acide urique dans le plasma est plus élevée pour la lignée grasse que pour la lignée maigre ce qui suggère un catabolisme protéique plus élevé pour les poulets de cette lignée (Lessire, 1995).

2.5 Les potentiels biomarqueurs plasmatiques de la masse grasse

Les études de corrélations entre les paramètres plasmatiques et les variations de la masse grasse ont permis de montrer que plusieurs paramètres plasmatiques sont corrélés à la masse grasse relative au poids vif chez le porc comme chez le poulet. Néanmoins, les paramètres identifiés diffèrent entre les deux espèces.

2.5.1 Mise en évidence des corrélations chez le porc

Chez le porc, la leptine est positivement corrélée avec la masse adipeuse relative du TA périrénal ainsi que celle du TASC. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature qui montrent que la concentration sérique ou plasmatique de leptine considérée comme un marqueur d'adiposité chez l'humain (Maffei et al., 1995), est un bon prédicteur de l'accumulation de la masse grasse chez le porc (Suzuki et al., 2009) ou chez l'humain (Fabian et al., 2003). De même, la leptine est corrélée avec la masse corporelle ou la masse adipeuse épididymaire chez la souris (Steyn et al., 2013).

Une corrélation positive est observée entre la concentration plasmatique d'insuline et la masse grasse relative au poids vif du TA périrénal et du TASC. Une telle corrélation a également été rapportée entre la concentration plasmatique d'insuline et la masse corporelle ou la masse du tissu adipeux épididymaire chez la souris (Steyn et al., 2013). De même, le niveau plasmatique de créatine et la masse adipeuse sont positivement corrélés, ce qui est en accord avec une autre étude montrant une corrélation négative entre la concentration plasmatique de créatine et le pourcentage de masse maigre chez le porc (Rohart et al., 2012) et qui suggère un lien entre la créatine plasmatique et la masse de tissu adipeux.

L'urée plasmatique est positivement corrélé à la masse grasse relative du TA périrénal et du TASC comme cela a déjà été démontré dans une autre étude menée chez le porc (Coma et al., 1995). La tyrosine est positivement corrélé à la masse relative du TA périrénal et du TASC et a été identifiée comme un indicateur de dépôt de gras chez le porc et chez l'humain (He et al., 2012 ; Martin et al., 2013). Une corrélation négative est observée entre la concentration plasmatique de triglycérides ou le niveau de VLDL-LDL et la masse grasse relative au poids vif du tissus adipeux périrénal et du TASC chez le porc contrairement à ce qui est observé chez l'humain pour qui la concentration plasmatique de triglycérides est positivement corrélée au tissu adipeux viscéral (Hoenig et al., 2011 ; Szymanska et al., 2012).

2.4.1 Mise en évidence des corrélations chez le poulet

Chez le poulet, une corrélation positive est observée entre l'acide urique et la masse de tissu adipeux abdominal, ce qui suggère également un lien étroit entre le métabolisme protéique et la masse grasse (Fouad et El-Senousey, 2014). Une corrélation positive est observée entre la masse grasse relative des tissus adipeux (abdominal et situé sur la partie externe de l'arrière des deux cuisses) et la concentration en triglycérides ce qui est en accord avec les données obtenues chez l'humain (Szymanska et al., 2012 ; Hoenig et al., 2011). Des corrélations négatives sont observées entre la masse de gras abdominal, ou situé sur la partie externe de l'arrière des deux cuisses relative au poids vif, et la T3, l'homocystéine, la glutamine, l'histidine et le β-hydroxybutyrate. Les corrélations entre l'homocystéine ainsi que la bétaïne avec la masse relative du tissu adipeux abdominal suggèrent une reconversion ultérieure de l'homocystéine en méthionine dans le foie des poulets gras par l'intermédiaire de la bétaïne (Cholewa et al., 2014).

2.4.2 Les paramètres sanguins à retenir chez le porcs et le poulet

Peu de paramètres sont significativement corrélés dans le même sens de variation, avec la masse grasse à la fois chez le porc et chez le poulet. Par conséquent, la mise en évidence de marqueurs génériques par dosage des métabolites par une méthode standard ou par une approche métabolomique est difficile. L'identification de corrélation intra-espèce montre l'importance de chaque paramètre pour expliquer la variabilité de la masse grasse. Cependant, dans notre étude, c'est une combinaison de paramètres qui explique le mieux la variation de la masse grasse pour les deux espèces. Chez le porc la combinaison de paramètres tels que le glucose, les phospholipides, la leptine et la créatine explique majoritairement la variabilité de la masse relative du tissu adipeux périrénal. Par ailleurs, le glucose, la leptine, l'IGF-I et la tyrosine expliquent majoritairement la variabilité du tissu adipeux sous-cutané. Chez le poulet, la combinaison de paramètres tels que les acides gras libres, le cholestérol total, les phospholipides, le β-hydroxybutyrate, la glutamine et la méthionine explique majoritairement la variation de masse grasse relative du tissu adipeux abdominal. Par ailleurs la concentration en triglycérides et de l'homocystéine expliquent majoritairement la variabilité de la masse grasse de la partie externe du haut de la cuisse chez le poulet. C'est la première fois que ces combinaisons de biomarqueurs sont proposées afin d'expliquer les variations de masse grasse chez le porc et le poulet.

3 Le transcriptome : un outil potentiel de caractérisation du phénotype ?

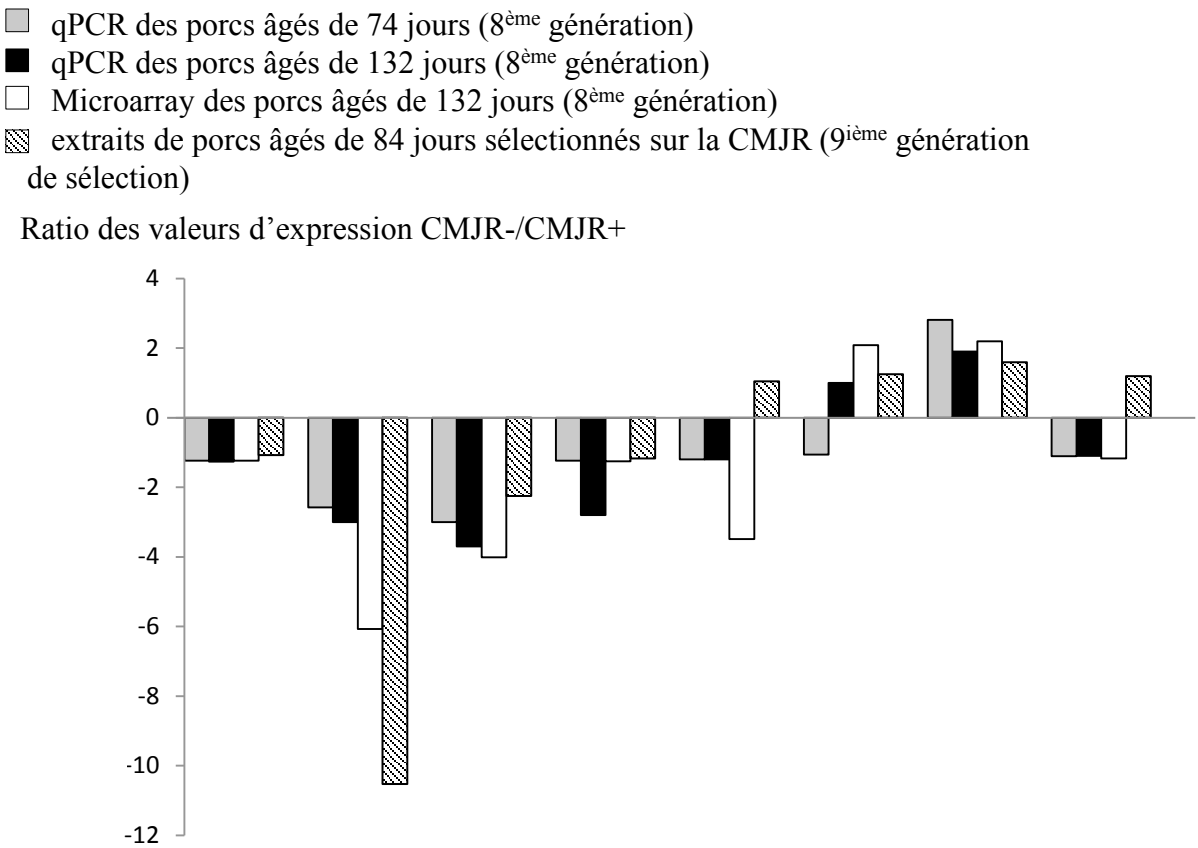
En comparaison avec l'effet marqué de la sélection génétique, chez les deux espèces, notre étude montre qu'une variation de source énergétique du régime alimentaire a un faible impact sur le transcriptome sanguin et la composition corporelle du poulet, alors qu'elle influence les performances de croissance et la composition corporelle des deux lignées chez le porc (Gondret et al., 2014).

3.1 Le transcriptome sanguin : une source de biomarqueurs chez le porc ?

La mise en évidence du différentiel d'expression des gènes peut permettre d'une part de mieux comprendre les bases physiologiques des animaux sélectionnés sur la CMJR et d'autre part d'identifier des marqueurs sanguins en réponse à cette sélection. Notre étude a exploré pour la première fois le transcriptome sanguin chez des porcs sélectionnés sur ce paramètre. Un grand nombre de gènes sont différemment exprimés dans le sang des porcs sélectionnés. Ces gènes

sont impliqués dans plusieurs voies métaboliques. Ceux impliqués dans l'élongation de la traduction sont surexprimés chez les porcs CMJR- comparés aux porcs CMJR+. Parmi ces gènes, celui codant une protéine impliquée dans l'initiation de la traduction (eiF1B) fait également parti des 10 gènes ayant le plus fort différentiel d'expression. Une différence d'expression de gènes impliqués dans l'initiation ou l'élongation de la traduction au niveau du muscle squelettique a aussi été observée pour des porcs de 6ième et de 7ième générations de sélection sur la CMJR (Vincent et al., 2015). Ceci suggère une synthèse protéique plus importante pour les porcs CMJR- que pour les porcs CMJR+ qui pourrait être lié à la masse maigre qui est plus élevée pendant la période de croissance pour les porcs CMJR- (Faure et al., 2013). Cependant, cette hypothèse est à vérifier car les protéines impliquées dans l'initiation de la traduction ne diffèrent pas au niveau du muscle squelettique (Le Naou et al., 2012 ; Cruzen et al., 2013).

L'analyse fonctionnelle des gènes DE en fonction de la lignée révèle que les voies biologiques les plus impactées sont l'immunité et les mécanismes de défense. La plupart des gènes qui ont permis l'analyse fonctionnelle sont sous-exprimés pour les porcs CMJR- par comparaison avec les porcs CMJR+ mais quelques gènes sont surexprimés pour les porcs CMJR- (IFITM1, SLPI, IL6ST). Le système immunitaire ou les mécanismes de défense qui sont mis en évidence par l'analyse fonctionnelle pourraient être liés à l'une des fonctions majeures du sang puisque certaines cellules sanguines constituent le premier système de la défense immunitaire (Liew et al., 2006). Une étude récente réalisée chez le porc montre que le transcriptome des cellules périphériques du sang permet d'identifier des gènes liés à la réponse immunitaire et de prédire l'efficacité de la réponse immunitaire d'un individu (Mach et al., 2013). Toutefois, l'efficacité de la réponse immunitaire des porcs sélectionnés sur la CMJR ne peut pas être prédite par notre étude. Il a été suggéré que les animaux sélectionnés sur des caractères d'efficacité de production étaient plus vulnérables aux facteurs de stress et aux maladies (Rauw et al., 1998 ; Prunier et al., 2010). Cependant, les données disponibles dans la littérature sont peu nombreuses et ne permettent pas de confirmer ce lien entre la sélection sur l'efficacité alimentaire des porcs et leur capacité de réponse immunitaire (Mani et al., 2013 ; Labussière et al., 2015). Une concentration plus faible en haptoglobine, qui est une protéine majeure de la réponse inflammatoire chez le porc (Eckersall et al., 1996) a été récemment observée pour les porcs CMJR- comparés aux porcs CMJR+ (Mani et al., 2013). De plus, les porcs CMJR- ont une meilleure réponse immunitaire et leurs performances de croissance sont moins affectées en réponse à un challenge immunitaire induit par l'injection



P-value	CD40	GPX3	OAZ3	DGAT2	NMI	TRAF6	SLPI	PSEN1
qPCR 74 jours	*	**	**	*	>0.1	>0.1	*	>0.1
qPCR 132 jours	***	***	***	**	*	>0.1	**	*
Microarray	**	***	***	**	***	***	***	**
qPCR 84 jours	>0.1	***	**	>0.1	>0.1	**	0.06	**

Figure 21. Comparaison des valeurs d'expression de 8 gènes quantifiés par qPCR chez les porcs sélectionnés sur la CMJR. Les qPCR réalisés sur les porcs âgés de 74 et 132 jours correspondent aux porcs issu de la 8ième génération de sélection sur la CMJR, les qPCR réalisées sur des porcs âgés de 84 jours correspondent à des porcs issus d'un autre schéma expérimental ou les porcs étaient issus de la 9ième génération de sélection sur la CMJR. Les ratio d'expression représentent la valeur d'expression du gène des porcs CMJR- comparés aux CMJR+; le ratio est inversé et précédé d'un signe moins pour les valeurs inférieures à 1 (c.a.d. un ratio de 0,5 est indiqué -2). *CD40*, tumor necrosis factor receptor superfamily member 5; *GPX3*, glutathione peroxidase 3; *OAZ3*, ornithine decarboxylase antizyme 3; *DGAT2*, diacylglycerol O-acyltransferase 2; *NMI*, N-myc interactor; *TRAF6*, TNF receptor-associated factor 6; *SLPI*, secretory leukocyte peptidase inhibitor; *PSEN1*, presenilin 1.

d'un virus (porcine reproductive and respiration syndrome virus) que les porcs CMJR+ (Dunkelberger et al., 2015).

L'étude du sang par approche transcriptomique a permis la mise en évidence de gènes différemment exprimés en fonction de la lignée qui peuvent être de potentiels marqueurs ou prédicteurs utiles à la sélection génétique chez le porc. L'expression des gènes qui codent la gluthatione peroxydase (GPX3) et l'ornithine decarboxylase antizyme 3 (OAZ3) sont DE pour les porcs CMJR- comparés aux porcs CMJR+ à 74 et à 132 jours pour les porcs de 8ième génération et à 84 jours pour des porcs de la 9ième génération de sélection sur la CMJR. L'expression des 8 gènes différemment exprimés en fonction de la lignée (CD40 GPX3, OAZ3, DGAT2, NMI, TRAF6, SLPI, PSEN1) a également été mesurée sur des échantillons de sang prélevés sur des porcs âgés de 84 jours sélectionnés sur la CMJR (9ième génération de sélection). Les gènes qui codent pour GPX3 et OAZ3 sont sous-exprimées chez les porcs CMJR- par comparaison avec les porcs CMJR+ dans les deux schémas expérimentaux (**Figure 21**). Ces deux gènes sont également DE au niveau du muscle squelettique pour des porcs sélectionnés sur la CMJR (Vincent et al., 2015). Ce qui confirme la pertinence d'utilisation de ces deux gènes comme indicateur du statut métabolique de ces porcs. Les porcs CMJR- auraient un métabolisme oxydatif moins élevé comme cela a été démontré dans une expérience de sélection similaire (Grubbs et al., 2014) et l'expression de ces deux gènes pourrait être considérée comme un indicateur pertinent du statut métabolique des porcs sélectionnés sur la CMJR.

En parallèle de l'étude du transcriptome sanguin, les transcriptomes tissulaires des tissus adipeux (périrénal et sous-cutané), du muscle longissimus et du foie ont été obtenus. L'effet du régime alimentaire a eu un impact moins important sur le nombre de gènes différemment exprimés dans le sang que dans les tissus adipeux, le muscle longissimus et le foie. La comparaison des 4 transcriptomes tissulaires avec le transcriptome sanguin montre que 4 gènes DE sont communs (SLA-1 ; NKIRAS1 ; OAZ3 et TRAF6). Parmi ces 4 gènes, 3 sont impliqués dans la réponse immunitaire (SLA-1, NKIRAS1, TRAF6) et un gène (OAZ3) est impliqué dans le métabolisme oxydatif.

3.2 Le transcriptome sanguin : une source de biomarqueurs chez le poulet ?

L'étude de l'expression des gènes différemment exprimés au niveau du transcriptome des PBMCs chez le poulet a permis d'identifier des processus biologiques et/ou des fonctions moléculaires impliqués dans la réponse à la variation du type génétique. Comme chez le porc, l'effet de la lignée sur le profil d'expression des gènes différemment exprimés dans les PBMCs est plus marqué que l'effet du régime alimentaire chez le poulet. L'analyse fonctionnelle révèle que l'effet du type génétique s'exerce d'une part sur le catabolisme protéique avec la surexpression de gènes impliqués dans l'ubiquitination des protéines (USP12P1, UBE2G1, SKP2…) ce qui entraine leur dégradation, et d'autre part sur l'anabolisme protéique avec la surexpression de gènes impliqués dans la traduction (RPL19, EIF1, EIF2B3…). Certains gènes différemment exprimés au niveau des PBMCs ont un rôle dans le développement du tissu adipeux et sont surexprimés (RB1, EHBP1, PRPSAP1, SOX5, SPAG9) ou sous exprimés (MAOA, GNAL) chez les poulets de la lignée grasse en comparaison avec les poulets de la lignée maigre. Ces gènes ont déjà été identifiés comme important pour le dépôt de tissu adipeux uniquement abdominal chez le poulet (Zhang et al., 2012 ; Zhang et al., 2014). Le gène RB1 régule l'activité de la C/EBP-DNA binding lors de l'adipogenèse et a un rôle dans la différentiation des adipocytes (Fajas et al., 2002 ; Cole et al., 2004). Le gène MAOA code pour une enzyme impliquée dans l'obésité chez l'humain (Need et al., 2006). Le gène PRPSAP1 est associé avec le pourcentage de masse grasse en cas d'obésité (Lee et al., 2003) et le gène EHBP1 a un rôle dans la translocation des récepteurs du glucose vers la membrane de la cellule (Guilherme et al., 2004). Les gènes qui ont pu être mis en évidence, ainsi que les voies fonctionnelles identifiées, permettent d'améliorer nos connaissances sur les lignées grasse et maigre chez le poulet. Les gènes identifiés pourront être pris en compte pour l'élaboration de futurs schémas de sélection pour cette espèce.

3.3 Le transcriptome sanguin source d'information de variations alimentaires

Même si les résultats obtenus dans notre étude montrent que la variation de la source énergétique du régime alimentaire a un faible impact sur le transcriptome sanguin du porc et du poulet, certains gènes affectés par le régime méritent d'être explorés plus finement. En effet, ils pourraient être intéressants dans la perspective d'identification de biomarqueurs sanguins pouvant refléter la variation de la source énergétique du régime alimentaire. Parmi les gènes DE dans le sang entre les porcs nourris avec le régime HF et les porcs nourris avec

Tableau 13. Mesure de l'expression de gène dans le compartiment sanguin en lien avec une variation de la masse grasse.

Références	Espèce	Tissu	Méthode	Gènes	Variation de l'expression de gènes
Konieczna et al., 2014	Rat	PBMC	Microarray	CPT1A	Maigre > Gras
Oliver et al. , 2013	Rat	PBMC	qPCR	CPT1A	=
Reynes et al., 2015	Rat	PBMC	RT-PCR	CPT1A	Maigre < Gras
Díaz-Rúa et al., 2015	Rat	PBMC	Microarray	CPT1A	Maigre < Gras
Caimari et al., 2010 B	Rat	PBMC	Microarray	CPT1A	Maigre < Gras
Catalàn et al., 2015	Homme	PBMC	qPCR	LCN2	Maigre < Gras
Berisha et al., 2011	Homme	Sang total	Microarray	LCN2	Maigre < Gras
Telle Hansen et al., 2013	Homme	PBMC	qPCR	CPT1A	=

CPT1A, carnitine palmitoyltransferase 1A ; LCN2, lipocalin 2.

le régime LF, certains gènes DE sont impliqués dans la réponse immunitaire et dans le métabolisme lipidique, comme ce qui a pu être observé chez des mini-porcs nourris soit par un régime hyperlipidique soit par un régime hyperglucidique (Takahashi et al., 2012). Une augmentation de la masse grasse a été induite par la distribution d'un régime de type « cafétéria » par comparaison avec des rats nourris avec un régime standard. Vu la modification phénotypique observé il est intéressant de s'intéresser aux variations de transcrits dans le sang. Le nombre de gènes DE dans les PBMCs en fonction de la variation de la masse grasse était de 566 gènes (Caimari et al., 2010), ce qui est beaucoup plus élevé (>5 fois) que le nombre de gènes DE en fonction du régime chez le porc et le poulet. Cela pourrait être lié aux variations du type de nutriments qui constituent les régimes alimentaires, ou à la variation très importante d'apport énergétique entre le régime « cafétéria » et le régime standard chez le rongeur. De plus, les deux groupes de rongeurs présentaient un fort différentiel de poids vif et par conséquent de masse grasse alors que chez le porc, le régime HF induit une réduction de la masse grasse par comparaison avec les porcs nourris avec le régime LF. Chez le rongeur, il a été montré que le nombre de gènes DE était plus élevé au niveau des PBMCs qu'au niveau du cœur (Deans et al., 2009). Il a été montré que l'expression des gènes DE au niveau tissulaire étaient également DE au niveau du sang (Liew et al., 2006). Les gènes DE au niveau sanguin pourraient être le reflet de changements intervenus au niveau des tissus en réponse à de nombreux facteurs de variations, peu d'études portent sur la comparaison du transcriptome sanguin avec le transcriptome d'un tissu dans la littérature.

Parmi les gènes affectés par le régime chez le porc, le gène codant la lipocaline 2 (LCN2) est surexprimé chez les porcs ayant reçu un régime HF. Ce gène a été caractérisé récemment, et code pour une protéine impliquée dans le métabolisme glucidique et dans le métabolisme des lipides (Guo et al., 2013 ; Wu et al., 2014). La lipocaline 2 serait notamment impliquée dans la réponse immunitaire innée, pour laquelle le tissu adipeux joue un rôle important via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires tel que l'IFNγ et le TNFα (Zhao et al., 2014). Ce gène codant la LCN2 est également surexprimé au niveau des PBMCs chez les humains adultes qui ont une masse adipeuse plus élevée (Catalan et al., 2015) et/ou un poids ou un indice de masse corporelle plus élevé (**Tableau 13**). Toutefois, la LCN2 est dépendante du type de tissu et de l'âge. Or, plus un paramètre est dépendant de plusieurs critères, moins ce paramètre est robuste (Guo et al., 2013). Par conséquent la LCN2 n'est pas un marqueur spécifique d'une variation de la masse grasse.

Concernant le métabolisme lipidique, le gène qui code pour la CPT1A est également surexprimé chez les porcs nourris avec le régime HF en comparaison des porcs nourris avec le régime LF. La CPT1A est impliquée dans la β-oxydation des acides gras. La surexpression de ce gène peut refléter une plus forte capacité de β-oxydation par les cellules sanguines des porcs nourris avec un régime HF, comme ce qui a pu être observé pour le rat (Konieczna et al., 2014). Cependant, une autre étude montre que l'expression de la CPT1A dans les PBMCs ne varie pas entre des rats obèses et des rats contrôles (Oliver et al., 2013) ou entre les individus obèses et les individus de poids normal chez l'humain (Telle-Hansen et al., 2013). Alors que la valeur d'expression de la CPT1A est plus élevée dans le sang total d'enfants obèses que dans celui d'enfants de poids normal (Sanchez et al., 2012). Malgré l'absence de variation de masse grasse en fonction du régime alimentaire chez le poulet, on observe comme chez le porc, une surexpression du gène qui code la CPT1A chez les poulets ayant reçu un régime riche en fibres et en lipides. La généricité de ce marqueur suggère qu'il pourrait être associé non pas à la variation de la masse grasse mais à la différence de source énergétique du régime alimentaire. De plus, l'expression de ce gène a été mesurée chez des porcs et des poulets abattus 2 ou 3 h après leur dernier repas, respectivement. Ce délai post-prandial pourrait avoir affecté le nombre de gènes différentiellement exprimés en fonction du régime.

Conclusion et perspectives

L'originalité de ce travail portait sur la mise en évidence de marqueurs sanguins en lien avec le génotype et la variation du régime alimentaire chez le porc et le poulet. La mesure des paramètres plasmatiques par des approches standards ainsi que par des approches « omiques » (métabolomique et transcriptomique) ont permis de mettre en évidence des potentiels indicateurs sanguins en lien avec le génotype ou la variation de régime alimentaire chez le porc et chez le poulet. Ces résultats montrent que ces différentes analyses au niveau sanguin peuvent constituer des outils supplémentaires pour étudier les variations phénotypiques de façon dynamique pendant la vie de l'animal.

L'étude du transcriptome sanguin a permis d'identifier un potentiel marqueur générique de variation de la source énergétique du régime alimentaire, le gène CPT1A. Cependant, nous avons pu constater qu'une variation de génotype induisait un grand nombre de gènes différemment exprimés en comparaison de l'effet du régime. Ce faible effet du régime est même observé avec une modification du phénotype, comme c'est le cas chez les porcs. Notre étude ne permet pas d'identifier des marqueurs sanguins définis, avec des seuils définis qui indiqueraient des changements phénotypiques, mais des indicateurs de mécanismes métaboliques et physiologiques qui expliquent les différences d'engraissement. La mise en évidence de biomarqueurs sanguin est plus laborieuse quand les variations qui ont un impact sur le phénotype sont engendrées par des variations de régimes alimentaires qui restent à l'échelle « physiologique », comme c'est le cas dans notre étude, en comparaison d'études menées chez l'humain, ou chez le rongeur, où les variations de masse grasse atteignent une ampleur parfois pathologique allant jusqu'à l'obésité. Dans les perspectives du travail qui a été réalisé pendant la thèse, il serait intéressant de mesurer l'expression des gènes identifiés comme différemment exprimés en fonction de la lignée ou en fonction du régime dans d'autres schémas expérimentaux, ou sur de plus larges populations. Enfin, l'effet du régime pourrait être testé avec différentes durées d'intervalle post-prandial.

Notre étude montre de fortes différences entre lignées quant à la réponse immunitaire qu'il conviendrait de confirmer par des challenges immunitaires chez le porc et chez le poulet. Chez le porc sélectionné sur la CMJR, le nombre d'études permettant d'effectuer le lien entre le système immunitaire et la sélection est faible. Cependant, l'identification de gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif tel que GPX3 a pu être mise en évidence dans un autre schéma de sélection portant également sur la sélection sur l'efficacité alimentaire chez le porc. Chez le poulet, l'effet de la lignée induit une variation de masse grasse et les poulets les plus maigres sur-expriment les gènes (parmi les gènes ayant un plus fort différentiel

d'expression) qui sont impliqués dans la réponse immunitaire. Le lien entre la variation de la masse grasse et ses effets sur le système immunitaire a été largement décrit chez l'humain ou chez le rongeur dans la littérature, cependant cela n'avait pas encore été mis en évidence chez le poulet.

Les résultats montrent que les deux espèces n'ont pas répondu aux régimes alimentaires de la même façon au niveau du phénotype. La variation de la masse grasse a été induite par la variation de la source énergétique du régime alimentaire chez le porc, alors que chez le poulet aucune variation de la masse grasse n'a été observée. La variation de la masse grasse induite par le régime chez le porc est surtout due à une variation d'énergie ingérée ce qui n'a pas été le cas chez le poulet. En effet, chez ce dernier le régime n'a pas eu d'impact sur la consommation alimentaire et par conséquent sur l'énergie ingérée. Chez le porc, différents niveaux de substitution de glucides par des lipides et des fibres pourraient être distribués, ce qui permettrait de déterminer les niveaux à partir desquels la consommation et l'état d'engraissement sont impactés. Des cinétiques plasmatiques pourraient également être effectuées à partir des indicateurs mis en évidence dans notre étude, ainsi que des mesures d'expression de gènes, notamment concernant le gène de la CPT1A qui diffère en fonction de la source énergétique chez les deux espèces. La même expérience pourrait être réalisée chez le poulet afin de pouvoir valider le gène codant la CPT1A. La mesure d'expression de la protéine CPT1A pourrait également être effectuée.

La réponse métabolique face aux régimes alimentaire est différente en fonction des espèces. Chez le porc, la distribution des deux régimes alimentaires est associée à des différences de concentrations plasmatiques de plusieurs paramètres circulants, alors que ces régimes ont un faible impact sur les paramètres plasmatiques chez le poulet. Les métabolismes des glucides, des lipidiques et protéiques ont été influencés par la variation de la source énergétique chez les deux espèces cependant les voies affectées sont différentes. Chez le porc, les animaux les plus gras favorisent la lipogenèse de novo à partir des glucides présents dans le régime LF. Ils favorisent aussi le dépôt de lipides par la voie du catabolisme protéique via les AA néoglucogéniques. Les combinaisons de paramètres plasmatiques permettant d'expliquer la masse grasse chez les deux espèces devront être validées sur d'autres populations et pourraient être pris en compte lors de l'élaboration de nouveaux schémas de sélection ou pour aider à adapter les formules alimentaires des animaux.

Références bibliographiques

Afman L.A., Muller M., 2012. Human nutrigenomics of gene regulation by dietary fatty acids. Prog. Lipid Res. 51, 63-70.

Ambayya A., Su A.T., Osman N.H., Nik-Samsudin N.R., Khalid K., Chang K.M., Sathar J., Rajasuriar J.S., Yegappan S., 2014. Haematological reference intervals in a multiethnic population. PLos One. 9, e91968.

Ameri M., Schnaars H.A., Sibley J.R., Honor D.J., 2011. Stability of hematologic analytes in monkey, rabbit, rat, and mouse blood stored at 4 degrees C in EDTA using the ADVIA 120 hematology analyzer. Vet. Clin. Pathol. 40, 188-193.

Anderson L., 2014. Six decades searching for meaning in the proteome. J Proteomics 107, 24-30.

Anderson L., Anderson N.G., 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5421-5425.

Asare A.L., Kolchinsky S.A., Gao Z., Wang R., Raddassi K., Bourcier K., Seyfert-Margolis V., 2008. Differential gene expression profiles are dependent upon method of peripheral blood collection and RNA isolation. BMC Genomics 9, 474.

Badimon L., Badimon J.J., Turitto V.T., Vallabhajosula S., Fuster V., 1988. Platelet thrombus formation on collagen type I. A model of deep vessel injury. Influence of blood rheology, von Willebrand factor, and blood coagulation. Circulation 78, 1431-1442.

Baéza E., Brillard J.P. 2005. Effet d'une réversion du sexe sur le développement musculaire du poulet. In Sixième journées de la recherche avicole (Saint-Malo), pp. 469-472.

Baéza E., Gondret F., Chartrin P., Le Bihan-Duval E., Berri C., Gabriel I., Narcy A., Lessire M., Metayer-Coustard S., Collin A., Jégou M., Lagarrigue S., Duclos M.J., 2015. The ability of genetically lean or fat slow-growing chickens to synthesize and store lipids is not altered by the dietary energy source. Animal 9, 1643-52.

Baéza E., Le Bihan-Duval E., 2013. Chicken lines divergent for low or high abdominal fat deposition: a relevant model to study the regulation of energy metabolism. Animal. 7, 965-973.

Barea R., Dubois S., Gilbert H., Sellier P., van Milgen J., Noblet J., 2010. Energy utilization in pigs selected for high and low residual feed intake. J. Anim. Sci. 88, 2062-2072.

Bartov I., Bornstein S., Lipstein B., 1974. Effect of calorie to protein ratio on the degree of fatness in broilers fed on practical diets. Br. Poult. Sci. 15, 107-117.

Baulande S., Criqui A., Duthieuw M., 2014. Les microARN circulants, une nouvelle classe de biomarqueurs pour la médecine. Med Sci (Paris) 30, 289-296.

Beccavin C., Chevalier B., Simon J., Duclos M.J., 1999. Circulating insulin-like growth factors (IGF-I and -II) and IGF binding proteins in divergently selected fat or lean chickens: effect of prolonged fasting. Growth Horm. IGF Res. 9, 187-194.

Bee G., Biolley C., Guex G., Herzog W., Lonergan S.M., Huff-Lonergan E., 2006. Effects of available dietary carbohydrate and preslaughter treatment on glycolytic potential, protein degradation, and quality traits of pig muscles. J. Anim. Sci. 84, 191-203.

Berisha S.Z., Serre D., Schauer P., Kashyap S.R., Smith J.D., 2011. Changes in whole blood gene expression in obese subjects with type 2 diabetes following bariatric surgery: a pilot study. PLos One. 6, e16729.

Bernard C., 1877. Leçon sur le diabète et la glycogenèse animale. J. B. Baillère et fils (Paris).

Berri C., Le Bihan-Duval E., Baéza E., Chartrin P., Millet N., Bordeau T., 2005. Effect of selection for or against abdominal fatness on muscle and meat characteristics of broilers. In Proceedings XVII WPSA European Symposium on the Quality of Poultry Meat, Doorwerth, The Netherlands, 23-26/05/05, 266-270.

Berschauer F., Close W.H., Stephens D.B., 1983. The influence of protein:energy value of the ration and level of feed intake on the energy and nitrogen metabolism of the growing pig. 2. N metabolism at two environmental temperatures. Br. J. Nutr. 49, 271-283.

Birse C., Lagier R., FitzHugh W., Pass H., Rom W., Edell E., Bungum A., Maldonado F., Jett J., Mesri M., Sult E., Joseloff E., Li A., Heidbrink J., Dhariwal G., Danis C., Tomic J., Bruce R., Moore P., He T., Lewis M., Ruben S., 2015. Blood-based lung cancer biomarkers identified through proteomic discovery in cancer tissues, cell lines and conditioned medium. Clinical Proteomics 12, 18.

Biomarkers Definitions Working Group, 2001. Biomarkers and surrogate endpoints : preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther. 69, 89-95

Breves G., Kock J., Schröder B., 2007. Transport of nutrients and electrolytes across the intestinal wall in pigs. Livest. Sci. 109, 4-13.

Brosnan J.T., Wijekoon E.P., Warford-Woolgar L., Trottier N.L., Brosnan M.E., Brunton J.A., Bertolo R.F., 2009. Creatine synthesis is a major metabolic process in neonatal piglets and has important implications for amino acid metabolism and methyl balance. J. Nutr. 139, 1292-1297.

Buermans H.P.J., den Dunnen J.T., 2014. Next generation sequencing technology: Advances and applications. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1842, 1932-1941.

Bunter K.L., Cai W., Johnston D.J., Dekkers J.C., 2010. Selection to reduce residual feed intake in pigs produces a correlated response in juvenile insulin-like growth factor-I concentration. J. Anim. Sci. 88, 1973-1981.

Bunter K.L., Hermesch S., Luxford B.G., Graser H., Crump R.E., 2005. Insulin-like growth factor-I measured in juvenile pigs is genetically correlated with economically important performance traits. Aust. J. Exp. Agric. 45, 783-792.

Buyse J., Decuypere E., 1999. The role of the somatotrophic axis in the metabolism of the chicken. Domest. Anim. Endocrinol. 17, 245-255.

Byerly M.S., Simon J., Lebihan-Duval E., Duclos M.J., Cogburn L.A., Porter T.E., 2009. Effects of BDNF, T3, and corticosterone on expression of the hypothalamic obesity gene network in vivo and in vitro. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 296, R1180-1189.

Caimari A., Oliver P., Rodenburg W., Keijer J., Palou A., 2010. Slc27a2 expression in peripheral blood mononuclear cells as a molecular marker for overweight development. Int J Obes (Lond) 34, 831-839.

Camp L.K., Southern L.L., Bidner T.D., 2003. Effect of carbohydrate source on growth performance, carcass traits, and meat quality of growing-finishing pigs. J. Anim. Sci. 81, 2488-2495.

Carew L.B., Jr., Hill F.W., 1964. Effect of corn oil on metabolic efficiency of energy utilization by chicks. J. Nutr. 83, 293-299.

Carew L.B., Jr., Hopkins D.T., Nesheim M.C., 1964. Influence of amount and type of fat on metabolic efficiency of energy utilization by the chick. J. Nutr. 83, 300-306.

Catalan V., Gomez-Ambrosi J., Rodriguez A., Ramirez B., Valenti V., Moncada R., Silva C., Salvador J., Fruhbeck G., 2015. Peripheral mononuclear blood cells contribute to the obesity-associated inflammatory state independently of glycemic status: involvement of the novel proinflammatory adipokines chemerin, chitinase-3-like protein 1, lipocalin-2 and osteopontin. Genes Nutr. 10, doi: 10.1007/s12263-015-0460-8.

Cholewa J.M., Guimaraes-Ferreira L., Zanchi N.E., 2014. Effects of betaine on performance and body composition: a review of recent findings and potential mechanisms. Amino Acids 46, 1785-1793.

Cochereau D., Junot C., 2013. Apport de la métabolomique à la détection de biomarqueurs prédictifs. Oncologie 15, 461-466.

Coen M., Ruepp S.U., Lindon J.C., Nicholson J.K., Pognan F., Lenz E.M., Wilson I.D., 2004. Integrated application of transcriptomics and metabonomics yields new insight into the toxicity due to paracetamol in the mouse. J. Pharm. Biomed. Anal. 35, 93-105.

Cole K., Harmon A., Harp J., Patel Y., 2004. Rb regulates C/EBPbeta-DNA-binding activity during 3T3-L1 adipogenesis. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 286, C349 - C354.

Coma J., Zimmerman D.R., Carrion D., 1995. Relationship of rate of lean tissue growth and other factors to concentration of urea in plasma of pigs. J. Anim. Sci. 73, 3649-3656.

Comte B., Vidal H., Laville M., Riou J.P., 1990. Influence of thyroid hormones on gluconeogenesis from glycerol in rat hepatocytes: a dose-response study. Metabolism 39, 259-263.

Cowland J.B., Borregaard N., 1997. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. Genomics 45, 17-23.

Cruzen S.M., Harris A.J., Hollinger K., Punt R.M., Grubbs J.K., Selsby J.T., Dekkers J.C., Gabler N.K., Lonergan S.M., Huff-Lonergan E., 2013. Evidence of decreased muscle protein turnover in gilts selected for low residual feed intake. J. Anim. Sci. 91, 4007-4016.

Dakovic N., Terezol M., Pitel F., Maillard V., Elis S., Leroux S., Lagarrigue S., Gondret F., Klopp C., Baeza E., Duclos M.J., Roest Crollius H., Monget P., 2014. The loss of adipokine genes in the chicken genome and implications for insulin metabolism. Mol. Biol. Evol. 31, 2637-2646.

Daumas G., 2010. Dissection européenne de la carcasse de porc : composition des carcasses de porcs charcutiers. Techni porc 33, 37-40.

de Mello V.D., Kolehmanien M., Schwab U., Pulkkinen L., Uusitupa M., 2012. Gene expression of peripheral blood mononuclear cells as a tool in dietary intervention studies: What do we know so far? Mol. Nutr. Food Res. 56, 1160-1172.

Deans K.J., Minneci P.C., Chen H., Kern S.J., Logun C., Alsaaty S., Norsworthy K.J., Theel S.M., Sennesh J.D., Barb J.J., Munson P.J., Danner R.L., Solomon M.A., 2009. Impact of animal strain on gene expression in a rat model of acute cardiac rejection. BMC Genomics 10, 1471-2164.

Debey S., Zander T., Brors B., Popov A., Eils R., Schultze J.L., 2006. A highly standardized, robust, and cost-effective method for genome-wide transcriptome analysis of peripheral blood applicable to large-scale clinical trials. Genomics 87, 653-664.

Diaz-Rua R., Keijer J., Caimari A., van Schothorst E.M., Palou A., Oliver P., 2015. Peripheral blood mononuclear cells as a source to detect markers of homeostatic alterations caused by the intake of diets with an unbalanced macronutrient composition. J. Nutr. Biochem. 26, 398-407.

Dunkelberger J.R., Boddicker N.J., Serão N.V.L., Young J.M., Rowland R.R.R., Dekkers J.C.M., 2015. Response of pigs divergently selected for residual feed intake to experimental infection with the PRRS virus. Livest. Sci. 177, 132-141.

Eckersall P.D., Saini P.K., McComb C., 1996. The acute phase response of acid soluble glycoprotein, alpha(1)-acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig. Vet. Immunol. Immunopathol. 51, 377-385.

Edwards H.M., Jr., Hart P., 1971. Carcass composition of chickens fed carbohydrate-free diets containing various lipid energy sources. J. Nutr. 101, 989-996.

Ellis P.R., Roberts F.G., Low A.G., Morgan L.M., 1995. The effect of high-molecular-weight guar gum on net apparent glucose absorption and net apparent insulin and gastric inhibitory polypeptide production in the growing pig: relationship to rheological changes in jejunal digesta. Br. J. Nutr. 74, 539-556.

Etherton T.D., Aberle E.D., Thompson E.H., Allen C.E., 1981. Effects of cell size and animal age on glucose metabolism in pig adipose tissue. J. Lipid Res. 22, 72-80.

Fabian J., Chiba L.I., Kuhlers D.L., Frobish L.T., Nadarajah K., McElhenney W.H., 2003. Growth performance, dry matter and nitrogen digestibilities, serum profile, and carcass and meat quality of pigs with distinct genotypes. J. Anim. Sci. 81, 1142-1149.

Fajas L., Egler V., Reiter R., Hansen J., Kristiansen K., Debril M., Miard S., Auwerx J., 2002. The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation. Dev. Cell 3, 903 - 910.

Faure-Cohades J., 2013. Metabolisme energétique musculaire, homéostasie et qualités des viandes chez le porc. Thèse de doctorat, Institut Supérieur des Sciences Agronomiquese, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage, FRA.

Faure J., Lefaucheur L., Bonhomme N., Ecolan P., Meteau K., Coustard S.M., Kouba M., Gilbert H., Lebret B., 2013. Consequences of divergent selection for residual feed intake in pigs on muscle energy metabolism and meat quality. Meat Sci. 93, 37-45.

Fisher C., 1984. Fat deposition in broilers. In: Fat in animal nutrition, pp.437-470, J.Wiseman editor. London: Butterworth.

Font-i-Furnols M., Carabus A., Pomar C., Gispert M., 2015. Estimation of carcass composition and cut composition from computed tomography images of live growing pigs of different genotypes. Animal. 9, 166-178.

Foster W.H., Kilpatrick D.J., Heaney I.H., 1983. Genetic variation in the efficiency of energy utilization by the fattening pig. Anim. Sci. 37, 387-393.

Fouad A.M., El-Senousey H.K., 2014. Nutritional factors affecting abdominal fat deposition in poultry: a review. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 27, 1057-1068.

Frayn K.N., Macdonald I.A., 1996. Adipose tissue circulation. In: Benett and S.M. Gardiner(Eds.) Nervous control of blood vessels. pp. 505-539.

Friendship R.M., Lumsden J.H., McMillan I., Wilson M.R., 1984. Hematology and biochemistry reference values for Ontario swine. Canadian Journal of Comparative Medicine 48, 390-393.

Fulks R.M., Li J.B., Goldberg A.L., 1975. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. J. Biol. Chem. 250, 290-298.

Furuse M., Tachibana T., Ohgushi A., Ando R., Yoshimatsu T., Denbow D.M., 2001. Intracerebroventricular injection of ghrelin and growth hormone releasing factor inhibits food intake in neonatal chicks. Neurosci. Lett. 301, 123-126.

Gardan D., 2007 Caractéristiques fonctionnelles des adipocytes selon leur localisation anatomique chez le porc : particularités des adipocytes intramusculaires. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, Rennes, FRA.

Géraert P.A., Leclercq B., Larbier M., 1987. Effects of dietary glucogenic amino acid supplementation on growth performance, body composition and plasma free amino acid levels in genetically lean and fat chickens. Reprod. Nutr. Dev. 27, 1041-1051.

Géraert P.A., MacLeod M.G., Leclercq B., 1988. Energy metabolism in genetically fat and lean chickens: diet- and cold-induced thermogenesis. J. Nutr. 118, 1232-1239.

Ghanim H., Aljada A., Hofmeyer D., Syed T., Mohanty P., Dandona P., 2004. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. Circulation 110, 1564-1571.

Ghosh S., Dent R., Harper M.E., Gorman S.A., Stuart J.S., McPherson R., 2010. Gene expression profiling in whole blood identifies distinct biological pathways associated with obesity. BMC Med Genomics 3, 56.

Gibney M.J., Walsh M., Brennan L., Roche H.M., German B., van Ommen B., 2005. Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. Am. J. Clin. Nutr. 82, 497-503.

Gilad S., Meiri E., Yogev Y., Benjamin S., Lebanony D., Yerushalmi N., Benjamin H., Kushnir M., Cholakh H., Melamed N., Bentwich Z., Hod M., Goren Y., Chajut A., 2008. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. PLos One. 3, e3148.

Gilbert H., Bidanel J.P., Gruand J., Caritez J.C., Billon Y., Guillouet P., Lagant H., Noblet J., Sellier P., 2007. Genetic parameters for residual feed intake in growing pigs, with emphasis on genetic relationships with carcass and meat quality traits. J. Anim. Sci. 85, 3182-3188.

Girard J.P., Bout J., D. S. 1988. Lipides et qualités des tissus adipeux et musculaires de porc facteurs de variation. In Journées de la Recherche Porcine, pp. 250-278.

Gondret F., Louveau I., Mourot J., Duclos M.J., Lagarrigue S., Gilbert H., van Milgen J., 2014. Dietary energy sources affect the partition of body lipids and the hierarchy of energy metabolic pathways in growing pigs differing in feed efficiency. J. Anim. Sci. 92, 4865-4877.

Gregoire F.M., Smas C.M., Sul H.S., 1998. Understanding adipocyte differentiation. Physiol. Rev. 78, 783-809.

Griffiths L., Leeson S., Summers J.D., 1977. Fat Deposition in Broilers: Effect of Dietary Energy to Protein Balance, and Early Life Caloric Restriction on Productive Performance and Abdominal Fat Pad Size. Poult. Sci. 56, 638-646.

Grubbs J.K., Huff-Lonergan E., Gabler N.K., JC M.D., Lonergan S.M., 2014. Liver and skeletal muscle mitochondria proteomes are altered in pigs divergently selected for residual feed intake. J. Anim. Sci. 92, 1995-2007.

Guilherme A., Soriano N., Furcinitti P., Czech M., 2004. Role of EHD1 and EHBP1 in perinuclear sorting and insulin-regulated GLUT4 recycling in 3T3-L1 adipocytes. J. Biol. Chem. 279, 40062 - 40075.

Guo H., Bazuine M., Jin D., Huang M.M., Cushman S.W., Chen X., 2013. Evidence for the regulatory role of lipocalin 2 in high-fat diet-induced adipose tissue remodeling in male mice. Endocrinology 154, 3525-3538.

Havel P.J., 2005. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. Nutr Rev 63, 133-157.

He Q., Ren P., Kong X., Wu Y., Wu G., Li P., Hao F., Tang H., Blachier F., Yin Y., 2012. Comparison of serum metabolite compositions between obese and lean growing pigs using an NMR-based metabonomic approach. J. Nutr. Biochem. 23, 133-139.

Henry Y., 1977. Développement morphologique et métabolique du tissu adipeux chez le porc : influence de la sélection, de l'alimentation et du mode d'élevage. Annales de biologie animale, biochimie, biophysique, 1977, 17 (5B), pp. 923-952.

Hermier D., Chapman M.J., Leclercq B., 1984. Plasma lipoprotein profile in fasted and refed chickens of two strains selected for high or low adiposity. J. Nutr. 114, 1112-1121.

Hermier D., Quignard-Boulange A., Dugail I., Guy G., Salichon M.R., Brigant L., Ardouin B., Leclercq B., 1989. Evidence of enhanced storage capacity in adipose tissue of genetically fat chickens. J. Nutr. 119, 1369-1375.

Hillgartner F.B., Charron T., Chesnut K.A., 1996. Alterations in nutritional status regulate acetyl-CoA carboxylase expression in avian liver by a transcriptional mechanism. Biochem. J. 319 (Pt 1), 263-268.

Hoenig M.R., Cowin G., Buckley R., McHenery C., Coulthard A., 2011. Low density lipoprotein cholesterol is inversely correlated with abdominal visceral fat area: a magnetic resonance imaging study. Lipids Health Dis. 10, article 12.

Hossner K.L., McCusker R.H., Dodson M.V., 1997. Insulin-like growth factors and their binding proteins in domestic animals. Anim. Sci. 64, 1-15.

Huang da W., Sherman B.T., Lempicki R.A., 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res. 37, 1-13.

Huang da W., Sherman B.T., Lempicki R.A., 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature Protocols 4, 44-57.

Isaksson H., Landberg R., Sundberg B., Lundin E., Hallmans G., Zhang J.X., Tidehag P., Erik Bach Knudsen K., Moazzami A.A., Aman P., 2013. High-fiber rye diet increases ileal excretion of energy and macronutrients compared with low-fiber wheat diet independent of meal frequency in ileostomy subjects. Food Nutr Res. 57.

Isken F., Klaus S., Osterhoff M., Pfeiffer A.F., Weickert M.O., 2010. Effects of long-term soluble vs. insoluble dietary fiber intake on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. J. Nutr. Biochem. 21, 278-284.

Jin D., Guo H., Bu S.Y., Zhang Y., Hannaford J., Mashek D.G., Chen X., 2011. Lipocalin 2 is a selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation and function in lipid homeostasis and energy expenditure. FASEB J. 25, 754-764.

Jlali M., Gigaud V., Metayer-Coustard S., Sellier N., Tesseraud S., Le Bihan-Duval E., Berri C., 2012. Modulation of glycogen and breast meat processing ability by nutrition in chickens: effect of crude protein level in 2 chicken genotypes. J. Anim. Sci. 90, 447-455.

Jorgensen H., Zhao X.Q., Eggum B. O., 1996. The influence of dietary fibre and environmental temperature on the development of the gastrointestinal tract, digestibility, degree of fermentation in the hind-gut and energy metabolism in pigs. Br. J. Nutr., 75, 375-378.

Kamm R.C., Smith A.G., 1972. Nucleic acid concentrations in normal human plasma. Clin. Chem. 18, 519-522.

Kennedy B.W., van der Werf J.H., Meuwissen T.H., 1993. Genetic and statistical properties of residual feed intake. J. Anim. Sci. 71, 3239-3250.

Kerr B.J., Kellner T.A., Shurson G.C., 2015. Characteristics of lipids and their feeding value in swine diets. J Anim Sci Biotechnol 6, 30.

Kerr B.J., Shurson G.C., 2013. Strategies to improve fiber utilization in swine. J Anim Sci Biotechnol 4, 11.

Keun H., Athersuch T., 2011. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-Based Metabolomics, In: Metz T.O. (Ed.) Metabolic Profiling. Humana Press, pp. 321-334.

Kim M.S., Pinto S.M., Getnet D., Nirujogi R.S., Manda S.S., Chaerkady R., Madugundu A.K., Kelkar D.S., Isserlin R., Jain S., Thomas J.K., Muthusamy B., Leal-Rojas P., Kumar P., Sahasrabuddhe N.A., Balakrishnan L., Advani J., George B., Renuse S., Selvan L.D., Patil A.H., Nanjappa V., Radhakrishnan A., Prasad S., Subbannayya T., Raju R., Kumar M., Sreenivasamurthy S.K., Marimuthu A., Sathe G.J., Chavan S., Datta K.K., Subbannayya Y., Sahu A., Yelamanchi S.D., Jayaram S., Rajagopalan P., Sharma J., Murthy K.R., Syed N., Goel R., Khan A.A., Ahmad S., Dey G., Mudgal K., Chatterjee A., Huang T.C., Zhong J., Wu X., Shaw P.G., Freed D., Zahari M.S., Mukherjee K.K., Shankar S., Mahadevan A., Lam H., Mitchell C.J., Shankar S.K., Satishchandra P., Schroeder J.T., Sirdeshmukh R., Maitra A., Leach S.D., Drake C.G., Halushka M.K., Prasad T.S., Hruban R.H., Kerr C.L., Bader G.D., Iacobuzio-Donahue C.A., Gowda H., Pandey A., 2014. A draft map of the human proteome. Nature. 509, 575-581.

Koch R.M., Swiger L.A., Chambers D., Gregory K.E., 1963. Efficiency of Feed Use in Beef Cattle. J. Anim. Sci. 22, 486-494.

Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K., 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature. 402, 656-660.

Konieczna J., Sanchez J., van Schothorst E.M., Torrens J.M., Bunschoten A., Palou M., Pico C., Keijer J., Palou A., 2014. Identification of early transcriptome-based biomarkers related to lipid metabolism in peripheral blood mononuclear cells of rats nutritionally programmed for improved metabolic health. Genes Nutr. 9, 366.

Kreuzer M., Hanneken H., Wittmann M., Gerdemann M.M., Machmuller A., 2002. Effects of different fibre sources and fat addition on cholesterol and cholesterol-related lipids in blood serum, bile and body tissues of growing pigs. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 86, 57-73.

Krogdahl A., 1985. Digestion and absorption of lipids in poultry. J. Nutr. 115, 675-685.

Kussmann M., Raymond F., Affolter M., 2006. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. J. Biotechnol. 124, 758-787.

Labussière E., Dubois S., Gilbert H., Thibault J.N., Le Floc'h N., Noblet J., van Milgen J., 2015. Effect of inflammation stimulation on energy and nutrient utilization in piglets selected for low and high residual feed intake. Animal. 9, 1653-1661.

Larbier M., Leclercq B., 1992. Physiologie digestive. In Nutrition et alimentation des volailles (ed. INRA, Paris), pp 28-61.

Le Naou T., Le Floc'h N., Louveau I., Gilbert H., Gondret F., 2012. Metabolic changes and tissue responses to selection on residual feed intake in growing pigs. J. Anim. Sci. 90, 4771-4780.

Leclercq B., 1983. The influence of dietary protein content on the performance of genetically lean or fat growing chickens. Br. Poult. Sci. 24, 581-587.

Leclercq B., 1988. Genetic selection of meat-type chickens for high or low abdominal fat content. In Leanness in domestic birds: genetic, metabolic and hormonal aspects (ed. B Leclercq and CC Whitehead), pp 25-40. Butterworths & Co., Ltd-INRA, London, UK.

Leclercq B., Chagneau A.M., Cochard T., Hamzaoui S., Larbier M., 1993. Comparative utilisation of sulphur-containing amino acids by genetically lean or fat chickens. Br. Poult. Sci. 34, 383-391.

Leclercq B., Hermier D., Salichon M.R., 1984. Effects of age and diet on plasma lipid and glucose concentrations in genetically lean or fat chickens. Reprod., Nutr. et Dev. 24, 53-61.

Lee Y.H., Tokraks S., Pratley R.E., Bogardus C., Permana P.A., 2003. Identification of differentially expressed genes in skeletal muscle of non-diabetic insulin-resistant and insulin-sensitive Pima Indians by differential display PCR. Diabetologia 46, 1567-1575.

Lefaucheur L., Lebret B., Ecolan P., Louveau I., Damon M., Prunier A., Billon Y., Sellier P., Gilbert H., 2011. Muscle characteristics and meat quality traits are affected by divergent selection on residual feed intake in pigs. J. Anim. Sci. 89, 996-1010.

Lerner A.B., 1953. Metabolism of phenylalanine and tyrosine. Adv Enzymol Relat Subj Biochem. 14, 73-128.

Lessire M., 1995. Qualité des viandes de volaille: le rôle des matières grasses alimentaires. INRA Prod. Anim. 8, 335-340.

Leveille G.A., Romsos D.R., Yeh Y.-Y., 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.

Li L., Ying L., Naesens M., Xiao W., Sigdel T., Hsieh S., Martin J., Chen R., Liu K., Mindrinos M., Davis R., Sarwal M., 2008. Interference of globin genes with biomarker discovery for allograft rejection in peripheral blood samples. Physiol. Genomics 32, 190-197.

Liew C.C., Ma J., Tang H.C., Zheng R., Dempsey A.A., 2006. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. J. Lab. Clin. Med. 147, 126-132.

Louveau I., Bonneau M., 2001. Biology and actions of somatotropin in the pig. In "Biotechnology in animal husbandry" Vol.5, Ed. Hofman M. and Anné J., the Netherlands

Louveau I., Gondret F., 2004. Regulation of development and metabolism of adipose tissue by growth hormone and the insulin-like growth factor system. Domest. Anim. Endocrinol. 27, 241-255.

Lyvers Peffer P., Lin X., Jacobi S.K., Gatlin L.A., Woodworth J., Odle J., 2007. Ontogeny of carnitine palmitoyltransferase I activity, carnitine-Km, and mRNA abundance in pigs throughout growth and development. J. Nutr. 137, 898-903.

Mach N., Gao Y., Lemonnier G., Lecardonnel J., Oswald I.P., Estelle J., Rogel-Gaillard C., 2013. The peripheral blood transcriptome reflects variations in immunity traits in swine: towards the identification of biomarkers. BMC Genomics 14, 894.

Maffei M., Halaas J., Ravussin E., Pratley R.E., Lee G.H., Zhang Y., Fei H., Kim S., Lallone R., Ranganathan S., et al., 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. Nat. Med. 1, 1155-1161.

Mani V., Harris A.J., Keating A.F., Weber T.E., Dekkers J.C., Gabler N.K., 2013. Intestinal integrity, endotoxin transport and detoxification in pigs divergently selected for residual feed intake. J. Anim. Sci. 91, 2141-2150.

Marion D., 2013. An introduction to biological NMR spectroscopy. Mol. Cell. Proteomics 12, 3006-3025.

Martin F.P., Montoliu I., Collino S., Scherer M., Guy P., Tavazzi I., Thorimbert A., Moco S., Rothney M.P., Ergun D.L., Beaumont M., Ginty F., Qanadli S.D., Favre L., Giusti V., Rezzi S., 2013. Topographical body fat distribution links to amino acid and lipid metabolism in healthy obese women PLos One. 8, e73445.

Matsuhisa M., Nishizawa H., Ikeda M., Kubota M., Arai S., Kawamori R., Yamasaki Y., 1998. Prior muscular contraction enhances disposal of glucose analog in the liver and muscle. Metabolism 47, 44-49.

McDermott J.E., Wang J., Mitchell H., Webb-Robertson B.J., Hafen R., Ramey J., Rodland K.D., 2013. Challenges in Biomarker Discovery: Combining Expert Insights with Statistical Analysis of Complex Omics Data. Expert Opin Med Diagn 7, 37-51.

McNabb F.M.A., 1992. Thyroid Hormones. Prentice Hall, Englewood Cliffs.

Metzker M.L., 2010. Sequencing technologies - the next generation. Nat. Rev. Genet. 11, 31-46.

Mignon-Grasteau S., Moreri U., Fablet J., Tixier-Boichard M., David J., Pinard-van der Laan M.H., Bas Rodenburg T., Zerjal T. 2014. Heritability to body surface temperature measured by infrared thermography in laying hens exposed to high temperature conditions. In XIVth European poultry conference (Stavanger, Norway), p. 468.

Minihane A.M., 2013. The genetic contribution to disease risk and variability in response to diet: where is the hidden heritability? Proc. Nutr. Soc. 72, 40-47.

Mohr S., Liew C.C., 2007. The peripheral-blood transcriptome: new insights into disease and risk assessment. Trends Mol. Med. 13, 422-432.

Montagne L., Loisel F., Le Naou T., Gondret F., Gilbert H., Le Gall M., 2014. Difference in short-term responses to a high-fiber diet in pigs divergently selected for residual feed intake. J. Anim. Sci. 92, 1512-1523.

Mooney M., Bond J., Monks N., Eugster E., Cherba D., Berlinski P., Kamerling S., Marotti K., Simpson H., Rusk T., Tembe W., Legendre C., Benson H., Liang W., Webb C.P., 2013. Comparative RNA-Seq and microarray analysis of gene expression changes in B-cell lymphomas of Canis familiaris. PLos One. 8, e61088.

Mortazavi A., Williams B.A., McCue K., Schaeffer L., Wold B., 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nat Methods 5, 621-628.

Mullur R., Liu Y.Y., Brent G.A., 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. Physiol. Rev. 94, 355-382.

Myer R.O., Combs G.E., 1991. Fat supplementation of diets containing a high level of oats for growing-finishing swine. J. Anim. Sci. 69, 4665-4669.

Nault R., Fader K.A., Zacharewski T., 2015. RNA-Seq versus oligonucleotide array assessment of dose-dependent TCDD-elicited hepatic gene expression in mice. BMC Genomics 16, 373.

Need A.C., Ahmadi K.R., Spector T.D., Goldstein D.B., 2006. Obesity is associated with genetic variants that alter dopamine availability. Ann. Hum. Genet. 70, 293-303.

Noblet J., Le Goff G., 2001. Effect of dietary fibre on the energy value of feeds for pigs. Anim. Feed Sci. Technol. 90, 35-52.

O'Grada C.M., Morine M.J., Morris C., Ryan M., Dillon E.T., Walsh M., Gibney E.R., Brennan L., Gibney M.J., Roche H.M., 2014. PBMCs reflect the immune component of the WAT transcriptome--implications as biomarkers of metabolic health in the postprandial state. Mol. Nutr. Food Res. 58, 808-820.

O'Hea E.K., Leveille G.A., 1968a. Lipid metabolism in isolated adipose tissue of the domestic pig (Sus domesticus). Comp. Biochem. Physiol. 26, 1081-1089.

O'Hea E.K., Leveille G.A., 1968b. Lipogenesis in isolated adipose tissue of the domestic chick (Gallus domesticus). Comp. Biochem. Physiol. 26, 111-120.

Oliver P., Reynes B., Caimari A., Palou A., 2013. Peripheral blood mononuclear cells: a potential source of homeostatic imbalance markers associated with obesity development. Pflugers Arch. 465, 459-468.

Ordovas Munoz J.M., 2013. Predictors of obesity: the "power" of the omics. Nutr Hosp 28 Suppl 5, 63-71.

Paris A., André F., Antignac J.P., Le Bizec B., Bonneau M., Briant C., Caraty A., Chilliard Y., Cognié Y., Combarnous Y., Cravedi J.P., Fabre-Nys C., Fernandez-Suarez A., Fostier A., Humblot P., Laudet V., Leboeuf B., Louveau I., Malpaux B., Martinat-Botté F., Maurel M.C., Pelicer-Rubio M.T., Picard-Hagen N., Pinault L., Pinel G., Ponsart C., Popot M.A., Schmidely P., Toutain P.L., Zalko D., 2006. Hormones et promoteur de croissance en productions animales : de la physiologie à l'évaluation du risque. INRA Prod. Anim. 19, 151-240.

Pascual V., Chaussabel D., Banchereau J., 2010. A genomic approach to human autoimmune diseases. Annu. Rev. Immunol. 28, 535-571.

Polakof S., Diaz-Rubio M.E., Dardevet D., Martin J.F., Pujos-Guillot E., Scalbert A., Sebedio J.L., Mazur A., Comte B., 2013. Resistant starch intake partly restores metabolic and inflammatory alterations in the liver of high-fat-diet-fed rats. J. Nutr. Biochem. 24, 1920-1930.

Prunier A., Heinonen M., Quesnel H., 2010. High physiological demands in intensively raised pigs: impact on health and welfare. Animal 4, 886-898.

Quiniou N., Noblet J., 2012. Effect of the dietary net energy concentration on feed intake and performance of growing-finishing pigs housed individually. J. Anim. Sci. 90, 4362-4372.

Rainbird A.L., Low A.G., 1986. Effect of various types of dietary fibre on gastric emptying in growing pigs. Br. J. Nutr., 55, 111-121.

Rauw W.M., Kanis E., Noordhuizen-Stassen E.N., Grommers F.J., 1998. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. Livest. Prod. Sci. 56, 15-33.

R Development Core Team 2008. R: A language and environment for statistical computing (Vienna, Austria).

Rees W.D., Hay S.M., 2014. Lipocalin-2 (Lcn2) expression is mediated by maternal nutrition during the development of the fetal liver. Genes Nutr. 9, 380.

Ricard F.H., Leclercq B., 1984. Similitude de la composition des lipides intramusculaires chez des poulets génétiquement maigres ou gras. Genet. Sel. Evol. 16, 127-130.

Ricard F.H., Leclercq B., Marché G., 1982. Rendement en viande de poulets de deux lignées sélectionnées sur l'état d'engraissement. Genet. Sel. Evol. 14, 551-556.

Ricard F.H., Leclercq B., Touraille C., 1983. Selecting broilers for low or high abdominal fat: Distribution of carcass fat and quality of meat. Br. Poult. Sci. 24, 511-516.

Ricard F.H., Touraille C., 1988. Selection for leanness and carcass quality. In Leanness in domestic birds: Genetics, metabolic and hormonal aspects (ed. B. Leclerq and CC Whitehead), pp. 377-386. Butterworths & Co., Ltd-INRA, London, UK.

Rideau N., Métayer-Coustard S., 2012. Utilisation périphérique du glucose chez le poulet et le canard : implications pour la croissance et la qualité de la viande. INRA Prod. Anim. 25, 337-350.

Rifai N., Gillette M.A., Carr S.A., 2006. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. Nat. Biotechnol. 24, 971-983.

Rohart F., Paris A., Laurent B., Canlet C., Molina J., Mercat M.J., Tribout T., Muller N., Iannuccelli N., Villa-Vialaneix N., Liaubet L., Milan D., San Cristobal M., 2012. Phenotypic prediction based on metabolomic data for growing pigs from three main European breeds. J. Anim. Sci. 90, 4729-4740.

Röhme D., 1981. Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 78, 5009-5013.

Rose S.P., Kyriazakis I. 1991. Diet selection of pigs and poultry. Proceeding of the nutrition society 50, 87-98

Rosebrough R.W., McMurtry J.P., Vasilatos-Younken R., 1999. Dietary fat and protein interactions in the broiler. Poult. Sci. 78, 992-998.

Saadoun A., Leclercq B., 1986. In vivo lipogenesis in genetically fat and lean chickens of various ages. Comp. Biochem. Physiol. 83B, 607-611.

Sales N.M., Pelegrini P.B., Goersch M.C., 2014. Nutrigenomics: definitions and advances of this new science. J. Nutr. Metab. doi: 10.1155/2014/202759.

Samour J., 2006. Diagnostic value of hematology. In : Avian medecine. Harrisson's bird foods, 597-609

Sanchez J., Priego T., Pico C., Ahrens W., De Henauw S., Fraterman A., Marild S., Molnar D., Moreno L.A., Peplies J., Russo P., Siani A., Tornaritis M., Veidebaum T., Palou A., 2012. Blood cells as a source of transcriptional biomarkers of childhood obesity and its related metabolic alterations: results of the IDEFICS study. J. Clin. Endocrinol. Metab. 97, 2011-2209.

Sato K., Suzuki K., Akiba Y., 2009. Characterization of chicken portomicron remnant and very low density lipoprotein remnant. Poult. Sci. 46, 35-39.

Scanes C.G., 2008. Perspectives on analytical techniques and standardization. Poult. Sci. 87, 2175-2177.

Scanes C.G. 2015. Strurkie's Avian physiology, Colin G. Scanes, New-York.

Schmaier A.A., Stalker T.J., Runge J.J., Lee D., Nagaswami C., Mericko P., Chen M., Cliche S., Gariepy C., Brass L.F., Hammer D.A., Weisel J.W., Rosenthal K., Kahn M.L., 2011. Occlusive thrombi arise in mammals but not birds in response to arterial injury: evolutionary insight into human cardiovascular disease. Blood 118, 3661-3669.

Scholz A.M., Bunger L., Kongsro J., Baulain U., Mitchell A.D., 2015. Non-invasive methods for the determination of body and carcass composition in livestock: dual-energy X-ray absorptiometry, computed tomography, magnetic resonance imaging and ultrasound: invited review. Animal 9, 1250-1264.

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

Seliger C., Schaerer B., Kohn M., Pendl H., Weigend S., Kaspers B., Härtle S., 2012. A rapid high-precision flow cytometry based technique for total white blood cell counting in chickens. Vet. Immunol. Immunopathol. 145, 86-99.

Sharp P.J., Dunn I.C., Waddington D., Boswell T., 2008. Chicken leptin. Gen. Comp. Endocrinol. 158, 2-4.

Shen W.J., Sridhar K., Bernlohr D.A., Kraemer F.B., 1999. Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 5528-5532.

Shirazi-Beechey S.P., Moran A.W., Batchelor D.J., Daly K., Al-Rammahi M., 2011. Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport. Proc. Nutr. Soc. 70, 185-193.

Sillence M.N., 2004. Technologies for the control of fat and lean deposition in livestock. Vet. J. 167, 242-257.

Simon J., Leclercq B., 1982. Longitudinal study of adiposity in chickens selected for high or low abdominal fat content: further evidence of a glucose-insulin imbalance in the fat line. J. Nutr. 112, 1961-1973.

Simon J., Leclercq B., 1985. Fat and lean chickens: prefattening period and in vivo sensitivity to insulin, atropine, and propranolol. Am. J. Physiol. 249, R393-401.

Simon J., Rideau N., Taouis M., Dupont J., 2011. Plasma insulin levels are rather similar in chicken and rat. Gen. Comp. Endocrinol. 171, 267-268.

Skiba-Cassy S., Collin A., Chartrin P., Medale F., Simon J., Duclos M.J., Tesseraud S., 2007. Chicken liver and muscle carnitine palmitoyltransferase 1: nutritional regulation of messengers. Comp. Bioch. Phys. 147B, 278-287.

Steen H., Mann M., 2004. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5, 699-711.

Steyn F.J., Xie T.Y., Huang L., Ngo S.T., Veldhuis J.D., Waters M.J., Chen C., 2013. Increased adiposity and insulin correlates with the progressive suppression of pulsatile GH secretion during weight gain. J. Endocrinol. 218, 233-244.

Stroun M., Anker P., Beljanski M., Henri J., Lederrey C., Ojha M., Maurice P.A., 1978. Presence of RNA in the nucleoprotein complex spontaneously released by human lymphocytes and frog auricles in culture. Cancer Res. 38, 3546-3554.

Suzuki K., Inomata K., Katoh K., Kadowaki H., Shibata T., 2009. Genetic correlations among carcass cross-sectional fat area ratios, production traits, intramuscular fat, and serum leptin concentration in Duroc pigs. J. Anim. Sci. 87, 2209-2215.

Swantek P.M., Zimprich R.C., Marchello M.J., Harrold L., 1996. Performance and carcass characteristics of grow-finish pigs fed waxy corn. J. Anim. Sci. 74 (Suppl. 1), Abstract 287.

Swennen Q., Janssens G.P., Collin A., Le Bihan-Duval E., Verbeke K., Decuypere E., Buyse J., 2006. Diet-induced thermogenesis and glucose oxidation in broiler chickens: influence of genotype and diet composition. Poult. Sci. 85, 731-742.

Szymanska E., Bouwman J., Strassburg K., Vervoort J., Kangas A.J., Soininen P., Ala-Korpela M., Westerhuis J., van Duynhoven J.P., Mela D.J., Macdonald I.A., Vreeken R.J., Smilde A.K., Jacobs D.M., 2012. Gender-dependent associations of metabolite profiles and body fat distribution in a healthy population with central obesity: towards metabolomics diagnostics. OMICS J. Integr. Biol. 16, 652-667.

Takahashi J., Waki S., Matsumoto R., Odake J., Miyaji T., Tottori J., Iwanaga T., Iwahashi H., 2012. Oligonucleotide microarray analysis of dietary-induced hyperlipidemia gene expression profiles in miniature pigs. PLos One. 7, e37581.

Taouis M., Chen J.-W., Daviaud C., Dupont J., Derouet M., Simon J., 1998. Cloning the chicken leptin gene. Gene 208, 239-242.

Telle-Hansen V.H., Halvorsen B., Dalen K.T., Narverud I., Wesseltoft-Rao N., Granlund L., Ulven S.M., Holven K.B., 2013. Altered expression of genes involved in lipid metabolism in obese subjects with unfavourable phenotype. Genes Nutr. 8, 425-434.

Thorens B., 1996. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. Am. J. Physiol. 270, G541-553.

Tschop M., Smiley D.L., Heiman M.L., 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. Nature. 407, 908-913.

Tuggle C.K., Wang Y., Couture O., 2007. Advances in swine transcriptomics. Int J Biol Sci. 3, 132-152.

Turchinovich A., Weiz L., Langheinz A., Burwinkel B., 2011. Characterization of extracellular circulating microRNA. Nucleic Acids Res. 39, 7223-7233.

van der Lely A.J., Tschop M., Heiman M.L., Ghigo E., 2004. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. Endocr. Rev. 25, 426-457.

Vincent A., Louveau I., Gondret F., Tréfeu C., Gilbert H., Lefaucheur L., 2015. Divergent selection for residual feed intake affects the transcriptomic and proteomic profiles of pig skeletal muscle. J. Anim. Sci. 93, 2745-2758.

Walzem R.M., 1996. Lipoproteins and the laying hen: form follows function. Poult. Avian Biol. Rev. 7, 31-64.

Wang Z., Gerstein M., Snyder M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat. Rev. Genet. 10, 57-63.

Whitehead C.C., Griffin H.D., 1986. Development of divergent lines of lean and fat broilers using plasma very low density lipoprotein concentration as selection criterion; results over the fourth generation and lack of effect of dietary fat on performance and carcase fat content. Br. Poult. Sci. 27, 317-324.

Whitfield P.D., German A.J., Noble P.J., 2004. Metabolomics: an emerging post-genomic tool for nutrition. Br. J. Nutr. 92, 549-555.

Whitney A.R., Diehn M., Popper S.J., Alizadeh A.A., Boldrick J.C., Relman D.A., Brown P.O., 2003. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 1896-1901.

Woyengo T.A., Beltranena E., Zijlstra R.T., 2014. Nonruminant Nutrition Symposium: Controlling feed cost by including alternative ingredients into pig diets: a review. J. Anim. Sci. 92, 1293-1305.

Wren A.M., Small C.J., Abbott C.R., Dhillo W.S., Seal L.J., Cohen M.A., Batterham R.L., Taheri S., Stanley S.A., Ghatei M.A., Bloom S.R., 2001. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. Diabetes 50, 2540-2547.

Wright C., Bergstrom D., Dai H., Marton M., Morris M., Tokiwa G., Wang Y., Fare T., 2008. Characterization of globin RNA interference in gene expression profiling of whole-blood samples. Clin. Chem. 54, 396-405.

Wu G., Li H., Zhou M., Fang Q., Bao Y., Xu A., Jia W., 2014. Mechanism and clinical evidence of lipocalin-2 and adipocyte fatty acid-binding protein linking obesity and atherosclerosis. Diabetes Metab Res Rev 30, 447-456.

Wylie A.R., 2011. Leptin in farm animals: where are we and where can we go? Animal. 5, 246-267.

Xing J., Kang L., Jiang Y., 2011. Effect of dietary betaine supplementation on lipogenesis gene expression and CpG methylation of lipoprotein lipase gene in broilers. Mol. Biol. Rep. 38, 1975-1981.

Xu Q.Y., Liu Y.H., Zhang Q., Ma B., Yang Z.D., Liu L., Yao D., Cui G.B., Sun J.J., Wu Z.M., 2014. Metabolomic analysis of simvastatin and fenofibrate intervention in high-lipid diet-induced hyperlipidemia rats. Acta Pharmacol. Sin. 35, 1265-1273.

Yamaoka M., Maeda N., Nakamura S., Kashine S., Nakagawa Y., Hiuge-Shimizu A., Okita K., Imagawa A., Matsuzawa Y., Matsubara K., Funahashi T., Shimomura I., 2012. A pilot investigation of visceral fat adiposity and gene expression profile in peripheral blood cells. PLos One. 7, e47377.

Yamaoka M., Maeda N., Nakamura S., Mori T., Inoue K., Matsuda K., Sekimoto R., Kashine S., Nakagawa Y., Tsushima Y., Fujishima Y., Komura N., Hirata A., Nishizawa H., Matsuzawa Y., Matsubara K.-i., Funahashi T., Shimomura I., 2013. Gene expression levels of S100 protein family in blood cells are associated with insulin resistance and inflammation (Peripheral blood S100 mRNAs and metabolic syndrome). Biochem. Biophys. Res. Commun. 433, 450-455.

Yan H., Potu R., Lu H., Vezzoni de Almeida V., Stewart T., Ragland D., Armstrong A., Adeola O., Nakatsu C.H., Ajuwon K.M., 2013. Dietary fat content and fiber type modulate hind gut microbial community and metabolic markers in the pig. PLos One. 8, e59581.

Yde C.C., Bertram H.C., Theil P.K., Knudsen K.E., 2011. Effects of high dietary fibre diets formulated from by-products from vegetable and agricultural industries on plasma metabolites in gestating sows. Arch. Anim. Nutr. 65, 460-476.

Yde C.C., Westerhuis J.A., Bertram H.C., Bach Knudsen K.E., 2012. Application of NMR-based metabonomics suggests a relationship between betaine absorption and elevated creatine plasma concentrations in catheterised sows. Br. J. Nutr. 107, 1603-1615.

Zebrowska T., Low A.G., Zebrowska H., 1982. Studies on gastruc digestion of protein and carbohydrate, gastric secretion and exocrine pancreatic secretion in the growing pig. Br. J. Nutr. 49, 401-410

Zhan X.A., Li J.X., Xu Z.R., Zhao R.Q., 2006. Effects of methionine and betaine supplementation on growth performance, carcase composition and metabolism of lipids in male broilers. Br. Poult. Sci. 47, 576-580.

Zhang H., Du Z.Q., Dong J.Q., Wang H.X., Shi H.Y., Wang N., Wang S.Z., Li H., 2014. Detection of genome-wide copy number variations in two chicken lines divergently selected for abdominal fat content. BMC Genomics 15, 517.

Zhang H., Wang S.-Z., Wang Z.-P., Da Y., Wang N., Hu X.-X., Zhang Y.-D., Wang Y.-X., Leng L., Tang Z.-Q., Li H., 2012. A genome-wide scan of selective sweeps in two broiler chicken lines divergently selected for abdominal fat content. BMC Genomics 13, 704.

Zhang Q., Wang G., A J., Ma B., Dua Y., Zhu L., Wu D., 2010. Metabonomic profiling of diet-induced hyperlipidaemia in a rat model. Biomarkers 15, 205-216.

Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372, 425-432.

Zhao P., Elks C.M., Stephens J.M., 2014. The induction of lipocalin-2 protein expression in vivo and in vitro. J. Biol. Chem. 289, 5960-5969.

Zheng A., Chang W., Hou S., Zhang S., Cai H., Chen G., Lou R., Liu G., 2014. Unraveling molecular mechanistic differences in liver metabolism between lean and fat lines of Pekin duck (Anas platyrhynchos domestica): a proteomic study. J Proteomics 98, 271-288.

Ziemer C.J., Kerr B.J., Weber T.E., Arcidiacono S., Morrison M., Ragauskas A., 2012. Effects of feeding fiber-fermenting bacteria to pigs on nutrient digestion, fecal output, and plasma energy metabolites. J. Anim. Sci. 90, 4020-4027.

Annexes

Annexe I

Caractéristiques et composition des régimes chez le porc en période de croissance (74 à 102 jours) ou de finition (102 à 132 jours).

Composition (g/kg)	Croissance		Finition	
Matières premières	HF	LF	HF	LF
Blé tendre	269,5	362,2	330,9	417,2
Orge	269,5	362,2	330,9	417,2
Tourteau de soja	233,5	199,9	116,1	84,9
Amidon de maïs	0	27,5	0	35,7
Paille de blé	114,5	0	112,6	0
Huile de colza	25,1	3,4	25,1	3,5
Huile de soja	50,1	6,8	50,3	6,7
L-Lysine HCl	2,8	3,2	2,9	3,3
L-Thréonine	1,17	1,20	10,3	10,5
L-Tryptophane	0,28	0,26	0,22	0,19
DL-Méthionine	1,04	0,76	0,46	0,38
Sel	4,5	4,50	4,50	4,50
Carbonate de calcium	10,5	10,5	10,0	10,0
Dicalcium phosphate	12,5	12,5	10,0	10,0
Prémix vitamines et minéraux	5,0	5,0	5,0	5,0
Matière sèche (g/ 100g)	88,0	87,4	87,2	86,9
Composition chimique, (%)				
Matière organique	82,6	82,4	82,5	82,6
Matière azotée totale	17,3	17,4	13,1	13,4
Matière grasse	7,0	2,1	7,4	2,2
Amidon	30,8	42,6	36,2	48,5
NDF	17,7	12,8	18,3	11,5
ADF	8,5	3,8	7,9	3,5
Valeurs nutritionnelles				
EM (MJ/kg)	12,9	12,9	12,9	12,9
Énergie nette (MJ/kg)	9,8	9,6	10,0	9,9
Lysine digestible (g/kg)	9,5	9,5	7,0	7,0
Threonine digestible (g/kg)	0,62	0,62	0,46	0,46
Methionine digestible (g/kg)	0,32	0,30	0,21	0,21
AG (% AG extraits)				
C18:2 n-6	41,0	45,3	41,6	44,6
C18:3 n-3	5,6	5,0	5,7	4,7
Acides gras saturés	13,9	18,5	13,8	19,0
AGMI	36,2	27,0	36,4	25,9
AGPI	54,6	49,8	50,0	55,1
AG n-6 / AG n-3	5,0	5,3	5,4	4,8

Annexe II

Caractéristiques et composition des régimes chez le poulet de 21 à 63 jours.

	Croissance			
Composition (g/kg)	HF 21-56 j	LF 21-56 j	HF 56-63 j	LF 56-63 j
Matières premières				
Blé	250,00	400,00	250,00	400,00
Tourteau soja	239,80	105,30	239,80	105,30
Isolat de soja	0	70,00	0	70,00
Pois	60,00	60,00	60,00	60,00
Maïs	272,50	102,30	277,50	107,30
Amidon	0	192,00	0	192,00
Gluten de maïs 60	22,90	24,20	22,90	24,20
Cellulose	50,00	0	50,00	0
Phosphate bicalcique	16,30	15,90	16,30	15,90
Huile de colza	22,00	5,00	22,00	5,00
Huile de soja	41,00	0	41,00	0
HCl Lysine	1,40	1,10	1,40	1,10
DL-Méthionine	2,30	2,00	2,30	2,00
Thréonine	0	0	0	0
Sel	3,00	3,00	3,00	3,00
Carbonate de calcium	8,60	9,00	8,60	9,00
Premix vitamines et minéraux	5,00	5,00	5,00	5,00
Composition chimique (%)				
Anticoccidien	0,20	0,20	0,20	0,20
Dioxyde de titane	5	5	0	0
Caractéristiques (g/kg)				
EM(kcal/kg)	2999	3000	2999	3000
Protéines brutes	190,00	190,00	190,00	190,00
Lysine	10,47	10,43	10,47	10,43
Acides Aminés Soufrés	8,19	8,23	8,19	8,23
Tryptophane	2,14	2,24	2,14	2,24
Thréonine	6,82	6,56	6,82	6,56
Calcium	9,02	9,00	9,02	9,00
Phosphore disponible	3,71	3,70	3,71	3,70
Matières grasses ajoutées	63,00	5,00	63,00	5,00
AGS (% AG totaux)	12	12	12	12
AGMI (% AG totaux)	32	31	32	31
AGPI (% AG totaux)	56	57	56	57
AG n-3	5,84	1,03	5,84	1,03
AG n-6	38,82	8,52	38,82	8,52
AG n-6 / AG n-3	6,6	8,3	6,6	8,3
Matière grasse totale	84,93	22,00	84,93	22,00

Annexe III

JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE
The Premier Journal and Leading Source of New Knowledge and Perspective in Animal Science

Dietary energy sources affect the partition of body lipids and the hierarchy of energy metabolic pathways in growing pigs differing in feed efficiency

F. Gondret, I. Louveau, J. Mourot, M. J. Duclos, S. Lagarrigue, H. Gilbert and J. van Milgen

J ANIM SCI 2014, 92:4865-4877.
doi: 10.2527/jas.2014-7995 originally published online September 24, 2014

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:
http://www.journalofanimalscience.org/content/92/11/4865

American Society of Animal Science
www.asas.org

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on November 3, 2014

Dietary energy sources affect the partition of body lipids and the hierarchy of energy metabolic pathways in growing pigs differing in feed efficiency[1,2]

F. Gondret,*†[3] I. Louveau,*† J. Mourot,*† M. J. Duclos,§ S. Lagarrigue,*† H. Gilbert,‡ and J. van Milgen*†

*INRA, UMR1348 Pegase, F-35590 Saint-Gilles, France;
†Agrocampus-Ouest, UMR1348 Pegase, F-35000 Rennes, France; ‡INRA, UMR1388 GenPhySE, F-31326 Castanet-Tolosan cedex, France; and §INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France

ABSTRACT: The use and partition of feed energy are key elements in productive efficiency of pigs. This study aimed to determine whether dietary energy sources affect the partition of body lipids and tissue biochemical pathways of energy use between pigs differing in feed efficiency. Forty-eight barrows (pure Large White) from two divergent lines selected for residual feed intake (RFI), a measure of feed efficiency, were compared. From 74 d to 132 ± 0.5 d of age, pigs (n = 12 by line and by diet) were offered diets with equal protein and ME contents. A low fat, low fiber diet (LF) based on cereals and a high fat, high fiber diet (HF) where vegetal oils and wheat straw were used to partially substitute cereals, were compared. Irrespective of diet, gain to feed was 10% better ($P < 0.001$), and carcass yield was greater (+2.3%; $P < 0.001$) in the low RFI compared with the high RFI line; the most-efficient line was also leaner (+3.2% for loin proportion in the carcass, $P < 0.001$). In both lines, ADFI and ADG were lower when pigs were fed the HF diet (–12.3% and –15%, respectively, relatively to LF diet; $P < 0.001$). Feeding the HF diet reduced the perirenal fat weight and backfat proportion in the carcass to the same extent in both lines (–27% on average; $P < 0.05$). Lipid contents in backfat and LM also declined (–5% and –19%, respectively; $P < 0.05$) in pigs offered the HF diet. The proportion of saturated fatty acids (FA) was lower, but the percentage of PUFA, especially the EFA C18:2 and C18:3, was greater ($P < 0.001$) in backfat of HF-fed pigs. In both lines, these changes were associated with a marked decrease ($P < 0.001$) in the activities of two lipogenic enzymes, the fatty acid synthase (FASN) and the malic enzyme, in backfat. For the high RFI line, the hepatic lipid content was greater ($P < 0.05$) in pigs fed the HF diet than in pigs fed the LF diet, despite a reduced FASN activity (–32%; $P < 0.001$). In both lines, the HF diet also led to lower glycogen content (–70%) and lower glucokinase activity (–15%; $P < 0.05$) in the liver. These results show that dietary energy sources modified the partition of energy between liver, adipose tissue, and muscle in a way that was partly dependent of the genetics for feed efficiency, and changed the activity levels of biochemical pathways involved in lipid and glucose storage in tissues.

Key words: feed efficiency, fiber, glucokinase, lipid partition, lipogenesis

© *2014 American Society of Animal Science. All rights reserved.*
J. Anim. Sci. 2014.92:4865–4877
doi:10.2527/jas2014-7995

INTRODUCTION

The increasing pressures on food production and feed supplies challenge the need of genotypes with an improved feed efficiency and ability to cope with alternative feed resources such as fibrous feedstuff. The greater feed efficiency of pigs selected for a low residual feed intake (**RFI**), a measure of feed efficiency, has been mainly established on standard diets (Gilbert et al., 2007). Adverse effects on weight gain and feed efficiency have been observed when pigs selected for a high RFI but not for a low RFI were shifted to a high

[1]We thank Y. Billon and A. Priet (INRA, UE1372 GenESI, Le Magneraud, F-17700 Surgères, France) for line selection, P. Roger and J. Delamarre (INRA, UMR Pegase) for animal care, G. Guillemois (INRA, UMR Pegase) for diet preparation, and J. Liger and J. F. Rouault (INRA, UMR Pegase) for slaughter procedures. We are also grateful to N. Bonhomme, S. Daré, Y. Jaguelin-Peyraud, C. Perrier, A. Starck, S. Tacher, and A. Vincent (UMR Pegase) for their expert assistance in collecting and analyzing diets and tissues. Thanks are also due to B. Quemeneur (BNA-Animal Nutrition, Chateau-Gontier, France) for discussions on diet swelling capacity.

[2]The study was funded by the French National Research Agency (Agence Nationale de la Recherche ANR, ANR-11-SVSE7004 FatInteger).

[3]Corresponding author: florence.gondret@rennes.inra.fr
Received April 28, 2014.
Accepted September 3, 2014.

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on November 3, 2014

fiber, low energy diet for 3 wk (Montagne et al. 2014). This suggests that low RFI pigs may have a better ability to cope with a diet rich in fiber. Because fiber is poorly degraded along the digestive tract (De Lange et al., 2006), it is usually considered as a diluent of pig diets. Therefore, adding fat to a fiber diet has been shown as a relevant strategy to improve dietary energy value and feed efficiency (Myer and Combs, 1991). However, this strategy changes the nutrients and energy source as compared with a low fat diet, with possible consequences on the energy use by pigs. Indeed, fatty acids (**FA**) are oxidized for ATP synthesis with the same efficiency as glucose, but are deposited in tissues with a much greater energetic efficiency (Birkett and de Lange, 2001). The effects on performance and body composition remain, however, difficult to predict, as illustrated by the interplay between dietary fat content and fiber type in determining backfat depth (Yan et al., 2013). The responses could also be dependent of the genetics for feed efficiency. Indeed, lipid metabolic pathways are down-regulated in low RFI pigs (Lkhagvadorj et al., 2010) and metabolic specificities in the way low vs. high RFI pigs use energy in tissues have been suggested (Le Naou et al., 2012).

This study aimed to determine body composition and tissue energy metabolism in pigs differing in feed efficiency, and offered contrasting diets for nutrients and energy source.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Diets

The care and use of pigs were performed in compliance with the guidelines of the French Ministry of Agriculture and Fisheries for animal research, and was approved by a local ethical committee (Rennes, France).

From Large White pure animals, two lines were divergently selected for low RFI vs. high RFI since 2000, as described by Gilbert et al. (2007). Briefly, daily feed intake (**ADFI**) was measured on group-housed boars fed ad libitum from 35 to 95 kg BW. Candidates for selection were tested over a fixed BW range. Two traits were recorded and used to calculate the predicted feed intake: ADG from 35 to 95 kg, and ultrasonic backfat thickness (**UBT**) at 95 kg averaged from 6 different measures (right and left shoulder, right and left midback, right and left loin). The R^2 of the model used to compute the predicted feed intake was 0.66. A phenotypic RFI selection index was computed as a linear combination of those traits as follows:

$$\text{RFI} = \text{ADFI} - (1.24 \times \text{ADG}) - (31.9 \times \text{UBT}),$$

in which ADFI and ADG (measured in grams) and UBT (measured in millimeters) were corrected for the effects of contemporary group and pen size before computation.

The present study refers to Generation 8 of selection. Forty-eight barrows (n = 24 per RFI line from 12 pairs of full or half sibs) were chosen at weaning (27 ± 1.9 d of age and 8.2 ± 0.2 kg BW on average) from the selection herd (INRA GenESI, Le Magneraud, France). Within each line, 6 different sires and 12 different sows were used. Two successive transfers of piglets to the postweaning facilities of INRA Pegase (Saint-Gilles, France) were done at a 3-wk interval. There, they were housed in collective pens (one pen per line and per replicate) and offered free access to a standard prestarter diet (10.2 MJ NE/kg, 19.2% CP, and 12.8 g/kg digestible lysine) during the first 2 wk postweaning, and a standard starter diet (9.9 MJ NE/kg, 18.4% CP, and 11.4 g/kg digestible lysine) during the next 5 wk postweaning. At 74.0 ± 0.3 d of age, pigs were moved to growing facilities, where they were housed individually (full-slatted floor) allowing individual feed intake recording. After 2 d, the starter diet was progressively replaced by an experimental diet (75/25, 50/50, 50/50, and 25/75) during a 4-d period. Thereafter, pigs received the experimental diet in a phase-feeding program: the growing diet was distributed during the first 6 wk after the feeding trial has started, and the finishing diet which differed mainly for the protein and amino-acid contents, was distributed thereafter until slaughter at the same age (132 ± 0.5 d of age). Within each line, pigs (n = 12 per line and per diet) were offered either a low fat, low fiber (**LF**) diet or a high fat, high fiber (**HF**) diet. The LF diet was mainly based on cereals (wheat and barley) and soybean meal. The HF diet was formulated by the partial replacement of cereals by ground straw (11.5% of the diet; 5 mm grinding) and a mixture of rapeseed and soybean oils (7.5% of the diet) to provide the same protein and ME contents as the LF diet (Table 1). Fiber was considered as a diluting factor of diet, because energy digestibility of wheat straw for growing pigs is only 13% (De Lange et al., 2006). All diets were prepared and pelleted (4.5 mm) at the experimental mill of INRA Pegase (Saint Gilles). Samples of diets were stored at 4°C and freeze-dried later for chemical analyses. Feed swelling capacity was estimated (Quemeneur et al., 2013) to be 3.4 and 3.9 mL/g of DM for the grower formulas of LF and HF diets, respectively, as well as to be 3.3 and 3.7 mL/g of DM for the finisher formulas of LF and HF diets, respectively.

Pigs were weighed when entering in the growing facilities, every 2 wk thereafter, and on the morning of the slaughter day. Individual feed consumption was recorded weekly (feed offered minus refusals) during the 8 wk of the feeding trial. Throughout the experiment, animals had free access to water. The ADG, ADFI, and G:F were calculated for the test period.

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on November 3, 2014

Table 1. Ingredients, chemical and nutritional compositions of the experimental diets[1]

	Growing		Finishing	
Diet	HF	LF	HF	LF
Ingredients, g/kg (as-fed basis)				
Wheat	269.5	362.2	330.9	417.2
Barley	269.5	362.2	330.9	417.2
Soybean meal	233.5	199.9	116.1	84.9
Corn starch	0	27.5	0	35.7
Crushed wheat straw	114.5	0	112.6	0
Rapeseed oil	25.1	3.4	25.1	3.5
Soybean oil	50.1	6.8	50.3	6.7
L-Lysine HCl	2.8	3.2	2.9	3.3
L-Threonine	1.17	1.20	10.3	10.5
L-Tryptophane	0.28	0.26	0.22	0.19
DL-Methionine	1.04	0.76	0.46	0.38
Salt	4.5	4.50	4.50	4.50
Calcium carbonate	10.5	10.5	10.0	10.0
Dicalcium phosphate	12.5	12.5	10.0	10.0
Vitamins and minerals premix	5.0	5.0	5.0	5.0
DM, g/100 g	88.0	87.4	87.2	86.9
Chemical composition, % (as-fed basis)				
Ash	5.4	5.0	4.7	4.3
OM	82.6	82.4	82.5	82.6
CP	17.3	17.4	13.1	13.4
Fat	7.0	2.1	7.4	2.2
Starch	30.8	42.6	36.2	48.5
NDF	17.7	12.8	18.3	11.5
ADF	8.5	3.8	7.9	3.5
GE, MJ/kg	17.5	15.9	17.3	15.8
Nutritional values				
ME, MJ/kg	12.9	12.9	12.9	12.9
NE, MJ/kg	9.8	9.6	10.0	9.9
Digestible lysine, g/kg	9.5	9.5	7.0	7.0
Digestible threonine, g/kg	0.62	0.62	0.46	0.46
Digestible methionine, g/kg	0.32	0.30	0.21	0.21
FA composition, % extracted FA				
C18:2 n-6	41.0	45.3	41.6	44.6
C18:3 n-3	5.6	5.0	5.7	4.7
Saturated FA	13.9	18.5	13.8	19.0
Mono-unsaturated FA	36.2	27.0	36.4	25.9
Poly-unsaturated FA	54.6	49.8	50.0	55.1
Ratio n-6:n-3	5.0	5.3	5.4	4.8

[1]A low fat, low fiber diet (LF) and a high fat, high fiber diet (HF) were formulated at the same protein and ME contents. For each dietary group, a growing diet was distributed to pigs from 76 d of age onwards for 6 wk, and a finishing diet which differed for the protein and amino-acid contents, was distributed thereafter and until slaughter. FA = fatty acid.

In vivo Backfat Depth

Backfat thickness (**BFT**) was measured by ultrasound (VETKOPLUS, Noveko Inc., Boucherville, QC, Canada) on the left and right sides of the body, at the last rib level, when pigs entered the grower facilities and at 4 and 7 wk after the feeding trial had started.

Animal Slaughtering and Sample Collection

Two hours after the first morning meal, pigs were killed by electronarcosis followed by jugular exsanguination. At bleeding, a blood sample (10 mL) was collected on EDTA and centrifuged for 15 min at 2,500 × *g* and 4°C. Plasma was stored at –20°C for later analyses. Backfat (comprising all fat layers) was immediately sampled by an incision along the dorsal right side of the body at the last rib level. The carcass was then prepared by removing digestive, urogenital, and respiratory tracts. The digestive tract was weighed (full and empty), and the weight of the digestive content was calculated. Backfat thickness was obtained by optical measurements (one spot between the 3rd and 4th last rib) on the hot carcass (CGM, Sydel, Lorient, France). Liver and kidneys were weighed, and the liver was immediately sampled. Perirenal fat was removed, weighed, and sampled. Within 20 min after slaughter, a sample of the LM was also collected at the last rib on the right side of the carcass, just below the sampling location of backfat. Tissue samples were cut into small pieces, snap frozen in liquid nitrogen and stored at –75°C until biochemical analyses. A portion of liver was also freeze-dried.

The carcass was then chilled at 4°C. After 36 h of chilling, the left and right half side of the carcass were weighed. The left side of the carcass was dissected into its main cuts (backfat, belly, loin, ham, and shoulder). The entire LM was then dissected from the loin, weighed, and a sample was freeze-dried. All cuts weights were then expressed as percentage of the left chilled carcass weight.

Chemical and Biochemical Analyses

All analyses were performed in duplicate. Frozen (backfat and perirenal fat) or freeze-dried (LM, liver, and diets) subsamples were ground. Freeze-dried samples were first analyzed using methods of the International Standardization Organization (http://www.iso.org, verified September 26, 2014) for DM (ISO 6496-1983). Ash content (ISO-5984) was determined in diets. Gross energy content (ISO 9831-1998) was measured in diets with an adiabatic bomb calorimeter (IKA C5000, IKA, Staufen, Germany). Feeds were also analyzed for cell wall constituents (NDF and ADF) according to van Soest and Wine (1967), and for starch content (ISO 6493-2000) using a digital polarimeter (ADP220, Bellingham, UK). The N content in diets, LM, and liver samples was analyzed according to the Dumas procedure (NF V18-120, 1997; http://www.afnor.org/en, verified September 26, 2014) with a Rapid N cube (Elementar France, Villeurbanne, France), and protein content (N × 6.25) was deduced. Lipid contents of diets and tissues were determined by the application of supercritical CO_2 and solvent extraction (Sahena et al., 2009) with an automatic system (Leco TFE 2000 Instrument, Leco Corporation, St. Joseph, MI). The glycogen content was determined in liver

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on November 3, 2014

and LM according to the method described by Good et al. (1933) with minor adaptations (Montagne et al., 2014). In LM, the glycolytic potential (**GP**) was also calculated as GP = 2[(glycogen) + (glucose) + (glucose-6-phosphate)] + (lactate), as described previously (Monin and Sellier, 1985). Glucose and glucose-6-phosphate were determined together using the enzymatic method (Glucose HK Kit; ABX Diagnostics, Montpellier, France). Glycogen content was determined from glucose determination after hydrolysis by amyloglucosidase. Lactate content was determined using a dedicated commercial kit (Lactate PAP; BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Glucose (Glucose RTU, BioMérieux) and triglyceride (TG PAP 1000 kit, BioMérieux) concentrations were also determined in plasma. All measurements were performed on a clinical chemistry analyzer Konelab 20i (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France).

Fatty Acid Composition

Fatty acid compositions of diets and backfat were determined after methylation of lipids extracted as described above. The boron trifluoride methanol was used according to procedures developed by Morrison and Smith (1964). Analyses were performed on a gas chromatograph (Nelson Analytical, Manchester, NH) equipped with a fused-silica capillary column (30 m × 0.25 mm i.d.), with a base-deactivated silica stationary phase (a 0.25-µm film thickness) filled with a stationary phase (80% biscyanopropyl and 20% cyanopropylphenyl) and using margaric acid (C17:0) as the internal standard. The furnace temperature was 180°C, and injector and detector temperatures were 240°C. For all samples, retention times and peak areas were determined. Peaks were identified by comparison with the retention times of standard FA methyl esters. Individual FA, as well as the sum of SFA, MUFA, or PUFA, were reported as percentages of the total FA identified in each sample.

Enzyme Activities of Nutrient Oxidative Catabolism and Glycogenesis

Specific activities of enzymes were monitored in selected tissues. To evaluate the oxidative ability, the β-hydroxylacyl-CoA dehydrogenase (**HAD**) involved in β-oxidation of FA, and citrate synthase (**CS**) participating to oxidation of nutrients in the Krebs cycle, were measured. Briefly, frozen samples of the liver, LM, and backfat (approximately 300 mg each) were homogenized in a 0.1 *M* phosphate buffer (pH = 7.5) containing EDTA (2 m*M*). Mixtures were sonicated (60 s, 50 Hz) and centrifuged (13 min, 1,500 × *g*, 4°C). Supernatants were stored in ice. Specific activities were assayed at 340 nm absorbance for HAD (Bass et al., 1969) and at 405 nm absorbance for CS (Srere, 1969), using the clinical chemistry analyzer Konelab 20i.

In addition, the activities of the glucokinase (**GCK**) participating to glycogenesis and considered as a glucose sensor, and of the hexokinase (**HK**), using glucose as substrate to produce glucose-6-phosphate, were measured in the liver and LM, respectively, using a spectrophotometric method (Panserat et al., 2000). Briefly, liver or LM samples (500 mg) were homogenized (dilution 1:9) in ice-cold buffer [50 m*M* Tris, 5 m*M* EDTA, 2 m*M* 1,4-dithiothreitol (**DTT**) and protease inhibitors cocktail (Complete, Roche Diagnostic, Meylan, France); pH 7.4]. Homogenates were centrifuged at 4°C for 10 min at 900 × *g*. Enzyme activity was measured at 37°C by coupling ribulose-5-phosphate formation from glucose-6-phosphate to the reduction of NADP, using purified glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase (Sigma) as coupling enzymes. One unit of enzyme activity was defined as the amount that phosphorylates 1 µmol glucose per min. The GCK activity in liver was estimated by subtracting the rate of Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (**NADPH**) formation (at 340 nm) in the presence of 0.5 m*M* glucose (scoring low-Km HK activity) from that obtained in the presence of 100 m*M* glucose (scoring total HK activity) and taking into account the possible interference of glucose 1-dehydrogenase activity, as follows:

$$GCK = HKT - HK - GDH/3,$$

where HKT referred to total HK activity, and GDH to glucose 1-dehydrogenase activity.

To calculate enzyme specific activities, protein content in the assayed supernatants was measured using Bradford reagent with BSA as standard (Bradford, 1976).

Lipogenic Enzyme Activities

Activities of lipogenic enzymes were assessed in backfat, perirenal fat, LM, and liver. Tissue samples were first homogenized in 0.25 *M* ice-cold sucrose solution containing EDTA (1 m*M*) and DTT (1 m*M*). Mixtures were ultracentrifuged at 100,000 × *g* during 1 h at 4°C. The resulting supernatants containing cytosolic proteins were collected and frozen at –75°C until use. Specific activities of malic enzyme (**ME1**), glucose-6-phosphate dehydrogenase (**G6PDH**), and fatty acid synthase (**FASN**) were assayed spectrophotometrically at 340 nm absorbance (Bazin and Ferré, 2001). The measurements have been first adapted in volumes of supernatants and reagents for using the KoneLab 20i apparatus. Activities were expressed per units of cytosolic proteins.

Statistical Analysis

Data were analyzed using the SAS Software (v. 9.2; SAS Inst. Inc., Cary, NC) by ANOVA using the GLM

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on November 3, 2014

Table 2. Performance as influenced by line and diet during the growing-finishing period

	RFI[1] line		Diet			*P*-value[2]	
Pigs	High	Low	HF	LF	RSD	Line	Diet
n	24	24	24	24	–	–	–
Start BW, kg	26.9	26.1	26.2	26.8	4.3	0.539	0.624
End BW, kg	73.3	77.8	70.9	80.2	5.5	0.008	<0.001
Age at slaughter, d	132	133	132	133	4	0.121	0.492
ADG, g/d	796	882	770	907	73	<0.001	<0.001
ADFI,[3] g/d	2,307	2,250	2,216	2,340	106	0.099	0.004
G:F	0.351	0.386	0.361	0.374	0.020	<0.001	0.131
HCW, kg	54.0	58.6	52.0	60.6	4.3	<0.001	<0.001
Carcass yield, %	73.5	75.2	73.2	75.5	1.7	0.001	<0.001
Digestive content,[4] kg	6.55	5.87	6.99	5.42	0.89	0.010	<0.001
Empty digestive tract,[3] kg	5.30	4.86	5.20	4.97	0.39	0.001	0.140

[1]RFI = residual food intake.

[2]There was no interaction ($P > 0.10$) between genetic line (high or low RFI) and diet (LF: low fiber low fat; HF: high fiber high fat) for any analyzed traits. Least squares means for the effects of Line and of Diet are shown.

[3]Corrected for differences in end-of-test BW.

[4]Corrected for ADFI to account for difference in the size of the last meal.

procedure. Line, diet, and the interaction between line and diet were considered as fixed effects, and replicate was considered as a random effect. End-of-test BW and ADFI during the test period were also considered as covariates to decipher changes induced by nutrients and energy source from changes related to growth allometry. Data are shown as pooled least squares means when the statistical analysis did not reveal any line × diet interaction. Differences were considered significant for $P \leq 0.05$, and $0.05 < P \leq 0.10$ was discussed as a trend.

RESULTS

Growth Performance

No interactions ($P > 0.10$) between line and diet were observed for growth traits, so only the separate effects of line and diet are presented (Table 2). Irrespective of diet, ADG was 11% greater ($P < 0.001$) in the low RFI line than the high RFI line, and this line-associated difference was observed whatever the periods considered in the feeding trial (0 to 3 wk, 3 to 6 wk, and 6 wk to end; data not shown). During the test, there was a trend for a reduction in ADFI (–57 g/d; $P < 0.10$) in the low RFI line compared with the high RFI line (Table 2). Altogether, G:F was 10% greater ($P < 0.001$) in the low RFI pigs than in the high RFI pigs. At slaughter, carcass yield was greater (+2.3%; $P = 0.001$) in the low RFI pigs than in the high RFI pigs. Digestive content was reduced by 10.4% ($P = 0.010$) in the formers. The empty digestive tract was also lighter (–8%; $P = 0.010$) in the low RFI pigs than in the high RFI pigs when data were adjusted for differences in end-of test BW (Table 2), whereas there was no line-associated difference ($P = 0.30$) when no correction was applied (data not shown).

Irrespective of line, pigs offered the HF diet had a 15% lower ADG ($P < 0.001$) and a 12% lower ADFI (2.13 vs. 2.43 kg/d on average; $P < 0.01$) during the test period. The difference in ADFI between diets was less marked at the beginning of the test (0 to 3 wk: –10%) than thereafter (3 to 6 wk or 6 wk to end: –13% on average; data not shown). When data were corrected for end-of-test BW, ADFI was also lower in the HF-fed pigs than in the LF-fed pigs (Table 2). As a result, G:F during the test did not differ between diets ($P = 0.131$). At slaughter, BW and carcass yield were reduced ($P < 0.001$) in pigs fed the HF diet compared with those fed the LF diet. The digestive content was 29% heavier ($P < 0.001$) in pigs fed the HF diet. No dietary-associated difference was observed for the weight of the empty digestive tract when difference in BW at slaughter was taken into account (5.08 kg on average; $P = 0.140$), although it was lighter in HF-fed pigs than in LF-fed pigs when no correction was applied (4.91 kg vs. 5.25 kg, respectively; $P = 0.03$).

Carcass Composition

There were no interactions ($P > 0.10$) between line and diet for carcass composition (Table 3), so line and diet effects are shown separately. Liver and kidney weights were lower ($P < 0.005$) in the low RFI line than in the high RFI line. The loin proportion in the carcass and the LM relative weight were greater ($P < 0.05$) in the low RFI pigs than in high RFI pigs, and ham percentage did not differ between the two lines, resulting in a greater proportion of lean pieces (+2%, $P < 0.01$) in the low RFI pigs. The sum of the main fatty pieces in the carcass (backfat and belly) was conversely lower (–9%; $P < 0.01$) in the low RFI pigs than in the high RFI pigs; however, BFT, weight

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on November 3, 2014

Table 3. Body composition as influenced by line and diet during the growing-finishing period

	RFI[1] line		Diet			*P*-value[2]	
Composition	High	Low	HF	LF	RSD	Line	Diet
n	24	24	24	24	–	–	–
Start BFT,[2] mm	4.9	5.1	4.9	5.1	0.9	0.300	0.550
BFT 4 wk, mm	6.7	6.8	6.3	7.2	1.0	0.960	0.004
BFT 7 wk, mm	8.7	8.7	8.0	9.4	1.3	0.910	0.001
End BFT, mm	14.1	13.6	11.9	15.8	2.5	0.496	<0.001
Organ weight,[3] g							
Perirenal fat	535	534	455	613	92	0.967	<0.001
Kidneys	320	279	301	299	29	<0.001	0.874
Liver	1,740	1,600	1,608	1,731	146	0.004	0.030
Carcass composition, %							
Backfat	7.3	6.8	5.9	8.2	1.0	0.113	<0.001
Belly	13.4	12.3	12.4	13.4	2.1	0.072	0.103
Ham	22.8	23.0	23.4	22.3	0.72	0.382	<0.001
Shoulder	25.1	25.7	25.7	25.1	2.0	0.390	0.247
Loin	27.8	28.7	28.8	27.8	0.73	<0.001	<0.001
LM	4.96	5.38	5.28	5.06	0.004	0.050	0.048
Fatty pieces[4]	20.8	19.1	18.3	21.6	2.02	0.009	<0.001
Lean pieces[5]	75.7	77.3	77.9	75.1	2.03	0.008	<0.001

[1]RFI, residual food intake.

[2]There was no interaction ($P > 0.10$) between genetic line (high or low RFI) and diet (LF: low fiber low fat; HF: high fiber high fat) for any traits including backfat thickness (BFT) assessed at the beginning of the growing-finishing period, and 4 or 7 wk later. Least squares means for the effects of Line and of Diet are shown.

[3]Data corrected for differences in BW at slaughter.

[4]The sum of backfat and belly.

[5]The sum of shoulder, ham, and loin.

of perirenal fat, and backfat proportion in the chilled carcass did not differ between the two lines (Table 3). Corrected by ADFI of pigs during the test, backfat proportion in the carcass was however slightly reduced ($P = 0.05$) for the low RFI line (6.8% of the carcass) compared with the high RFI line (7.4% of the carcass). Similarly, backfat proportion was reduced in the low RFI pigs compared with the high RFI pigs when data were adjusted for differences in end BW (6.79 vs. 7.37%; $P = 0.08$) or in carcass weight (6.71 vs. 7.45%; $P = 0.03$).

In both lines, pigs fed the HF diet had greater ($P < 0.001$) proportions of loin (+3.5%) and ham (+4.9%) as compared with pigs fed the LF diet (Table 3). Conversely, feeding the HF diet reduced body adiposity compared with feeding the LF diet, as illustrated by lower perirenal fat weight (–26%), thinner backfat (–25%), and lower proportion of backfat in the carcass (–28%; $P < 0.001$). The difference between diets for BFT was already significant 4 wk after the start of the feeding trial (–12.5%; $P = 0.004$; Table 3). Relatively to ADFI during the feeding test, perirenal fat proportion in the body and backfat proportion in the chilled carcass were still lower in HF-fed pigs (0.61 and 6.4%, respectively) compared with LF-fed pigs (0.78 and 7.8%, respectively; $P < 0.001$). Similarly, the dietary-associated differences observed in the relative proportions of fatty and lean pieces were significant even after correction for differences in end-of-test BW (e.g., 6.2% vs. 8.1% for backfat proportion in HF-fed and LF-fed pigs, respectively; $P < 0.001$) as well as for carcass weight (data not shown).

Glycemia and Triglyceridemia

Plasma concentrations of glucose (1.45 ± 0.08 g/L on average) and triglycerides (508 ± 47 mg/L on average) did not differ between RFI lines. Plasma triglyceride concentrations were 1.8-fold greater ($P < 0.001$) in HF-fed pigs (650 ± 47 mg/L) than in LF-fed pigs (357 ± 47 mg/L). Conversely, plasma glucose concentrations tended ($P = 0.10$) to be lower in pigs fed the HF diet (1.35 ± 0.08 g/L) than in pigs fed the LF diet (1.55 ± 0.08 g/L); this dietary-associated variation in glucose concentrations reached significance (1.26 vs. 1.63 g/L, respectively; $P = 0.02$) when data were corrected for difference in BW at slaughter.

Tissue Composition

There were no differences in protein and moisture contents in the LM between lines and diets (Table 4). In liver, moisture content was greater in the low RFI pigs fed HF diet compared with those fed LF diet, whereas there was no feeding-associated variation in moisture content within the high RFI line. Hepatic glycogen content was

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on November 3, 2014

Table 4. Tissue composition[1] as influenced by line (high or low residual food intake, RFI) and diet (LF, low fiber low fat; HF, high fiber high fat)

	High RFI		Low RFI			*P*-value[2]		
Tissue	HF	LF	HF	LF	RSD	Line	Diet	L × D
n	12	12	12	12	–	–	–	–
LM								
Protein, g/100 g tissue wet wt.	22.4	23.1	22.9	23.1	1.9	0.599	0.431	0.708
Moisture, g/100 g tissue wet wt.	74.5	73.5	74.3	73.4	2.1	0.800	0.152	0.925
Glycogen, g/100 g tissue wet wt.	0.97	1.00	0.97	1.02	0.18	0.859	0.457	0.813
Glycolytic potential, µEq lactate/g of tissue	214	210	204	214	22	0.651	0.657	0.297
Liver								
Protein, g/100 g tissue wet wt.	20.1	19.2	19.5	19.4	1.1	0.512	0.129	0.200
Moisture, g/100 g tissue wet wt.	72.8a	73.3ab	73.5b	72.7a	0.9	0.733	0.705	0.028
Glycogen, g/100 g tissue wet wt.	1.66	2.32	1.82	3.09	0.65	0.337	0.049	0.527

[a,b]Difference ($P < 0.05$) between least squares means in the same row.

[1]Contents in protein (N × 6.25), moisture, and glycogen were expressed in g/100 g tissue wet weight. Glycolytic potential was expressed in µEq lactate/g of tissue.

[2]Effects of genetic line (low or high RFI), diet, and the interaction between line and diet (L × D). Least squares means in the four experimental groups are shown.

similar in the low RFI line and the high RFI lines, whereas it was 41% lower ($P = 0.05$) for pigs fed the HF diet than in pigs fed the LF diet. There were no dietary-associated differences in glycogen content or in the GP in LM.

An interaction between line and diet was denoted for lipid content in some tissues, so that data are presented for the 4 experimental groups (Fig. 1). There was no significant difference in the amount of lipids in backfat and LM between the high and low RFI lines. Irrespective of line, feeding the HF diet led to lower lipid contents ($P < 0.05$) in backfat and LM when compared with the LF diet. In perirenal fat, there was a trend ($P = 0.102$) for an interaction between diet and line, so that the reduction in lipid content in HF-fed pigs with LF-fed pigs was observed for the high RFI line only (77.2 vs. 80.3%, respectively; $P = 0.030$). For hepatic lipid content, diet and line also interacted ($P = 0.017$): lipid content was 18% greater ($P < 0.05$) for the high RFI pigs fed the HF diet than fed the LF diet, whereas it was similar with both diets for the low RFI pigs.

There was no interaction ($P > 0.10$) between line and diet for FA composition in backfat, so line and diet effects for the most important FA are shown separately (Table 5). The low RFI pigs tended ($P < 0.08$) to have a lower proportion of SFA, which was related to the lower proportions ($P < 0.02$) of C10:0 to C15:0 FA in that line (data not shown) without any variations in the relative percentages of the predominant SFA C16:0 and C18:0, when compared with the high RFI line. The low RFI pigs had a greater percentage ($P = 0.010$) of MUFA, which was mainly due to the greater proportion of C18:1 n-9 in this line compared with the high RFI line (38.7 vs. 37.4%, respectively; $P = 0.006$). The PUFA content (21.7% of total FA) and the ratio of n-6 to n-3 FA (5.4 on average) in backfat were similar ($P > 0.40$) in both lines. Irrespective of line, feeding the HF diet resulted in a marked decrease ($P < 0.001$) in the proportion of SFA, including lower ($P < 0.001$) proportions of C16:0 and C18:0 when compared with the LF diet. There was also a slight decrease in the proportion of MUFA in backfat of HF-fed pigs (Table 5), which was related to the lower percentages of C16:1, C20:1, and C18:1 n-9 to a lesser extent, in HF-fed pigs compared with LF-fed pigs. Conversely, pigs offered the HF diet had lipids with a 2.3-fold greater proportion of PUFA ($P < 0.001$), which was due to greater ($P < 0.001$) proportions of C18:2, C18:3, and C20:2 compared with LF-fed pigs. The ratio of n-6 to n-3 families was also modified by the diet, toward a predominance of n-6 FA in pigs offered diet HF when compared with those offered diet LF.

Energy Metabolism in Tissues

There was no interaction ($P > 0.10$) between line and diet for lipogenic activities, so line and diet effects are shown separately (Table 6). The specific activities of FASN, ME1, and G6PDH did not differ between RFI lines in adipose tissues and liver. In LM, activities of ME1 and G6PDH were lower ($P < 0.005$) in the low RFI pigs than in the high RFI pigs. Irrespective of line, activities of lipogenic enzymes in backfat, perirenal fat and LM were much lower ($P < 0.001$) for pigs fed diet HF than for pigs fed diet LF. In liver, FASN activity was reduced by 32% ($P < 0.001$) in HF-fed pigs compared with LF-fed pigs, but hepatic activities of ME1 and G6PDH producing NADPH did not differ between diets.

Concerning enzymes involved in the nutrient catabolism, tissue-specific responses to line or diet were observed (Table 7). In backfat, the oxidative enzyme activities were increased by 17% for HAD and 7% for CS ($P < 0.10$) in the low RFI line compared with the high RFI line, and they were lower (–19% on average,

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on November 3, 2014

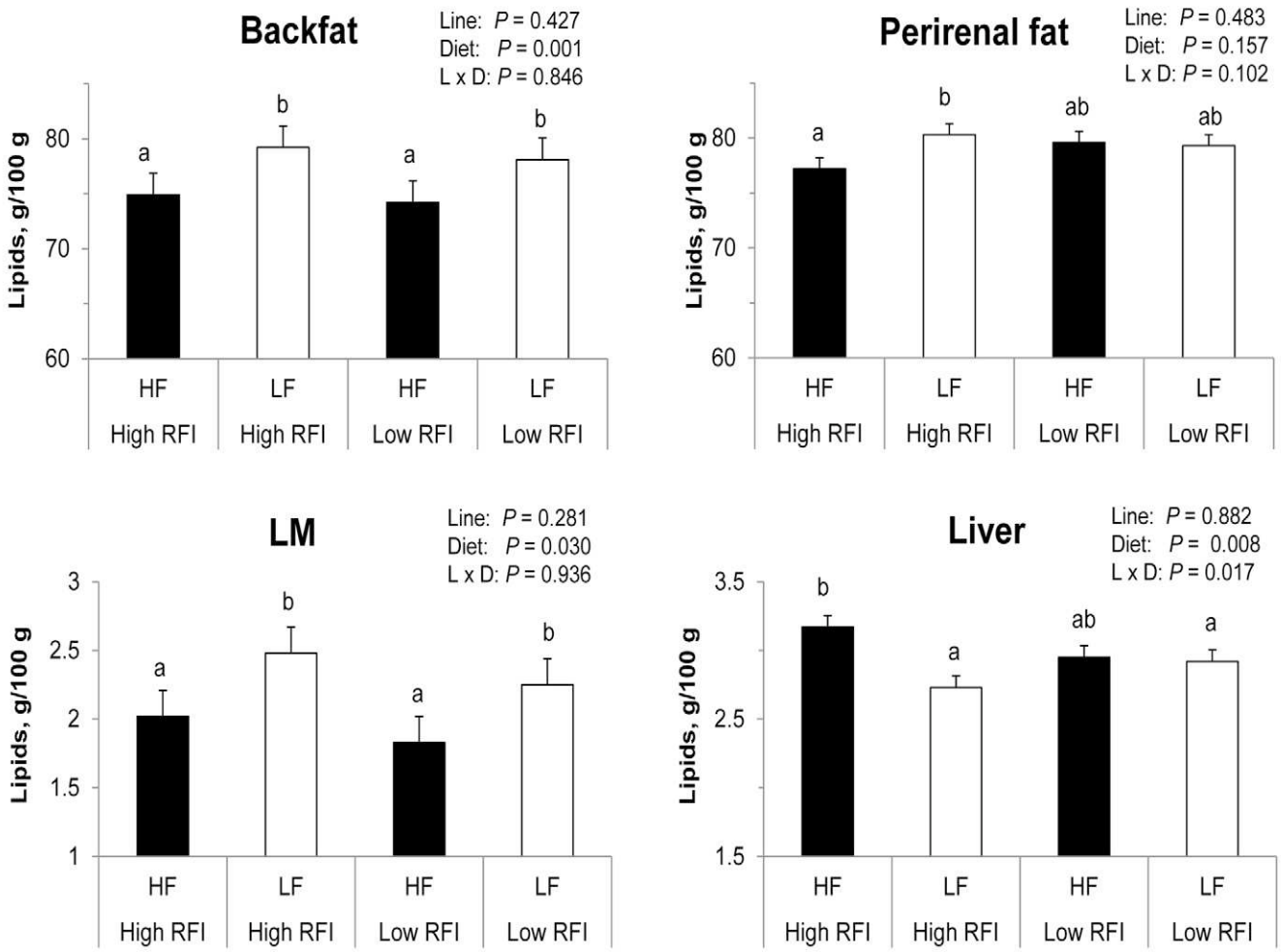


Figure 1. Lipid content in tissues. Pigs from two lines divergently selected for residual feed intake (RFI) were offered either a low fat, low fiber (LF, white bars) diet or a high fat, high fiber (HF, black bars) during the growing period. Data were analyzed with line, diet, and the interaction between line and diet (L × D) as the main effects. Least squares means in the four experimental groups are shown.

$P < 0.005$) when pigs were fed the HF diet. In liver, HAD activity was lower ($P < 0.02$) in the low RFI pigs than in the high RFI pigs, and CS activity did not vary between the two lines. Feeding the HF diet had no effect on hepatic activities of these mitochondrial oxidative enzymes. In the LM, the activities of these enzymes were similar whatever the line and the diet. However, the ratio of HK to CS in muscle was 31% lower ($P = 0.03$) when pigs were fed the HF diet than with the LF diet.

Finally, GCK activity in liver was greater ($P < 0.001$) in the low RFI line than in the high RFI line (Table 7). Irrespective of line, feeding a HF diet led to a reduction of hepatic GCK activity (–15%, $P < 0.05$) as compared with the LF diet. Altogether, the ratio of GCK to CS activities in liver was 36% greater ($P < 0.001$) in the low RFI line than in the high RFI line, and feeding HF diet tended to reduce this ratio by 13% ($P < 0.10$) when compared with diet LF.

DISCUSSION

This study clearly shows that, irrespective of diet, pigs selected for a low RFI exhibited improved growth performance and carcass merit than pigs selected for a high RFI. The improved G:F of pigs selected for low RFI was expected, because RFI is a unique measure of feed efficiency (Koch et al., 1963); however, the greater ADG measured in the low RFI pigs during the growing period (+87 g/d) was not in line with the selection objective to keep BW constant (Gilbert et al., 2007) and with previous data showing no difference in growth rate between lines of pigs divergently selected for RFI (Harris et al., 2012; Faure et al., 2013). Because the difference in ADG between low and high RFI groups was observed for any given interval, the hypothesis of line-associated differences in growth precocity during the grower period can be discarded. Testing pigs over a fixed age range rather than over a fixed BW range as in the selection procedure may be rather partly responsible for this discrepancy on ADG between studies. At slaughter, the bet-

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on November 3, 2014

Table 5. Fatty acid composition[1] in subcutaneous adipose tissue as influenced by line and diet

	RFI Line		Diet			*P*-value[2]	
FA	High	Low	HF	LF	RSD	Line	Diet
n	12	12	12	12	–	–	–
SFA	37.7	36.6	29.3	45.0	2.1	0.071	<0.001
C14:0	1.06	0.98	0.86	1.18	0.09	0.007	<0.001
C16:0	21.6	21.2	17.6	25.2	1.1	0.172	<0.001
C18:0	13.8	13.3	9.7	17.4	1.3	0.195	<0.001
MUFA	40.5	41.8	40.4	41.8	1.7	0.010	0.010
C16:1	1.58	1.70	1.47	1.81	0.2	0.094	<0.001
C18:1	37.4	38.7	37.6	36.4	1.6	0.007	0.078
C20:1	1.32	1.29	1.22	1.39	0.24	0.683	0.017
PUFA	21.8	21.6	30.2	13.2	1.9	0.700	<0.001
C18:2	16.4	16.3	23.5	9.2	1.7	0.950	<0.001
C18:3	1.56	1.53	2.51	0.61	0.24	0.518	<0.001
C20:2	1.19	1.17	1.48	0.87	0.60	0.907	0.001
C20:3	1.22	0.98	1.12	1.08	0.84	0.321	0.872
n-6/n-3	5.25	5.60	6.02	4.84	1.6	0.450	0.014

[1]The most quantitatively important fatty acids (FA) of SFA, MUFA, or PUFA families are indicated as the proportion of all individual identified FA.

[2]Effects of genetic line, diet, and the interaction between line and diet (L × D).

ter carcass yield in the low RFI pigs than in the high RFI pigs confirms previous data obtained in a former generation of selection (Faure et al., 2013). The present study further indicates that this benefit was due to the lesser development of the digestive tract and lower digestive content in that line. Carcass composition was also affected by selection with heavier muscled carcasses for the low RFI pigs in this study, as reported in other experiments (Lefaucheur et al., 2011; Smith et al, 2011; Faure et al., 2013). This difference could be related to reduced protein degradation in pigs selected for a low RFI (Cruzen et al., 2013), although we have reported no difference in the activities of some enzymes related to protein catabolism in the former generation of pigs selected for RFI (Le Naou et al., 2012). A limited line-associated difference in the proportion of fat tissues in the carcass, with no change in BFT, was shown herein; whereas marked differences in carcass adiposity between RFI lines have been reported in the former generations of selection for pigs at the market BW (Le Naou et al., 2012; Faure et al., 2013). Early line difference in BFT is not expected because BFT at 95 kg BW is included in the computation of the RFI selection index (Gilbert et al., 2007). The finding that line difference for BFT becomes significant for 19 wk onwards (Faure et al., 2013), which was the end point of the present experiment, also support our data. Pigs were investigated at this young age to reveal causal rather than associated mechanisms that may underline adiposity variation. At this age, as well as at a later age in the finishing period (Le Naou et al., 2012), the activities of enzymes involved in lipogenesis in backfat were not affected by RFI selection. However, it is conceivable that a shift in the balance between lipogenesis and lipolysis explained difference in body fat development between RFI lines. Importantly, the current study reported greater activities of HAD and CS in backfat of low RFI pigs compared with the high RFI pigs. A proper functioning of mitochondria is essential for ATP synthesis needed for various metabolic pathways in adipocytes, with the induction of lipolysis being notably associated with stimulation of various mitochondrial proteins participating to tricarboxylic acid cycle and FA oxidation (Cho et al., 2009). However, the role of mitochondrial oxidation rate in white adipose tissue has been largely neglected in the literature relative to energy homeostasis. In pigs, Vincent et al. (2012) have reported greater expression of several genes related to mitochondrial energy metabolism in subcutaneous adipose tissue of a lean breed compared with a fat breed. In mice, the levels of approximately half of the gene transcripts encoding mitochondrial proteins in epididymal fat are decreased during the development of obesity (Wilson-Fritch et al., 2004). Finally, induction of mitochondrial oxidative phosphorylation and of (UCP1-independent) beta-oxidation in white adipocytes has been suggested as a key to lean phenotype in both humans and rodents (Flachs et al., 2013 for a review). Altogether, we suggest that oxidative capacity of mitochondria in adipose tissue needs to be reconsidered in future studies on feed efficiency in swine, regarding its potential role in energy homeostasis and body composition. An opposite response of HAD activity to RFI selection was observed in the liver, with the lowest hepatic HAD activity in the low RFI pigs fitting with previous data obtained in a former generation of selection (Le Naou et al., 2012). Similarly, Grubbs and colleagues (2013)

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on November 3, 2014

Table 6. Activities of enzymes related to lipogenesis[1] in tissues as influenced by line and diet

	RFI line[2]		Diet			*P*-value[3]	
Tissue	High	Low	HF	LF	RSD	Line	Diet
n	24	24	24	24	–	–	–
Backfat							
FASN	77	70	60	88	21	0.243	<0.001
Malic enzyme	1,313	1,200	840	1,671	271	0.153	<0.001
G6PDH	498	518	439	577	87	0.444	<0.001
Perirenal fat							
FASN	104	100	83	121	32	0.629	<0.001
Malic enzyme	1,550	1,534	876	2,209	472	0.906	<0.001
G6PDH	667	740	558	849	161	0.129	<0.001
Muscle							
Malic enzyme	9.9	8.6	8.6	9.9	1.5	0.004	0.003
G6PDH	1.01	0.76	0.79	0.98	0.21	<0.001	0.004
Liver							
FASN	11.3	12.8	9.7	14.3	2.9	0.100	<0.001
Malic enzyme	11.0	9.5	9.7	10.8	3.8	0.188	0.302
G6PDH	50.8	53.2	52.8	51.2	7.8	0.287	0.477

[1]Specific activities of the fatty acid synthase (FASN), malic enzyme, and the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) were expressed as nmol per min and per mg of cytosolic proteins.

[2]RFI, residual feed intake.

[3]There was no interaction ($P > 0.10$) between genetic line (low or high RFI) and diet (LF, low fiber, low fat; HF, high fiber, high fat), so that least squares means for the effects of Line and of Diet are shown.

have found lower abundance of HAD and of acyl-CoA dehydrogenase, another enzyme involved in FA oxidation, in isolated liver mitochondria of low vs. high RFI pigs. The RFI selection had also lowered GCK activity, the low affinity hepatic HK; therefore, GCK-to-CS ratio was greater in liver of the low RFI pigs, which means likely that the gluconeogenic pathway has been favored by selection for feed efficiency.

Despite line-associated differences in performance and tissue energy metabolism, feeding a HF diet adversely affected feed intake, growth rate and carcass yield in a similar manner in the two RFI lines when compared with feeding a LF diet. Recently, Montagne et al. (2014) have suggested that the low RFI pigs may have a better ability than the high RFI pigs to cope with a high fiber but low energy diet during a 3-wk interventional period. Nevertheless, the results of the present study comparing the responses to contrasted diets with equal ME content during the whole growing period did not support this idea. The duration of the feeding trial, the type of fibers included in diets, and the level of dietary energy might be involved in these discrepancies. In both lines, the reduction in ADFI observed when feeding the HF diet is likely due to increased physical constraints as illustrated by the greater swelling capacity of this diet compared with the LF diet, which may have resulted in longer time spent eating (Whittemore et al., 2002; De Lange et al., 2006) and early satiety (Kerr and Shurson, 2013). The reduction in carcass yield resulted likely from a greater gut fill and increased development of the digestive tract in HF-fed pigs, which might be associated with the high fiber content of this diet (Millet et al., 2012). Although extractable fat was included in the HF diet, thus leading to a slightly greater NE content than in the LF diet, this did not prevent the decrease in ADG nor had it benefits on G:F. These data disagree with Myer and Combs (1991), showing that adding fat improves feed efficiency of growing pigs whether diets contain fiber or not. This means that, even if dietary energy concentration is important to consider, the main determinant of growth performance in pigs housed individually is daily ingested energy (Quiniou and Noblet, 2012).

The dietary-associated changes in body adiposity were difficult to predict, due to antagonistic effects of dietary fat level and fiber content on BFT (Yan et al., 2013). Because differences in backfat proportion between HF-fed and LF-fed pigs were significant even when data were corrected for individual differences in ADFI, BW or carcass weight, we suggest that the lower adiposity of pigs fed the HF diet was not simply the consequence of their lower energy intake or their slower growth rate. Rather, the differences in tissue lipid contents were likely associated with reduced lipogenic rates when feeding the HF diet, an assumption that is supported by lower proportions of palmitate (C16:0) and oleate (C18:0) in backfat, the first synthetized FA from carbohydrate sources, and lower specific activities of key lipogenic enzymes. These data are in accordance with the observation that dietary fat inhibits lipogenesis in isolated porcine adipocytes (Benmansour et al.,

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on November 3, 2014

Table 7. Activities of oxidative enzymes and glucokinase in tissues as influenced by line and diet[1]

	RFI line[2]		Diet			*P*-value[3]	
Tissue	High	Low	HF	LF	RSD	Line	Diet
n	24	24	24	24	–	–	–
Backfat							
HAD	0.221	0.259	0.214	0.266	0.06	0.025	0.003
CS	0.252	0.269	0.235	0.286	0.03	0.088	<0.001
LM							
HAD	0.031	0.030	0.030	0.031	0.01	0.846	0.811
CS	0.056	0.060	0.059	0.057	0.02	0.412	0.684
HK	0.876	0.877	0.801	0.952	0.43	0.996	0.233
HK/CS	16.54	15.58	13.08	19.04	9.23	0.721	0.031
Liver							
HAD	0.011	0.010	0.011	0.011	0.001	0.017	0.961
CS	0.092	0.096	0.094	0.095	0.015	0.441	0.750
GCK	19.46	28.75	22.45	25.74	2.37	<0.001	0.041
GCK/CS	213	301	243	270	63	<0.001	0.100

[1]Specific activities of the hydroxyl-acyl-CoA dehydrogenase (HAD), citrate synthase (CS), hexokinase (HK), and glucokinase (GCK) expressed as µmoles per min and per mg of cytosolic proteins.

[2]RFI, residual feed intake.

[3]There was no interaction ($P > 0.10$) between genetic line (low or high RFI) and diet (LF, low fiber, low fat; HF, high fiber, high fat), so that least squares means for the effects of Line and of Diet are shown.

1991). In liver, the lower activity of the FASN in HF-fed pigs compared with LF-fed pigs also matches with the recent finding that reduced BFT and reduced hepatic expression of FASN might be associated in pigs (Munoz et al., 2013), so that liver may have an input into lipid metabolism and body composition even in peri-pubertal pigs (Ponsuksili et al., 2007). Conversely, the finding that proportions of C18:2 and C18:3, which are essential PUFA, were dramatically higher in backfat of HF-fed pigs, argues for the direct deposition of a portion of dietary lipids in backfat; however, despite lower oxidation rates of FA in backfat with the HF diet, this was not enough to sustain backfat development to the rate of lipid deposition obtained with the distribution of the LF diet. Because it has been recently shown that dietary fibers attenuate the fat accumulation expected with the distribution of a high fat diet in grower pigs (Yan et al., 2013), one explanation might be that part of ingested lipids in HF-fed pigs, which resulted in greater plasma triglyceride concentrations in HF-fed pigs than in LF-fed pigs, was sequestered elsewhere than in peripheral tissues in those pigs. We have no direct evidence for that, but the greater hepatic lipid content measured for the high RFI line when feeding the HF diet as compared with the LF diet argues for lipid trapping by digestive organs, at least in this line. This fits with the assumption of increased energy needs in HF-fed pigs to sustain a greater development of the digestive tract and a heavier digestive content, and to cope with an increase in populations of cellulolytic and hemicellulolytic bacterial species in the intestine in response to the ingestion of diet high in plant cell wall materials (Varel and Yen, 1997). The RFI-specificity of this response is likely to be associated with the greater maintenance requirements in the high RFI line (Barea et al., 2010), considering also the fact that both digestive content, gastrointestinal tract and liver weights were heavier in the high RFI pigs than in the low RFI pigs in the present study.

Finally, changing energy source and nutrients in pig diet had also resulted in variations in hepatic glycogen content in both lines. The decreased GCK activity in the liver of pigs fed the HF diet is consistent with the lower hepatic glycogen content reported herein as compared with the LF-fed pigs. Indeed, this enzyme is expressed in tissues such as liver to allow trapping excess of glucose for glycogen synthesis (Printz et al., 1993). Because this enzyme is considered as a glucose sensor in mammals (Matschinsky, 1990), the reduced GCK activity in HF-fed pigs likely results from the lower plasma glucose level observed after the distribution of this low starch diet. Similar changes in GCK activity during the post-prandial period have been observed when other species are fed diets with decreasing carbohydrate contents (Mithieux, 1996; Tranulis et al., 1996). In muscle, the ratio of HK, playing a pivotal role in glucose transport and metabolism by trapping glucose through phosphorylation, to CS, involved in tricarboxylic acid cycle within mitochondria, was lower in pigs fed the HF diet compared with pigs fed the LF diet. This theoretically favors oxidation over glycolysis in the HF-fed pigs, and may indicate a better coordination of cytosolic and oxidative metabolisms (Simoneau and Kelley, 1997) in those pigs. This observed difference in the HK/CS ratio in muscle of HF-fed vs. LF-fed pigs agrees with the observation

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on November 3, 2014

that ratio of glycolytic to oxidative enzymes is generally lower in lean than in obese Human subjects (Simoneau and Kelley, 1997).

Conclusions

Irrespective of feed energy sources, feed conversion efficiency, carcass yield, and composition of pigs selected for a low RFI were favorable. Irrespective of the line, feeding a high-fat diet with a high level of coarsely ground fibers reduced feed intake with adverse consequences on growth rate, compared with feeding a LF diet. There was an interaction with genetics for feed efficiency in the partition and use of feed energy and nutrients, so that lipid contents responded in a tissue-specific manner to this diet. Not only the hierarchy in lipid metabolic pathways was affected, but also the glycogenic metabolism was involved in the variations of tissue composition according to dietary energy sources.

LITERATURE CITED

Barea, R., S. Dubois, H. Gilbert, P. Sellier, J. van Milgen, and J. Noblet. 2010. Energy utilization in pigs selected for high and low residual feed intake. J. Anim. Sci. 88:2062–2072. doi:10.2527/jas.2009-2395

Bass, A., D. Brdiczka, P. Eyer, S. Hofer, and D. Pette. 1969. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. Eur. J. Biochem. 10:198–206. doi:10.1111/j.1432-1033.1969.tb00674.x

Bazin, R., and P. Ferré. 2001. Assays of lipogenic enzymes. Methods Mol. Biol. 155:121–127.

Benmansour, N. M., Y. Demarne, M. J. Lecourtier, and C. Lhuillery. 1991. Effects of dietary fat and adipose tissue location on insulin action in young boar adipocytes. Int. J. Biochem. 23:499–506. doi:10.1016/0020-711X(91)90180-U

Birkett, S., and C. F. M. de Lange. 2001. A computational framework for a nutrient flow representation of energy utilization by growing monogastric animals. Br. J. Nutr. 86:647–659. doi:10.1079/BJN2001441

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

Cho, S. Y., P. J. Park, E. S. Shin, J. H. Lee, H. K. Chang, and T. R. Lee. 2009. Proteomic analysis of mitochondrial proteins of basal and lipolytically (isoproterenol and TNF-alpha)-stimulated adipocytes. J. Cell. Biochem. 106:257–266. doi:10.1002/jcb.21998

Cruzen, S. M., A. J. Harris, K. Hollinger, R. M. Punt, J. K. Grubbs, J. T. Selsby, J. C. Dekkers, N. K. Gabler, S. M. Lonergan, and E. Huff-Lonergan. 2013. Evidence of decreased muscle protein turnover in gilts selected for low residual feed intake. J. Anim. Sci. 91:4007–4016. doi:10.2527/jas.2013-6413

De Lange, C., J. van Milgen, S. Dubois, and J. Noblet. 2006. Energy cost of ingesting and excreting indigestible material in growing pigs is minimal. Anim. Res. 55:551–562. doi:10.1051/animres:2006041

Faure, J., L. Lefaucheur, N. Bonhomme, P. Ecolan, K. Meteau, S. M. Coustard, M. Kouba, H. Gilbert, and B. Lebret. 2013. Consequences of divergent selection for residual feed intake in pigs on muscle energy metabolism and meat quality. Meat Sci. 93:37–45. doi:10.1016/j.meatsci.2012.07.006

Flachs, P., M. Rossmeisl, O. Kuda, and J. Kopecky. 2013. Stimulation of mitochondrial oxidative capacity in white fat independent of UCP1: A key to lean phenotype. Biochim. Biophys. Acta 1831:986–1003. doi:10.1016/j.bbalip.2013.02.003

Gilbert, H., J. P. Bidanel, J. Gruand, J. C. Caritez, Y. Billon, P. Guillouet, H. Lagant, J. Noblet, and P. Sellier. 2007. Genetic parameters for residual feed intake in growing pigs, with emphasis on genetic relationships with carcass and meat quality traits. J. Anim. Sci. 85:3182–3188. doi:10.2527/jas.2006-590

Good, C. A., H. Kramer, and M. Somogyi. 1933. The determination of glycogen. J. Biol. Chem. 100:485–491.

Grubbs, J. K., A. N. Fritchen, E. Huff-Lonergan, N. K. Gabler, and S. M. Lonergan. 2013. Selection for residual feed intake alters the mitochondria protein profile in pigs. J. Proteomics 80:334–345. doi:10.1016/j.jprot.2013.01.017

Harris, A. J., J. F. Patience, S. M. Lonergan, J. M. Dekkers, and N. K. Gabler. 2012. Improved nutrient digestibility and retention partially explains feed efficiency gains in pigs selected for low residual feed intake. J. Anim. Sci. 90(S4):164–166. doi:10.2527/jas.53855

Kerr, B. J., and G. C. Shurson. 2013. Strategies to improve fiber utilization in swine. J. Anim. Sci. Biotechnol. doi: 10.1186/2049-1891-4-11.

Koch, R. M., L. A. Swiger, D. Chambers, and K. E. Gregory. 1963. Efficiency of feed use in beef cattle. J. Anim. Sci. 22:486–494.

Lefaucheur, L., B. Lebret, P. Ecolan, I. Louveau, M. Damon, A. Prunier, Y. Billon, P. Sellier, and H. Gilbert. 2011. Muscle characteristics and meat quality traits are affected by divergent selection on residual feed intake in pigs. J. Anim. Sci. 89:996–1010. doi:10.2527/jas.2010-3493

Le Naou, T., N. Le Floc'h, I. Louveau, H. Gilbert, and F. Gondret. 2012. Metabolic changes and tissue responses to selection on residual feed intake in growing pigs. J. Anim. Sci. 90:4771–4780. doi:10.2527/jas.2012-5226

Lkhagvadorj, S., L. Qu, W. Cai, O. P. Couture, C. R. Barb, G. J. Hausman, D. Nettleton, L. L. Anderson, J. C. Dekkers, and C. K. Tuggle. 2010. Gene expression profiling of the short-term adaptive response to acute caloric restriction in liver and adipose tissues of pigs differing in feed efficiency. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 298:R494–R507. doi:10.1152/ajpregu.00632.2009

Matschinsky, F. M. 1990. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. Diabetes 39:647–652. doi:10.2337/diab.39.6.647

Millet, S., S. Kumar, J. De Boever, T. Meyns, M. Aluwé, D. De Brabander, and R. Ducatelle. 2012. Effect of particle size distribution and dietary crude fibre content on growth performance and gastric mucosa integrity of growing-finishing pigs. Vet. J. 192:316–321. doi:10.1016/j.tvjl.2011.06.037

Mithieux, G. 1996. Role of glucokinase and glucose-6 phosphatase in the nutritional regulation of endogenous glucose production. Reprod. Nutr. Dev. 36:357–362. doi:10.1051/rnd:19960402

Monin, G., and P. Sellier. 1985. Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: The case of the Hampshire breed. Meat Sci. 13:49–63. doi:10.1016/S0309-1740(85)80004-8

Montagne, L., F. Loisel, T. Le Naou, F. Gondret, H. Gilbert, and M. Le Gall. 2014. Difference in short-term responses to a high fiber diet in pigs divergently selected on residual feed intake. J. Anim. Sci. 92:1512–1523. doi:10.2527/jas.2013-6623

Morrison and Smith. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoride-methanol. J. Lipid Res. 5:600–608.

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on November 3, 2014

Munoz, R., J. Estany, M. Tor, and O. Doran. 2013. Hepatic lipogenic enzyme expression in pigs is affected by selection for decreased backfat thickness at constant intramuscular fat content. Meat Sci. 93:746–751. doi:10.1016/j.meatsci.2012.11.045

Myer, R. O., and G. E. Combs. 1991. Fat supplementation of diets containing a high level of oats for growing-finishing swine. J. Anim. Sci. 69:4665–4669.

Panserat, S., F. Medale, C. Blin, J. Breque, C. Vachot, E. Plagnes-Juan, E. Gomes, R. Krishnamoorthy, and S. Kaushik. 2000. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 278:R1164–R1170.

Ponsuksili, S., E. Murani, C. Walz, M. Schwerin, and K. Wimmers. 2007. Pre- and postnatal hepatic gene expression profiles of two pig breeds differing in body composition: Insight into pathways of metabolic regulation. Physiol. Genomics 29:267–279. doi:10.1152/physiolgenomics.00178.2006

Printz, R. L., M. A. Magnuson, and D. K. Granner. 1993. Mammalian glucokinase. Annu. Rev. Nutr. 13:463–496. doi:10.1146/annurev.nu.13.070193.002335

Quemeneur, B., M. Le Roux, and M. Magnin. 2013. Characterization and interest of the feed swelling capacity for the weaned piglets. Journées Rech. Porcine 45:197–198.

Quiniou, N., and J. Noblet. 2012. Effect of the dietary net energy concentration on feed intake and performance of growing-finishing pigs housed individually. J. Anim. Sci. 90:4362–4372. doi:10.2527/jas.2011-4004

Sahena, F., I. S. M. Zaidul, S. Jinap, A. A. Karim, K. A. Abbas, N. A. N. Norulaini, and A. K. M. Omar. 2009. Application of supercritical CO_2 in lipid extraction. J. Food Eng. 95:240–253. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.06.026

Simoneau, J. A., and D. E. Kelley. 1997. Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. J. Appl. Physiol. 83:166–171.

Smith, R. M., N. K. Gabler, J. M. Young, W. Cai, N. J. Boddicker, M. J. Anderson, E. Huff-Lonergan, J. C. Dekkers, and S. M. Lonergan. 2011. Effects of selection for decreased residual feed intake on composition and quality of fresh pork. J. Anim. Sci. 89:192–200. doi:10.2527/jas.2010-2861

Srere, P. A. 1969. Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. Methods Enzymol. 13:3–11.

Tranulis, M. A., O. Dregni, B. Christophersen, A. Krogdahl, and B. Borrebaek. 1996. A glucokinase-like-enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 114:35–39. doi:10.1016/0305-0491(95)02119-1

van Soest, P. J., and R. H. Wine. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 50:50–55.

Varel, V. H., and J. T. Yen. 1997. Microbial perspective on fiber utilization by swine. J. Anim. Sci. 75:2715–2722.

Vincent, A., I. Louveau, F. Gondret, B. Lebret, and M. Damon. 2012. Mitochondrial function, fatty acid metabolism, and immune system are relevant features of pig adipose tissue development. Physiol. Genomics 44:1116–1124. doi:10.1152/physiolgenomics.00098.2012

Whittemore, E. C., I. Kyriazakis, B. J. Tolkamp, and G. C. Emmans. 2002. The short-term feeding behavior of growing pigs fed foods differing in bulk content. Physiol. Behav. 76:131–141. doi:10.1016/S0031-9384(02)00686-8

Wilson-Fritch, L., S. Nicoloro, M. Chouinard, M. A. Lazar, P. C. Chui, J. Leszyk, J. Straubhaar, M. P. Czech, and S. Corvera. 2004. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. J. Clin. Invest. 114:1281–1289. doi:10.1172/JCI200421752

Yan, H., R. Potu, H. Lu, V. Vezzoni de Almeida, T. Stewart, D. Ragland, A. Armstrong, O. Adeola, C. H. Nakatsu, and K. M. Ajuwon. 2013. Dietary fat content and fiber type modulate hind gut microbial community and metabolic markers in the pig. PLoS ONE 8:e59581. doi:10.1371/journal.pone.0059581

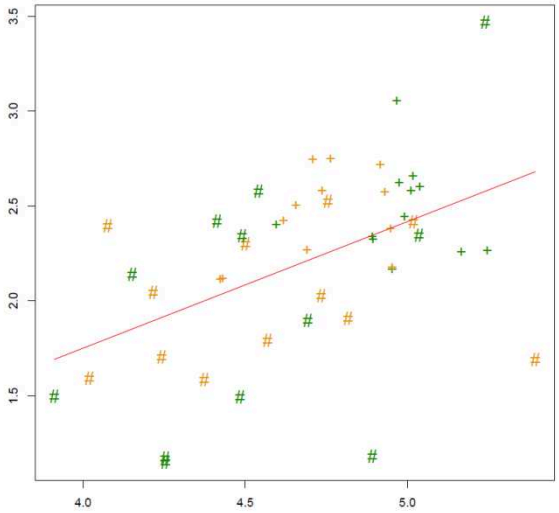
Downloaded from www.journalofanimalscience.org at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on November 3, 2014

References This article cites 43 articles, 20 of which you can access for free at:
http://www.journalofanimalscience.org/content/92/11/4865#BIBL

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at INRA Institut National de la Recherche Agronomique on November 3, 2014

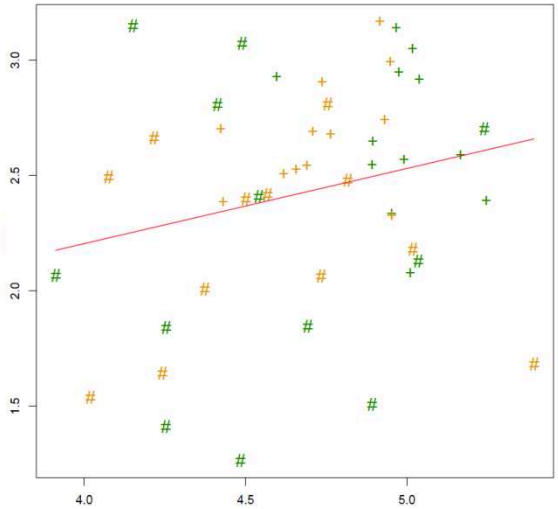
Annexe IV

Expression de CD40 dans le TA périrénal



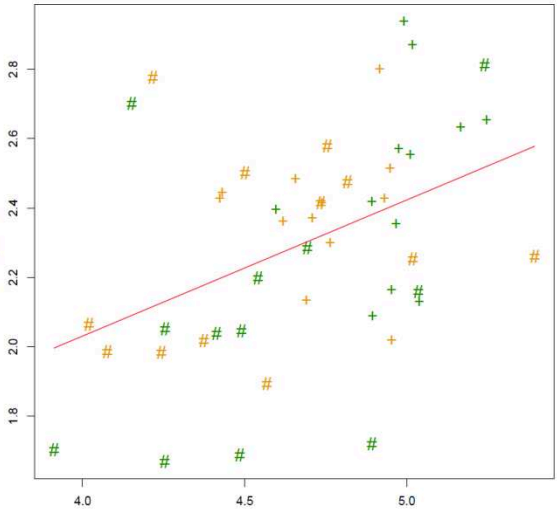
Expression de CD40 dans le Sang

Expression de CD40 dans le TASC



Expression de CD40 dans le Sang

Expression de CD40 dans le foie

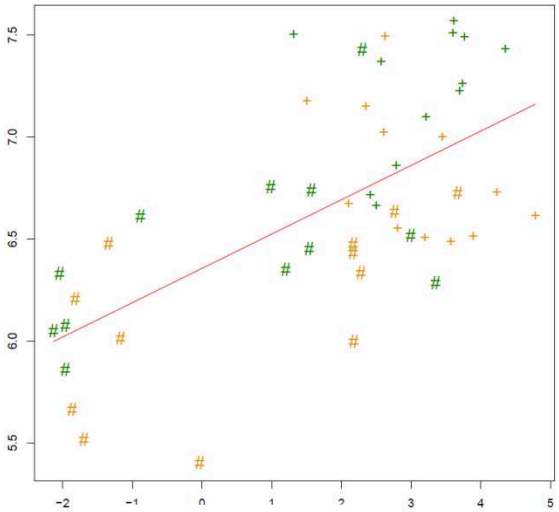


Expression de CD40 dans le Sang

Légende:
CMJR- HF
+ CMJR+ HF
# CMJR- LF
+ CMJR- LF

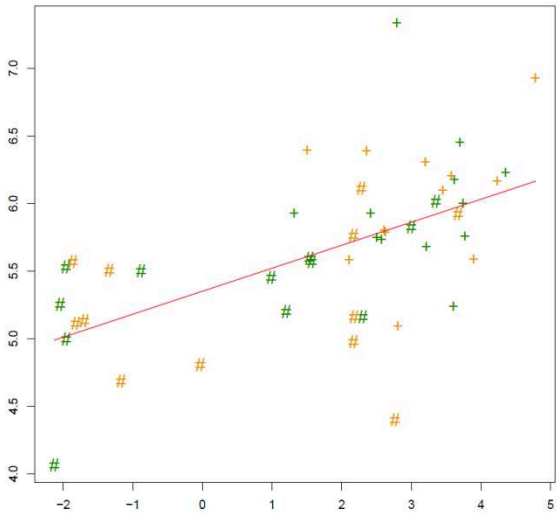
Corrélation entre l'expression du gène codant CD40 dans le sang et dans les tissus ($P<0,05$; $r>|0,3|$) chez le porc.

Expression de GPX3 dans TA périrénal



Expression de GPX3 dans le Sang

Expression de GPX3 dans le foie

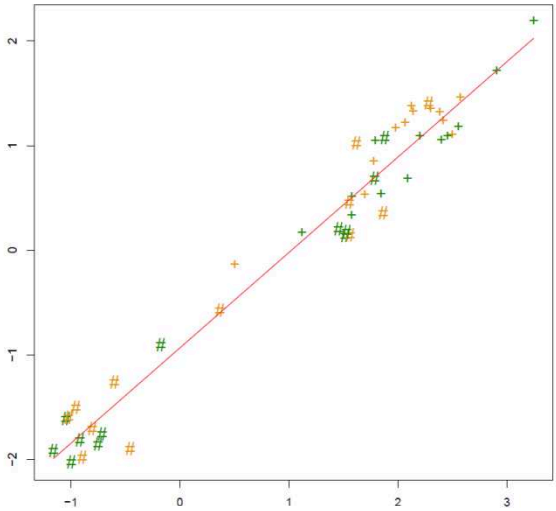


Expression de GPX3 dans le Sang

Légende:
CMJR- HF
+ CMJR+ HF
# CMJR- LF
+ CMJR- LF

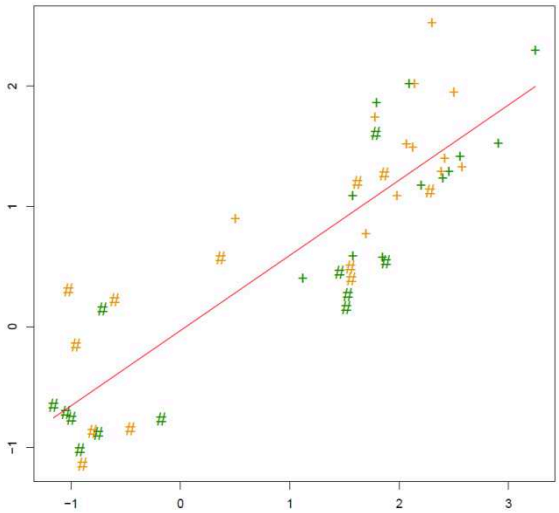
Corrélation entre l'expression du gène codant GPX3 dans le sang et dans les tissus ($P<0,05$; $r>|0,3|$) chez le porc.

Expression de NMI dans TA périrénal



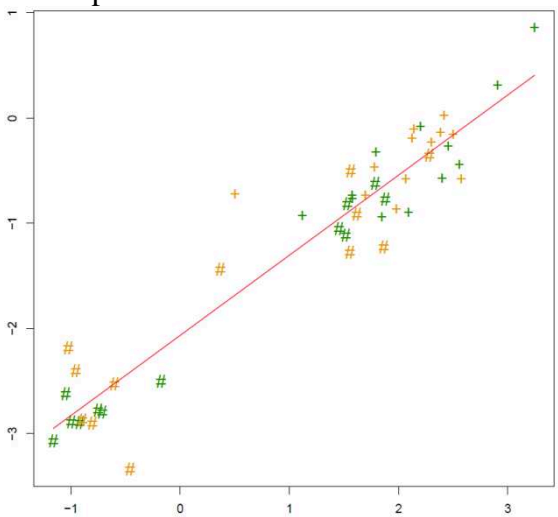
Expression de NMI dans le Sang

Expression de NMI dans le foie



Expression de NMI dans le Sang

Expression de NMI dans le LD

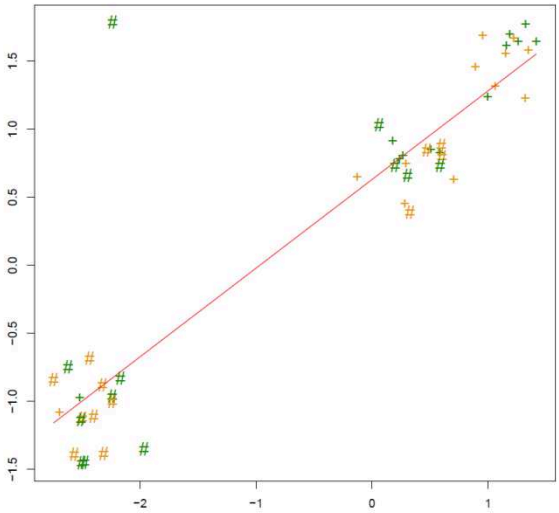


Expression de NMI dans le Sang

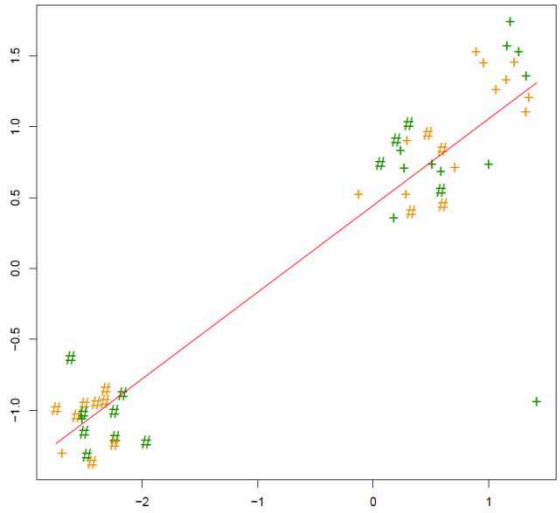
Légende:
CMJR- HF
+ CMJR+ HF
# CMJR- LF
+ CMJR- LF

Corrélation entre l'expression du gène codant NMI dans le sang et dans les tissus ($P<0,05$; $r>|0,3|$) chez le porc.

Expression de OAZ3 dans le TA périrénal



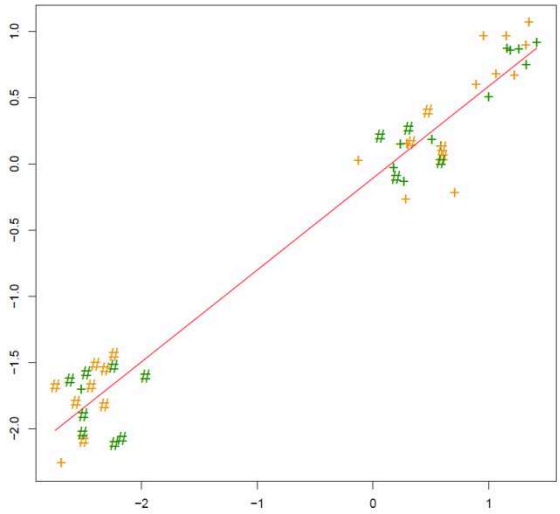
Expression de OAZ3 dans le TASC



Expression de OAZ3 dans le Sang

Expression de OAZ3 dans le Sang

Expression de OAZ3 dans le Foie

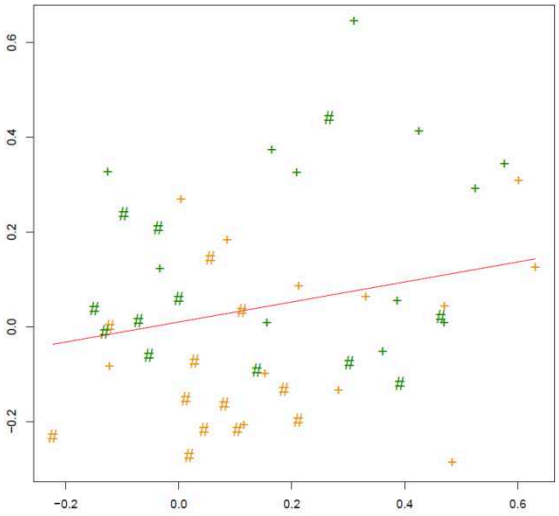


Expression de OAZ3 dans le Sang

Légende:
CMJR- HF
+ CMJR+ HF
# CMJR- LF
+ CMJR- LF

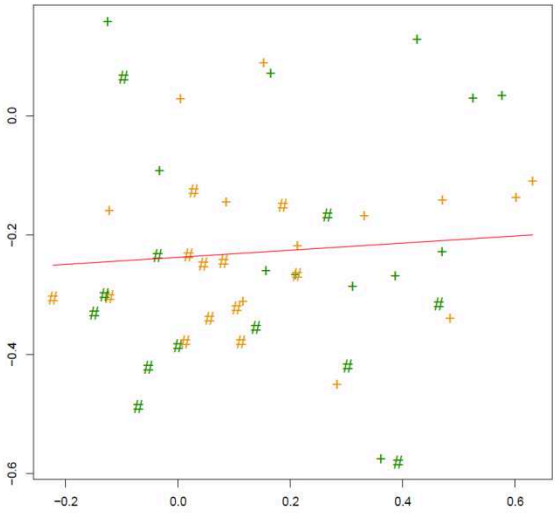
Corrélation entre l'expression du gène codant OAZ3 dans le sang et dans les tissus (P<0,05; r>|0,3|) chez le porc.

Expression de PSEN1 dans le TA périrénal



Expression de PSEN1 dans le Sang

Expression de PSEN1 dans le foie

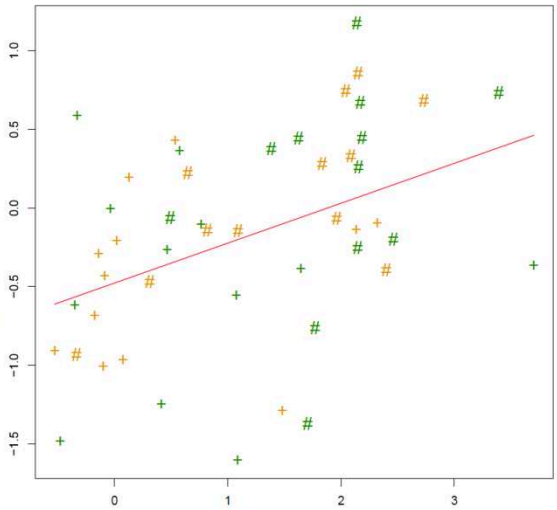


Expression de PSEN1 dans le Sang

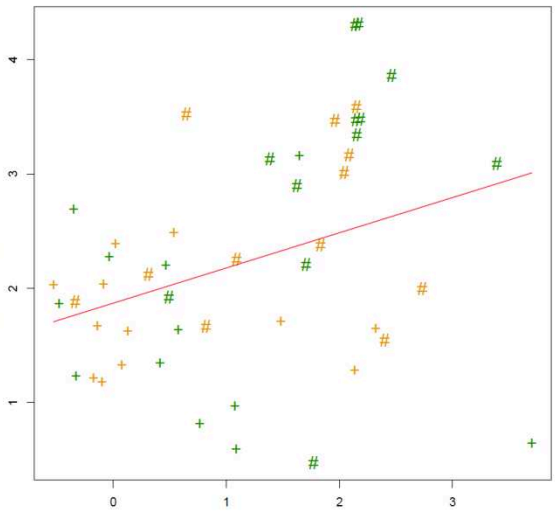
Légende:
CMJR- HF
+ CMJR+ HF
# CMJR- LF
+ CMJR- LF

Corrélation entre l'expression du gène codant PSEN1 dans le sang et dans les tissus ($P<0,05$; $r>|0,3|$) chez le porc.

Expression de SLPI dans le Foie



Expression de SLPI dans le LD



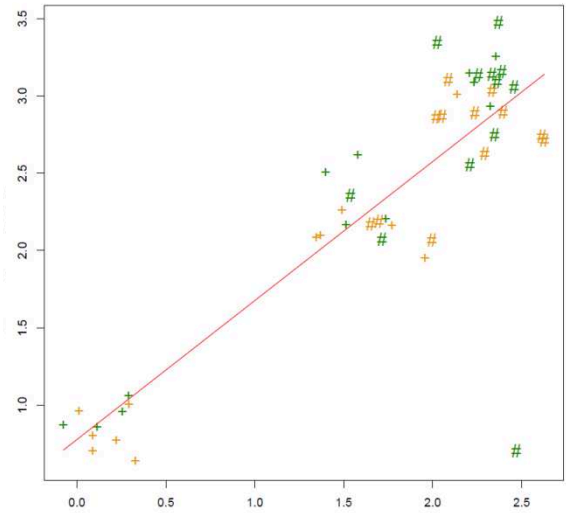
Expression de SLPI dans le Sang

Expression de SLPI dans le Sang

Légende:
CMJR- HF
+ CMJR+ HF
# CMJR- LF
+ CMJR- LF

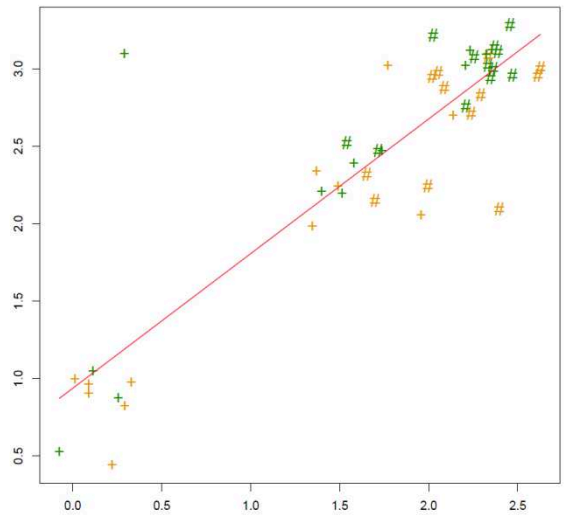
Corrélation entre l'expression du gène codant SLPI dans le sang et dans les tissus (P<0,05; r>|0,3|) chez le porc.

Expression de TRAF6 dans le TA périrénal



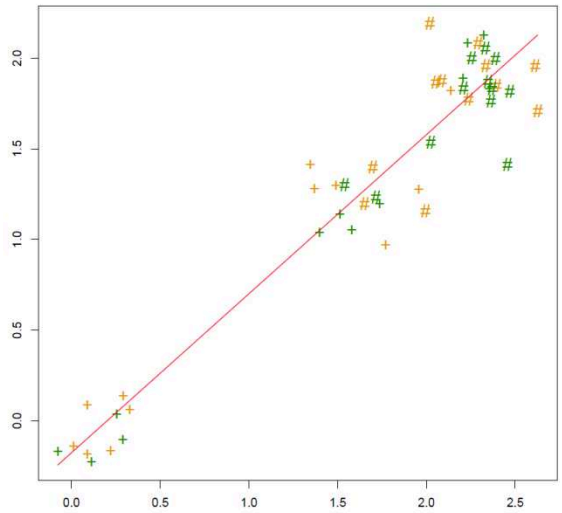
Expression de TRAF6 dans le Sang

Expression de TRAF6 dans le TASC



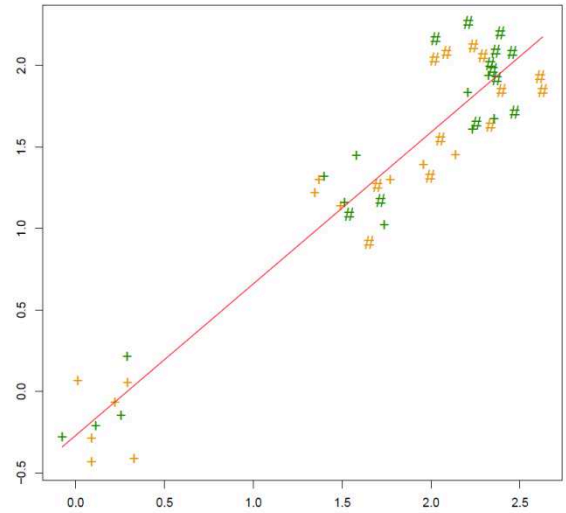
Expression de TRAF6 dans le Sang

Expression de TRAF6 dans le foie



Expression de TRAF6 dans le Sang

Expression de TRAF6 dans le LD

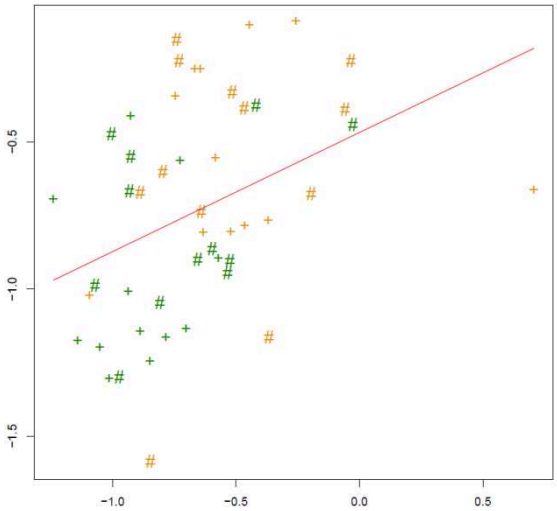


Expression de TRAF6 dans le Sang

Légende:
CMJR- HF
+ CMJR+ HF
# CMJR- LF
+ CMJR- LF

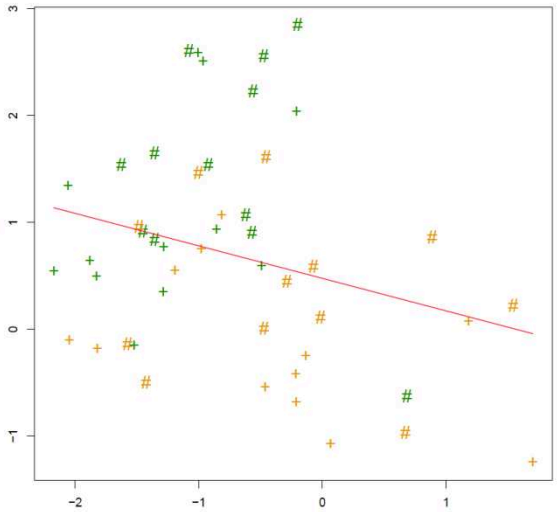
Corrélation entre l'expression du gène codant TRAF 6 dans le sang et dans les tissus (P<0,05; r>|0,3|) chez le porc.

Expression de CPT1A dans le TA périrénal



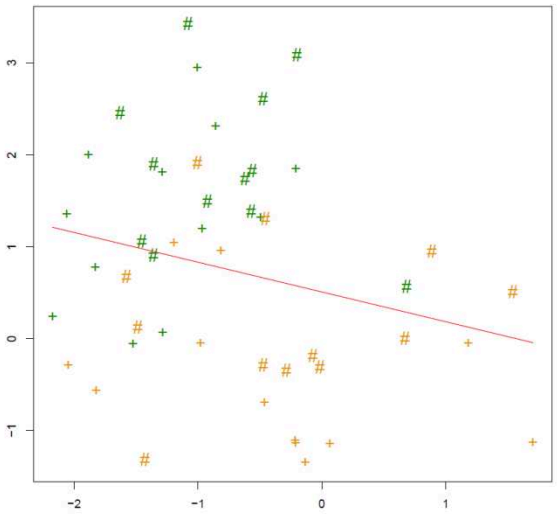
Expression de CPT1A dans le Sang

Expression de LCN2 dans le TASC



Expression de LCN2 dans le Sang

Expression de LCN2 dans le TA périrénal



Expression de LCN2 dans le Sang

Légende:
CMJR- HF
+ CMJR+ HF
# CMJR- LF
+ CMJR- LF

Corrélation entre l'expression du gène codant LCN2 dans le sang et dans les tissus (P<0,05; r>|0,3|) chez le porc.

Annexe V

Animal, page 1 of 10 © The Animal Consortium 2015
doi:10.1017/S1751731115000683

The ability of genetically lean or fat slow-growing chickens to synthesize and store lipids is not altered by the dietary energy source

E. Baéza[1†], F. Gondret[2], P. Chartrin[1], E. Le Bihan-Duval[1], C. Berri[1], I. Gabriel[1], A. Narcy[1], M. Lessire[1], S. Métayer-Coustard[1], A. Collin[1], M. Jégou[2], S. Lagarrigue[2] and M. J. Duclos[1]

[1]*INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France;* [2]*INRA, UMR1348 Physiologie, Environnement et Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Elevage, F-35590 Saint-Gilles, France*

(Received 30 January 2015; Accepted 14 April 2015)

The increasing use of unconventional feedstuffs in chicken's diets results in the substitution of starch by lipids as the main dietary energy source. To evaluate the responses of genetically fat or lean chickens to these diets, males of two experimental lines divergently selected for abdominal fat content were fed isocaloric, isonitrogenous diets with either high lipid (80 g/kg), high fiber (64 g/kg) contents (HL), or low lipid (20 g/kg), low fiber (21 g/kg) contents (LL) from 22 to 63 days of age. The diet had no effect on growth performance and did not affect body composition evaluated at 63 days of age. Glycolytic and oxidative energy metabolisms in the liver and glycogen storage in liver and Sartorius *muscle at 63 days of age were greater in chicken fed LL diet compared with chicken fed HL diet. In* Pectoralis major *(PM) muscle, energy metabolisms and glycogen content were not different between diets. There were no dietary-associated differences in lipid contents of the liver, muscles and abdominal fat. However, the percentages of saturated (SFA) and monounsaturated fatty acids (MUFA) in tissue lipids were generally higher, whereas percentages of polyunsaturated fatty acids (PUFA) were lower for diet LL than for diet HL. The fat line had a greater feed intake and average daily gain, but gain to feed ratio was lower in that line compared with the lean line. Fat chickens were heavier than lean chickens at 63 days of age. Their carcass fatness was higher and their muscle yield was lower than those of lean chickens. The oxidative enzyme activities in the liver were lower in the fat line than in the lean line, but line did not affect energy metabolism in muscles. The hepatic glycogen content was not different between lines, whereas glycogen content and glycolytic potential were higher in the PM muscle of fat chickens compared with lean chickens. Lipid contents in the liver, muscles and abdominal fat did not differ between lines, but fat chickens stored less MUFA and more PUFA in abdominal fat and muscles than lean chickens. Except for the fatty acid composition of liver and abdominal fat, no interaction between line and diet was observed. In conclusion, the amount of lipids stored in muscles and fatty tissues by lean or fat chickens did not depend on the dietary energy source.*

Keywords: chicken, energy metabolism, fatty acid composition, lipid deposition, starch

Implications

Broiler production is facing to an increasing incorporation (Slominski *et al.*, 2004; Bregendhal, 2008) of unconventional feedstuffs (rapeseed meal, beet pulps, palm kernel cake and distiller's dried grains with solubles) containing more fibers in diets. To restore suitable energy content, fat may be added to fiber rich diets, so that energy source is changed from starch to lipids. Divergently selected chicken lines for body fatness are pertinent experimental models to unravel energy metabolism pathways and body composition and to test possible interactions between genetics and nutrition. Our study showed that these lines are able to use starch or lipids without modifying their respective growth performance and body composition. Therefore, one may assume that broilers could adapt well to different energy sources allowing the inclusion of more fibers in the diet formulation even if the apparent metabolizable energy was lower and lipid digestibility was higher with diet presenting high lipid and high fiber contents compared with diet presenting low lipid content and high starch content.

Introduction

The feed cost represents about 60% of total cost in chicken production. In a context of high prices for raw materials used

† E-mail: baeza@tours.inra.fr

in animal feed, it is necessary to optimize feed efficiency and especially the use of dietary energy. In chickens, feed energy is mainly provided by starch derived from cereals and by oils. From a metabolic point of view, dietary lipids can be directly stored in body tissues, whereas carbohydrates stimulate hepatic *de novo* fatty acid synthesis and then, the secretion of neo-synthesized lipids to peripheral tissues. The effects of dietary energy sources on growth performance and body composition of chickens remain however rather controversial between studies (Plavnik *et al.*, 1997; Adrizal *et al.*, 2002; Malheiros *et al.*, 2004). The ability to synthesize and store lipids is also controlled by genetics. To increase our understanding of the genetic regulation of adiposity and energy metabolism in chickens, experimental lines have been divergently selected for low or high abdominal fat (Leclercq, 1988). These lines are also suitable to study the interactions between diets and genetics. Indeed, these lines notably show different responses to variations in energy to protein ratio in diets. Swennen *et al.* (2006) reported that chickens fed a low protein and high fat diet exhibited higher abdominal fat deposition than chickens fed a high protein and low fat diet, and this difference was more pronounced for the fat chickens. Conversely, Jlali *et al.* (2012) showed that decreasing the dietary energy to protein ratio altered glycogen storage and quality traits of breast muscle in lean chickens only. However, the effects of dietary energy source on growth performance, body composition and energy metabolism of these genetically divergent fat and lean lines have not been described so far.

The aim of this study was to determine how experimental slow-growing lines having a contrasted ability to store and synthetize lipids can adapt to different dietary energy sources, by evaluating growth performance, lipid and energy digestibility, body composition, tissue energy metabolism and meat quality traits.

Material and methods

Experimental design

All experimental procedures were performed in accordance with the French National Guidelines for the care and use of animals for research purposes (certificate of authorization to experiment on living animals n°7740, Ministry of Agriculture and Fish Products, and favorable notice of ethics committee of 'Val de Loire', 30 March 2012). A total of 120 males from two experimental lines (60 per line) divergently selected on abdominal fat content (fat and lean lines, respectively, Leclercq, 1988) were obtained from the 'Pôle Expérimental Avicole de Tours' (INRA, Nouzilly, France) on the day of hatching. Chickens were reared together in a closed building (6.7 birds/m^2) and fed a starting diet (12.12 MJ ME/kg and 210 g CP/kg). At 21 days of age, in order to limit individual variability, 32 chickens per line of similar BW were distributed into two groups receiving one of the two experimental diets and placed in individual cages ($60 \times 45 \times 60$ cm per cage). To limit the genetic variation, two or four brothers from a same family (one sire crossed with one dam) were equally distributed into the two dietary groups. The chickens had free access to water and feed. The composition and main characteristics of diets are presented on Table 1. All diets were provided under pelleted form. Their characteristics were in adequacy with the requirement of these slow-growing chickens (Larbier and Leclercq, 1992). The growing diets were calculated, thanks to data presented in INRA tables (INRA, 1989), to be isocaloric (12.54 MJ ME/kg) and isonitrogenous (190 g CP/kg) but exhibited a low (LL) or a high (HL) lipid content. Purified cellulose was used as a diluent in the HL diet. The percentages of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids (SFA, MUFA and PUFA, respectively) were similar in the two growing diets. The experimental growing diets were given from 21 to 63 days. The growing diets contained titanium dioxide (5 g/kg feed) to determine apparent metabolizable energy (AME) and lipid digestibility at the beginning and at the end of the growing period (Jagger *et al.*, 1992; Short *et al.*, 1996). Diets were sampled to determine crude fiber (NF V03-040), starch (enzymatic method, NF V18-121), total protein (Kjeldhal method, NF ISO 5983-1) and lipid (Soxhlet method, NF ISO 11085) contents. The dietary FA composition was determined according to Chartrin *et al.* (2005).

Growth performance and body composition

Birds were weighed at 0, 21, 35, 49 and 63 days of age. Between 21 and 63 days of age, feed consumption was individually recorded every 2 weeks. At 63 days of age, 12 chickens per line and per diet were selected according to their BW close to the average value of their group to limit individual variability. Chickens were feed-deprived for 12 h and then refed for 3 h before being euthanized by decapitation and bleeding. Just after slaughter, the liver, heart, *Pectoralis major* (PM) and *Sartorius* (SART) muscles, abdominal fat, fat located on the top of the external face of the thigh and the remaining portion of thigh and shrank (without skin) were immediately removed and weighed in order to determine their percentages relative to BW. Tissue samples were immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at −80°C until analyses.

AME and lipid digestibility

At 28 and 62 days of age, all the excreta produced during 24 h (Peron *et al.*, 2005) were individually collected and immediately frozen at −20°C. Then, excreta were freeze dried, ground with a hammer mill at 0.5 mm and stored at 4°C until analyses. To determine AME and lipid digestibility, the gross energy (GE) and lipid content of diets and excreta were first measured by using an isoperibol calorimeter C7000 IKA (Staufen, Germany) (NF ISO 9831) and a Soxhlet system after an acid hydrolysis (NF ISO 11085), respectively. Then, titanium dioxide concentrations in diets and excreta were measured according to Myers *et al.* (2004). The AME (kcal) and lipid digestibility (%) were calculated as following:

$$\text{AME} = \text{GE feed} - [\text{GE feces} \times (\%\,\text{titanium dioxide feed}/\%\,\text{titanium dioxide excreta})]$$

$$\text{Lipid digestibility} = \%\,\text{lipids feed} - [\%\,\text{lipids feces} \times (\%\,\text{titanium dioxide feed}/\%\,\text{titanium dioxide excreta})] / \%\,\text{lipids feed} \times 100$$

Table 1 *Composition and main calculated characteristics of diets*

Composition (g/kg)	Starting (0 to 21 days)	Growing HL (22 to 63 days)	Growing LL (22 to 63 days)
Maize	274.20	272.50	102.30
Soybean meal	201.00	239.80	105.30
Wheat	334.60	250.00	400.00
Starch			192.00
Cellulose		50.00	
Maize gluten meal	70.00	22.90	24.20
Peas	60.00	60.00	60.00
Soybean proteins			70.00
Dicalcium phosphate	18.40	16.30	15.90
Rapeseed oil	10.00	22.00	5.00
Soybean oil	5.00	41.00	
Calcium carbonate	12.60	8.60	9.00
Vitamins and trace minerals*	5.00	5.00	5.00
Sodium chloride	3.00	3.00	3.00
DL-methionine	1.70	2.30	2.00
HCl Lysine	4.00	1.40	1.10
Threonine	0.30		
Anticoccidiostatic (Clinacox)	0.20	0.20	0.20
Titanium dioxyde		5	5
Characteristics (g/kg)			
Metabolizable energy (MJ/kg)	12.12	12.54	12.54
CP	210.00	190.00	190.00
Lysine	12.20	10.47	10.43
Sulfur amino acids	8.56	8.19	8.23
Tryptophane	2.13	2.14	2.24
Threonine	7.59	6.82	6.56
Calcium	11.02	9.02	9.00
Available phosphorus	4.20	3.71	3.70
SFA (% total FA)	3.78 (11%)	9.67 (12%)	2.11 (12%)
MUFA (% total FA)	11.09 (33%)	25.90 (32%)	5.36 (31%)
PUFA (% total FA)	18.71 (56%)	44.66 (56%)	9.55 (57%)
n-3 FA	2.10	5.84	1.03
n-6 FA	16.61	38.82	8.52
n-6/n-3 FA	7.9	6.6	8.3
Total fat	39.00	84.93	22.00

SFA = saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids; HL, LL = diets having high or low lipid content.
*Vitamins A: 3.10^6 IU; D3: 86.10^4 IU; E: 2.10^4 UI; K3: 1000 mg; B1: 1000 mg; B2: 1600 mg; pantothenate: 5000 mg; B6: 1400 mg; B12: 5.2 mg; niacin: 2.10^4 mg; folate: 600 mg; biotin: 60 mg; choline chloride: 110.10^4 mg; trace minerals: Cu: 4.10^3 mg; Fe: 1.10^4 mg; Zn: 18.10^3 mg; Mn: 16.10^3 mg; I: 400 mg; Se: 40 mg. The concentration is expressed per kg of premix.

Histomorphometry of the jejunum

Just after slaughter, the intestine was removed. In the median part of the jejunum, a portion (0.5 cm length) was taken, longitudinally opened, washed with NaCl (0.9 g/l) and fixed in a buffered formaline solution for 24 h. Then samples were rinsed three times with ethanol 70% and stored at 4°C. Histological analyses were performed as described by Gabriel *et al.* (2008). Briefly, the samples were rehydrated, stained with Alcian Blue and periodic Schiff's reagent, and then rinsed in distilled water before storage at 4°C in a 45% acetic acid solution until analysis the following week (De Verdal *et al.*, 2010). Villi and crypts were carefully individualized under a dissecting microscope and mounted between slides and coverslips. Ten villi and 20 crypts of Liberkühn were measured for each bird using an optical microscope, a camera and image analysis software as described by De Verdal *et al.* (2010). Height and width of villi and depth and width of crypts were measured. The surface areas of the villi and crypts were calculated as the product of the height multiplied by the width. An average value was calculated for each parameter and each bird.

Glycolytic potential (GP) and markers of energy metabolism

Glycogen, glucose-6-phosphate, free glucose and lactate contents (μmol/g fresh tissue) were measured in liver and muscles by enzymatic procedures according to Dalrymple and Hamm (1973) from 1 g of frozen tissue. The GP, that takes into account the main intermediate metabolites of

glycogen degradation in live and *postmortem* tissue and therefore represents an estimate of the resting glycogen level in tissue (Monin and Sellier, 1985), was calculated as follows:

$$GP = 2[(\text{glycogen}) + (\text{glucose}) + (\text{glucose-6-phosphate})] + (\text{lactate})$$

It was expressed as μmol of lactate equivalent/g fresh tissue.

The activities of three enzymes participating to glycolytic (lactate dehydrogenase, LDH) or oxidative (β-hydroxyacyl CoA dehydrogenase, HAD and citrate synthase, CS) energy metabolism in liver and muscles were spectrophotometrically assayed as described by Bass *et al.* (1969).

The activities of enzymes participating in lipogenesis were only assessed in liver. Tissue samples were first homogenized in 0.25 M ice-cold sucrose solution containing EDTA (1 mM) and dithiothreitol (1 mM). Mixtures were ultra-centrifuged at 100 000 × **g** during 1 h at +4°C. The resulting supernatants containing cytosolic proteins were collected and frozen at −80°C until use. Specific activities of malic enzyme (ME1), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), and fatty acid synthase (FAS) were assayed spectrophotometrically at 340 nm absorbance (Bazin and Ferré, 2001). Activities were expressed per units of cytosolic proteins.

Meat quality traits

After slaughter, the left PM muscle was removed and stored in a plastic bag at 4°C for 24 h to determine the ultimate pH (pHu) and color parameters, namely lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*) values of the meat as described by Berri *et al.* (2007). The left thigh without skin and SART muscle was stored in a plastic bag at 4°C for 7 days before determining the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) on a sample of the *Quadriceps femoris* muscle according to Lynch and Frei (1993).

Lipid content and FA composition of tissues

The lipid content and FA composition in the liver, abdominal fat and muscles were determined according to Chartrin *et al.* (2005).

Statistical analysis

The experimental unit was the bird. The effects of line (fat or lean), diet (HL or LL) and the interaction between diet and line (D × L) on the different parameters were submitted to ANOVA (Statview software). Means were compared with a Newman–Keuls' test. A probability level $P < 0.05$ was retained for significance. We also calculated Pearson correlation coefficients between different parameters.

Results

Characteristics of experimental diets

As planned, starch content was greater but lipid and cellulose contents were four-fold and three-fold lower, respectively, in diet LL than in diet HL (Table 2). Contrary to calculated values, the percentage of measured MUFA was slightly lower and that of PUFA was slightly higher for the LL diet than for the HL diet (Table 2). Overall, the LL diet, exhibiting lower lipid content than the HL diet, provided lower quantities of SFA, MUFA and PUFA than the HL diet.

Table 2 *Analyzed characteristics of starting and growing diets*

Parameters	Starting	Growing HL	Growing LL
Proteins (g/kg)	213	194	192
Starch (g/kg)	429	379	514
Crude fiber (g/kg)	28	64	21
Lipids (g/kg)	40.3	79.7	20.3
Fatty acid composition (% total fatty acids)			
C14	0.17	0.10	0.09
C16	12.05	10.10	12.20
C16:1	0.30	0.14	0.17
C18	4.81	3.10	1.88
C18:1	35.25	37.56	33.61
C18:2	40.82	42.18	45.92
C18:3	4.39	5.93	5.10
C20	0.71	0.42	0.38
C20:1	0.53	0.47	0.65
C20:4	0.98	nd	nd
SFA	17.74	13.72	14.55
MUFA	36.08	38.17	34.43
PUFA	46.19	48.11	51.02
n-6 FA	41.80	42.18	45.92
n-3 FA	4.39	5.93	5.10
n-6/n-3 FA	9.52	7.11	9.00

SFA = saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids; nd = not detected; HL, LL = diets having high or low lipid content.

Growth performance and body composition

No interaction ($P > 0.10$) between diet and line was observed for growth performance and body composition of chickens. The diet had no effect on growth performance (Table 3). Irrespective of diet, chickens of the lean line displayed lower average daily gain (ADG) and lower average daily feed intake (ADFI) over the growth period considered, so that BW at 63 days of age was 6% lower ($P = 0.02$) in the lean line than in the fat line. However, the gain to feed ratios, calculated between 49 and 63 days of age (data not shown) and for the whole growing period (22 to 63 days of age), were higher ($P = 0.03$) in lean chickens than in fat chickens.

The diet had no effect on body composition at 63 days of age, with the exception of the liver, which was heavier ($P < 0.0001$) with the LL diet than with the HL diet (Table 4). Irrespective of the diet, chickens of the lean line had a higher muscle yield but a lower carcass fatness than fat chickens, as illustrated by the 63% reduction in abdominal fat proportion. The correlations between the percentage of abdominal fat and the percentages of fat located on the top of thighs, PM and SART muscles were +0.72 ($P < 0.01$), −0.40 ($P < 0.05$) and −0.36 ($P < 0.05$), respectively. The line had no effect on the percentages of liver and heart relative to BW.

Table 3 *Effect of line (fat and lean) and diet (HL and LL) on the growth performance of chickens (*n = *12)*

	Fat-LL	Fat-HL	Lean-LL	Lean-HL	SEM	Diet (*D*) effect	Line (*L*) effect	*D* × *L* effect
BW 21 days (g)	399	397	386	398	38	0.69	0.57	0.51
BW 63 days (g)	2423	2361	2235	2261	202	0.76	0.02	0.45
ADG 22 to 63 days (g)	48	47	44	44	5	0.68	0.02	0.50
ADFI 22 to 63 days (g/day per chicken)	114	113	101	102	8	0.88	<0.01	0.71
Gain to feed ratio 22 to 63 days	0.42	0.41	0.43	0.43	0.03	0.62	0.03	0.56

ADG = average daily gain; ADFI = average daily feed intake; HL, LL = diets having high or low lipid content.

Table 4 *Effect of line (fat and lean) and diet (HL and LL) on the body composition of chickens at 63 days of age (% BW;* n = *12)*

	Fat-LL	Fat-HL	Lean-LL	Lean-HL	s.e.m.	Diet (*D*) effect	Line (*L*) effect	*D* × *L* effect
Abdominal fat	3.5	3.3	1.1	1.4	0.7	0.77	<0.01	0.26
Fat situated on the top of the thighs	0.5	0.3	0.2	0.2	0.1	0.18	<0.01	0.17
Pectoralis major muscle	4.2	4.2	4.4	4.4	0.3	0.88	0.03	0.75
Sartorius muscle	0.62	0.60	0.65	0.63	0.06	0.28	0.04	0.89
Rest of thigh + shank whithout skin	10.2	10.3	10.9	10.8	0.5	0.80	<0.01	0.63
Heart	0.58	0.63	0.61	0.64	0.09	0.13	0.60	0.68
Liver	2.1	1.9	2.2	1.9	0.2	<0.01	0.10	0.85

HL, LL = diets having high or low lipid content.

Table 5 *Effect of chicken line (fat and lean) and diet (HL and LL) on apparent metabolizable energy (AME) and apparent lipid digestibility of diets measured at 28 and 62 days of age (*n = *12)*

	Fat-LL	Fat-HL	Lean-LL	Lean-HL	s.e.m.	Diet (*D*) effect	Line (*L*) effect	*D* × *L* effect
AME 28 days (MJ)	12.77	12.53	13.17	12.77	0.33	<0.01	<0.01	0.33
AME 62: days (MJ)	13.12	12.99	13.39	13.35	0.32	0.33	<0.01	0.23
Lipid digestibility: 28 days (%)	77	84	82	90	4	<0.01	<0.01	0.75
Lipid digestibility: 62 days (%)	83	91	85	93	2	<0.01	<0.01	0.52

HL, LL = diets having high or low lipid content

AME and lipid digestibility and histomorphometry of the jejunum

No interaction between diet and line was observed for digestibility values or histological traits of the jejunum. At 28 days of age, AME was higher (+2.5%, $P < 0.01$) and apparent lipid digestibility was lower (−8.6%, $P < 0.0001$) for the LL diet than for the HL diet (Table 5). At 62 days of age, the diet did not affect AME, whereas lipid digestibility was still lower (−8.7%, $P < 0.0001$) in the LL diet than in the HL diet (Table 5). AME and apparent lipid digestibility were higher at 62 days than at 28 days of age (+3% and +6%, respectively; $P < 0.05$). Irrespective of the diet and age, lean chickens had higher AME ($P < 0.001$) and apparent lipid digestibility ($P < 0.0001$) than fat chickens at both ages.

Chickens fed the LL diet exhibited reduced width (−15%, $P < 0.01$) and area (−16%, $P = 0.03$) of villi and lower depth (−12%, $P = 0.04$) and smaller area (−5%, $P < 0.05$) of crypts in the jejunum than chickens fed the HL diet (Table 6). The morphology of villi and crypts in the jejunum did not differ between lines.

GP and markers of energy metabolism in tissues

No interaction between diet and line was observed for glycogen content, GP and enzyme activities related to energy metabolism in tissues.

Irrespective of the line, chickens fed the LL diet had higher glycogen content and GP (+27%, on average, for both traits, $P < 0.0001$) in the liver than chickens fed the HL diet (Table 7), without any dietary-associated variation of hepatic lactate content. Chickens fed the LL diet also had higher ($P < 0.01$) activities of LDH, HAD and CS enzymes than chickens fed the HL diet (Table 8); moreover, these chicken had a higher ($P = 0.0002$) activity of FAS, the key lipogenic enzyme, than chickens fed the HL diet, whereas the activities of G6PDH and ME1 enzymes producing NADPH for lipogenesis did not differ between diets (Table 9).

The diet had no effect on glycogen and lactate contents and GP in PM muscle, but chickens fed LL diet had higher glycogen content (+18%, $P = 0.002$) and GP (+13%, $P = 0.0002$) than chickens fed HL diet in SART muscle.

Irrespective of the diet, the line had no effect on the glycogen and lactate contents, GP and LDH activity in the

Table 6 *Effect of line (fat and lean) and diet (HL and LL) on the morphology of villi and crypts in the jejunum of chickens at 63 days of age (*n *= 12)*

	Fat-LL	Fat-HL	Lean-LL	Lean-HL	s.e.m.	Diet (*D*) effect	Line (*L*) effect	*D* × *L* effect
Villi length (mm)	2.10	2.06	2.18	2.30	0.29	0.63	0.06	0.35
Villi width (mm)	1.91	2.21	1.92	2.32	0.40	0.01	0.63	0.68
Villi area (mm^2)	4.13	4.62	4.27	5.36	1.24	0.03	0.22	0.40
Crypt depth (μm)	150	170	154	165	29	0.04	0.59	0.98
Crypt width (μm)	53	58	50	57	9	0.06	0.54	0.76
Crypt area (μm^2)	9	10	9	9	1	0.05	0.07	0.92

HL, LL = diets having high or low lipid content

Table 7 *Effect of line (fat and lean) and diet (HL and LL) on glycogen and lactate contents and glycolytic potential of muscles and liver of chickens (*n *= 12)*

	Fat-LL	Fat-HL	Lean-LL	Lean-HL	s.e.m.	Diet (*D*) effect	Line (*L*) effect	*D* × *L* effect
Liver								
Glycogen (μmol/g)	376	300	388	300	65	<0.01	0.75	0.75
Lactate (μmol/g)	6.01	6.19	6.38	6.69	1.44	0.55	0.29	0.88
Glycolytic potential (μmol equivalent lactate/g)	758	607	783	607	129	<0.01	0.74	0.75
Pectoralis major muscle								
Glycogen (μmol/g)	75	78	69	69	11	0.53	0.02	0.56
Lactate (μmol/g)	22.82	19.94	26.16	23.72	5.47	0.10	0.03	0.88
Glycolytic potential (μmol equivalent lactate/g)	172	176	164	162	18	0.82	0.03	0.51
Sartorius muscle								
Glycogen (μmol/g)	62	51	50	44	9	<0.01	<0.01	0.32
Lactate (μmol/g)	26.20	27.12	28.13	29.59	7.43	0.59	0.31	0.91
Glycolytic potential (μmol equivalent lactate/g)	151	130	128	118	13	<0.01	<0.01	0.17

HL, LL = diets having high or low lipid content.

Table 8 *Effect of line (fat and lean) and diet (HL and LL) on the enzymatic activity of lactate dehydrogenase (LDH), β-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (HAD) and citrate synthase (CS) of muscles and liver of chickens expressed as μmoles of substrate transformed/min per g of muscle (*n *= 12)*

	Fat-LL	Fat-HL	Lean-LL	Lean-HL	s.e.m.	Diet (*D*) effect	Line (*L*) effect	*D* × *L* effect
Liver								
LDH	113	99	138	99	34	<0.01	0.20	0.22
HAD	10.50	8.00	14.74	8.70	3.46	<0.01	0.02	0.09
CS	4.19	3.26	5.76	3.90	1.59	<0.01	0.03	0.35
Pectoralis major muscle								
LDH	2595	2381	2573	2672	694	0.78	0.51	0.21
HAD	10.46	10.88	10.04	11.74	2.87	0.21	0.79	0.42
CS	6.82	5.67	6.86	6.55	1.98	0.21	0.45	0.47
Sartorius muscle								
LDH	577	550	581	503	191	0.34	0.70	0.65
HAD	13.16	10.93	13.88	10.77	5.71	0.12	0.86	0.79
CS	8.04	7.14	8.82	7.78	4.04	0.42	0.55	0.95

HL, LL = diets having high or low lipid content.

Table 9 *Effect of line (fat and lean) and diet (HL and LL) on the enzymatic activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), malic enzyme (ME1) and fatty acid synthase (FAS) of liver of chickens expressed as nmoles/min per mg proteins (*n *= 12)*

	Fat-LL	Fat-HL	Lean-LL	Lean-HL	s.e.m.	Diet (*D*) effect	Line (*L*) effect	*D* × *L* effect
G6PDH	12.7	11.3	10.7	9.9	3.4	0.28	0.11	0.74
ME1	17.5	10.6	12.9	15.8	9.0	0.45	0.92	0.06
FAS	11.1	8.0	10.9	8.0	2.6	<0.01	0.87	0.90

HL, LL = diets having high or low lipid content.

liver (Tables 7 and 8). On the opposite, activities of HAD and CS enzymes were greater ($P < 0.03$) in the lean line than in the fat line. In PM and muscles, the lean chickens had lower glycogen content (−11%, and −17%, $P < 0.05$, respectively) and PG (−6%, and −12%, $P < 0.05$, respectively) than the fat chickens. Activities of enzymes involved in energy metabolism did not differ between the two lines (Table 8).

Meat quality traits

No interaction between diet and line was observed for the meat quality traits (Table 10). Chickens fed the LL diet had lower pHu (5.76 *v.* 5.83, $P = 0.03$) and b^* value (8.4 *v.* 9.1, $P = 0.04$) but higher L^* value (50.9 *v.* 49.3, $P = 0.004$) in PM muscle than chickens fed the HL diet. The diet had no effect on a^* value. Irrespective of diet, the line had no effect on the pHu value of breast muscle (Table 10), but the lean chickens exhibited higher a^* (−0.5 *v.* −1.3, $P = 0.0003$) and b^* (9.2 *v.* 8.3, $P = 0.04$) values than the fat chickens. Overall, the correlation between pHu and L^* was 0.44 ($P < 0.05$). The diet and line did not influence the production of TBARS in the thigh muscle.

Lipid content and FA composition of tissues

In all examined tissues, diet and line did not affect lipid content (Table 11), but affected the FA composition (Figure 1). In PM and SART muscles, the interaction between diet and line on the FA composition was not significant (data not shown).

Irrespective of line, chickens fed the LL diet exhibited the highest ($P < 0.0001$) percentages of SFA (particularly C14 and C16) and MUFA (particularly C16:1 and C18:1) in abdominal fat, liver and muscles; they also had the lowest ($P < 0.0001$) percentages of PUFA and n-3 and n-6 FA in all examined tissues (Figure 1 and data not shown).

Irrespective of diet, the line had only minor impacts on FA composition of tissues. In abdominal fat, the lean chickens had a higher percentage of MUFA (48.7% *v.* 43.9%, $P = 0.03$) and lower percentages of C18:3 (1.9% *v.* 2.3%, $P < 0.01$) and n-3 FA (1.9% *v.*2.3%, $P < 0.01$) than the fat chickens. A significant interaction ($P < 0.05$) between diet and line was observed for C16:1 with the fat-LL and lean-LL groups having the highest values and the fat-HL group having the lowest value (data not shown). In PM muscle, the lean chickens had a higher percentage of C18:1 (38.1% *s.* 36. 6%, $P = 0.03$) and lower percentages of C18:2 (18.6% *v.* 19.9%, $P < 0.05$) and n-6 FA (22.9% *v.* 24.3%, $P = 0.03$) than the fat chickens. In SART muscle, the lean chickens had higher percentages of C18:1 (41.3% *v.* 39.9%, $P = 0.007$) and MUFA (45.4% *v.* 43.7%, $P < 0.01$) and lower percentages of C18:3 (1.7% *v.* 2.0%, $P = 0.04$), PUFA (23.3% *v.* 25.7%, $P < 0.05$) and n-6 (20.8% *v.* 22. 9%, $P < 0.05$) and n-3 FA (2.5% *v.* 2.9%, $P = 0.03$) than the fat chickens. The line had no effect on the FA composition of the liver but we

Table 10 *Effect of chicken line (fat and lean) and diet (HL and LL) on the ultimate pH (pHu) and the color of breast muscle measured after 24 h storage at 4°C and the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS value expressed as mg equivalent malondialdehyde/kg) of thigh muscle measured after 7 days of storage at 4°C (*n = 12*)*

	Fat-LL	Fat-HL	Lean-LL	Lean-HL	s.e.m.	Diet (*D*) effect	Line (*L*) effect	*D* × *L* effect
Pectoralis major muscle								
pHu	5.74	5.80	5.77	5.85	0.10	0.03	0.17	0.71
Lightness (L^*)	51.3	49.5	50.4	49.0	1.8	<0.01	0.19	0.65
Redness (a^*)	−1.4	−1.1	−0.5	−0.4	0.7	0.23	<0.01	0.55
Yellowness (b^*)	7.9	8.6	8.9	9.5	1.0	0.24	<0.01	0.71
Quadriceps femoris muscle								
TBARS value	0.38	0.47	0.41	0.41	0.13	0.23	0.74	0.25

HL, LL = diets having high or low lipid content.

Table 11 *Effect of chicken line (fat and lean) and diet (HL and LL) on the lipid content (%) of abdominal fat, liver and* Pectoralis major *(PM) and* Sartorius *(SART) muscles and protein content (%) of liver (*n = 12*)*

	Fat-LL	Fat-HL	Lean-LL	Lean-HL	s.e.m.	Diet (*D*) effect	Line (*L*) effect	*D* × *L* effect
Lipid content								
Abdominal fat	86.79	89.68	88.60	87.74	7.61	0.65	0.98	0.40
Liver	4.56	4.46	4.39	4.72	1.12	0.73	0.90	0.52
PM muscle	1.30	1.31	1.41	1.44	0.36	0.87	0.25	0.90
SART muscle	4.65	4.31	4.51	4.75	1.00	0.84	0.54	0.24
Protein content								
Liver	18.21	19.51	18.39	20.05	0.92	<0.01	0.18	0.51

HL, LL = diets having high or low lipid content.

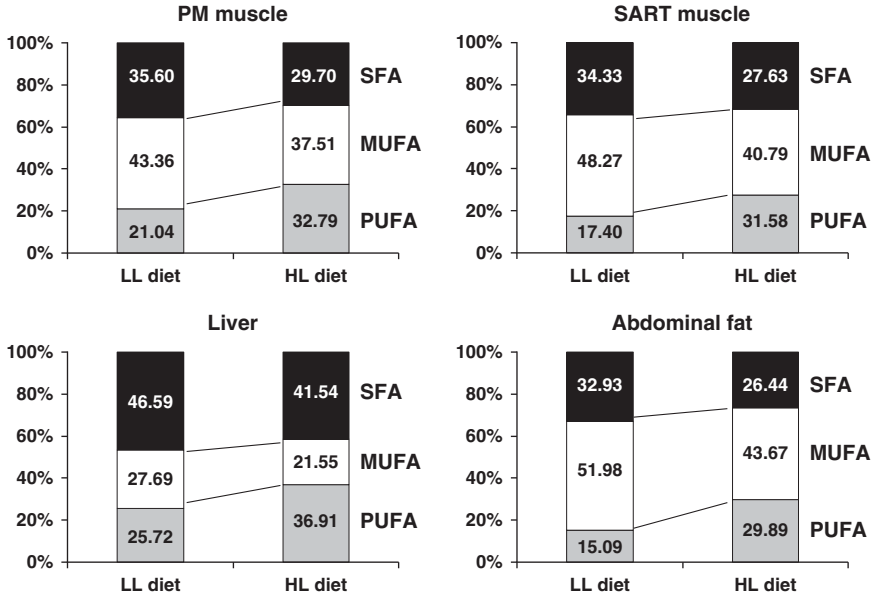


Figure 1 Effect of diet having high or low lipid content (HL and LL) on the fatty acid composition (% total FA) of *Pectoralis major* (PM) and *Sartorius* (SART) muscles, liver and abdominal fat of chickens ($n = 12$).

observed significant interaction ($P < 0.05$) between line and diet for different FA (data not shown). For C14:0, the fat-LL and lean-HL groups had higher values than the fat-HL group. For C16:1, the fat-LL and lean-LL groups had higher values than the fat-HL and lean-HL groups. For C20:4 and C22:6, the fat-HL group had the highest values and the fat-LL and lean-LL groups had the lowest values.

In the liver, chickens fed the HL diet had a higher protein content than chickens fed the LL diet (Table 11).

Discussion

Diets formulated at the same protein and ME contents but differing by energy source (lipids *v.* starch) did not alter the respective performance of genetically fat or lean chicken lines between 21 and 63 days of age. The accelerated ADG previously reported in chickens fed high-fat diets (Coon *et al.*, 1981) probably reflected the higher energy content of these diets rather than the effects of lipids *per se*. Our data are therefore consistent with the hypothesis that the main determinant of growth performance is ME content rather than energy source (Coon *et al.*, 1981). Importantly, the G : F ratio was not altered by diets, although the digestibility of lipids was lower for the LL diet than for the HL diet. Attention must be given to the fact that these digestibilities are given as apparent values. In LL diet, endogenous losses, proportionally greater than in HL one, may artificially reduce the value. Another explanation could be linked to the high level of wheat in LL diet compared with HL diet (40% *v.* 25%). Actually, wheat contains soluble NSP affecting all nutrients' digestibility, and particularly the absorption of dietary lipids (Maisonnier *et al.*, 2001). The increase in villi and crypt area observed in the jejunum of chickens fed HL diet could result from the higher level of the poorly fermentable cellulose in this diet compared with LL diet (Goodlad *et al.*, 1987). This could have favored the absorption of dietary lipids in chicken fed this high-fat high fiber diet. In the present study, AME was, however, similar in both diets, except at the beginning of the experimental period (28 days) when the chickens had to adapt their digestive physiology to face the cellulose load and the increased lipid intake induced by the ingestion of the HL diet.

The dietary energy source did not affect carcass composition after 6 weeks of experimental feeding. Similarly, Edwards and Hart (1971), Bartov *et al.* (1974) and Griffiths *et al.* (1977) did not observe any differences in carcass composition resulting from the isocaloric substitution of dietary fat by carbohydrates. By contrast, Carew and Hill (1964) and Carew *et al.* (1964) showed that the isocaloric replacement of carbohydrates by maize oil had increased carcass energy retention in the form of fat. These discrepancies between studies could be explained by differences in the level of isocaloric replacement. Beside no effect on carcass composition, a dietary-induced difference was observed in hepatic weight in the present experiment; this was associated with a higher hepatic glycogen content in chickens fed the LL diet as compared with the HL diet, whereas protein content was higher with the HL diet and lipid content did not differ between diets. In support, the hepatic activity of LDH, an enzyme catalyzing an early step in neoglucogenesis from blood lactate, was also greater in chickens fed the LL diet than in those fed the HL diet. The situation in muscles was almost similar, with higher glycogen content in the SART muscle and a lower pHu in PM muscle (a *postmortem* indicator, which is highly negatively correlated with glycogen content at slaughter) for chickens fed the LL diet than for those fed the HL diet. The lack of

dietary-associated difference in glycogen content in PM muscle, in this study, however, suggests that this temporary form of glucose storage might have been more rapidly used in PM than in SART muscle, likely due to differences in glycolytic enzymatic equipment and fiber type composition between these muscles (Rémignon *et al.*, 1994). Beside glucose metabolism, we provide evidence that lipid metabolism was also slightly modified by diets. Indeed, chickens fed different diets had similar lipid contents in abdominal fat, liver and muscles, which suggests that they were able to synthesize FA from carbohydrates with almost the same efficacy than storing directly dietary fat in body tissues. In support to a direct deposition of lipids when feeding the HL diet *v.* hepatic synthesis and secretion of newly synthesized FA when fed the LL diet, is the composition of tissue lipids. Indeed, chickens fed HL diet had more PUFA, notably C18:2 and C18:3, and less C16:0, C16:1 and C18:1 (the main *de novo* synthesized FA) in all tissues compared with chickens fed the LL diet. Moreover, the activity of FAS enzyme was also lower in the liver, the main site of lipogenesis in birds, when chickens were fed the HL diet. The decreased FAS activity when fed an HL diet might be associated with its lower content of starch but also to its greater fiber content compared with the LL diet. Indeed, Akiba and Matsumoto (1982) have previously demonstrated that FAS activity in the liver of chickens is reduced by dietary cellulose. Conversely, the higher oxidative enzyme activities in the liver of chickens fed LL diet compared with chickens fed HL diet might have sustained the greater energy needs of hepatocytes for *de novo* lipid synthesis and lipid secretion to peripheral tissues. Although PUFA are more susceptible to lipid oxidation than other FA, the susceptibility of thigh muscle to lipid oxidation after storage at 4°C was not affected by diets.

It is noteworthy that the consequences of feeding diets with different energy sources were similar in both genetic lines regardless of their divergence for body fatness and energy metabolism. Indeed, the experimental lines had important difference in carcass fatness, in agreement with the selection criteria, and this line-associated difference was commensurate in both diets. The lean and fat lines also had contrasted growth performance. In agreement with earlier studies (see Baéza and Le Bihan-Duval, 2013 for a review), the lean line had lower ADFI and ADG between 22 and 63 days of age but an improved gain to feed ratio compared with the fat line. However, the difference in ADFI between fat and lean lines (+12%) could not totally explain the large difference in abdominal fat deposition (2.8-fold higher in the fat line compared with the lean line). The better feed efficiency of lean chickens might be partly explained by the improved digestibility of dietary energy and lipids in that line compared with the fat line. As previously described (Sibut *et al.*, 2008), lean chickens also displayed lower glycogen stores in the PM muscle, and the situation was similar for SART muscle in the present study. Interestingly, lactate content in the PM muscle was higher in lean than in fat chickens, suggesting a higher use of glycogen to produce energy by the anaerobic pathway. However, there was no line-associated difference in pHu of the breast meat, in contrast to Berri *et al.* (2005) who reported higher pHu in meat of the lean chickens than in fat chickens. This discrepancy between studies could be due to differences in the metabolic status of the birds, which were killed in a postprandial state in the present study but after 8 h of feed withdrawal in the aforementionned experiment. Despite large difference in body fatness, there was no line-associated difference in tissue lipid contents. These observations are in close-agreement with the lack of differences previously reported for the same lines in intramuscular fat contents in breast and thigh muscles (Ricard *et al.*, 1983; Berri *et al.*, 2005). However, the line-associated differences in FA composition in tissues again argue for different lipid metabolism between lines. Indeed, the higher percentage of MUFA in abdominal fat and of C18:1 proportion in PM and SART muscles of the lean line, together with the lower percentages of C18:2 and n-6 FA in the PM muscle compared with fat chickens, suggest a lower ability of the lean line to synthesize and deposit PUFA and/or a higher oxidation of PUFA in this line. In support of this last hypothesis, the activities of HAD, enzyme implicated in the β-oxidation of FA, and CS, participating to tricarboxylic acid cycle in the mitochondria, were greater in the liver of the lean chickens compared with the fat chickens. In agreement, the hepatic β-oxidation of lipids has been shown to be higher for the lean line than for the fat line in the fed state (Skiba-Cassy *et al.*, 2007).

In conclusion, the amount of lipids stored in muscles and fatty tissues of lean or fat chickens did not depend on the dietary energy source. Only the FA composition of these lipids was affected. Moreover, the response to dietary energy source did not depend on the genetic ability for body fatness. Even if, in the present study, we used slow-growing chickens, our data should be applied to fast-growing chickens, more usually used for broiler meat production, and particularly during the finishing period (21 to 35 days of age). However, further evaluations of a variety of unusual feedstuffs with a wide range of nutrient composition are necessary before being able to conclude that broilers would be able to adapt well to high fat and high fiber diets. Actually, in the present study, the AME was lower and lipid digestibility was higher with diet presenting high lipid and high fiber contents compared with diet presenting low lipid content and high starch content.

Acknowledgments

The authors thank the staff of the INRA experimental poultry unit (UE1295 PEAT, Nouzilly, France) for producing and rearing animals and the technicians of the research units for measurements on birds, sample collection and laboratory analyses. This project was supported by the French ANR FatInteger program (ANR-11-BSV7-0004).

References

Adrizal S, Ohtani AS and Yayota M 2002. Dietary energy source and supplements in broiler diets containing deffated rice bran. Journal of Applied Poultry Research 11, 410–417.

Akiba Y and Matsumoto T 1982. Effects of dietary fibers on lipid metabolism in liver and adipose tissue in chicks. Journal of Nutrition 112, 1577–1585.

Baéza E and Le Bihan-Duval E 2013. Chicken lines divergent for low or high abdominal fat deposition: a relevant model to study the regulation of energy metabolism. Animal 7, 965–973.

Bartov I, Bornstein S and Lipstein B 1974. Effect of calorie to protein ratio on the degree of fatness in broilers fed on practical diets. British Poultry Science 15, 107–117.

Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hoper S and Pette D 1969. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. European Journal of Biochemistry 10, 198–206.

Bazin R and Ferré P 2001. Assays of lipogenic enzymes. Methods of Molecular Biology 155, 121–127.

Berri C, Le Bihan-Duval E, Baéza E, Chartrin P, Millet N and Bordeau T 2005. Effect of selection for or against abdominal fatness on muscle and meat characteristics of broilers. Proceedings of XVII WPSA European Symposium on the Quality of Poultry Meat, 23–26 May 2005, Doorwerth, The Netherlands, pp. 266–270.

Berri C, Le Bihan-Duval E, Debut M, Santé-Lhoutellier V, Baéza E, Brunel V, Jégo Y and Duclos MJ 2007. Consequence of muscle hypertrophy on Pectoralis major characteristics and breast meat quality of broiler chickens. Journal of Animal Science 85, 2005–2011.

Bregendahl K 2008. Use of distillers co-products in diets fed to poultry. In Using distillers grains in the US and international livestock and poultry industries (ed. BA Babcock, DJ Hayes and JD Lawrence), pp. 99–128. MATRIC, Iowa, USA.

Carew LB and Hill FW 1964. Effect of corn oil on metabolic efficiency of energy utilization by chicks. Journal of Nutrition 83, 293–299.

Carew LB, Hopkins DT Jr and Nesheim MC 1964. Influence of amount and type of fat on metabolic efficiency of energy utilization by the chick. Journal of Nutrition 83, 300–306.

Chartrin P, Berri C, Le Bihan-Duval E, Quentin M and Baéza E 2005. Influence of production system (label, standard, certified) on lipid and fatty acid composition of fresh and cured-cooked chicken meat. Archiv für Geflügelkunde 69, 219–225.

Coon CN, Becker WA and Spencer JV 1981. The effect of feeding high energy diets containing supplemental fat on broiler weight gain, feed efficiency and carcass composition. Poultry Science 60, 1264–1271.

Dalrymple RH and Hamm R 1973. A method for extraction of glycogen and metabolites from a single muscle sample. Journal of Food Technology 8, 439–444.

De Verdal H, Mignon-Grasteau S, Jeulin C, Le Bihan-Duval E, Leconte M, Mallet S, Martin C and Narcy A 2010. Digestive tract measurements and histological adaptation in broiler lines devergently selected for digestive efficiency. Poultry Science 89, 1955–1961.

Edwards HM and Hart P 1971. Carcass composition of chickens fed carbohydrate-free diets containing various lipid energy sources. Journal of Nutrition 101, 989–996.

Gabriel I, Mallet S, Leconte M, Travel A and Lalles JP 2008. Effects of whole wheat feeding on the development of the digestive tract of broiler chickens. Animal Feed Science and Technology 142, 144–162.

Goodlad RA, Lenton W, Ghatei MA, Adrian TE, Bloom SR and Wright NA 1987. Effects of an elemental diet, inert bulk and different types of dietary fiber on the response of the intestinal epithelium to refeeding in the rat and relationship to plasma gastrin, enteroglucagon, and PYY concentrations. Gut 28, 171–180.

Griffiths L, Leeson S and Summers JD 1977. Influence of energy system and level of various fat sources on performance and carcass composition of broilers. Poultry Science 56, 1018–1026.

INRA 1989. L'alimentation des animaux monogastriques: porc, lapin, volailles. ed. INRA, Paris, France, 282pp.

Jagger S, Wiseman J, Cole DJA and Craigon J 1992. Evaluation of inert markers for the determination of ileal and fecal apparent digestibility values in the pig. British Journal of Nutrition 68, 729–739.

Jlali M, Gigaud V, Métayer-Coustard S, Sellier N, Tesseraud S, Le Bihan-Duval E and Berri C 2012. Modulation of glycogen and breast meat processing ability by nutrition in chickens: impact of crude protein level in two chicken genotypes. Journal of Animal Science 90, 447–455.

Larbier M and Leclercq B 1992. Alimentation des oiseaux en croissance. In Nutrition et alimentation des volailles (ed.) INRA pp. 171–193. INRA, Paris, France.

Leclercq B 1988. Genetic selection of meat-type chickens for high or low abdominal fat content. In Leanness in domestic birds: genetic, metabolic and hormonal aspects (ed. B Leclercq and CC Whitehead), pp. 25–40. Butterworths & Co. Ltd-INRA, London, UK.

Lynch SM and Frei B 1993. Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. Journal of Lipid Research 34, 1745–1753.

Malheiros RD, Barbosa Moraes VM, Collin A, Janssens GPJ, Decuypere E and Buyse J 2004. Dietary macronutrients and performance and plasma hormone and metabolite levels of broiler chickens – fat by carbohydrate substitution. Archiv für Geflügelkunde 68, 87–93.

Maisonnier S, Gomez J and Carré B 2001. Nutrient digestibility and intestinal viscosities in broiler chickens fed on wheat diets, as compared to maize diets with added guar gum. British Poultry Science 42, 102–110.

Monin G and Sellier P 1985. Pork of low technological quality with a normal rate of pH fall in the intermediate post mortem period: the case of Hampshire breed. Meat Science 13, 49–63.

Myers WD, Ludden PA, Nayigihugu V and Hess BW 2004. Technical note: a procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. Journal of Animal Science 82, 179–183.

Peron A, Bastianelli D, Oury FX, Gomez J and Carré B 2005. Effects of food deprivation and particle size of ground wheat on digestibility of food components in broilers fed on a pelleted diet. British Poultry Science 46, 223–230.

Plavnik I, Wax E, Sklan D, Bartov I and Hurwitz S 1997. The response of broiler chickens and turkey poults to dietary energy supplied either by fat or carbohydrates. Poultry Science 76, 1000–1005.

Rémignon H, Lefaucheur L, Blum JC and Ricard FH 1994. Effects of divergent selection for body-weight on 3 skeletal-muscles characteristics in the chicken. British Poultry Science 35, 65–76.

Ricard FH, Leclercq B and Touraille C 1983. Selecting broilers for low and high abdominal fat, distribution of carcass fat and quality of meat. British Poultry Science 24, 511–516.

Short FJ, Gorton P, Wiseman J and Wiseman KN 1996. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. Animal Feed Science and Technology 59, 215–221.

Sibut V, Le Bihan-Duval E, Tesseraud S, Godet E, Bordeau T, Cailleau-Audouin E, Chartrin P, Duclos MJ and Berri C 2008. Adenosine monophosphate-activated protein kinase involved in variations of muscle glycogen and breast meat quality between lean and fat chickens. Journal of Animal Science 86, 2888–2896.

Skiba-Cassy S, Collin A, Chartrin P, Médale F, Simon J, Duclos MJ and Tesseraud S 2007. Chicken liver and muscle carnitine palmitoyltransferase 1: nutritional regulation of messengers. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 147, 278–287.

Slominski BA, Boros D, Campbell LD, Guenter W and Jones O 2004. Wheat by-products in poultry nutrition. Part I. Chemical and nutritive composition of wheat screenings, bakery by-products and wheat mill run. Canadian Journal of Animal Science 84, 421–428.

Swennen Q, Janssens GPJ, Collin A, Le Bihan-Duval E, Verbeke K, Decuypere E and Buyse J 2006. Diet-induced thermogenesis and glucose oxidation in broiler chickens: influence of genotype and diet composition. Poultry Science 85, 731–742.

Annexe VI

Coefficient de corrélation (r) entre le nombre des cellules sanguines et les paramètres de croissance de l'animal.

	Poids vif	GMQ	Consommation journalière	IC
Leucocytes totaux	-0,06	-0,10	-0,06	0,10
Lymphocytes	-0,15	-0,24	-0,21	0,15
Monocytes	0,07	-0,07	0,11	0,20
Granulocytes neutrophiles	0,04	0,07	0,09	0,01
Érythrocytes	0,22	0,23	0,18	-0,14
Thrombocytes	-0,12	-0,02	-0,04	-0,02

Annexe VII

S1 Table. Primer sequences used for analysis of gene expression by qPCR.

Gene symbol	Description	Accession number[a]	Primer sequence (5'-3')[b]
CD40	CD40 molecule, tumor necrosis factor receptor superfamily member 5	NM_214194	F : GCCCGCCAGGACAGAAA R : GGAACTGCAAGGAAGGCATTC
CPT1A	Carnitine palmitoyltransferase 1A	XM_005660602	F: TTAAAGTCCTGGTGGGCTACAA R: CCTCGCCGCCTGAATGT
DGAT2	Diacylglycerol O-acyltransferase 2	HQ403606	F: CCTGATGTCTGGAGGCATCTG R: CACGATGATGATGGCATTGC
GPX3	Glutathione peroxidase 3	NM_001115155	F : GCTTCCCCTGCAACCAATT R : GGACATACCTGAGAGTGGACAGAA
LCN2	Lipocalin 2	XM_005660462	F: TCGCAATCGACCAGTGCAT R: TGGGCAAAGGCTGAAGACAT
NMI	N-myc (and STAT) interactor	XM_005652427	F: GTGGAGAGCGTGGAGTATGACA R: TCAGCAACTCCACTTTCCACAA
OAZ3	Ornithine decarboxylase antizyme 3	NM_001301406	F : ATTGTATTCGGCTGGGAACCT R : GGCGGAAGTGGAAGTCTAGCT
PSAP	Prosaposin	XM_005671043	F : ACAAGCCAACCGTGAAATCC R : CAGTGGCATTGTCTTTCAACATG
PSEN1	Presenilin 1	XM_005666340	F : GTCACGATCTGCTGTACAGGATCT R : ATCCAAGTTTTACTCCCCTTTCTTC
SLPI	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	NM_213870	F : TGCTATCACGAACCCAGTTAAGG R : GAGCATCATACACTGGCCATAGAC
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	XM_005652801	F: CCCCCTGTGGTCATAGGTTCT R: GTGACCTGCATCCCTTATTGACT
TBP1[c]	Telomeric DNA binding protein 1	XM_005658569	F : AACAGTTCAGTAGTTATGAGCCAGA R: AGATGTTCTCAAACGCTTCG
TOP2B[c]	Topoisomerase (DNA) II beta	AF222921	F: AACTGGATGATGCTAATGATGCT R: TGGAAAAACTCCGTATCTGTCTC

[a]Accession number in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) or Ensembl project database for pig sequences. F and R indicated respectively.
[b]F: forward primers; R: reverse primers.
[c]Gene used as reference for qPCR normalization.

Annexe VIII

S2 Table. Probes expressed in blood affected by the interaction line x diet, of pigs selected for low or high residual feed intake (RFI) fed a low-fat, low-fiber (LF) or high-fat, high-fiber (HF) diet. (Partie 1/3)

Probes	Gene Symbol	P-Value	Description
A_72_P302829	CRYZ	0,0002	crystallin, zeta (quinone reductase)
A_72_P425884	INVS	0,0003	inversin
O6942	C16orf72	0,0007	chromosome 16 open reading frame 72
A_72_P130236	C10orf25	0,0007	chromosome 10 open reading frame 25
A_72_P116391	#N/A	0,0010	No Description
A_72_P315828	TNKS2	0,0010	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase 2
A_72_P044976	#N/A	0,0011	No Description
A_72_P010271	#N/A	0,0011	No Description
A_72_P029576	LACTB2	0,0013	lactamase, beta 2
A_72_P058161	#N/A	0,0014	No Description
A_72_P339423	STAP1	0,0015	signal transducing adaptor family member 1
A_72_P380713	#N/A	0,0018	No Description
A_72_P205812	#N/A	0,0019	No Description
A_72_P519986	TASP1	0,0021	taspase, threonine aspartase, 1
A_72_P406418	#N/A	0,0021	No Description
CUST_272_PI427286967	PDLIM7	0,0022	PDZ and LIM domain 7 (enigma)
A_72_P052391	UVRAG	0,0023	UV radiation resistance associated gene
A_72_P250832	SERPINB1	0,0025	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1
A_72_P571614	GLT8D1	0,0026	glycosyltransferase 8 domain containing 1
A_72_P500797	MYLIP	0,0029	myosin regulatory light chain interacting protein
gi|115547841|dbj|AK234817.1|	MED24	0,0037	mediator complex subunit 24
A_72_P410468	STAP1	0,0038	signal transducing adaptor family member 1
OTTSUST00000000622	LTB	0,0039	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
A_72_P377963	ARHGAP17	0,0040	Rho GTPase activating protein 17
A_72_P569179	LGALS3	0,0042	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
A_72_P277344	#N/A	0,0042	No Description
A_72_P190816	USP48	0,0043	ubiquitin specific peptidase 48
A_72_P252857	#N/A	0,0043	No Description
A_72_P526562	LGALS3	0,0043	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
A_72_P188526	YLPM1	0,0044	YLP motif containing 1
A_72_P211702	LGALS3	0,0045	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
A_72_P376993	EDARADD	0,0046	EDAR-associated death domain
O8141	KLF6	0,0046	Kruppel-like factor 6
A_72_P120881	UBE3D	0,0048	ubiquitin protein ligase E3D
O14799	SMAGP	0,0049	small cell adhesion glycoprotein
A_72_P626952	PSMD4	0,0050	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 4

S2 Table. (suite partie 2/3)

Probes	Gene Symbol	P-Value	Description
OTTSUST00000000623	LTB	0,0051	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
A_72_P403578	#N/A	0,0051	No Description
A_72_P581447	LGALS3	0,0051	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
A_72_P371548	ARAP3	0,0053	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 3
O10482	MYLIP	0,0055	myosin regulatory light chain interacting protein
A_72_P164776	DDX21	0,0057	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 21
A_72_P581442	LGALS3	0,0057	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
A_72_P641919	LGALS3	0,0057	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
A_72_P383008	ZFP161	0,0058	zinc finger protein 161 homolog (mouse)
A_72_P121381	PSPC1	0,0059	paraspeckle component 1
A_72_P122051	ARRDC4	0,0059	arrestin domain containing 4
O1335	IFT43	0,0060	intraflagellar transport 43 homolog (Chlamydomonas)
A_72_P022426	#N/A	0,0062	No Description
A_72_P435009	#N/A	0,0063	No Description
A_72_P719118	ARG2	0,0063	arginase, type II
A_72_P140986	CTSC	0,0065	cathepsin C
gi|47523711|ref|NM_214323.1|	JUP	0,0065	junction plakoglobin
A_72_P508591	HERC2	0,0067	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2
A_72_P712383	ENTPD1	0,0069	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
O10492	SEC23A	0,0069	Sec23 homolog A (S. cerevisiae)
A_72_P641109	GRN	0,0071	granulin
A_72_P586226	LGALS3	0,0072	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
gi|47522805|ref|NM_213990.1|	CLEC5A	0,0072	C-type lectin domain family 5, member A
A_72_P704351	WFDC5	0,0073	WAP four-disulfide core domain 5
O11659	USP24	0,0074	ubiquitin specific peptidase 24
A_72_P154916	AGPAT2	0,0074	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (lysophosphatidic acid acyltransferase, beta)
A_72_P368668	#N/A	0,0076	No Description
A_72_P595679	MAOA	0,0077	monoamine oxidase A
A_72_P181536	#N/A	0,0077	No Description
A_72_P397053	#N/A	0,0077	No Description
O10037	SLC39A11	0,0078	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 11
gi|115549788|dbj|AK232068.1|	LGALS3	0,0078	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
A_72_P201947	#N/A	0,0078	No Description
O14934	RPL14	0,0079	ribosomal protein L14
A_72_P472438	DNAJB2	0,0079	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2
A_72_P046111	#N/A	0,0079	No Description
A_72_P490311	PDCD4	0,0080	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)

S2 Table. (suite partie 3/3)

Probes	Gene Symbol	P-Value	Description
A_72_P246972	#N/A	0,0081	No Description
A_72_P295324	#N/A	0,0081	No Description
A_72_P797349	#N/A	0,0081	No Description
gi|59811421|gb|DN117161.1|DN117161	PXMP2	0,0081	peroxisomal membrane protein 2, 22kDa
A_72_P261932	#N/A	0,0082	No Description
A_72_P053466	LGALS3	0,0082	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
A_72_P395278	NCOA5	0,0082	nuclear receptor coactivator 5
A_72_P409183	#N/A	0,0084	No Description
A_72_P705280	IL6R	0,0085	interleukin 6 receptor
A_72_P653861	CRYZ	0,0085	crystallin, zeta (quinone reductase)
A_72_P396743	#N/A	0,0086	No Description
A_72_P038441	#N/A	0,0088	No Description
A_72_P120151	#N/A	0,0089	No Description
A_72_P031846	#N/A	0,0090	No Description
A_72_P174681	#N/A	0,0090	No Description
A_72_P556035	C4BPA	0,0091	complement component 4 binding protein, alpha
A_72_P386918	#N/A	0,0091	No Description
A_72_P153221	#N/A	0,0091	No Description
A_72_P107481	#N/A	0,0091	No Description
O12016	ARHGAP17	0,0091	Rho GTPase activating protein 17
A_72_P077061	MORC2	0,0092	MORC family CW-type zinc finger 2
A_72_P284259	UVRAG	0,0093	UV radiation resistance associated gene
A_72_P116766	TADA2A	0,0094	transcriptional adaptor 2 (ADA2 homolog, yeast)-like
A_72_P406758	TAF5L	0,0094	TAF5-like RNA polymerase II, p300/CBP-associated factor (PCAF)-associated factor, 65kDa
A_72_P266587	#N/A	0,0096	No Description
A_72_P737263	CSAD	0,0096	cysteine sulfinic acid decarboxylase
O13375	TBC1D12	0,0096	TBC1 domain family, member 12
O11304	KIAA0753	0,0098	KIAA0753
A_72_P060066	LGALS3	0,0098	Lectin galactoside-binding soluble 3
A_72_P245082	#N/A	0,0098	No Description
A_72_P331288	CDYL	0,0099	chromodomain protein, Y-like
A_72_P475165	ANP32E	0,0099	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E
A_72_P400978	TUBGCP3	0,00998	tubulin, gamma complex associated protein 3

Annexe IX

Sondes différemment exprimées dans les PBMCs en fonction de l'interaction entre la lignée et le régime alimentaire pour les poulets sélectionnés sur la quantité de gras abdominal nourris par un régime LF ou HF. Partie 1/3.

oligo_ID	Gene symbol	Description
seq_RIGG00963	RPL9	Ribosomal protein L9 (RPL9)
seq_RIGG15703	MKI67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
A_87_P099201	NCOA7	Nuclear receptor coactivator 7
A_87_P280833	HDAC7	Histone deacetylase 7
A_87_P003404	PHYHD1	Phytanoyl-CoA dioxygenase domain-containing protein 1-like, transcript variant 2
A_87_P014279	Plagl2	Pleiomorphic adenoma gene-like 2
lip_LTA4H	LTA4H	Leukotriene A4 hydrolase
A_87_P016389	NA	NA
A_87_P235638	PLA2G12A	Phospholipase A2, group XIIA
T039408_G006182_NSFL1C_419268	NSFL1C	NSFL1 (p97) cofactor (p47)
A_87_P036413	LTA4H	Leukotriene A4 hydrolase
T023127_G014304_RPL9_771147	RPL9	Ribosomal protein L9
T009978_G006182_NSFL1C_419268	NSFL1C	NSFL1 (p97) cofactor (p47)
lip_FBP1	FBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1
A_87_P115418	MKKS	McKusick-Kaufman syndrome
A_87_P086186	SOS2	Son of sevenless homolog 2
lip_ELOVL5	ELOVL5	ELOVL fatty acid elongase 5
lip_LTA4H	LTA4H	Leukotriene A4 hydrolase
seq_RIGG10708	SFMBT1	Scm-like with four mbt domains 1
A_87_P036518	NSFL1C	NSFL1 (p97) cofactor (p47)
A_87_P053276	MYH9	Myosin, heavy chain 9, non-muscle (MYH9)
A_87_P021630	FBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1
A_87_P011987	NA	NA
A_87_P136188	TSPO	Translocator protein (18kDa)
A_87_P050661	KIF20A	Kinesin family member 20A
A_87_P182098	DDX5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5
seq_RIGG07002	ZNF652	Zinc finger protein 652, transcript variant 1
A_87_P022260	NDRG1	N-myc downstream regulated 1
A_87_P035701	CARD11	Caspase recruitment domain family, member 11
T041235_G002302__YEATS2	YEATS2	YEATS domain containing 2
A_87_P259638	ZFP91	Zinc finger protein 91 homolog
T025620_G015898_MYO6_395487	MYO6	Myosin VI

(suite, partie 2/3).

oligo_ID	Gene symbol	Description
A_87_P290833	SEPP1	Selenoprotein P, plasma, 1
A_87_P139693	EOGT	EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase
A_87_P142928	LOC770922	Deoxycytidine kinase-like
A_87_P326487	LOC425137	Aldo-keto reductase family 1, member B1-like
T024021_G014890_TNFRSF1A_777018	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
A_87_P238038	EEF1A1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
A_87_P194703	DPAGT1	Dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine) N-acetylglucosaminephosphotransferase 1 (GlcNAc-1-P transferase)
A_87_P021593	NA	NA
T035952_G022370_LOC425916_425916	NA	NA
A_87_P036058	PWP1	PWP1 homolog
T012354_G023649_LCOR_423847	LCOR	Ligand dependent nuclear receptor corepressor (LCOR), mRNA
A_87_P012741	BAG2	BCL2-associated athanogene 2
A_87_P081501	MKI67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
lip_DPAGT1	DPAGT1	Dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine) N-acetylglucosaminephosphotransferase 1 (GlcNAc-1-P transferase)
A_87_P081761	FN1	Fibronectin 1
A_87_P190418	BRD3	Bromodomain containing 3
A_87_P023008	ZDHHC4	Zinc finger, DHHC-type containing 4
seq_RIGG13073	ZDHHC4	Zinc finger, DHHC-type containing 4
A_87_P096276	RPL9	Ribosomal protein L9
A_87_P103653	LPCAT1	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1
A_87_P277313	CCDC12	Coiled-coil domain containing 12
A_87_P036176	CTSA	Cathepsin A
A_87_P073936	SEC61A1	Sec61 alpha 1 subunit
A_87_P017510	TPX2	TPX2, microtubule-associated, homolog
A_87_P095071	CSGALNACT1	Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1
T040350_G005962_ARHGAP17_416564	ARHGAP17	Rho GTPase activating protein 17
T004392_G002781_BRCA1_373983	BRCA1	Breast cancer 1, early onset
A_87_P071626	ARHGAP17	Rho GTPase activating protein 17
A_87_P056301	POFUT1	Protein O-fucosyltransferase 1
A_87_P066656	AKAP10	A kinase (PRKA) anchor protein 10

(suite, partie 3/3).

oligo_ID	Gene symbol	Description
A_87_P068481	PPAPDC3	Phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 3
seq_RIGG13505	MUC	Mucin protein
A_87_P221513	SLC16A10	solute carrier family 16, member 10 (aromatic amino acid transporter)
A_87_P316892	DERL1	Der1-like domain family, member 1
lip_DPAGT1	DPAGT1	Dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine) N-acetylglucosaminephosphotransferase 1 (GlcNAc-1-P transferase)
A_87_P204523	LGMN	Legumain
T009586_G005962_ARHGAP17_416564	ARHGAP17	Rho GTPase activating protein 17
seq_RIGG12101	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
A_87_P112298	FANCC	Fanconi anemia, complementation group C
A_87_P123789	LOC395611	Glutathione S-transferase class-alpha
A_87_P010917	CHKA	Choline kinase alpha
A_87_P135483	TSPO	Translocator protein (18kDa)
seq_RIGG08427	CCP110	Centriolar coiled coil protein 110kDa, transcript variant 1
T019120_G011697_SEC22A_424250	SEC22A	SEC22 vesicle trafficking protein homolog A
A_87_P250913	PSAP	Prosaposin
A_87_P105288	NDRG1	N-myc downstream regulated 1
A_87_P265963	FRMD4B	FERM domain containing 4B
A_87_P147138	ARHGAP17	Rho GTPase activating protein 17
A_87_P195223	IGSF6	Immunoglobulin superfamily, member 6
T036865_G016479_LAPTM4A_421959	LAPTM4A	Lysosomal protein transmembrane 4 alpha
A_87_P055561	INIP	Chromosome Z open reading frame, human C9orf80
A_87_P203823	COQ6	Coenzyme Q6 homolog, monooxygenase
T020592_G012613_FBP1_395218	FBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1
A_87_P038013	P2RX4	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4
T000524_G000384__LZTR1	LZTR1	Leucine-zipper-like transcription regulator 1
A_87_P030818	RIMS2	Regulating synaptic membrane exocytosis 2
A_87_P212563	OSTF1	Osteoclast stimulating factor 1