

UFR SCIENCES & TECHNIQUES COTE BASQUE
Université de Pau et des Pays de l'Adour

Licence Biologie des Organismes

INFLUENCE DE LA TENEUR EN METHIONINE ET PROTEINES DE L'ALIMENT SUR LES DEFENSES ANTIOXYDANTES DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL

GRISO Emmanuelle

Stage effectué du 04/03/2013 au 26/04/2013

**Pôle d'hydrobiologie INRA – Quartier Ibarron, 64310 Saint-Pée-sur-Nivelle
Sous la direction scientifique de Mme Stéphanie FONTAGNE DICHARRY**



"Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la responsabilité de l'Entreprise ou du Laboratoire d'accueil"

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Sandrine SKIBA, directrice de l'unité Nutrition, Métabolisme et Aquaculture et Monsieur Stéphane PANSERAT, directeur adjoint pour m'avoir accueillie au sein du pôle d'hydrobiologie de Saint-Pée-sur-Nivelle.

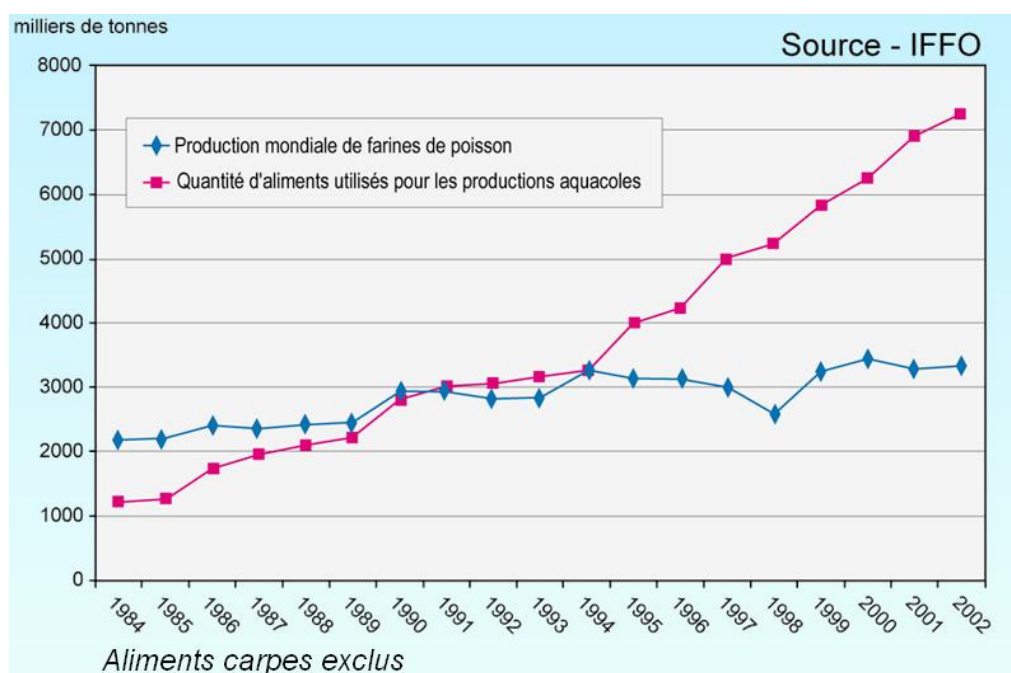
Je remercie tout particulièrement mon maître de stage, Madame Stéphanie FONTAGNE pour m'avoir acceptée comme stagiaire et m'avoir fait confiance tout au long de ce stage. Je la remercie aussi pour toutes les connaissances qu'elle m'a apportées, le temps qu'elle y a consacré, et surtout pour son aide précieuse lors de la rédaction de ce rapport.

Je remercie également Vincent VERON et Haokun LIU pour avoir pris le temps de me former et de m'avoir fait partager leurs connaissances.

Enfin je remercie tout le reste de l'équipe ainsi que tous les stagiaires et thésards que j'ai rencontrés pour leur accueil chaleureux me permettant de réaliser un stage très agréable au sein de cette équipe.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
A- Contexte de recherche	2
B- Importance aquacole de la truite arc-en-ciel	2
C- Rôle de la méthionine dans l'alimentation de la truite.....	3
D- Les fonctions antioxydantes chez la truite	4
a. Les antioxydants.....	4
b. L'oxydation et ses conséquences	5
II- MATERIEL ET METHODES	7
A- Conditions expérimentales	7
B- Analyse de l'expression des gènes	7
a. Les gènes cibles étudiés	7
b. Extraction des ARN totaux	8
c. Evaluation de la qualité et de la concentration des ARN totaux	9
d. Transcription inverse des ARN	9
e. Amplification par PCR en temps réel	10
f. Traitement statistique des résultats PCR.....	12
III- RESULTATS ET DISCUSSION.....	13
A- Niveaux d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de la méthionine ..	13
B- Niveaux d'expression des gènes impliqués dans les défenses antioxydantes.....	15
CONCLUSION.....	17
BIBLIOGRAPHIE	18



[Figure 1](#) : Evolution de la production mondiale de farine de poisson

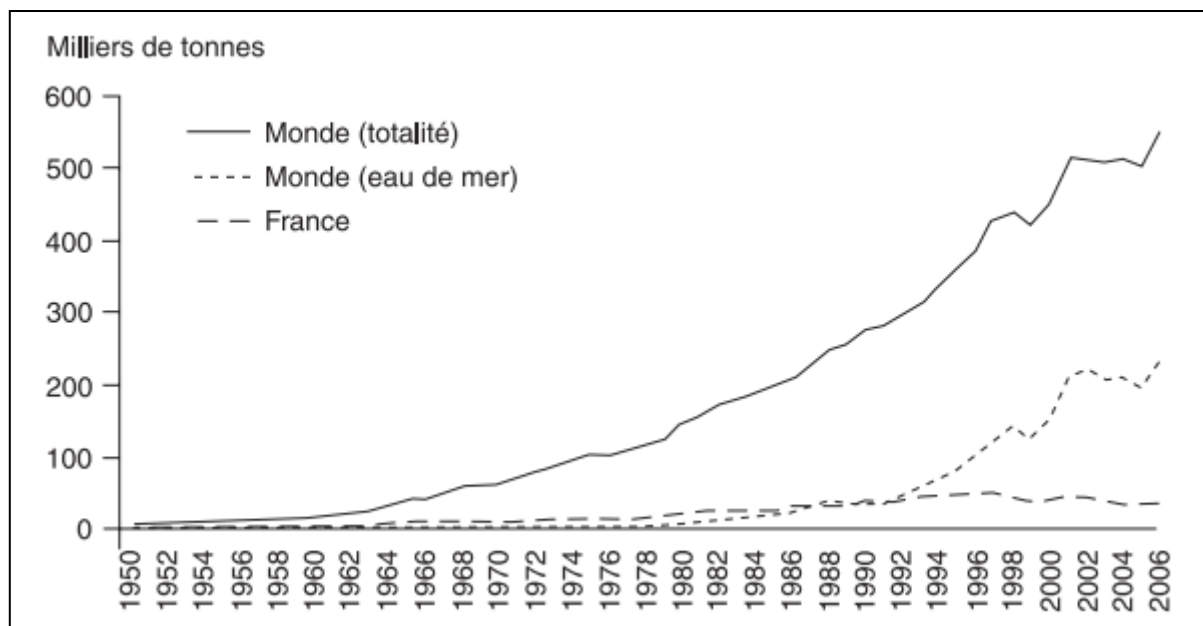
INTRODUCTION

La moitié des produits marins pour la consommation humaine provient de l'aquaculture, mais cette dernière dépend de la pêche. En effet l'alimentation des poissons d'élevage repose sur la farine et l'huile de poissons issus d'une pêche minotière, c'est-à-dire de petits poissons pêchés spécifiquement. Il faut 10 à 20 kg de poissons pélagiques pour produire seulement un litre d'huile de poisson et donc entre 3 et 15 kg de poissons sauvages pour produire 1 kg de poissons d'élevage (Consalvi, 2012). Le problème actuel est que les ressources en poissons sauvages se raréfient alors que la consommation de poissons et l'aquaculture continuent à se développer à un rythme soutenu (Figure 1).

Bien que les farines de porc et de volailles pour nourrir les poissons d'élevage soient de nouveau autorisées à partir de juin 2013 (utilisation interdite depuis 2001), d'autres voies d'alimentation pour les poissons sont possibles. L'une des pistes les plus prometteuses est de remplacer une partie de la farine et de l'huile de poisson par des produits végétaux renouvelables (Tacon et Metian, 2008). Les travaux en faveur d'un développement durable de l'aquaculture depuis plusieurs années ont montré qu'il était possible d'utiliser des aliments avec de très faibles apports en farines et huiles de poisson tout en assurant les performances, la valeur nutritionnelle et la qualité organoleptique des produits. Petit à petit le végétal s'impose puisqu'il y a quinze ans, il n'y avait que 25% de végétal dans l'alimentation du poisson contrairement à aujourd'hui où il y en a 85%. Par exemple, 1 kg de truite arc-en-ciel peut être produit avec 1,25 kg de petits poissons pêchés, et 1,5 kg pour le saumon Atlantique (Consalvi, 2012).

Cependant les derniers pourcentages sont difficiles à atteindre car une baisse de l'appétit est constatée dès que la farine de poisson est complètement supprimée. De plus ces nouveaux types d'alimentation sont limités par les niveaux trop faibles de méthionine qui entraîne une baisse de la croissance des poissons. En plus d'être essentielle dans la structure des protéines, la méthionine intervient également dans la croissance et le fonctionnement de différents processus biologiques, tels que l'activation des voies de signalisations cellulaires, le système de protection oxydant de la cellule, et les processus de méthylation qui régissent la régulation de l'expression du génome. Plusieurs études sont donc en cours au sein de l'unité de recherche en nutrition, métabolisme et aquaculture (NuMÉA) de l'INRA de Saint-Pée-sur-Nivelle pour évaluer les apports nécessaires en protéines et en méthionine sur ces mécanismes biologiques.

L'objectif de mon stage a été d'évaluer les effets d'une alimentation plus ou moins riche en protéines et en méthionine sur les fonctions antioxydantes de la truite arc-en-ciel. La méthionine joue un rôle dans les fonctions antioxydantes en tant que précurseur du glutathion qui est l'un des plus importants antioxydants mais aussi car c'est un acide aminé facilement oxydable protégeant ainsi les autres acides aminés. Un essai nutritionnel de 12 semaines avec 9 régimes alimentaires différents a été réalisé afin de préciser les besoins nutritionnels en méthionine chez la truite arc-en-ciel, principale espèce de poissons produite en France. Il a été également réalisé pour mettre en évidence le rôle de la méthionine dans les fonctions antioxydante en étudiant l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse du glutathion, dans les fonctions antioxydantes classiques et dans l'oxydation de la méthionine.



[Figure 2](#) : Evolution de la production de truite arc-en-ciel d'élevage en France et dans le monde.

I – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A – Contexte de recherche

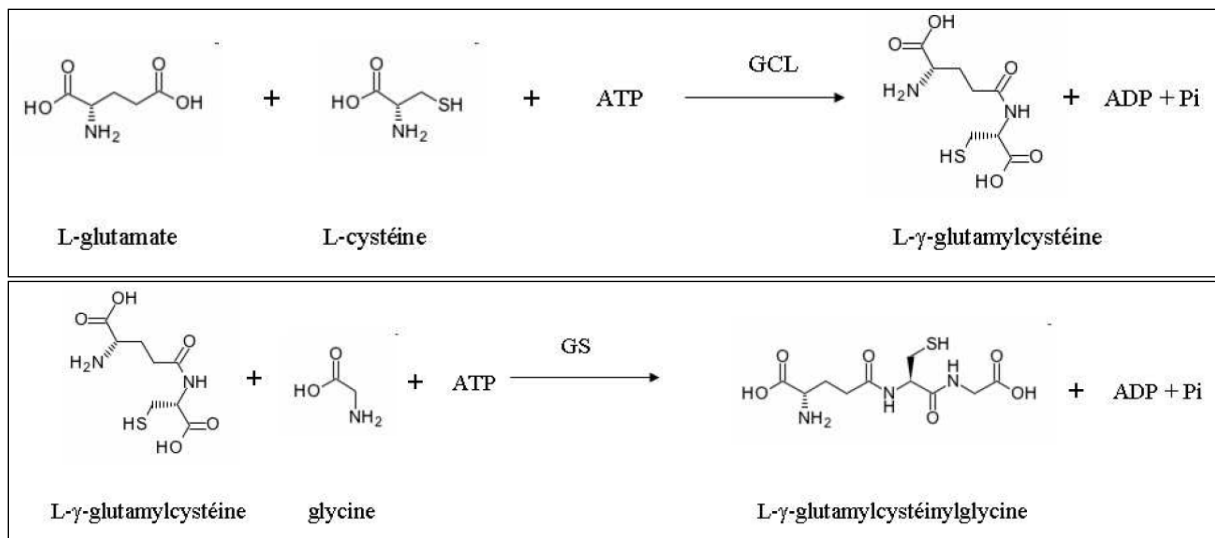
Face à une demande croissante de poissons pour la consommation humaine, l'élevage des poissons s'est développé. La part de l'aquaculture dans la production mondiale totale est passée de 9% en 1980 à 47% en 2010. Le problème est que les poissons sont nourris avec des huiles et des farines d'origine marine provenant de la pêche, dont les ressources atteignent leurs limites alors que la consommation des produits de la pisciculture croît de 8% par an à l'échelle mondiale. Il y a donc de plus en plus de poissons d'élevage qui consomment de plus en plus de poissons sauvages, ce qui contribue à augmenter le risque de pénurie de poissons (Figure 1). La durabilité et la compétitivité de l'aquaculture dépendent alors du remplacement des huiles et farines de poisson avec des ingrédients alternatifs. Depuis déjà 20 ans des programmes de recherche européens comme PEPPA, RAFOA ou Aquamax visent à remplacer les huiles et farines de poisson avec des ingrédients d'origine végétale. Depuis janvier 2012, un projet européen regroupant 21 partenaires dont des institutions scientifiques et des PME européennes a été mis en place. Il s'agit du projet ARRINA. C'est un projet dont le but est de développer des alternatives durables d'alimentation en aquaculture adaptées aux besoins nutritionnels de plusieurs espèces européennes de poissons au cours de leur cycle de vie complet avec des niveaux réduits en farine et huile de poissons et d'évaluer les conséquences physiologiques à long terme. Le projet est divisé en 6 volets scientifiques comportant, 1) l'identification de biomarqueurs, 2) le développement de nouveaux vecteurs de nutriments, 3) l'identification des besoins nutritionnels, 4) l'analyse des effets à long terme (performance et qualité), 5) l'évaluation des impacts environnementaux et 6) le développement de la programmation nutritionnelle.

De nombreux chercheurs de l'unité de recherche NuMÉA de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) situé à Saint-Pée-sur-Nivelle participent à ce projet. Mon maître de stage, Stéphanie Fontagné travaille sur une étude qui s'insère dans le volet scientifique sur les besoins nutritionnels dont l'objectif est de définir les besoins nutritionnels quantitatifs pour les 5 principales espèces européennes de poissons d'élevage que sont le saumon atlantique, la truite arc-en-ciel, la dorade, le bar et la carpe commune. Cette étude vise à analyser l'influence de la supplémentation en méthionine sur la croissance et la régulation du système de protection antioxydant chez les truites arc-en-ciel juvéniles.

B - Importance aquacole de la truite arc-en-ciel

Les recherches du projet ARRINA réalisées à l'INRA de Saint-Pée-sur-Nivelle sont réalisées chez la truite arc-en-ciel, principale espèce produite en France (Figure 2).

La truite arc-en-ciel fait partie des salmonidés et son nom commun tient à la présence d'une bande longitudinale irisée sur ses flancs (Jalabert et Fostier, 2010). Elle est originaire de la côte ouest de l'Amérique de Nord principalement en eau douce et a été introduite sur tous les continents depuis la fin du XIXe siècle. Ces introductions étaient motivées par les qualités de cette espèce pour la pisciculture. C'est l'une des espèces de poissons téléostéens dont



[Figure 3](#) : Synthèse du glutathion en 2 étapes par la glutamylcystéine ligase (GCL) et la glutathion synthétase (GS)

l'élevage plus ou moins intensif est le mieux maîtrisé. Cette espèce est capable de s'adapter à des conditions de milieu très variées pourvu que quelques exigences minimales soient satisfaites concernant notamment la teneur en oxygène et la température. Ce poisson accepte en captivité des aliments secs, dès l'alevinage et supporte des densités d'élevage relativement importantes avec très peu d'agressivité mutuelle. La maturité sexuelle complète est généralement atteinte sans difficultés au bout de 2 ans d'élevage ce qui permet aux éleveurs de recueillir les gamètes pour réaliser la fécondation artificielle et l'incubation des œufs et des alevins dans des conditions d'efficacité optimale. Au cours de la période de 1950 à 2006, la production mondiale a dépassé les 500 000 tonnes par an, mais depuis une vingtaine d'années c'est essentiellement la production en eau de mer qui contribue à l'augmentation mondiale et au contraire, la production en eau douce stagne à cause de la saturation des ressources en eau disponible.

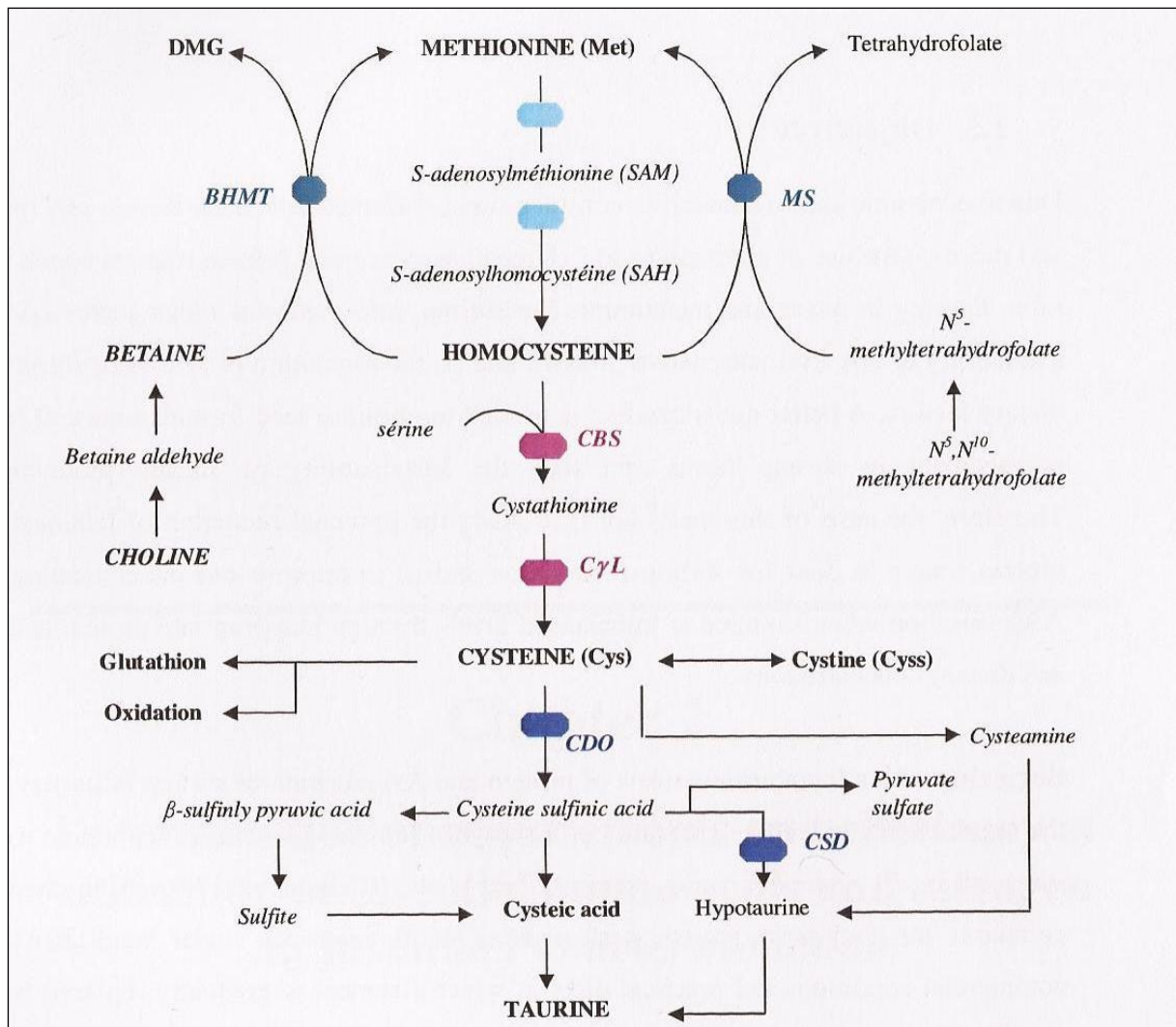
La truite est l'espèce chez laquelle les données quantitatives les plus complètes sur les besoins nutritionnels des poissons ont pu être acquises grâce à de très nombreux travaux de recherche depuis le début des années 1970. La truite est un poisson carnivore et ses besoins nutritionnels en matière azotés sont relativement élevés. La proportion nécessaire de protéines dans leur ration est pratiquement deux fois plus élevée que dans celle d'autres animaux d'élevage. Les besoins nutritionnels sont aussi couverts par les acides gras, les minéraux, les vitamines et très peu de glucides. Les acides aminés indispensables doivent être fournis dans les proportions optimales pour favoriser la croissance, le développement et le bien-être physiologique des poissons. La composition en acides gras des poissons d'élevage est le reflet de celle des lipides alimentaires et c'est sa richesse en acides gras à chaîne longue polyinsaturée qui leur confère leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques. L'apport en minéraux et en vitamines est indispensable dans la croissance du poisson et dans de nombreux processus biologiques comme par exemple la protection contre l'oxydation des lipides et les activités enzymatiques.

C – Rôle de la méthionine dans l'alimentation de la truite

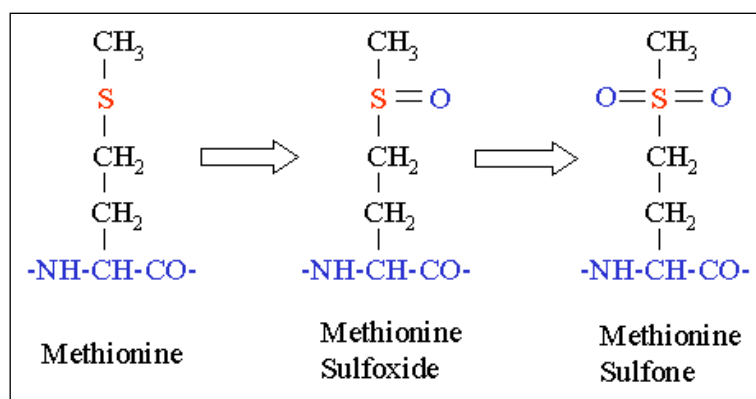
La méthionine est un acide aminé indispensable qui intervient dans de nombreuses fonctions biologiques importantes. Le besoin nutritionnel en méthionine est estimé entre 1,3 et 3,6 gramme de méthionine par gramme de protéines (Guillaume *et al.*, 1999). Cependant la teneur en méthionine des matières premières végétales est faible, ce qui entraîne un apport plus bas en méthionine lors d'une alimentation d'origine végétale et donc la nécessité de compléter les aliments avec des acides aminés de synthèse.

La méthionine joue un rôle important dans la croissance musculaire et dans les fonctions antioxydantes. Elle est essentielle au niveau de la croissance car chaque chaîne protéique démarre par l'incorporation d'une méthionine et que la croissance est liée à la teneur en protéines. Elle participe aussi à l'activation de voies de signalisations cellulaires et régit la régulation de l'expression du génome en étant un donneur de groupements méthyls essentiels aux mécanismes de méthylation (ADN et histones).

En tant que précurseur de la cystéine, elle intervient également dans le système de protection antioxydant de la cellule. La cystéine forme avec le glutamate et la glycine le glutathion, un puissant antioxydant, dans une réaction en deux étapes (Figure 3).



[Figure 4](#) : Métabolisme de la méthionine en glutathion



[Figure 5](#) : Oxydation de la méthionine

La réaction est catalysée par la γ -glutamylcystéine ligase (γ GCL) et la glutathion synthétase (GS), et nécessite un total de deux moles d'ATP par mole de glutathion. Le métabolisme de la méthionine en glutathion débute par une étape de transméthylation qui convertit la méthionine en homocystéine par la formation de deux intermédiaire : la S-adénosylméthionine et la S-adénosylhomocystéine ([Figure 4](#)). En fonction des besoins et des apports en méthionine et en cystéine, l'homocystéine produite est soit reméthylée en méthionine sous l'action de la betaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT) ou de la méthionine synthase (MS), soit orientée vers la voie irréversible de la synthèse de la cystéine. L'homocystéine est condensée avec une sérine par la cystathionine- β -synthase (CBS) pour produire la cystathionine qui est ensuite clivée par la cystathionine- γ -lyase pour produire la cystéine. La première étape de la synthèse du glutathion constitue l'étape limitante. L'activité de la γ GCL est contrôlée par rétroaction négative du glutathion et de la γ -glutamylcystéine qui viennent occuper les sites de fixation du glutamate et de la cystéine. La synthèse du glutathion est aussi fortement influencée par la disponibilité de ses acides animés précurseurs et en particulier de la cystéine. Il a été montré qu'un apport élevé en cystéine libre, ou en protéines riches en cystéine, stimule la synthèse du glutathion (Mariotti *et al.*, 2004). En tant que précurseur de la cystéine, une augmentation en méthionine laisserait alors supposer une augmentation de la production du glutathion comme cela a été mis en évidence dans l'intestin de carpe (Feng *et al.*, 2011).

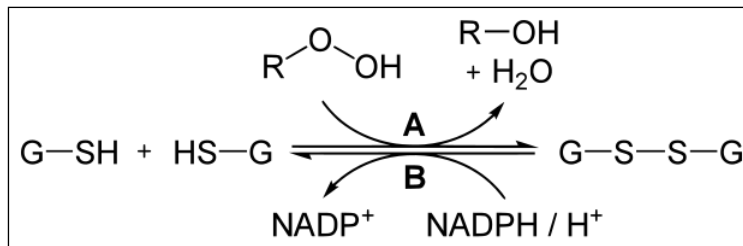
De plus, la méthionine est un acide aminé facilement oxydable, elle peut donc également servir directement de protection anti-oxydante car celle-ci peut être régénérée facilement. Le soufre de cette molécule est sensible à l'oxydation ce qui donne lieu à deux dérivés, la méthionine sulfone et la méthionine sulfoxyde ([Figure 5](#)). L'oxydation des résidus méthionines sert ainsi à protéger d'autres résidus essentiels contre les dommages oxydatifs. La méthionine peut ensuite retrouver sa forme réduite par l'action des méthionine sulfoxyde réductases.

D – Les fonctions antioxydantes chez la truite

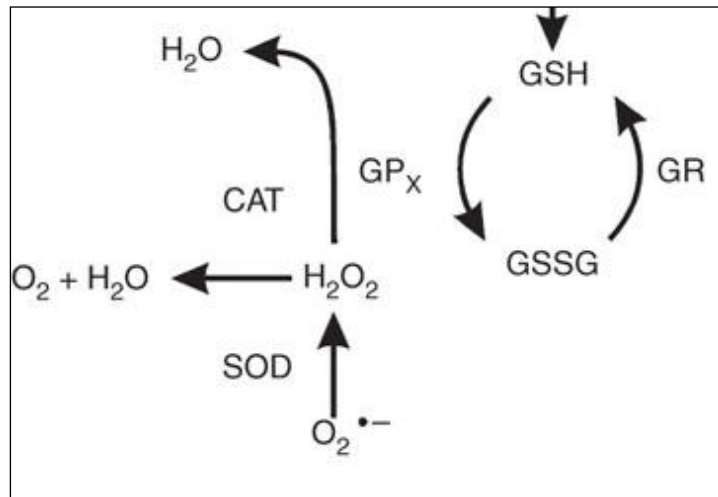
a – Les antioxydants

L'organisme du poisson possède deux mécanismes de défenses, le piégeage des radicaux libres par les antioxydants protégeant les autres composés sensibles à l'oxydation et par le système enzymatique permettant la destruction de certains composés intermédiaires. Les radicaux libres sont une forme d'espèces chimiques possédant un électron célibataire. Cette propriété les rend aptes à réagir avec différentes molécules notamment lors des réactions en chaîne comme la peroxydation des lipides. Les espèces réactives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ne sont pas des radicaux libres mais peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leur précurseurs est appelé espèces réactives de l'oxygène.

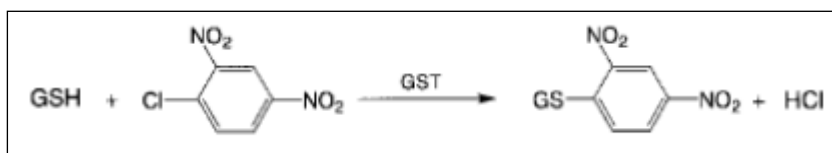
L'antioxydant principal non-enzymatique qui est présent à l'intérieur de pratiquement toutes les cellules est le glutathion (GSH). C'est un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Le couple glutathion réduit/glutathion oxydé (noté GSH/GSSG) assure le maintien du statut redox au niveau intracellulaire. Il participe ainsi au maintien de l'environnement cellulaire dans un état optimal réduit.



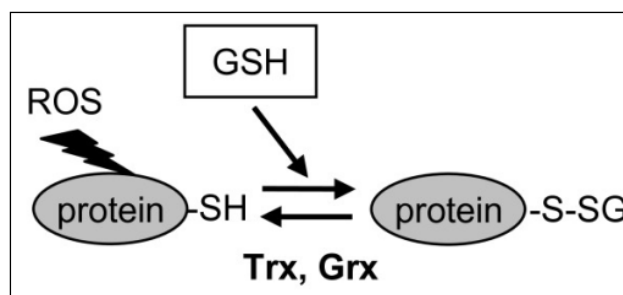
[Figure 6](#) : Réaction d'élimination d'espèces réactives de l'oxygène où le glutathion sert de co-facteur. A : Enzymes de la famille des glutathions peroxydases et B : Glutathion réductase



[Figure 7](#) : Réaction de dismutation, SOD : Superoxyde dismutase, CAT : Catalase



[Figure 8](#) : Exemple de réaction de conjugaison catalysé par la GST entre du glutathion et du 1-chloro-2,4-dinitrobenzène d'après De Franco (2009)



[Figure 9](#) : Réaction de glutathionylation

La forme réduite du glutathion peut être facilement régénérée à partir de la forme oxydée sous l'action de la glutathion réductase (GR). Le glutathion exerce aussi son rôle de tampon redox en participant à la régénération de la forme réduite d'autres antioxydants tels que les tocophérols ou l'acide ascorbique (vitamines E et C).

Le glutathion participe aux défenses antioxydantes en intervenant dans les réactions de détoxification et d'élimination d'espèces réactives de l'oxygène. Il a la capacité de capter directement et spontanément différentes espèces radicalaires. Il agit aussi en tant que cofacteur de réactions enzymatiques antioxydantes catalysées par des enzymes comme la glutathion peroxydase (GPX) qui permet d'éliminer les hydroperoxydes comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les hydroperoxydes lipidiques. Dans ce processus, deux molécules de GSH sont condensées en une seule molécule sous forme oxydée ([Figure 6](#)). D'autres enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) peuvent neutraliser et éliminer les espèces réactives de l'oxygène. La SOD est capable de transformer par une réaction de dismutation l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier peut être ensuite catabolisé par la CAT pour former des molécules d'eau ([Figure 7](#)).

Le glutathion est également utilisé comme substrat de conjugaison lors de la détoxification de composés toxiques de la cellule où il se lie à un composé (produit d'oxydation ou xénobiotique) par l'action de la glutathion-S-transférase (GST) afin d'être exporté hors de la cellule et être dégradé ([Figure 8](#)). Les produits de dégradation des conjugués sont réabsorbés et peuvent être utilisés pour la synthèse du glutathion.

En plus de ces rôles majeurs dans les défenses antioxydantes et le maintien du statut redox intracellulaire, le glutathion participe à d'autres mécanismes physiologiques dans la lutte contre le stress oxydant tels que la glutathionylation ([Figure 9](#)). Cette réaction permet de former des ponts disulfures entre le glutathion et les groupements sulphydryles des protéines, les protégeant ainsi contre certaines réactions irréversibles pouvant avoir lieu dans des conditions de stress oxydant, comme la carbonylation, la glycation ou la nitration, et donc à la perte de la fonction protéique.

Les autres antioxydants sont de nature non-enzymatique, ce sont des métallothionéines et des vitamines C et E (acide ascorbique et α -tocophérol). On retrouve également les thiorédoxines qui sont de petites molécules spécialisées dans la réduction de ponts disulfure. La plupart d'entre elles possèdent deux cystéines au sein de leur site actif. La thiorédoxine oxydée est régénérée par l'action de la thiorédoxine réductase qui tire son pouvoir réducteur du NADPH ([Figure 10](#)). Le facteur de transcription Nrf2 est conservé dans le cytoplasme par un groupe de protéines qui se dégradent rapidement lors d'un stress oxydant. Nrf2 ne se dégrade pas, mais se déplace vers le noyau où il se lie à un promoteur d'ADN qui déclenche la transcription de gènes et de protéines antioxydantes.

b – L'oxydation et ses conséquences

La présence d'espèces réactives de l'oxygène provoque la dégradation de nombreux composés, notamment de lipides et de protéines. Parmi les espèces réactives de l'oxygène, on retrouve les radicaux superoxydes $O_2^{\cdot -}$, les radicaux hydroxyles HO, les radicaux peroxydes ROO et les radicaux alkoxydes RO où R est une chaîne carbonée.

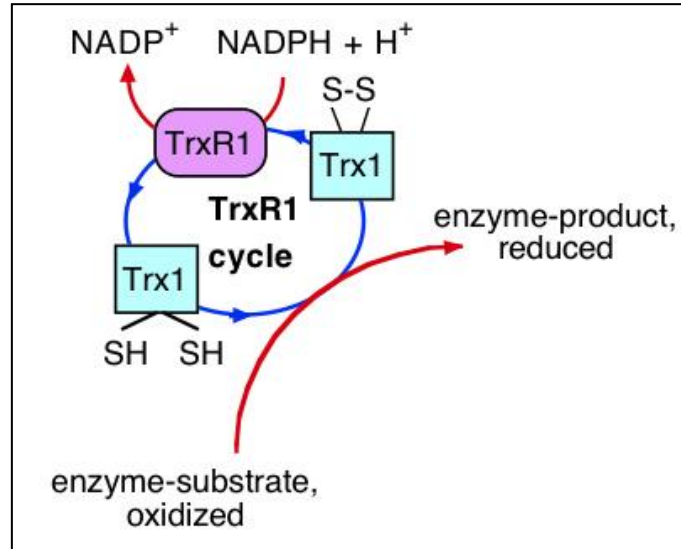


Figure 10 : Mécanisme antioxydant des thiorédoxines

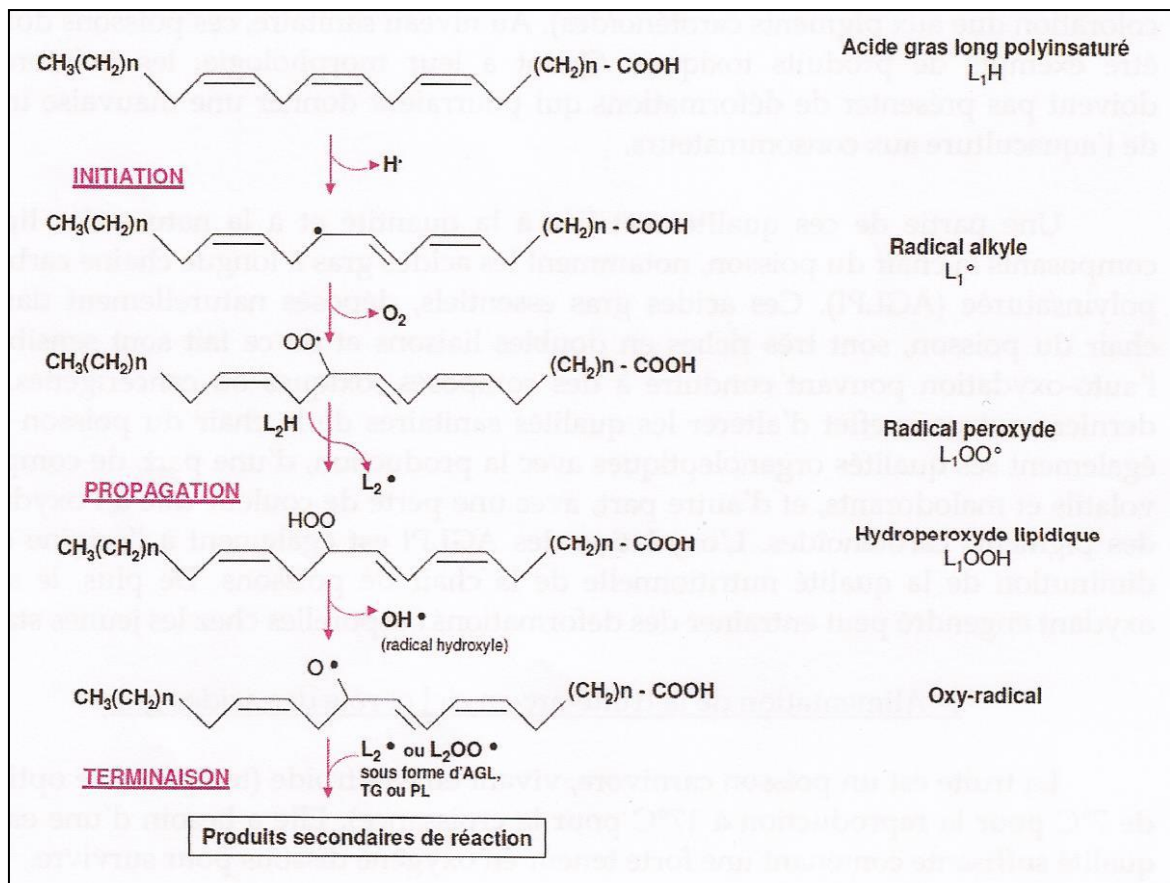


Figure 11 : Peroxydation lipidique

La qualité nutritionnelle du poisson pour l'homme repose en grande partie sur sa richesse en acides gras polyinsaturés n-3 mais au contact de l'oxygène les acides gras insaturés et surtout les plus insaturés d'entre eux, les acides gras à chaîne longue polyinsaturée tels que l'acide docosahexaénoïque (22:6n-3) sont facilement altérés par des réactions de peroxydation. Ce phénomène a lieu aussi bien dans les aliments et la chair lors du stockage que sur les organismes vivants. La difficulté de conservation de la chair de poisson résulte en grande partie de ces phénomènes. Ce phénomène de peroxydation intervient tout au long de la chaîne de production, des matières premières entrant dans la composition des aliments pour les poissons jusqu'au produit fini transformé. L'ensemble du processus de peroxydation comprend 3 grandes phases, l'initiation (arrachage d'un électron au niveau d'une double liaison et formation d'un radical instable), propagation avec formation en chaîne d'une série de radicaux libres se comportant tantôt comme réducteurs tantôt comme oxydants, et enfin arrêt de la réaction avec formation de composés terminaux tels qu'aldéhydes et cétones (Figure 11). Les radicaux libres sont extrêmement nocifs aux organites cellulaires et aux macromolécules et les composés terminaux peuvent être toxiques.

Les effets néfastes de la peroxydation des lipides sont multiples mais les symptômes les plus fréquemment rencontrés correspondent à une carence en vitamine E qui a pu être totalement utilisée dans les réactions de destruction des radicaux libres. Il est observé alors en particulier une dystrophie musculaire et des lyses d'hématie. La peroxydation provoque également une diminution de la coloration de la chair et une altération de sa flaveur (odeur et goût). La qualité diététique aussi diminue à cause de la destruction partielle des acides gras polyinsaturés bons pour la santé humaine et de vitamines et pigments sensibles à l'oxydation.

Les protéines subissent aussi des modifications directes sous l'action des radicaux libres oxygénés avec pour conséquence notamment l'oxydation des acides aminés et la formation de liaisons croisées entre deux protéines. Les acides aminés possédant une fonction thiol vont donner des sulfoxydes et former des ponts disulfures. L'oxydation directe des acides aminés peut également générer des composés carbonylés. Les protéines oxydées sont alors affectées dans leur fonction jusqu'à devenir inactives. Par conséquent les signaux cellulaires de prolifération ou de défenses peuvent être perturbés et inactivés. En plus d'altérer les protéines, les espèces réactives de l'oxygène peuvent également attaquer l'ADN ce qui entraîne des dégradations cellulaires et des mutations carcinogènes.

II – MATERIEL ET METHODES

A – Conditions expérimentales

L'expérience de 12 semaines a été réalisée entre les mois de novembre 2012 et janvier 2013 à la plate-forme expérimentale de Donzacq. Sept cent quatre-vingt-dix-huit truites arc-en-ciel, réparties dans 21 bacs, ont été nourries avec 9 régimes alimentaires différents. Il y avait 3 bacs par régime et donc 3 réplicats par traitement alimentaire. Tous les groupes ont été alimentés jusqu'à satiété visuelle et pesés toutes les 3 semaines. Au bout de 12 semaines, les foies de 81 truites arc-en-ciel ont été prélevés (3 poissons par bac, soit 9 poissons par régime), identifiés et conservés à -80°C à l'INRA de Saint Pée-sur-Nivelle.

La composition des 9 régimes alimentaires diffère par de la quantité de matières azotées présentes avec 4 niveaux : 9, 24, 38 et 49% de l'aliment ([Figure 12](#)). Ces protéines sont apportées par le concentré de protéines solubles de poissons (CPSP, 13,5% du mélange protéique), de soja (67,4%) et de blé (19,1%, [Tableau I](#)). Pour les niveaux LP (low protein, 24%), MP (medium protein, 38%) et HP (high protein, 49%), différents pourcentages en méthionine et cystéine ont été testés : soit carencés dans les régimes noté 0 (LP-0, MP-0 et HP-0), soit adéquats dans les régimes notés 1 (LP-1, MP-1, et HP-1), soit carencés en méthionine mais adéquats en cystéine dans le régime MP-2, soit avec un excès de méthionine dans le régime MP-3 ([Figure 13](#)), ([Tableau I](#)). Les teneurs carencées et adéquates en méthionine et cystéines sont exprimées en pourcentage des protéines et la méthionine lorsqu'elle est exprimée en pourcentage de l'aliment représente entre 0,19% et 1,25% des aliments NP et MP-3, respectivement. La composition des 9 régimes permet donc de comparer l'effet de différents types d'apports en protéines et méthionine de façon indépendante ou non. Les autres ingrédients, comme les acides gras, les minéraux et les vitamines sont présents dans les mêmes proportions pour les 9 régimes. En revanche ce n'est pas le cas des glucides puisque les régimes riches en protéines sont faibles en glucides et inversement ([Tableau I](#)).

B – Analyse de l'expression des gènes

a – Les gènes cibles étudiés

Pour évaluer l'impact d'une supplémentation en méthionine dans le régime alimentaire, les niveaux d'expression de gènes codant pour des enzymes et des facteurs de transcriptions ont été analysés. L'ensemble des gènes peut être partagé en 2 groupes, les gènes du métabolisme de la méthionine en glutathion avec les gènes spécifiques de la régénération de la méthionine réduite et les gènes impliqués dans les fonctions antioxydantes classiques.

Pour voir l'impact sur le métabolisme de la méthionine en glutathion de la truite ([Figure 14](#)), les gènes amplifiés par PCR sont ceux codant pour la γ -glutamylcystéine ligase (Gclc), la cystathionine- β -synthase (CBS), la cystathionine- γ -lyase (CGL), la betaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT) et la méthionine synthase (MS).

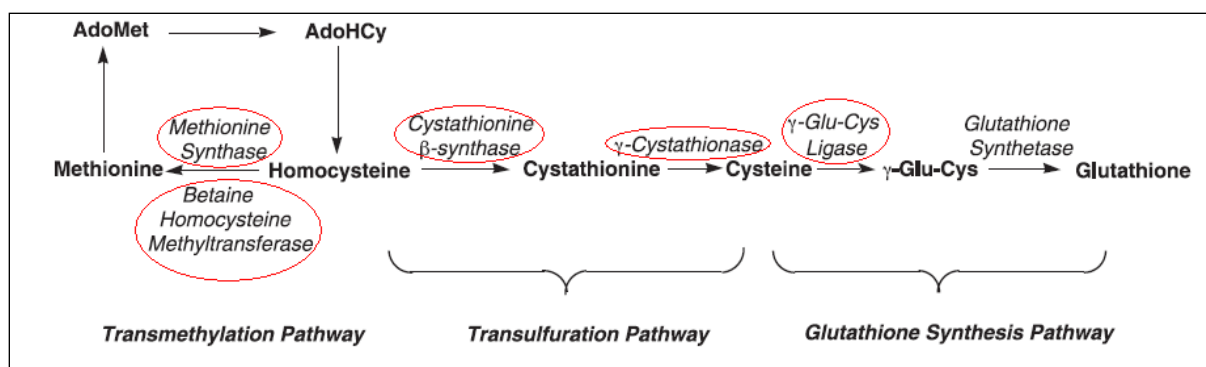


Figure 14 : Enzymes impliquées dans le métabolisme de la méthionine observées dans cette étude.

Tableau II : Liste des amorces

Gène	GenBank accession no.	Nom des Amorces	Séquence Amorces	Tm	T° hybridation	Taille amplicon
Elongation factor 1 (EF1)	AF498320.1	EF1a-F	TCCTCTTGGTCGTTTCGCTG	63.74	64°C	159
Glutamate-cysteine ligase 1 (Gclc1)	GE829695.1	Gclc-F	AGGCCAGAGTATGGCAGCTA	60.00	60°C	176
		Gclc-R1	CAGCCTAACCTTGGGAATGA	60.07		
Glutamate-cysteine ligase 2 (Gclc2)	DV193298.s.om.10 (=séquence Sigenae)	Gclc-F	GATGGCTATGTTTGGGATGG	60.00	60°C	166
		Gclc-R2	ACCTGTGCAGGTCTCTTCGT	60.18		
Glutamate-cysteine ligase 3 (Gclc3)	BX308140.3	Gclc3-F	CAACCAACTGGCAGACAATG	60.15	60°C	189
		Gclc3-R	CCTTTGACAAGGGGATGAGA	60.04		
cystathionine-β-synthase 1 (CBS1)	NM_001124686.1	CBS1-F	CCACCTCAGGCAATACAGGT	59.99	60°C	107
		CBS1-R	AACATCCACCTTCTCCATGC	59.93		
cystathionine-β-synthase 2 (CBS2)	V30TN01EYEEC.s.om.	CBS2-F	CAAGGCTCTCAGCACATCCA	62.54	63°C	132
		CBS2-R	ACCATCATCGAGCCACCT	62.87		
cystathionine-γ-lyase 1 (CGL1)	EU315111.1	CGL-F1	CACCAACCCACCATGAAAG	63.47	64°C	118
		CGL-R	GCGCTGGAAGTAGGCTGACA	63.90		
cystathionine-γ-lyase 2 (CGL2)	CA346244.s.om.10	CGL-F2	TGGCTTGAGACTCCCACCAA	64.11	64°C	132
		CGL-R	GCGCTGGAAGTAGGCTGACA	63.90		
betaine-homocystéine méthyltransférase 2 (BHMT2)	CA368068.s.om.10	BHMT2-F	GCTGAGGAGCTAGCCACAGA	60.84	60°C	140
		BHMT2-R	GGCTTCAGCTTCTCCAGTA	59.57		
méthionine synthase 1 (MS)	V30TN01A0UO6.s.om.	MTR1-F	AATGCAGGTCTGCCAATAC	59.96	60°C	137
		MTR1-R	CTGATGTGTGCAGGAGTCGT	59.90		
méthionine sulfoxyde réductase A1 (MSRA1)	NM_001160616.1	MSRA-F1	GATGGCTATGTTTGGGATGG	60.16	60°C	136
		MSRA-R	ACCTGTGCAGGTCTCTTCGT	59.91		
méthionine sulfoxyde réductase B1a (MSRB1a)	BX313019.3	MSRB1a-F	CTGGCCTGCCTTCACTGAGA	64.01	64°C	87
		MSRB1a-R	TTCCACATCGGACCTTGAA	63.71		
méthionine sulfoxyde réductase B2 (MSRB2)	BX311214.3	MSRB2-F	AGGGGACAGAGATGCCCTTC	62.84	63°C	149
		MSRB2-R	CCCATGAGCCTCTTTGAACG	63		
Glutathion réductase (GR)	CA368976.1	GR-F	CTAAGCGCAGCGTCATAGTG	59.80	64°C	108
		GR-R	ACACCCCTGTCTGACGACAT	60.44		
Glutathion-S-transférase π (GST π)	BX302932.3	GST2-L	TCGCTGACTGGACGAAAGGA	64.37	64°C	196
		GST2-R	CGAAGGTCCTCAACGCCATC	65.24		
Glutathion peroxydase 1 (GPX1)	CA357669.1	GPX1-1	CGAGCTCCATGAACGGTACG	63.99	64°C	183
		GPX1-2	TGCTTCCCCTTCACATCCAC	64.38		
Glutathion peroxydase 4 (GPX4)	CA344428.1	HPGPX-F	TTGAGGTCAGGAGCCAGGT	64.42	64°C	152
		HPGPX-R	ACCCTTTCCCTTGGGCTGTT	64.18		
thiorédoxine réductase (TR1)	BX857580.3	TR1-F	ACAAATCAAGGCGACCAAC	59.98	60°C	148
		TR1-R	GGCAGAGAGAACAGGTCTGTC	59.99		
Nrf2	CA360709.s.om.10	Nrf2-L	TGAGCTGCAGCAATGTCTGA	61.92	62°C	124
		Nrf2-R	GTTGGGCAATGGGTAGAAGC	61.76		

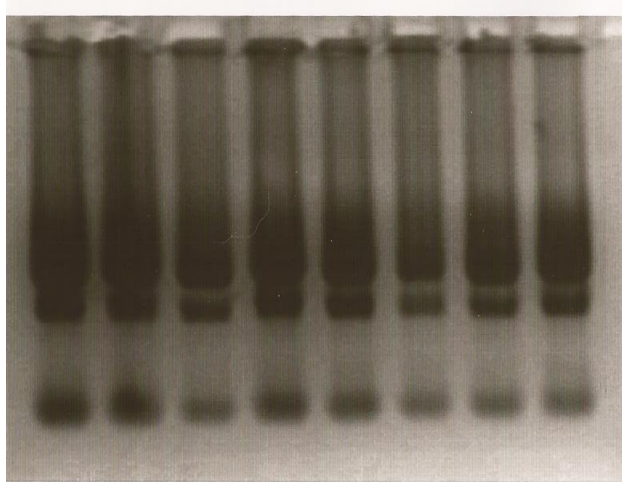
Au niveau des fonctions antioxydantes classiques, les gènes cibles sont ceux codant pour la glutathion-S-tranférase II (GST II), les glutathion peroxydases cytosolique (GPX1) et membranaire (GPX4), la thiorédoxine réductase 1 et le facteur de transcription Nrf2. Enfin les gènes codant pour les méthionine sulfoxyde réductases A et B (MSRA et MSRB) ont été étudiés afin d'évaluer le potentiel de régénération de la méthionine réduite.

Le Tableau II regroupe toutes les amorces utilisées. Certaines enzymes sont présentes plusieurs fois avec des amorces différentes ce qui signifie qu'une même enzyme peut être codée par plusieurs séquences correspondant parfois à plusieurs gènes ou bien plusieurs enzymes distinctes peuvent catalyser la même réaction. Plusieurs critères doivent être pris en compte afin d'avoir de bon résultats pour l'amplification par PCR. Les amorces doivent contenir un minimum de structures secondaires (pour éviter la formation de dimères d'amorces pouvant gêner l'amplification), ne pas avoir de répétitions trop importantes d'un même nucléotide, la température d'hybridation de chacune des deux amorces d'une même couple ne doit pas différer de plus de 1°C, tout en étant supérieure à 55°C et la taille de l'amplicon obtenue doit être inférieure à 300 pb. De plus les amorces doivent s'hybrider sur l'ADNc à cheval sur deux exons afin qu'elles ne puissent pas amplifier de l'ADN génomique qui lui contient des introns entre les exons.

b – Extraction des ARN totaux

Les ARN sont très sensibles à l'action des RNases, c'est pourquoi tout le matériel et l'eau distillée utilisés sont stérilisés par autoclavage et que le protocole s'effectue avec des gants pour empêcher la contamination des ARN par les RNases. L'extraction est réalisée par couplage d'une action chimique (Trizol – Invitrogen) et une action mécanique (broyage à l'Ultraturrax). Le Trizol permet d'extraire en une seule étape les ARN des tissus, il permet de lyser les cellules et de dissoudre les composants cellulaires tout en préservant l'intégrité des ARN. Le protocole permet d'obtenir des solutions d'ARN faiblement contaminées par des protéines et de l'ADN génomique.

Les échantillons qui ont été conservés dans un congélateur à – 80°C, sont déplacés dans de l'azote liquide car ils ne doivent pas se décongeler durant le prélèvement. Pour chaque échantillon, 100 mg de foie sont prélevés et déposés dans un tube contenant du Trizol (1 ml de Trizol pour 100 mg de foie). Ces tubes doivent toujours être maintenus à faible température, c'est pourquoi ils sont gardés sur de la glace tout au long du protocole. Les échantillons sont en premier broyés à l'Ultraturrax sous la hotte. Entre les différents tubes il est important de nettoyer la sonde avec de l'éthanol une fois et avec de l'eau stérile deux fois. Les tubes sont ensuite centrifugés 10 min pour récupérer le surnageant qui contient les ARN alors que le culot (un peu noir), contient les débris cellulaires. Ensuite les ARN sont extraits par l'ajout de chloroforme (200 µl pour 1 ml de Trizol) qui est suivi d'une centrifugation (15 min à 12000 g et à 4°C). Le mélange est alors divisé en 3 parties, une phase inférieure organique, une phase supérieure aqueuse contenant les ARN et une interface contenant les protéines. Les ARN sont récupérés en prélevant la phase supérieure. Afin de faire précipiter les ARN, de l'isopropanol est ajouté (500 µl pour 1 ml de Trizol) suivi de 10 min de centrifugation à 12000 g à 4°C. L'isopropanol est éliminé avec un système d'aspiration, et les ARN sont lavés avec de l'éthanol à 70 % (1 ml pour 1 ml de Trizol) qui est éliminé par 5 min de centrifugation à 7500 g et à 4°C. Les ARN sont séchés puis solubilisés dans de l'eau stérile dont la quantité ajoutée varie selon la taille du culot pour obtenir une concentration finale



[Figure 15](#) : Gel d'électrophorèse d'ARN

	1	2	3	4
A	1 RT1	1 PCR1	9 RT1	9 PCR1
B	1 RT2	1 PCR2	9 RT2	9 PCR2
C	2 RT1	2 PCR1	10 RT1	10 PCR1
D	2 RT2	2 PCR2	10 RT2	10 PCR2
E	3 RT1	3 PCR1	11 RT1	11 PCR1
F	3 RT2	3 PCR2	11 RT2	11 PCR2
G	4 RT1	4 PCR1	12 RT1	12 PCR1
H	4 RT2	4 PCR2	12 RT2	12 PCR2
I	5 RT1	5 PCR1	13 RT1	13 PCR1
J	5 RT2	5 PCR2	13 RT2	13 PCR2
K	6 RT1	6 PCR1	14 RT1	14 PCR1
L	6 RT2	6 PCR2	14 RT2	14 PCR2
M	7 RT1	7 PCR1	15 RT1	15 PCR1
N	7 RT2	7 PCR2	15 RT2	15 PCR2
O	8 RT1	8 PCR1	16 RT1	16 PCR1
P	8 RT2	8 PCR2	16 RT2	16 PCR2

A photograph of a 96-well microplate. The wells are arranged in a grid labeled A through P on the left and 1 through 11 on the top. The wells contain a dark liquid, likely a PCR reaction mixture.

[Figure 16](#) : Partie du plan de plaque pour les échantillons 1 à 16

comprise entre 1 et 2 µg par µl. Les ARN sont conservés à -20°C pour une utilisation relativement rapide et à -80°C pour une conservation à long terme.

c – Evaluation de la qualité et de la concentration des ARN totaux

Par spectrophotométrie avec l'aide d'un Nanodrop on peut mesurer la concentration d'ARN ainsi que quantifier la pureté des échantillons. C'est un appareil qui effectue une première mesure d'absorbance à 260 nm, la longueur d'onde à laquelle les acides nucléiques présentent le maximum d'absorption. Sachant qu'une unité d'absorbance correspond à 40 µg/ml d'ARN, l'appareil détermine la concentration en ARN totaux de l'échantillon. Il réalise ensuite une deuxième mesure à 280 nm qui représente le maximum d'absorption des acides aminés aromatiques présents dans les protéines. Le rapport 260/280 est alors calculé par l'appareil afin de déterminer la pureté des ARN. Elle est considérée comme satisfaisante si le rapport est compris entre 1,6 et 2, traduisant une faible contamination en protéines des ARN. Un autre rapport est calculé avec le Nanodrop, il s'agit du rapport 260/230 qui permet de déterminer s'il y a eu contamination par des restes de phénol qui peuvent fausser les valeurs de la concentration en ARN.

La qualité des ARN extraits est vérifiée également par une électrophorèse sur gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium (BET), par l'observation sous UV de bandes correspondantes à l'ARN ribosomal 28S et 18S. Le BET est un agent intercalant qui s'insère entre les bases de l'ARN et qui fluoresce sous UV (Figure 15).

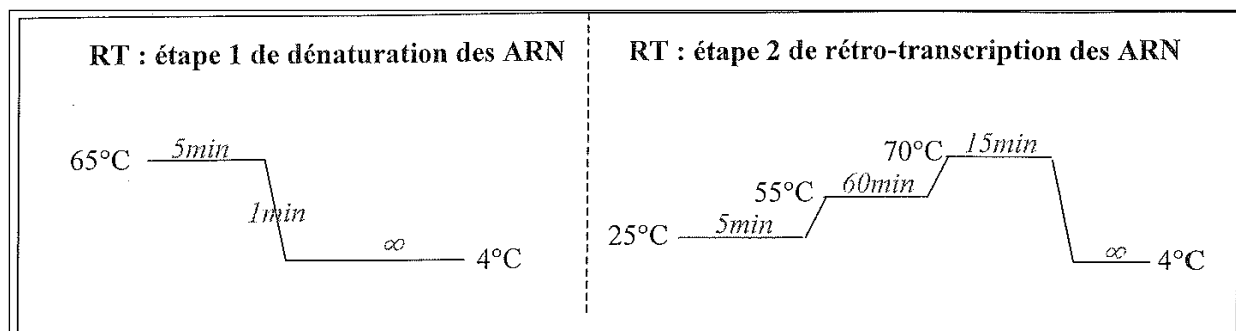
d – Transcription inverse des ARN totaux

La rétro-transcription (RT) permet de synthétiser des ADNc à partir d'ARN totaux grâce à l'enzyme transcriptase inverse qui est une ADN polymérase-ARN dépendante. Cette enzyme, la Superscript III d'Invitrogen rétro-transcrit tous les ARN à partir de polynucléotides et d'amorces aléatoires. La réaction se fait dans un thermocycler Roche, en deux étapes, une de dénaturation et une de rétro-transcription.

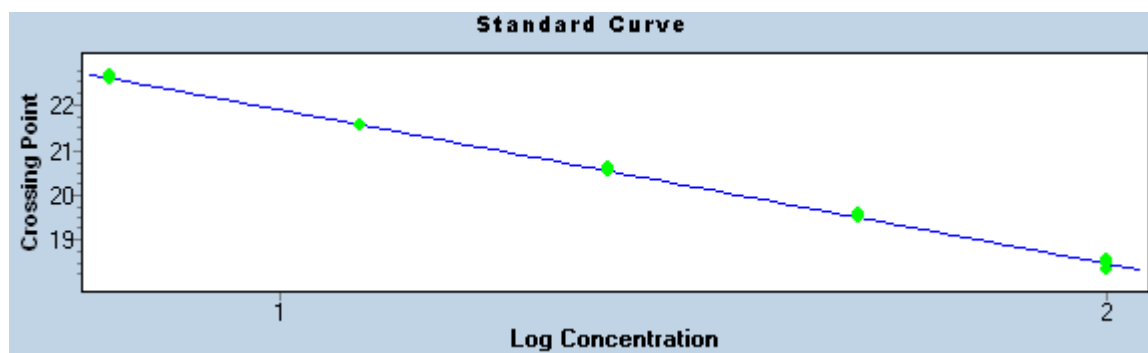
Première étape de dénaturation :

Comme la rétrotranscription est réalisée sur 1 µg d'ARN, le volume prélevé est calculé de façon à obtenir 1 µg d'ARN par puits. Dans mon cas j'ai dû préalablement réaliser une dilution pour tous mes échantillons car leur concentration en ARN était trop élevée et donc le volume à prélever trop faible (compris entre 0,5 et 1,5 µl). Cette concentration est due au volume réduit d'eau stérile rajouté à la fin de l'étape d'extraction.

Le volume d'ARN est ensuite déposé dans les puits d'une plaque 384 puits suivant le plan de plaque défini au préalable (Figure 16). Au volume d'ARN est ajouté de l'eau stérile pour arriver à un volume total de 21 µl avec l'aide d'une pipette multicanaux. Des contrôles sont effectués en réalisant des blancs RT et ADN. Le blanc RT permet de vérifier l'absence de contamination des différentes solutions utilisées, il ne contient donc pas d'ARN mais



[Figure 17](#) : Etapes et températures de la rétrotranscription



[Figure 18](#) : Droite étalon obtenue par la gamme de dilutions

seulement de l'eau et le blanc ADN permet de vérifier l'absence de contamination par de l'ADN génomique, il est représentatif de tous les échantillons. Il est réalisé en mélangeant 2 µl de chaque échantillon pour ensuite en prélever 1 µg et lui ajouter de l'eau à la place de l'enzyme Superscript III.

A ces volumes est ajouté, 4 µl du mix 1 avec l'aide d'une multipipette. Le mix 1 est un mélange d'amorces qui servent de point d'encrage et de démarrage pour la synthèse nucléique, ce sont des random primers qui se fixent aléatoirement sur l'ARN et de dNTP pour synthétiser les acides nucléiques. Les 4 µl du mix 1 sont multipliés par 1,1 fois le nombre d'échantillons afin de pouvoir pipeter les volumes nécessaires pour remplir la plaque. La plaque est ensuite fermée à l'aide d'un autocollant pour éviter toute évaporation avant d'être centrifugée quelques secondes à 3000 g et introduite dans le thermocycler pour le premier cycle. La dénaturation s'effectue à 65°C pendant 5 min avant de refroidir rapidement les échantillons à 4°C ([Figure 17](#)).

Deuxième étape de rétro-transcription :

La moitié du volume des puits RT est déposé dans les duplicats RT. A ces volumes réactionnels, sont ajoutés tous les composants de la rétro-transcription nécessaires à une réaction. Il s'agit d'eau, de tampon 5X, de DTT qui est un agent réducteur évitant la formation de ponts disulfures intra et intermoléculaires, de Rnase-out qui est un inhibiteur de ribonucléases protégeant ainsi l'ARN de dégradations et de Superscript III qui est l'enzyme transcriptase inverse. La plaque est ensuite fermée avec un autocollant, centrifugée et introduite dans le thermocycler. Les échantillons sont chauffés pour permettre la réaction, pendant 5 min, à 55°C pendant 1 h et à 70°C pendant 15 min ([Figure 17](#)). A la fin les échantillons qui sont sous forme d'ADNc sont plus stables et peuvent être conservés 10 jours à 4°C et 48 h s'ils sont dilués. Comme ils ne s'utilisent pas purs pour la PCR, ils sont dilués au quarantième ou cinquantième et la plaque d'ADNc purs est conservée à -20°C.

e – Amplification par PCR en temps réel

La réaction d'amplification par PCR se déroule en présence des ADNc issus de la RT mélangés à un mix PCR. Le mix est composé d'un couple d'amorces (amorce forward et reverse) spécifiques du gène à amplifier, de dNTP et d'une enzyme polymérase qui synthétise de l'ADN à partir d'ADNc. A ce mélange, est ajouté un marqueur d'amplification, le SYBR Green qui en se liant à l'ADN double brin émet une quantité de fluorescence directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifiée.

En premier, on réalise une gamme étalon pour estimer l'efficacité de la réaction. Théoriquement à chaque cycle la quantité d'ADN est doublée, l'efficacité est alors de 2 mais jusqu'à 1,6 l'efficacité est jugée acceptable (80 à 100%). On effectue une dilution en série à partir d'un pool de tous les échantillons de la plaque des ADNc dilués au dixième. Les dilutions sont choisies de façon à ce que les échantillons se situent en milieu de gamme. Ici les ADNc sont dilués au 10^{ème}, 20^{ème}, 40^{ème}, 80^{ème} et 160^{ème}. Les valeurs obtenues après la réaction permettent de définir une droite dont la pente donne l'efficacité de la réaction ([Figure 18](#)). Cette gamme est déposée en triple dans les puits de la plaque diluée au 40^{ème}.

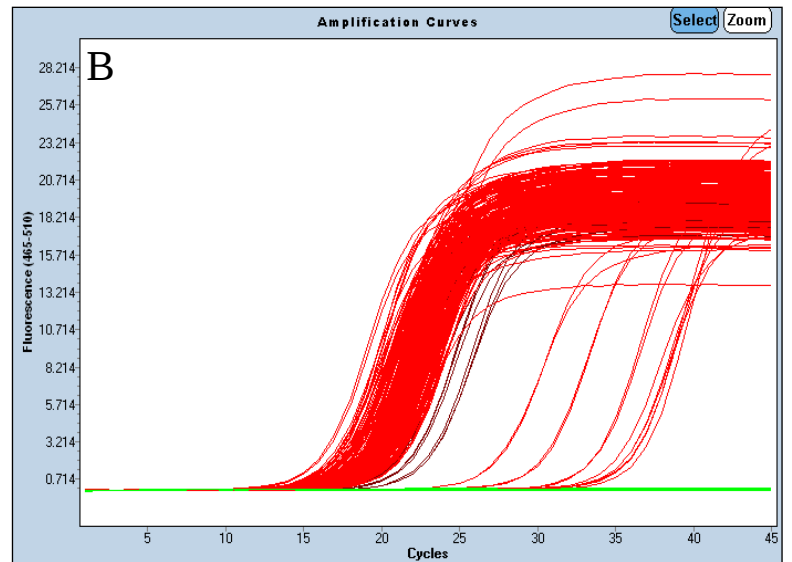
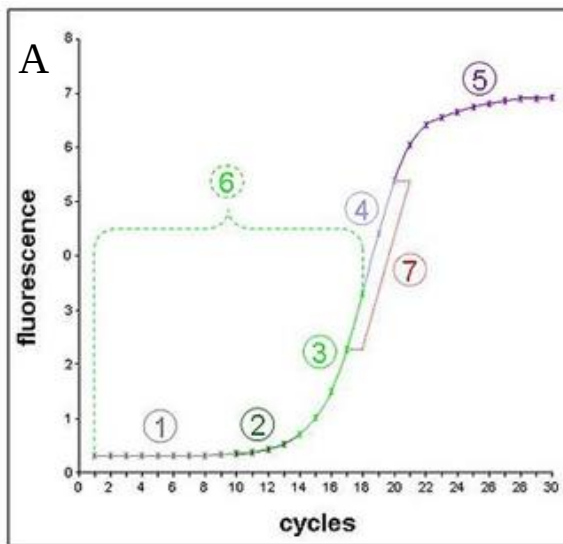


Figure 19 : Cinétique d'amplification de l'ADN par PCR en temps réel.
A : Profil type d'amplification, B : Exemple d'amplification extrait de l'étude

- 1) Bruit de fond
- 2) Phase biaisée par le fruit de fond
- 3) Phase exponentielle exploitable
- 4) Zone où la polymérase devient un facteur limitant
- 5) Phase d'amortissement et plateau de la cinétique

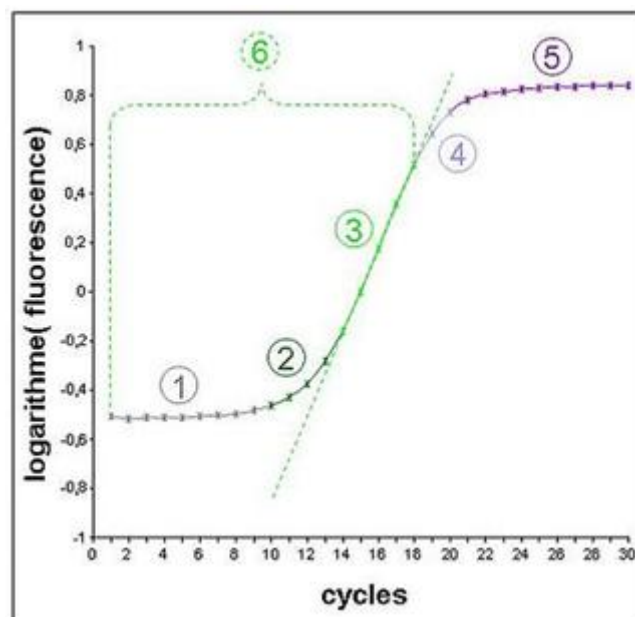


Figure 20 : Cinétique d'amplification convertie en logarithme décimal

Le premier gène amplifié par PCR est un gène de référence qui est un gène dont l'expression est constante quelles que soient les conditions expérimentales. Il permet de faire une comparaison entre les gènes cibles en réduisant les biais dus à des variations dans la quantité et la qualité des échantillons et dans les erreurs de manipulation (extraction, pipetage). Sur une plaque 384 puits sont déposés 2 µl des ADNc de la RT en duplicat. Les 4 puits sont donc remplis, la RT1 et RT2 en duplicat sur la seconde colonne. Le mix PCR est alors ajouté dans tous les puits. Il est composé des 2 amorces, de l'enzyme, d'un tampon contenant le cofacteur et des dNTP et d'eau. Après avoir été recouverte d'un plastique transparent et centrifugée, la plaque est insérée dans le thermocycler pour la réaction d'amplification pour PCR.

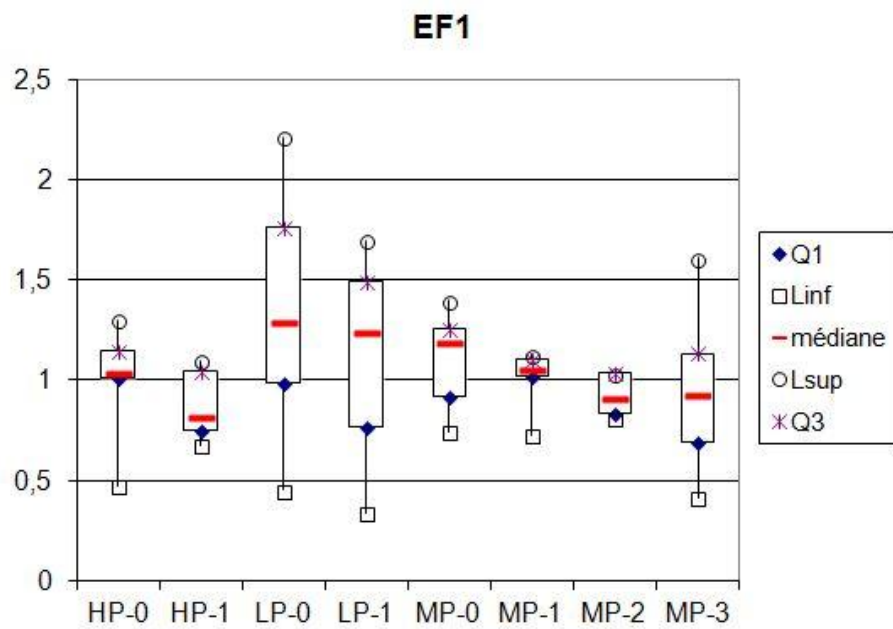
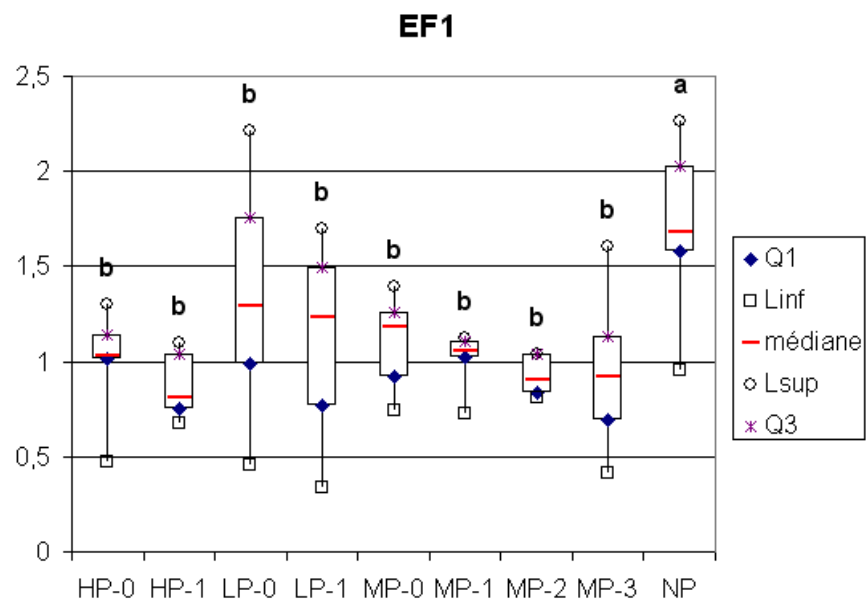
La technique de la PCR permet d'amplifier les séquences d'ADN par répétition de réactions d'élongation en présence d'amorces nucléotidiques spécifiques et d'une ADN polymérase. Le principe de l'amplification repose sur la répétition de trois phases :

- La dénaturation des deux brins d'ADN à température élevée (environ 95°C) afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténares.
- L'hybridation d'amorces oligonucléotidiques complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible (la température est alors ramenée à une valeur comprise entre 40°C et 65°C afin de permettre une bonne fixation des amorces).
- La réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable à partir des amorces, réalisé à température optimale de 72°C.

Les produits de ce premier cycle sont ensuite dénaturés par la chaleur. Les amorces sont à nouveau hybridées avec les brins d'ADN provenant du premier cycle d'amplification, chaque brin servant de matrice à la polymérase. A chaque cycle le nombre de copies du fragment d'ADN est théoriquement doublé.

Cette relation n'est applicable que dans la phase exponentielle, c'est-à-dire en début de réaction, à la sortie du « bruit de fond » lorsque l'émission de fluorescence est considérée comme un signal. Le nombre de cycles nécessaires pour avoir un signal est appelé Ct (cycle threshold) et correspond à l'intersection entre la courbe d'amplification et le seuil de sortie bruit de fond ([Figure 19](#)). La zone de la cinétique en phase exponentielle et mesurable sans biais correspond à la zone 3 de la [Figure 17](#). Lorsque les valeurs sont converties en logarithme décimal, la zone en phase exponentielle devient un segment de droite ([Figure 20](#)). Lors de cette phase, la quantité d'ADN synthétisée est proportionnelle à la quantité d'ADN initiale et les quantités de réactifs ne sont pas limitantes. Une valeur de Ct élevée signifie qu'il a fallu un grand nombre de cycles pour obtenir un signal et donc que la quantité d'ADNc présente au départ était faible.

Au final, chaque échantillon se retrouve en quatre exemplaires avec quatre données, deux RT avec pour chacun un double de PCR. La différence de Ct entre les deux RT doit être inférieure à 1 Ct et celle entre les doubles de PCR doit être inférieure à 0,5 Ct. Dans ce cas, la reproductibilité de l'expérimentation est jugée satisfaisante et c'est la moyenne des 4 valeurs qui constitue la valeur de Ct de l'échantillon.



[Figure 21](#) : Boîtes de dispersion du gène de référence avec et sans le régime NP

f – Traitement statistique des résultats PCR

Après avoir recueilli toutes les valeurs de Ct, le ratio R de chaque échantillon est calculé à partir de la valeur de l'efficacité E du gène cible et la différence de Ct entre le lot témoin constitué par la moyenne des Ct du lot témoin MP-1 et la valeur Ct de l'échantillon.

$$R = E_{\text{cible}}^{(\Delta \text{ Ct (témoin} - \text{traité)})}$$

Les tests de comparaison en statistique réalisés sur le logiciel SigmaStat permettent de déterminer si la différence d'expression des gènes entre les 9 régimes est significative ou non. Tout d'abord, il faut réaliser le test de Bartlett pour comparer les variances entre les 9 régimes. Ce test nous permet de savoir s'il y a homogénéité ou non des variances et donc de savoir s'il faut par la suite utiliser des tests paramétriques ou non paramétriques pour comparer les moyennes. Ici, le test rejette l'hypothèse d'une homogénéité de variances, ce qui signifie que les données ne suivent pas une loi normale et que les moyennes doivent être comparées par un test non paramétrique. Comme ce sont des données non appariées (9 groupes avec des individus tous différents), le test à utiliser est le test de Kruskal-Wallis. La p-value de ce test nous indique si l'hypothèse d'une absence de différence significative est rejetée ou non. Lorsqu'elle est supérieure au risque lié à la probabilité de la décision (α) l'hypothèse est acceptée ce qui signifie que la différence d'expression des gènes entre les 9 groupes n'est pas significative. Et quand elle est inférieure à α cela signifie que les groupes sont différents. Par la suite il faut réaliser un test de comparaison multiple pour repérer quels régimes sont différents des autres avec le test de Tukey.

Le premier gène testé est le gène de référence à partir des valeurs de R de ce gène. Le gène de référence est un gène qui n'est normalement pas influençable par les différents régimes alimentaires et donc qui a son niveau d'expression non significativement différent d'un groupe à l'autre. Comme les tests ont relevé une différence significative entre les échantillons du groupe NP et les autres, ce régime alimentaire a été retiré de l'analyse statistique. Finalement le test de comparaison sur les 8 régimes n'a pas relevé de différence significative et ce gène de référence a été validé pour normaliser les R de tous les gènes cibles suivant la formule :

$$R_{\text{normalisé}} = E_{\text{cible}}^{(\Delta \text{ Ct (témoin} - \text{traité)})_{\text{cible}}} / E_{\text{référence}}^{(\Delta \text{ Ct (témoin} - \text{traité)})_{\text{référence}}}$$

De plus, une boîte de dispersion a été réalisée pour donner une idée de distribution et pour repérer les valeurs aberrantes ([Figure 21](#)). Pour les gènes cibles, les tests se réalisent avec les valeurs de $R_{\text{normalisé}}$ qui correspondent au ratio du niveau d'expression de l'échantillon traité (R) sur le niveau d'expression du gène de référence.

Tableau III : Pourcentage de protéines, méthionine et cystéine dans l'aliment

Régimes	LP-0	LP-1	HP-0	HP-1	MP-0	MP-1	MP-2	MP-3
Pourcentage en protéine de l'aliment	24,08	24,02	48,66	48,41	37,91	38,04	38,24	38,33
Pourcentage en méthionine de l'aliment	0,36	0,54	0,71	1,07	0,53	0,82	0,55	1,25
Pourcentage en cystéine de l'aliment	0,26	0,3	0,52	0,59	0,37	0,42	0,47	0,47

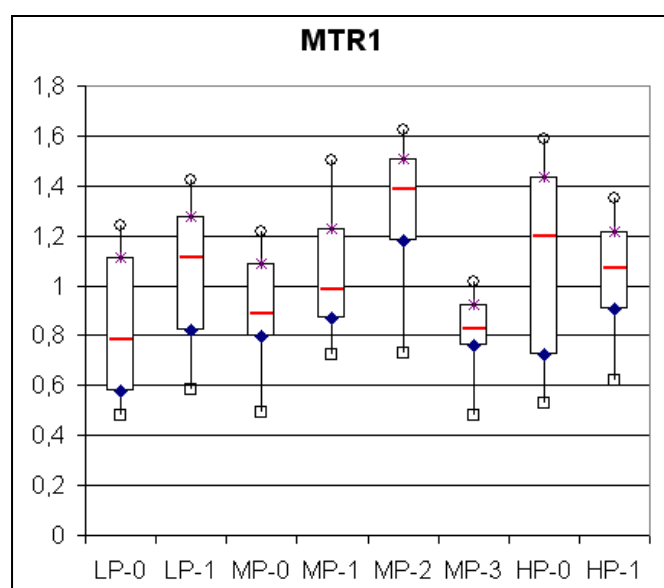


Figure 22 : Boîte de dispersion de MTR1

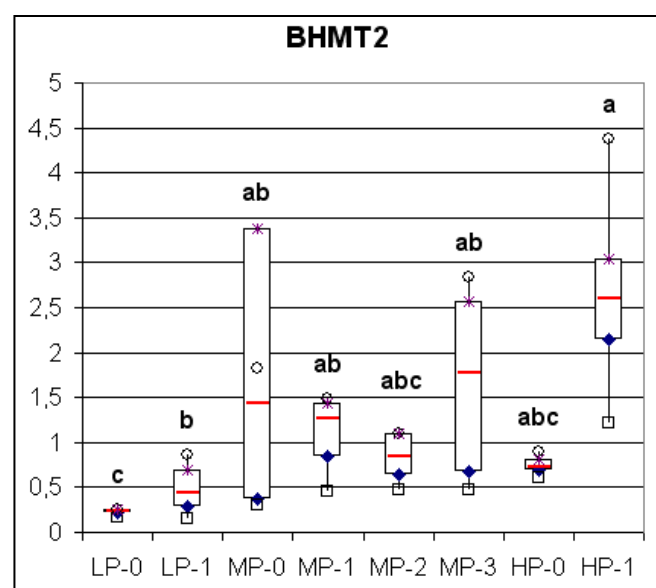


Figure 23 : Boîte de dispersion de BHMT2

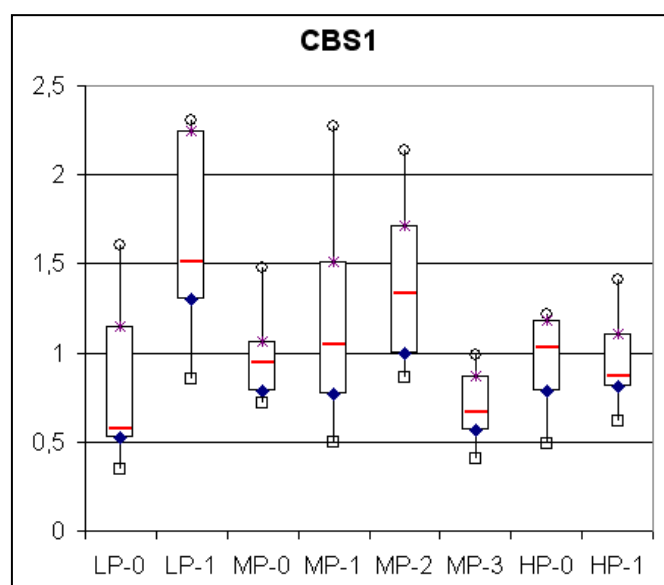


Figure 24 : Boîte de dispersion de CBS1

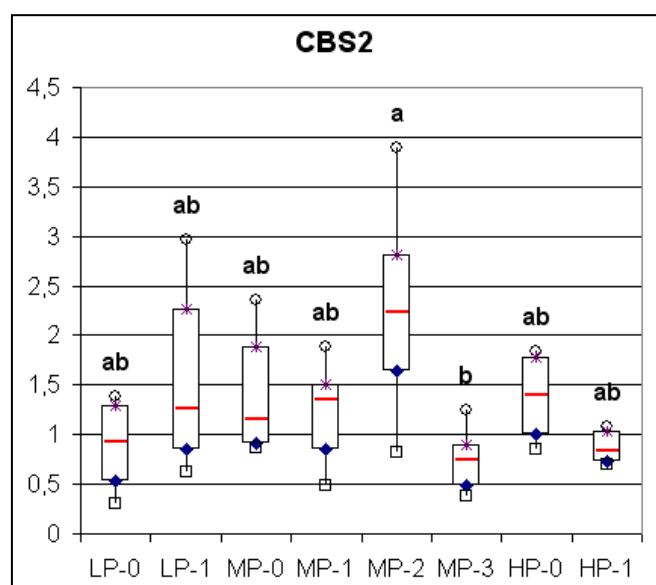


Figure 25 : Boîte de dispersion de CBS2

III – RESULTATS ET DISCUSSION

A – Niveaux d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de la méthionine

Au centre du métabolisme de la méthionine en glutathion, il y a l'homocystéine qui peut prendre deux voies en fonction des besoins et des apports en méthionine et cystéine (Guelzim, 2011).

Deux enzymes peuvent catalyser la voie de l'homocystéine vers la méthionine, la betaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT2) a montré des différences significatives, mais cela n'a pas été le cas pour la méthionine synthase (MTR) (Figure 22). L'étude statistique a montré que l'expression de BHMT2 était significativement différente entre 3 régimes, LP-0, LP-1 et HP-0 (Figure 23). Ces résultats suggèrent que son expression peut être influencée par l'apport en protéines. Les différences d'expression se retrouvent dans les régimes extrêmes, quand la teneur en protéines est faible (LP) et quand elle est élevée (HP). BHMT2 est 5,6 fois plus exprimée dans les régimes HP que dans les régimes LP. Le régime intermédiaire au niveau des protéines (MP) n'est pas significativement différent par rapport au deux autres types de régimes et son niveau d'expression se retrouve entre ceux des régimes HP et LP. Une différence liée au niveau en méthionine est également observable. Deux régimes avec les mêmes apports en protéines sont significativement différents. Il s'agit de LP-1 qui contient 0,54 % de méthionine dans l'aliment et de LP-0 avec 0,36 % de méthionine. Le gène est 2 fois moins exprimé quand il y a une carence en méthionine. Cette différence, même si elle est non significative est retrouvée également au niveau des régimes HP avec le gène BHMT2 qui est 2,4 fois moins exprimé pour HP-0 que pour HP-1. D'après ces résultats il semblerait que la carence en méthionine et en protéines inhiberait l'expression de BHMT2, l'enzyme qui catalyse la formation de méthionine à partir d'homocystéine. Des résultats inverses ont été retrouvés dans le foie de poulet et de rat où une carence en méthionine a conduit à une augmentation de l'expression des ARNm et de l'activité de l'enzyme BHMT (Emmert *et al.*, 1996 ; Park et Garrow, 1999). Cependant, d'après ces auteurs, cette augmentation d'expression est observée uniquement si la carence en méthionine est réalisée avec des régimes riches en donneurs de groupements méthyl tels que la choline ou la bétaine. Les régimes utilisés chez la truite ne sont peut-être pas suffisamment riches en donneurs de groupements méthyl pour observer un effet similaire. D'autre part, des différences entre espèces ont été mises en évidence. En effet, chez le porc la régulation de l'expression de la BHMT ne s'effectue pas au niveau hépatique comme le rat et le poulet mais au niveau rénal (Emmert *et al.*, 1998). De plus, lorsque les régimes contiennent des teneurs équivalentes en choline, une augmentation de la teneur en méthionine dans les aliments pour rats s'accompagne d'une augmentation de l'activité enzymatique de la BHMT (Slow et Garrow, 2006), ce qui irait dans le sens des résultats obtenus chez la truite.

La deuxième voie de l'homocystéine est celle qui est catalysée par la cystathionine- β -synthase (CBS) et qui donne de la cystathionine. Les résultats statistiques du gène codant pour la CBS1 n'ont pas révélé de différences significatives entre les 8 régimes (Figure 24). Cependant en ce qui concerne le niveau d'expression de la CBS2, les régimes MP-2 et MP-3 sont significativement différents entre eux (Figure 25). Cela ne semble pas être le taux de protéines qui crée des différences car les deux régimes contiennent 38% de protéines.

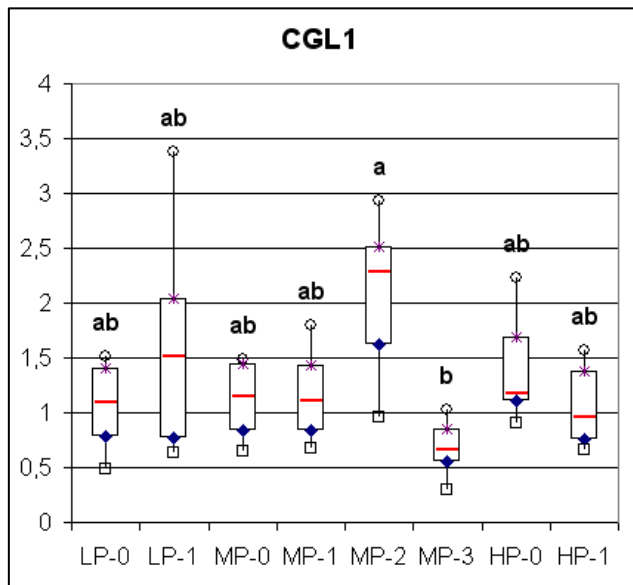


Figure 26 : Boite de dispersion de CGL1

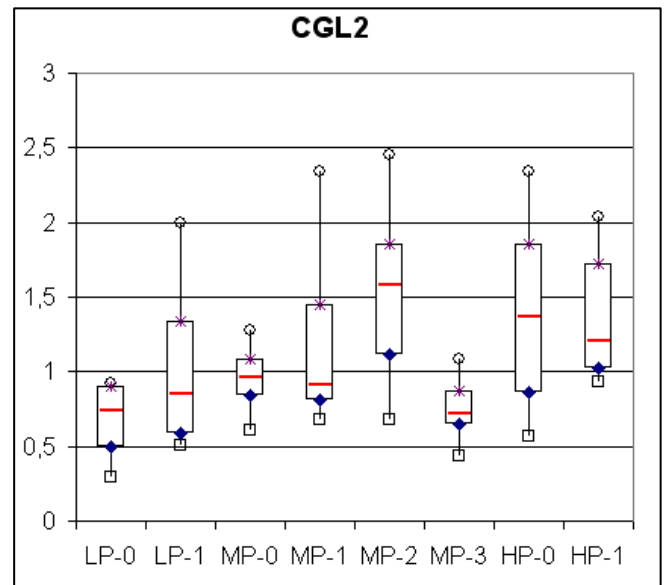


Figure 27 : Boite de dispersion de CGL2

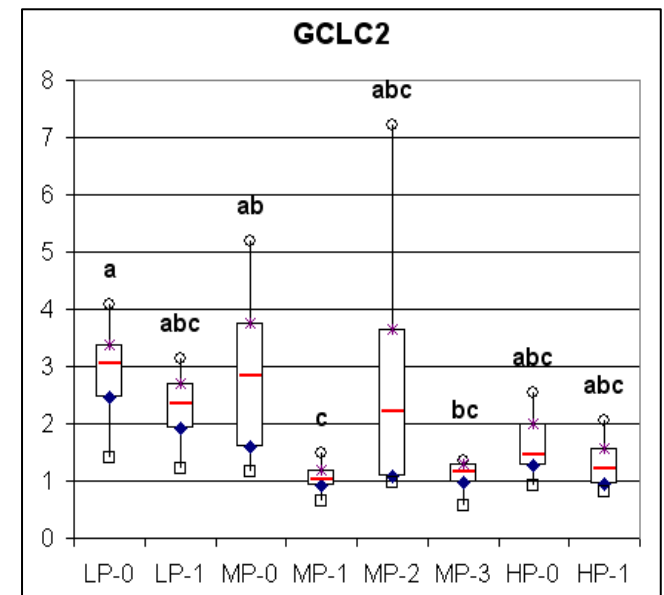
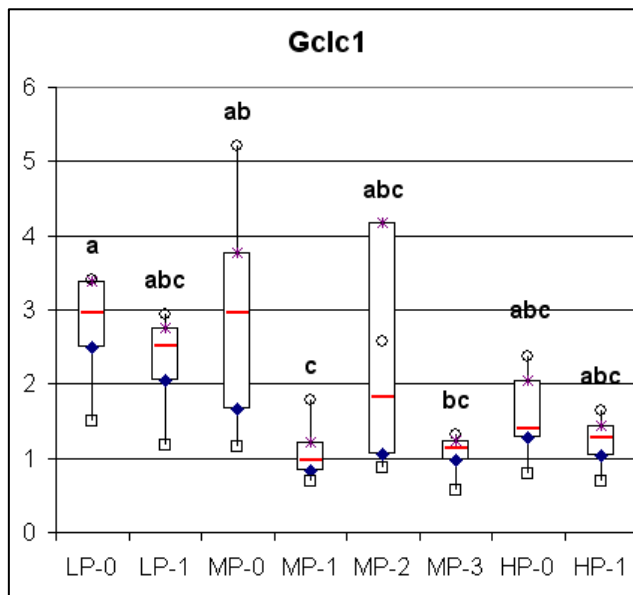


Figure 28 : Boite de dispersion de Gclc1 et GclC2

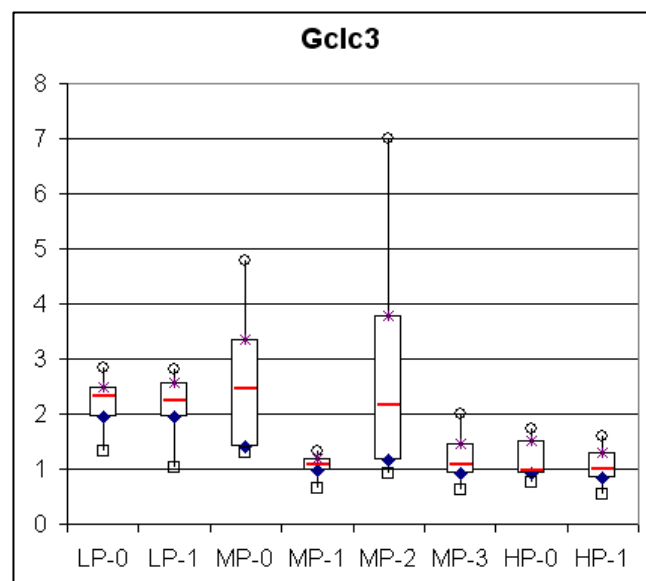
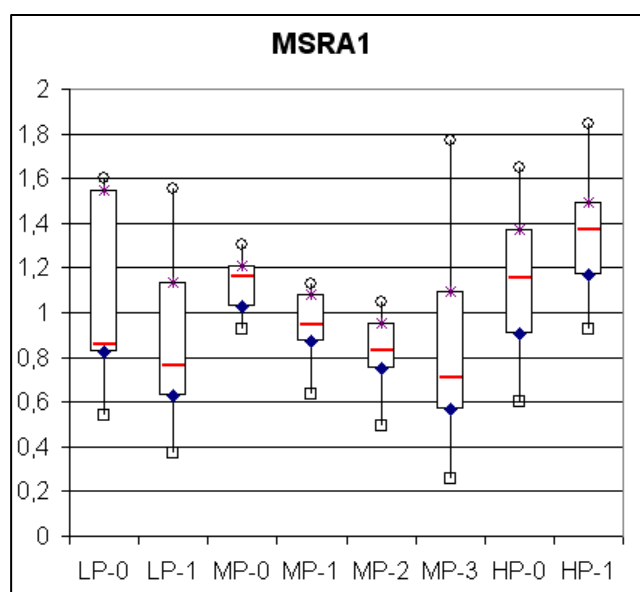
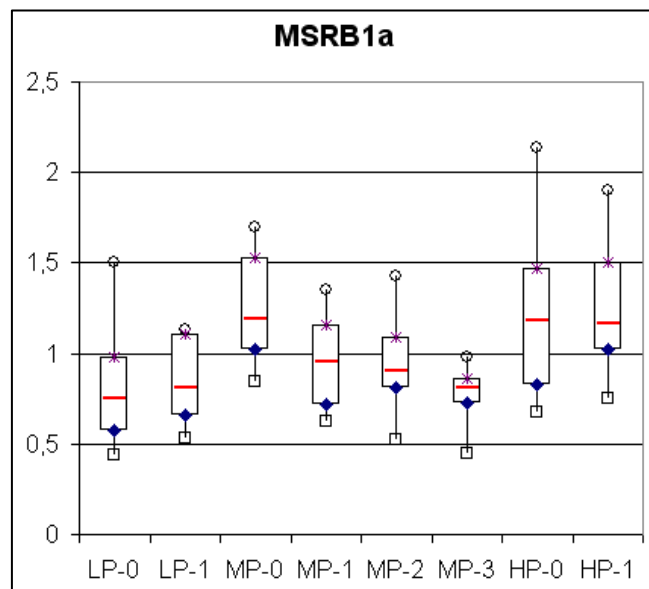
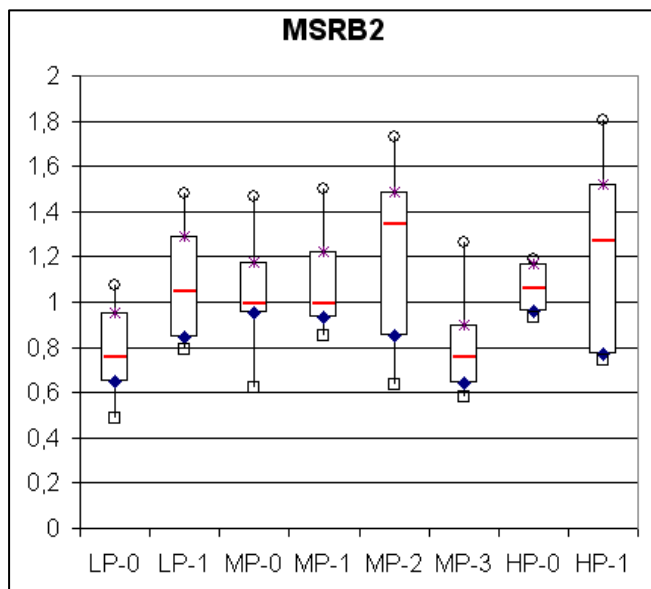


Figure 29 : Boite de dispersion de Gclc3

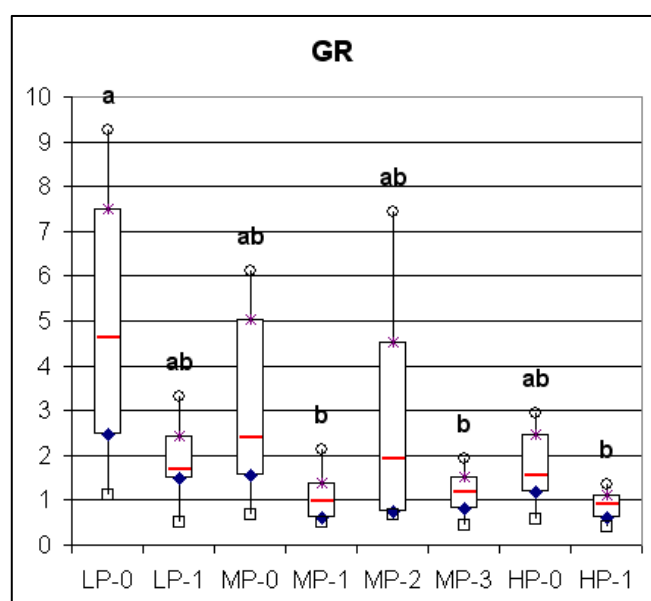
Cependant, la proportion de méthionine est de 0,55% pour MP-2 et de 1,25% pour MP-3. Elle joue donc sur l'expression puisque CBS2 est 2,8 fois moins exprimée dans le lot MP-3 que dans le lot MP-2. Le taux élevé de méthionine inhibe l'expression du gène CBS2. Cependant les mêmes taux de protéines et de méthionine sont retrouvés dans les régimes MP-0 et MP-2, alors que seul MP-2 est différent de MP-3. Cette différence peut être due à l'apport en cystéine qui est plus important pour MP-2. La forte teneur en cystéine semble augmenter l'expression de CBS2 dans le foie de truite alors qu'un tel effet n'a pas été décrit chez les mammifères où une régulation allostérique de l'activité enzymatique de la CBS par le S-adénosylméthionine a été rapportée ainsi qu'une augmentation de l'activité dans des conditions oxydantes (Banerjee *et al.*, 2003). Cependant, des études chez la souris ont montré qu'une carence en méthionine induisait une diminution de l'activité enzymatique de la CBS ainsi qu'une diminution de la quantité de protéine mais que celle-ci n'était pas associée à une diminution de l'expression du gène codant pour la CBS suggérant une régulation post-transcriptionnelle (Tang *et al.*, 2010). Il serait intéressant de mesurer l'activité de la CBS dans le foie de nos échantillons de truite afin d'étudier les relations entre le niveau d'activité enzymatique et le niveau d'expression des gènes dans les différents lots de poissons afin de préciser l'effet de la teneur en méthionine et cystéine sur cette enzyme.

Une fois la cystathionine formée, c'est la cystathionine- γ -lyase (GCL) qui va agir pour former la cystéine. Sur deux gènes étudiés, seul GCL1 a révélé des différences significatives en fonction des régimes (Figure 26). Néanmoins les résultats des ratios pour GCL2 montrent que les niveaux d'expression suivent les mêmes tendances que pour GCL1 (Figure 27). Les régimes significativement différents sont les mêmes que pour CBS2, il s'agit de MP-2 et MP-3 avec une expression également 2,8 fois plus importante pour le lot MP-2. La différence se fait donc aussi au niveau de l'apport en excès de méthionine et cystéine. Nos résultats suggèrent que l'expression du gène de la GCL est activée par la cystéine alors que des études chez les mammifères ont montré que l'activité de la GCL était inhibée par de fortes teneurs en cystéine (Bronowicka-Adamska *et al.*, 2011). De même que pour la CBS, il serait donc intéressant de mesurer l'activité enzymatique de la GCL dans le foie de nos échantillons de truite afin de préciser les relations entre le niveau d'activité enzymatique et le niveau d'expression des gènes dans les différents lots de poissons afin de préciser l'effet de la teneur en cystéine sur cette enzyme.

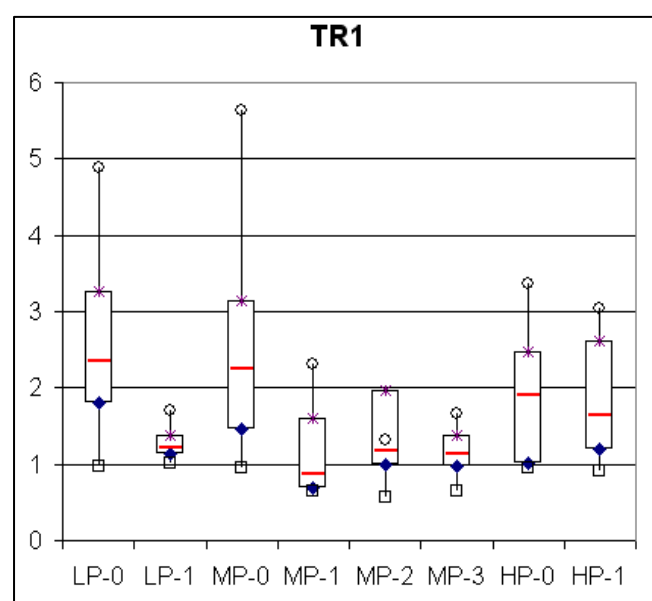
La γ -glutamylcystéine ligase catalyse les premières étapes de la synthèse du glutathion à partir de cystéine, de glutamate et de glycine. Seuls les gènes codant pour l'unité catalytique de la γ -glutamylcystéine ligase 1 (Gclc1) et 2 (Gclc2) ont des niveaux d'expression significativement différents selon les régimes (Figure 28). Les résultats statistiques n'ont pas montré de différence significative pour Gclc3 mais les niveaux d'expression suivent aussi les mêmes tendances (Figure 29). Pour Gclc1 et Gclc2, les régimes différents sont LP-0, MP-0, MP-1 et MP-3. L'apport en protéines semble avoir un effet sur l'expression de Gclc1 et Gclc2 puisque leur expression est 2,8 à 3 fois plus importante pour LP-0 que pour MP-1. Moins il y a de protéines dans l'aliment et plus l'expression des 2 gènes est forte. La quantité de méthionine semble aussi avoir un effet, son augmentation inhiberait l'expression de Gclc. Parmi les régimes MP, la différence significative entre MP-0 et MP-1 semble être due à la proportion de méthionine, qui est de 0,53% pour MP-0 et de 0,82% pour MP-1. Un niveau plus fort en méthionine inhiberait l'expression car le niveau d'expression est 3,3 fois moins élevé pour MP-1 que pour MP-0. De plus ce même type de résultat est retrouvé entre LP-0 et MP-1 dont l'expression est 2,8 fois plus importante pour LP-0 avec des proportions de méthionine, respectivement de 0,36% et 0,82%.



[Figure 30](#) : Boîtes de dispersions des gènes MSR



[Figure 31](#) : Boîte de dispersion de GR



[Figure 32](#) : Boîte de dispersion de TR1

Chez les mammifères, l'expression de la γ -glutamylcystéine ligase est induite par un stress oxydant (Lu, 2009). Il serait donc intéressant d'évaluer le niveau de peroxydation dans nos échantillons afin de confirmer le rôle antioxydant de la méthionine suggéré par le niveau d'expression de ce gène plus élevé dans le foie des truites nourries avec des régimes carencés en méthionine.

En ce qui concerne le rôle de la méthionine en tant qu'antioxydant, 3 gènes de méthionine sulfoxide réductase ont été analysés par traitement statistique. Dans les trois cas, aucune différence significative n'a été observée (Figure 30). Les différences d'apport en protéines et méthionine ne semblent donc pas jouer sur son rôle de régénération des protéines oxydées.

B – Niveaux d'expression des gènes impliqués dans les défenses antioxydantes

Lors d'un stress oxydant, le glutathion protège les autres composés sensibles à l'oxydation en s'oxydant à leur place et c'est par l'action de la glutathion réductase (GR) qu'il retrouve sa forme réduite. Les tests statistiques ont révélé des différences significatives d'expression de la GR entre les différents régimes (Figure 31). Le groupe LP-0 est significativement différent de MP-1, MP-3 et HP-1. Les niveaux d'expression semblent être influencés par la proportion de protéines dans l'aliment. Plus les proportions sont élevées et moins le gène est exprimé puisque dans les groupes LP l'expression est 2 fois plus importante que dans les groupes HP. Le niveau de méthionine paraît également responsable des différences d'expression. LP-0 est 3 fois plus exprimé que LP-1, MP-0 est 5 fois plus exprimé que MP-1 et HP-0 est 2,6 fois plus exprimé que HP-1. Il semblerait qu'une carence en méthionine provoquerait un stress oxydant et donc augmenterait l'expression de la glutathion réductase. Ces résultats couplés à ceux de la γ -glutamylcystéine ligase semblent confirmer le rôle antioxydant de la méthionine chez la truite en accord avec les données obtenues chez les mammifères (Baszczyk *et al.*, 2008).

Les thiorédoxines sont également des antioxydants qui agissent comme le glutathion, elles protègent les composés en s'oxydant. Elles sont régénérées par l'action de la thiorédoxine réductase. Les tests statistiques n'ont montré aucune différence significative entre les lots, elle semblerait ne pas être influencée par les niveaux en protéines et méthionine de l'aliment dans le foie de truite (Figure 32).

En plus des molécules antioxydantes, des systèmes enzymatiques permettent la destruction de certains composés et la protection des cellules contre l'oxydation. Parmi les glutathion peroxydases étudiées, les niveaux d'expression de la glutathion peroxydase membranaire (GPX4) dans les 8 régimes n'ont pas révélé de différence significative (Figure 33). Cependant, l'étude de la glutathion peroxydase cytosolique (GPX1) a montré une différence significative entre les régimes LP-1 et MP-0 (Figure 34). Le gène est 4 fois plus exprimé dans le lot MP-0. C'est l'apport en protéines qui semble avoir une influence puisqu'entre ces deux groupes, seul le niveau en protéines est différent.

La glutathion-S-transférase qui est impliquée dans la détoxification de la cellule a son expression qui est aussi significativement différente selon les régimes. Ces différences sont retrouvées entre les régimes LP-0 et MP-2 et les régimes MP-1 et HP-1 (Figure 35).

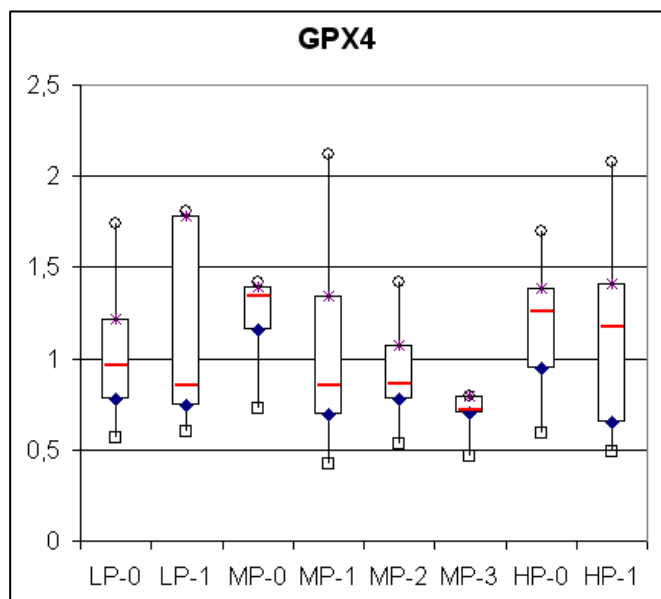


Figure 33 : Boite de dispersion de GPX4

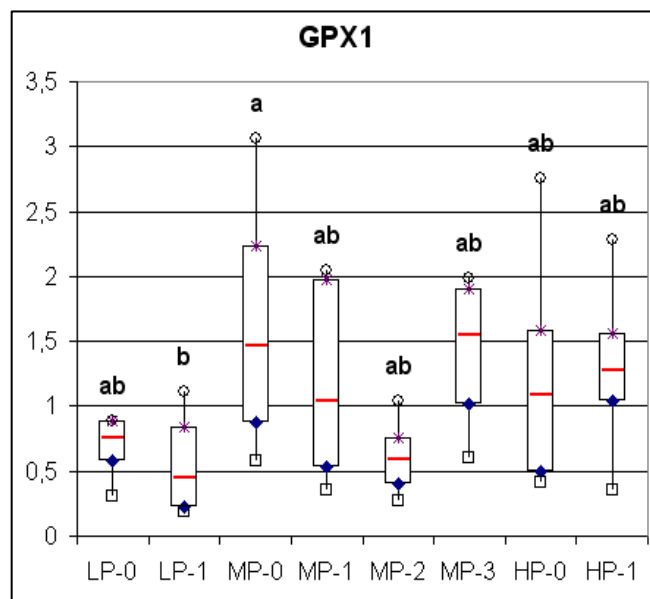


Figure 34 : Boite de dispersion de GPX1

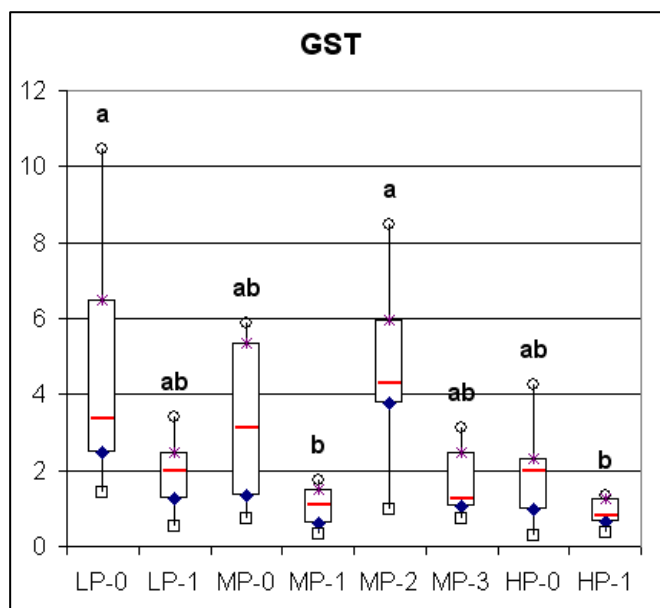


Figure 35 : Boite de dispersion de GST

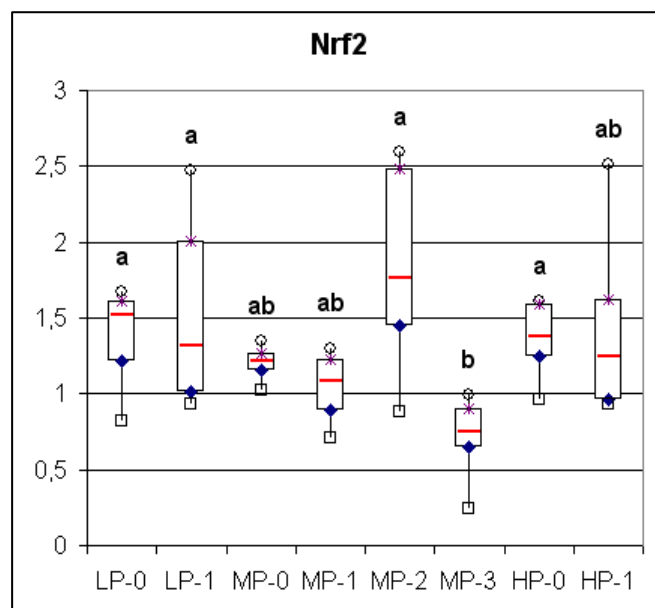


Figure 36 : Boite de dispersion de Nrf2

Le niveau en protéines ne paraît pas influencer l'expression de GST puisque des groupes ayant les mêmes apports en protéine sont significativement différents. Dans le régime LP-0 qui contient 0,36% de méthionine le gène s'exprime 3,4 fois plus que dans le régime HP-1 qui contient 1,25% de méthionine. L'influence de la méthionine apparaît aussi entre le régime MP-1 et MP-2 où l'expression est 3,4 fois plus importante pour MP-2. Le gène codant pour la GST semblerait être plus exprimé lors d'une carence en méthionine, en accord avec les résultats obtenus sur les hépatocytes de rat par Tsai *et al.* (2010).

En fin le facteur de transcription Nrf2 est aussi influencé par les types de régimes alimentaires puisque les tests statistiques sur son niveau d'expression ont révélé des différences significatives entre les 4 régimes LP-0, LP-1, MP-2, MP-0 et le régime MP-3 ([Figure 36](#)). Le niveau d'expression est 2,7 fois plus important pour MP-2 que MP-3. L'excès en méthionine semble donc inhiber l'expression du facteur de transcription puisque MP-3 contient 1,25% de méthionine contre 0,55% pour MP-2 et comme pour la GR et la GST, il semblerait qu'une carence en méthionine provoquerait un stress oxydant et donc augmenterait l'expression de ce facteur de transcription qui intervient dans la régulation des gènes de certaines enzymes anti-oxydantes telles que la glutathion-S-transférase et la γ -glutamylcystéine ligase (Itoh *et al.*, 2004 ; Kwak *et al.*, 2004). Ce facteur de transcription est présent sous forme inactive dans le cytoplasme lié à une protéine inhibitrice. Lors de l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, en particulier l' H_2O_2 , cette liaison est rompue et le facteur de transcription peut migrer vers le noyau pour se fixer sur l'ADN. En s'y fixant, il augmente la synthèse des enzymes anti-oxydantes ainsi que sa propre synthèse et celle de sa protéine inhibitrice Keap1.

CONCLUSION

Les mesures d'expression de gènes que j'ai réalisées pendant ces 6 semaines de manipulation en laboratoire, ont permis d'enrichir les connaissances sur les besoins nutritionnels en méthionine et son rôle sur les fonctions antioxydantes chez la truite arc-en-ciel.

Les résultats mettent en évidence l'importance de la méthionine et des protéines dans les fonctions antioxydantes puisqu'il a été observé qu'une carence en méthionine et protéines dans l'aliment induisait un stress oxydant. En effet dans les régimes carencés, l'expression des gènes codant pour les enzymes antioxydantes (glutathion réductase, glutathion peroxydase cytosolique et glutathion-S-tranférase) était plus importante. Il serait intéressant de compléter ces résultats par des mesures de peroxydation des lipides et des protéines afin de confirmer le rôle antioxydant de la méthionine chez la truite arc-en-ciel.

Cependant, l'étude du niveau d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de la méthionine en glutathion a révélé des résultats contradictoires. L'augmentation de l'apport en méthionine inhibe l'expression des gènes codants pour les enzymes catalysant la transformation de la méthionine en glutathion et augmente celle des enzymes formant de la méthionine. Cependant, l'expression d'un gène n'induit pas forcément l'activité de l'enzyme et il faudrait donc étudier également le niveau d'activité enzymatique pour préciser l'effet de la teneur en méthionine. De plus la régulation de certaines enzymes peut ne pas s'effectuer au niveau hépatique ce qui induirait des effets non observables dans les échantillons de foie. Les résultats de l'essai ont également mis en évidence que les différences d'apport en protéines et méthionine n'influençaient pas le niveau de régénération de la méthionine oxydée. Il serait donc intéressant de confirmer ces résultats par une mesure du niveau de protéines oxydées dans les échantillons.

Finalement, en plus d'être essentielle dans la croissance des truites arc-en-ciel l'apport en méthionine diminue les risques de stress oxydant et donc les risques de dégradation des protéines et des lipides. L'alimentation doit alors apporter suffisamment de protéines et de méthionine afin que la truite arc-en-ciel d'élevage garde toutes ces valeurs nutritionnelles liées à sa teneur en acides gras polyinsaturés n-3. Les aliments à base de farines et huiles végétales dont les niveaux en méthionine sont faibles doivent être supplémentés en méthionine pour diminuer les risques liés à l'oxydation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Banerjee R., Evande R., Kabil Ö., Ojha S. et Taoka S., 2003. Reaction mechanism and regulation of cystathionine β -synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, **1647**(1-2), 30-35.

Baszczyk I., Grucka-Mamczar E., Kasperczyk S. et Birkner E., 2008. Influence of fluoride on rat kidney antioxidant system: effects of methionine and vitamin E. *Biological Trace Element Research*, **121**(1), 51-59.

Bronowicka-Adamska P., Zagajewski J., Czubak J. et Wróbel M., 2011. RP-HPLC method for quantitative determination of cystathionine, cysteine and glutathione: An application for the study of the metabolism of cysteine in human brain. *Journal of Chromatography B*, **879**(21), 2005-2009.

Consalvi A., 2012. L'élevage sauvera-t-il les poissons ? *La Recherche*, **466**, 99-101.

De Franco P.-O., 2009. *Etude des glutathion S-transférases chez les algues brunes, Laminaria digitata et Ectocarpus siliculosus*. Thèse de l'Université de Rennes 1, France. 279p.

Emmert J.L., Garrow T.A. et Baker D.H., 1996. Hepatic betaine-homocysteine methyltransferase activity in the chicken is influenced by dietary intake of sulfur amino acids, choline and betaine. *The Journal of Nutrition*, **126**(8), 2050-2058.

Emmert J.L., Webel D.M., Biehl R.R., Griffiths M.A., Garrow L.S., Garrow T.A. et Baker D.H., 1998. Hepatic and renal betaine-homocysteine methyltransferase activity in pigs as affected by dietary intakes of sulfur amino acids, choline, and betaine. *Journal of Animal Science*, **76**(2), 606-610.

Feng L., Xiao W.W., Liu Y., Jiang J., Hu K., Jiang W.D., Li S.H. et Zhou X.Q., 2011. Methionine hydroxy analogue prevents oxidative damage and improves antioxidant status of intestine and hepatopancreas for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture Nutrition*, **17**(6), 595-604.

Guelzim N., 2011. *Régulation du métabolisme secondaire de l'arginine et de la cystéine par l'acide alpha-linolénique*. Thèse d'AgroParisTech, Physiologie de la nutrition et du comportement Alimentaire, France. 128p.

Guillaume J., Kaushik S., Bergot P. et Métailler R., 1999. *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés*. INRA Editions, France, 489p.

Itoh K., Tong K.I. et Yamamoto M., 2004. Molecular mechanism activating nrf2-keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radical Biology and Medicine*, **36**(10), 1208-1213.

Jalabert B. et Fostier A., 2010. *La truite arc-en-ciel : De la biologie à l'élevage*. Edition QUAE, France. 323p.

Kwak M.K., Wakabayashi N. et Kensler T.W., 2004. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **555**(1-2), 133-148.

Lu S.C., 2009. Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, **30**(1-2), 42-59.

Mariotti F., Simbelie K.L., Makarios-Lahham L., Huneau J.F., Laplaize B., Tome D. et Even P.C., 2004. Acute ingestion of dietary proteins improves post-exercise liver glutathione in rats in a dose dependent relationship with their cysteine content. *The Journal of Nutrition*, **134**(1), 128-131.

Park E.I. et Garrow T.A., 1999. Interaction between dietary methionine and methyl donor intake on rat liver betaine-homocysteine methyltransferase gene expression and organization of the human gene. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(12), 7816-7824.

Slow S. et Garrow T.A., 2006. Liver choline dehydrogenase and kidney betaine-homocysteine methyltransferase expression are not affected by methionine or choline intake in growing rats. *The Journal of Nutrition*, **136**(9), 2279-2283.

Tacon A.G.J et Metian M., 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, **285**, 146–158.

Tang B.Q., Mustafa A., Gupta S., Melnyk S., James S.J. et Kruger W.D., 2010. Methionine-deficient diet induces post-transcriptional downregulation of cystathionine beta-synthase. *Nutrition*, **26**(11-12), 1170-1175.

Tsai C.W., Lin A.H., Wang T.S., Liu K.L., Chen H.W. et Lii C.K., 2010. Methionine restriction up-regulates the expression of the pi class of glutathione S-transferase partially via the extracellular signal-regulated kinase-activator protein-1 signaling pathway initiated by glutathione depletion. *Molecular Nutrition & Food Research*, **54**(6), 841-850.

RESUME

Actuellement avec la baisse des ressources marines il est important de trouver des alternatives aux aliments d'origine marine pour l'aquaculture. La méthionine est un acide aminé essentiel pour la croissance des poissons mais aussi dans les fonctions antioxydantes en tant que précurseur du glutathion. Cependant les teneurs en méthionine sont faibles dans les aliments d'origine végétale qui sont pourtant des voies alternatives aux aliments d'origine marine. Un essai nutritionnel de 12 semaines avec 9 régimes alimentaires différents a été réalisé à l'INRA de Saint-Pée-sur-Nivelle afin de préciser les besoins nutritionnels en méthionine chez la truite arc-en-ciel juvénile. Les régimes différaient selon leurs teneurs en protéines et en méthionine (faible, importante ou intermédiaire). Pour préciser les besoins nutritionnels en méthionine et observer ses effets sur les fonctions antioxydantes, des gènes codant pour des enzymes et des facteurs de transcription ont été étudiés. Il s'agissait de gènes participant aux fonctions antioxydantes classiques et au métabolisme de la méthionine. Ils ont été amplifiés par PCR en temps réel afin de comparer leur niveau d'expression d'un régime à l'autre. Mes résultats ont permis de montrer qu'une supplémentation de l'aliment en méthionine permettait d'éviter une carence à l'origine d'un stress oxydant responsable de la dégradation des lipides et des protéines chez la truite arc-en-ciel et donc de préserver ses valeurs nutritionnelles liées à sa richesse en acides gras à chaîne longue polyinsaturée n-3.

Mots clés :

Truite, antioxydant, méthionine, protéine, glutathion, RT-PCR