

# Génomique fonctionnelle de la réactivité surrénalienne à l'ACTH chez le porc

*Dominique HAZARD (1), Laurence LIAUBET (2), Magali SANCRISTOBAL (2), Pierre MORMÈDE (1)*

*(1) INRA, UMR1286, Laboratoire PsyNuGen, 33076 Bordeaux*

*(2) INRA, UMR444, Laboratoire de Génétique Cellulaire, 31326 Castanet-Tolosan*

*pierre.mormede@bordeaux.inra.fr*

## **Génomique fonctionnelle de la réactivité surrénalienne à l'ACTH chez le porc**

De nombreuses données expérimentales montrent la participation de facteurs génétiques dans les variations interindividuelles de l'activité de l'axe corticotrope. Ces variations influencent de nombreuses caractéristiques de production ou de qualité telles que la survie du nouveau-né, la vitesse de croissance ou le niveau d'adiposité des carcasses. Notre objectif est d'identifier, par une analyse de transcriptome, des gènes candidats impliqués dans la réactivité des surrénales à l'ACTH, un des principaux mécanismes responsables des variations de sécrétion de cortisol. L'expression génique surrénalienne a été mesurée chez des porcs Large White (LW) et Meishan (MS) en situation basale et en réponse à une stimulation par l'ACTH (le niveau de sécrétion basale de cortisol et après stress, la réactivité des surrénales à l'ACTH et le niveau d'adiposité des carcasses sont supérieurs chez les MS). Le génotype et/ou le traitement à l'ACTH ont affecté l'expression de 211 gènes impliqués dans diverses fonctions cellulaires. Aucune différence d'expression des gènes de la voie de signalisation activée par l'ACTH et des gènes de la stéroïdogénèse n'a été mise en évidence dans cette étude. Cependant, la surexpression de gènes du cycle de Krebs et des gènes Star et Ldlr chez les porcs MS suggère qu'une activité plus élevée du cycle de Krebs et qu'un apport plus important de cholestérol pour la stéroïdogénèse pourraient être impliqués dans les différences de fonctionnement surrénalien. L'exploration du rôle de ces gènes permettra de mieux comprendre la relation entre l'activité de l'axe corticotrope et l'adiposité des animaux, et leur intérêt pour la sélection.

## **Functional genomics of the adrenal sensitivity to ACTH in the pig**

Variability in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity has been shown to be influenced by genetic factors and related to differences in production characteristics such as newborn survival, growth rate or body fat content. The aim of this study was to investigate molecular bases of genetic variability of the adrenal sensitivity to ACTH, a major source of variability, in Meishan (MS) and Large White (LW) pigs, MS being reported to exhibit higher basal cortisol levels, response to ACTH and fatness than LW. A pig cDNA microarray was used to identify changes in gene expression in basal conditions and in response to ACTH stimulation. Genotype and/or ACTH affected the expression of 211 genes involved in various functions. No change in the expression of known key regulator proteins of the ACTH signaling pathway (Mc2R, Pka, Erk1/2 ...) or of steroidogenic enzymes (Cyp11a1, 3, hsd ...) was found. However, Mdh2, Sdha and Suclg2 genes involved in the tricarboxylic acid (TCA) pathway, were over-expressed in MS pigs. Higher TCA cycle activity in MS compared to LW may thus result in higher steroidogenic activity and explain the typically higher cortisol secretion in MS compared to LW. Moreover, up-regulation of Star and Ldlr genes in MS and/or in response to ACTH suggests that differences in the adrenal function between MS and LW may also involve mechanisms requisite for cholesterol supply to steroidogenesis. Further investigation of these genes should help understanding better the relationship between HPA axis activity and obesity in pigs, and their interest in animal selection.

## INTRODUCTION

L'axe corticotrope (hypothalamus-hypophyse-surrénales) produit des hormones glucocorticoïdes synthétisées dans le cortex surrénalien sous l'effet de l'ACTH (adrenocorticotropique hormone) hypophysaire. Les glucocorticoïdes (cortisol chez le porc) jouent un rôle important dans les métabolismes et les réponses de stress.

De nombreuses données expérimentales montrent la participation de facteurs génétiques dans les variations interindividuelles de l'activité de base de l'axe corticotrope et de sa réponse au stress (Kirschbaum et al., 1992 ; Désautés et al., 1997). Chez le porc, ces variations interfèrent avec d'importantes caractéristiques de production ou de qualité telles que la survie du nouveau-né (Leenhouders et al., 2002), la vitesse de croissance ou le niveau d'adiposité des carcasses. Par exemple, des corrélations positives (inter- et intra-races) ont récemment été observées entre les niveaux de cortisol (en situation de base et après un stress de transport) et la teneur en gras de la carcasse, confirmant les effets métaboliques du cortisol et soulignant l'importance de l'influence des variations génétiques d'activité de l'axe corticotrope sur l'adiposité des carcasses (Foury et al., 2007). Le niveau de sécrétion de cortisol, basal et après stress, la réactivité des surrénales à l'ACTH et le niveau d'adiposité de la carcasse sont supérieurs chez les porcs Meishan comparés aux porcs Large White (Désautés et al., 1997 ; 1999). Ces deux races de porcs constituent donc un modèle pertinent pour étudier la relation entre l'activité de l'axe corticotrope et les régulations métaboliques.

La réactivité des glandes surrénales à l'ACTH est l'un des principaux mécanismes biologiques responsables des variations génétiques de la sécrétion de cortisol. Chez le porc, des différences de sécrétion de cortisol ont été mises en évidence en réponse à une stimulation par la CRH (Corticotrophin-releasing hormone) alors que les niveaux d'ACTH et le catabolisme de l'hormone ne diffèrent pas entre les individus (Zhang et al., 1990). L'intensité de la réponse à l'ACTH est corrélée négativement avec le poids des animaux et la vitesse de croissance mais ne s'accompagne pas, dans cette étude, de différence de rendement de carcasse, d'épaisseur de lard ou de pH ultime (Hennessy et Jackson, 1987). L'intensité de la réponse à l'ACTH est héritable ( $h^2 = 0,26$  ; donnée obtenue par analyse de la ressemblance entre demi-frères paternels dans 357 portées issues de 24 verrats ; D.P. Hennessy, communication personnelle). L'objectif du présent travail était donc d'étudier les mécanismes moléculaires responsables de la différence de fonctionnement des glandes surrénales entre les porcs Meishan et Large White qui diffèrent pour la production de cortisol et la réponse à l'ACTH (Désautés et al., 1997 ; 1999).

La réponse à une stimulation aiguë par l'ACTH implique une synthèse protéique *de novo* (Stocco et al., 2005). La protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein), impliquée dans le transport du cholestérol de la membrane mitochondriale externe vers la membrane interne, est considérée comme l'enzyme limitante de la stéroïdogénèse (Clark et al., 1994 ; Stocco et Clark, 1996). Des changements dans l'expression du gène Star en réponse à une stimulation aiguë par l'ACTH ont été observés chez le rat dès 30 min et le niveau d'expression de ce gène était maximal entre 1h et 3h (Lehoux et al., 1998). Par ailleurs, les niveaux de cortisol induits par une injection d'ACTH chez les porcs Meishan et Large White sont maximaux après 1h de stimu-

lation (Hennessy et al., 1988 ; Désautés et al., 1999). Considérant ces résultats, nous avons fait l'hypothèse que des mécanismes de régulation transcriptionnelle pouvaient être impliqués dans la réponse aiguë à l'ACTH. Notre objectif était donc d'identifier des gènes candidats impliqués dans les différences de réactivité des surrénales à l'ACTH chez le porc par les techniques d'analyse d'expression génique différentielle avec des micro-réseaux d'ADNc génériques de porcs (AGENAE, ~9000 gènes).

## 1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1.1. Animaux et échantillons

Des porcelets Large White et Meishan âgés de 7 semaines ont été utilisés dans cette étude. L'élevage des animaux et les expérimentations se sont déroulés dans l'unité expérimentale GEPA (Génétique Expérimentale en Productions Animales) du Magneraud (INRA, Surgères). Les animaux sont élevés en case collective sous une photopériode naturelle (10h de lumière, 14h d'obscurité) et nourris *ad libitum*. Des groupes expérimentaux de 6 porcs sont constitués de façon aléatoire une semaine avant l'expérimentation.

Les porcelets sont soit non traités, soit injectés au niveau du muscle du cou avec 250 µg d'ACTH 1-24 (Synacthène immédiat). Les porcelets sont assommés puis saignés immédiatement après leur capture dans la case d'élevage (animaux témoins) ou 1h après l'injection d'ACTH. Du sang est prélevé au moment de l'abattage en vue du dosage de cortisol ainsi que les glandes surrénales pour l'analyse du transcriptome.

### 1.2. Dosage du cortisol

Le taux de cortisol plasmatique total est mesuré par dosage radioimmunologique comme décrit par Désautés et al. (1997). Après transformation logarithmique, les données sont soumises à une analyse de variance pour tester l'effet du génotype, l'effet du traitement et leur interaction.

### 1.3. Extraction des ARN et analyse du transcriptome

#### 1.3.1. Extraction des ARN

Les ARN ont été extraits à partir des surrénales par la méthode Trizol-chloroforme (TRIzol, Invitrogen Life Technologies) puis purifiés sur colonne (RNeasy MinElute kit, Qiagen). Au cours de la purification, l'ADN est digéré (RNase-free DNase set, Qiagen). L'ARN est quantifié (Nanodrop) et sa qualité contrôlée à l'aide du Bioanalyser Agilent (RNA 6000 Nano LabChip, Agilent Technologies).

#### 1.3.2. Analyse du transcriptome

L'expression des gènes a été analysée à l'aide de micro-réseaux d'ADNc sur membrane de nylon, développés par le Centre de Ressources Biologiques GADIE (Génomique des Animaux Domestiques d'Intérêt Économique, INRA, Jouy-en-Josas). Ils sont constitués de produits PCR amplifiés à partir de 8960 clones d'ADNc. Ces clones d'ADNc sont issus de banques normalisées multi-tissus incluant des surrénales collectées chez des porcs en condition basale et en situation de stress.

**Tableau 1 - Exemple de quelques gènes différentiellement exprimés selon le génotype et/ou le traitement avec l'ACTH choisies pour illustrer quelques unes des fonctions cellulaires affectées par le génotype et/ou le traitement.**

Gène	Nom	Fonction	p-value (ANOVA)			Expression relative				
			géno- type	traite- ment	inter- action	génotype : MS/LW		traitement : ACTH/control		
						contrôle	ACTH	LW	MS	
Gènes influencés par le génotype										
RNF2	ring finger protein 2	Transcription	***	NS	*	3,5	2,5	1,2	-1,2	
Snf1lk	SNF1-like kinase	Activité protéine kinase	***	NS	NS	1,8	1,8	1,2	1,3	
GPRC5B	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	Transduction de signal	***	NS	NS	1,6	1,5	1,1	-1,0	
LDHD	lactate dehydrogenase D	Biosynthèse d'ATP	***	NS	NS	1,6	1,6	1,1	1,1	
PPP1R1A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	Inhibiteur de phosphatase	***	NS	NS	1,6	1,4	-1,0	-1,2	
MDH2	<b>malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)</b>	<b>Cycle de Krebs</b>	***	NS	NS	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>	<b>1,0</b>	<b>1,1</b>	
SUCLG2	<b>succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit</b>	<b>Cycle de Krebs</b>	***	NS	NS	<b>1,4</b>	<b>1,3</b>	<b>1,0</b>	<b>-1,1</b>	
PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	Activité protéine phosphatase	***	NS	*	1,4	2,2	-1,0	1,5	
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	Métabolisme super oxide	***	NS	NS	1,4	1,5	-1,1	-1,0	
CITED1	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1	Transcription	***	NS	NS	-1,8	-2,0	1,1	-1,0	
C1QA	complement component 1, q subcomponent, A chain	Signalisation cellulaire	***	NS	NS	-2,1	-1,5	-1,1	1,2	
Gènes influencés par l'ACTH										
BAG3	BCL2-associated athanogene 3	Croissance/maintien cellulaire	NS	***	**	1,2	-1,3	3,0	2,0	
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	Régulation de protéine kinase	NS	***	NS	1,1	-1,1	2,1	1,7	
ID3	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	Transcription	NS	***	NS	-1,1	-1,2	2,0	1,9	
TOMM20	translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast)	Transport de protéine (mb ext mito)	NS	***	NS	1,2	1,1	1,5	1,4	
NFE2L2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	Transcription	NS	***	NS	1,1	1,0	-1,3	-1,3	
UNC84B	unc-84 homolog B (C. elegans)	Croissance/maintien cellulaire	NS	***	NS	1,2	-1,0	-1,3	-1,6	
WASF2	WAS protein family, member 2	Transduction de signal (G-protein)	NS	***	NS	-1,1	1,0	-1,3	-1,3	
STAT5A	signal transducer and activator of transcription 5A	Transcription	NS	***	NS	-1,1	1,0	-1,4	-1,3	
Gènes influencés par le génotype et l'ACTH										
CREM	cAMP responsive element modulator	Transcription	*	***	NS	1,7	1,1	4,4	3,0	
CD83	CD83 molecule	Transduction de signal	***	***	NS	1,9	1,5	3,2	2,6	
EIF1B	eukaryotic translation initiation factor 1B	Traduction	***	***	NS	1,5	1,9	2,5	3,3	
LDLR	<b>low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)</b>	<b>Transport du cholestérol</b>	**	***	NS	<b>1,6</b>	<b>1,3</b>	<b>2,3</b>	<b>1,8</b>	
SDHA	<b>succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)</b>	<b>Cycle de Krebs</b>	***	*	NS	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>-1,0</b>	<b>-1,1</b>	
ANPEP	alanyl (membrane) aminopeptidase (microsomal, CD13, p150)	Développement/morphogénèse	***	**	NS	2,1	1,9	-1,1	-1,2	
ECH1	enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	Métabolisme des acides gras	***	**	NS	1,4	1,4	-1,2	-1,2	
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	Régulation de protéine kinase	***	***	NS	-1,3	-1,3	2,4	2,4	
NONO	non-POU domain containing, octamer-binding	Transcription	***	**	NS	-1,4	-1,3	-1,2	-1,1	
A2M	alpha-2-macroglobulin	Transport de protéine	***	**	NS	-1,8	-1,7	-1,2	-1,1	
EPHX1	epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)	Protéolyse	***	*	NS	-1,8	-1,6	-1,2	-1,1	
ACOX1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	Métabolisme des acides gras	***	***	NS	-1,7	-1,5	-1,2	-1,1	
DAB2	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	Croissance/maintien cellulaire	*	***	NS	-1,1	-1,3	-1,4	-1,7	
PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	Transduction de signal	***	***	NS	-1,6	-1,6	-1,4	-1,5	

NS : Non Significatif,  $p > 0,05$ ; \* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,01$ ; \*\*\* :  $p < 0,001$ )

Les micro-réseaux sont tout d'abord hybridés avec une séquence oligonucléotidique radioactive ( $^{32}\text{P}$ ) commune à tous les produits PCR afin de contrôler la qualité des dépôts et la quantité d'ADN présent sur les membranes de nylon. Les micro-réseaux sont ensuite hybridés avec une sonde complexe radioactive synthétisée par rétro-transcription de 5  $\mu\text{g}$  d'ARN total (Superscript II RNAse H- reverse transcriptase, Invitrogen). Les hybridations se déroulent pendant 24h à 68°C. Après lavage, les micro-réseaux sont exposés durant 6 à 12h contre un écran radiosensible. Les écrans sont scannés à l'aide d'un phosphoimageur (FUJI BAS 5000, résolution 25  $\mu\text{m}$ ) puis les signaux sont quantifiés avec le logiciel AGScan (Cathelin et al., 2007).

### 1.3.3. Normalisation et analyse statistique des données de transcriptome

Avant l'analyse statistique, les données sont transformées en logarithme et normalisées. Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R (<http://www.cran.r-project.org>). Un modèle linéaire d'analyse de variance est utilisé pour tester l'effet du génotype, l'effet du traitement et leur interaction. La quantité d'ADN présent sur la membrane pour chaque clone est incluse dans le modèle comme covariable. Le taux de faux positifs est contrôlé selon la procédure proposée par Benjamini-Hochberg (1995).

### 1.4. Annotation fonctionnelle

Les transcrits différemment exprimés selon le génotype et/ou le traitement à l'ACTH sont annotés pour leur fonction en utilisant la base de données Gene Ontology (AmiGO, <http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>) et le logiciel EASE (Expression Analysis Systematic Explorer, DAVID bioinformatics database, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/ease/ease.jsp>).

### 1.5. Analyse de l'expression des gènes par PCR quantitative en temps réel

Les différences d'expression mises en évidence par l'analyse de transcriptome ont été vérifiées par PCR quantitative en temps réel. Onze gènes très significativement affectés par le génotype et/ou l'ACTH ont été sélectionnés (*Rnf2*, *Anpep*, *Gadd45b*, *Eif1b*, *Crem*, *A2m*, *Ckb*, *Dab2*, *Ldlr*, *Fxc1*, *Stai*). Huit autres gènes trouvés non différentiels (*Scarb1*, *Sqle*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*, *Cyp21*, *Cyp11b*) ou absents des micro-réseaux (*Mc2r*, *Bzrp*) mais fonctionnellement intéressants pour notre question ont également été sélectionnés pour mesurer leur expression par PCR en temps réel.

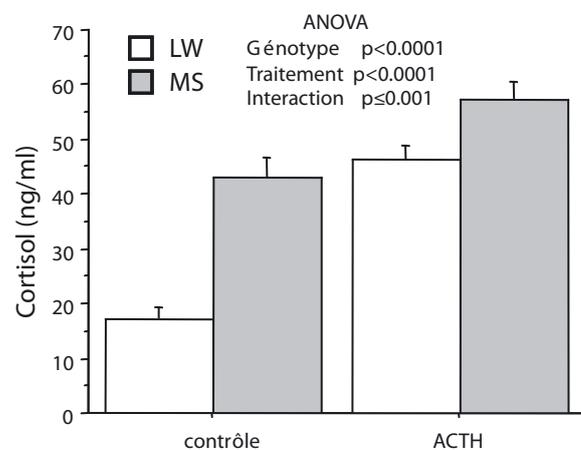
Pour chaque échantillon, 4  $\mu\text{g}$  d'ARN ont été rétro-transcrits. L'ADNc est dilué au 1/100 et 5  $\mu\text{l}$  de produits PCR dilués sont utilisés pour les réactions de PCR. Les amorces sont dessinées à partir des séquences nucléotidiques disponibles pour ces gènes dans Genbank et en utilisant le logiciel Primer Express (PE Applied Biosystems). Afin de valider les amorces choisies, l'efficacité de la PCR est calculée pour chaque couple d'amorces avec 5 points de gamme de dilution de l'échantillon calibrateur. La structure exons-introns de chaque gène porcin est déduite par comparaison avec le gène orthologue humain et les deux amorces d'un même couple sont choisies dans deux exons différents. L'expression relative de chaque gène est calculée par la méthode des  $\Delta\Delta\text{Ct}$  en utilisant les niveaux d'expression du gène de la transkétolase comme contrôle interne. L'expression relative

des gènes est soumise à une analyse de variance pour tester les effets du génotype, du traitement et de leur interaction.

## 2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Taux de cortisol

Les taux de cortisol mesurés dans cette étude (Figure 1) confirment des résultats antérieurs indiquant que les taux de base en cortisol et les taux de cortisol induits par l'ACTH sont supérieurs chez les porcs Meishan comparés aux porcs Large White (Désautés et al., 1997 ; 1999). La dose d'ACTH utilisée dans cette étude a déjà été décrite pour induire une réponse maximale en cortisol en moins d'une heure (Hennessy et al., 1988 ; Désautés et al., 1999) et devrait donc produire des effets maximums sur la stéroïdogénèse surrénalienne.



**Figure 1-** Teneur moyenne (+ écart type) en cortisol plasmatique (ng/ml) chez des porcelets Large White (LW) et Meishan (MS), sans (contrôle) ou 1h après injection d'ACTH (250  $\mu\text{g}$  par porc) (n = 6 par traitement)

### 2.2. Expression différentielle des gènes

Dans nos conditions expérimentales, 40% des gènes présents sur les micro-réseaux sont exprimés dans la glande surrénale. Parmi ces gènes, 211 sont différemment exprimés selon le génotype et/ou le traitement à l'ACTH en limitant le taux de faux positifs à 5% (Tableau 1, la liste complète des gènes différemment exprimés n'est pas présentée). Pour la majorité des gènes, les différences d'expression sont inférieures à 2 fois ; il existe toutefois quelques gènes pour lesquels les différences d'expression peuvent atteindre 3,5 fois (Tableau 1). Ces différences ont été confirmées par PCR en temps réel (Tableau 2, 11 premiers gènes listés). Nos résultats montrent que le type génétique et l'ACTH induiraient des changements d'expression des gènes surrénaliens, ces changements étant de faible amplitude mais vraisemblablement de grande importance physiologique (Hughes et al., 2000).

### 2.3. Stéroïdogénèse et voie de signalisation induite par l'ACTH

L'expression des gènes de la stéroïdogénèse (*Cyp11a1*, *Cyp17*, *3 $\beta$ hsd*, *Cyp21*, *Cyp11b*) ne varie pas en réponse à l'ACTH (Tableau 2). Ces résultats sont cohérents avec de précédents travaux montrant qu'une stimulation aiguë par l'ACTH a peu d'effet sur l'expression des gènes de la stéroïdogénèse alors que

**Tableau 2 - Analyse de l'expression des gènes par PCR en temps réel et comparaison avec les résultats de transcriptome**

Gène (symbole)	Micro-réseaux							PCR en temps Réel						
	p-value (ANOVA)			Expression relative				p-value (ANOVA)			Expression relative			
				génotype : MS/LW	traitement : ACTH/control	génotype :	traitement :				génotype :	traitement :	génotype : MS/LW	traitement : ACTH/control
génotype	traitement	interaction	contrôle	ACTH	LW	MS	génotype	traitement	interaction	contrôle	ACTH	LW	MS	
Rnf2	***	NS	*	3,5	2,5	1,2	-1,2	NS	NS	NS	1,1	-1,0	1,1	1,0
Anpep	***	**	NS	2,1	1,9	-1,1	-1,2	***	*	NS	3,9	3,0	-1,0	-1,4
Gadd45b	***	***	NS	-1,3	-1,3	2,4	2,4	*	***	NS	-1,5	-1,5	2,6	2,6
Eif1b	***	***	NS	1,5	1,9	2,5	3,3	**	***	*	1,4	1,9	2,9	4,1
Crem	*	***	NS	1,7	1,1	4,4	3,0	NS	***	NS	1,6	1,3	6,4	5,4
A2m	***	**	NS	-1,8	-1,7	-1,2	-1,1	***	NS	NS	-2,1	-2,1	-1,3	-1,2
Ckb	***	*	NS	2,1	1,9	1,3	1,2	**	NS	NS	2,3	2,1	1,3	1,2
Dab2	*	***	NS	-1,1	-1,3	-1,4	-1,7	NS	*	NS	-1,3	-1,2	-1,8	-1,6
Ldlr	*	**	*	1,5	1,0	1,6	1,1	NS	***	NS	1,4	1,2	2,2	2,0
Fxc1	***	*	NS	1,2	1,3	1,1	1,1	NS	NS	NS	-1,1	-1,4	1,6	1,2
Star	***	NS	NS	1,6	1,2	1,4	1,1	*	NS	NS	1,4	1,1	1,3	1,0
Mc2r	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NS	NS	NS	-1,1	1,1	1,2	1,4
Scarb1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1,1	-1,0	1,2	1,1
Sqle	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-1,1	-1,5	1,3	-1,0
Cyp11a1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1,2	-1,1	1,4	1,0
Hsd3b1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-1,1	-1,1	-1,3	-1,3
Cyp21	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	-1,2	-1,5	1,1	-1,1
Cyp11b	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1,3	1,3	1,2	1,2

(ND : non déterminé ; NS : non significatif,  $p > 0,05$  ; \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ )

des traitements à long terme avec l'ACTH induisent de grandes différences d'expression (Lehoux et al., 1998 ; Le Roy et al., 2000 ; Sewer et Waterman, 2003). De façon intéressante, aucune différence d'expression des gènes de la stéroïdogénèse n'a été mise en évidence entre les porcs Meishan et Large White (Tableau 2). Par contre, l'expression de plusieurs gènes du cycle de Krebs (*Mdh2*, *Sdha* et *Suclg2*) est supérieure chez les porcs Meishan (Tableau 1). L'activité catalytique principale du cycle de Krebs est de fournir des composés réduits pour le fonctionnement des complexes respiratoires (McCammon et al., 2003), par exemple pour l'hydroxylation des stéroïdes (Dragan et al., 2005). De plus, le cycle de Krebs contribue à la synthèse de hème (McCammon et al., 2003) nécessaire à l'activité des enzymes stéroïdogéniques du type cytochrome P450 (Dragan et al., 2006). Par ailleurs, le gène *Alas1*, codant l'enzyme limitante de la synthèse de hème (De Matteis, 1988), est également surexprimé chez les porcs Meishan. Ces mécanismes pourraient donc aboutir à une activité stéroïdogénique supérieure chez les porcs Meishan comparés aux Large White en fournissant plus de composés réduits et de hèmes aux enzymes de la stéroïdogénèse, sans variation de l'expression de ces derniers. Cette hypothèse est renforcée par une étude qui a montré que la disponibilité des hèmes était limitante pour la synthèse surrénalienne de corticostéroïdes (Martini et al., 1997) et par d'autres travaux plus récents montrant qu'une stimulation aiguë de la production de corticostéroïdes par l'ACTH est augmentée quand l'activité hème oxygénase est inhibée (Grion et al., 2007).

Les résultats d'études *in vitro* indiquent que l'ACTH est un régulateur positif de l'expression du gène de son récepteur (Mc2r) (Mountjoy et al., 1994 ; Le Roy et al., 2000 ; Carey et al., 2006). Dans notre étude, ni l'ACTH ni le génotype des animaux n'ont d'effet sur l'expression du gène Mc2r (Tableau 2). De façon similaire, aucune différence d'expression des gènes codant des protéines clés de la voie de signalisation induite par l'ACTH n'a été mise en évidence dans cette étude. Par contre, le gène *Crem*, un facteur de transcription AMPc-dépendant impliqué dans l'activation de l'expression de gènes de la stéroïdogénèse (Manna et al., 2002), est surexprimé en réponse à l'ACTH et chez les porcs Meishan (Tableau 1). Or, la stimulation des cellules surrénaliennes par l'ACTH induit une activation de l'adénylate cyclase qui conduit à une augmentation des niveaux intracellulaires en AMPc (Stocco et al., 2005). Ainsi, l'expression du gène *Crem* supérieure chez les porcs Meishan et fortement augmentée en réponse à l'ACTH pourrait conduire à une plus grande transduction du signal induit par l'ACTH.

#### 2.4. Synthèse et transport de cholestérol

Un apport constant de cholestérol est nécessaire pour la stéroïdogénèse surrénalienne. Aucune différence d'expression des gènes clés impliqués dans la synthèse endogène de cholestérol (*Sqle*, *Hmgcr*) n'a été mise en évidence dans notre étude alors que ces gènes ont été rapportés pour être régulés par l'ACTH (Lee et

Widmaier, 2005 ; Schimmer et al., 2006). L'apport de cholestérol peut aussi se faire par endocytose via les récepteurs aux LDL (Low Density Lipoprotein) ou la capture sélective via les récepteurs SRB1 (Scavenger Receptor class B, type 1) (Kraemer, 2007). De façon intéressante, le gène *Ldlr* est surexprimé chez les porcs Meishan comparés aux porcs Large White et en réponse à l'ACTH (Tableau 2). Les changements d'expression du gène *Ldlr* en réponse à l'ACTH trouvés dans notre étude sont en accord avec une surexpression de ce gène trouvée *in vitro* dans des cellules surrénaliennes murines traitées avec l'ACTH (Schimmer et al., 2006). En revanche, aucune différence d'expression du gène *Scarb1* n'a été trouvée dans notre étude alors que ce gène est surexprimé dans des cellules surrénaliennes murines traitées avec l'ACTH (Schimmer et al., 2006). Nos résultats indiquent que la capture de cholestérol via les récepteurs aux LDL serait la voie privilégiée d'apport de cholestérol pour la stéroïdogénèse surrénalienne chez le porc et pourrait être impliquée dans la régulation de la réponse aiguë à l'ACTH. Par ailleurs, notre étude révèle une surexpression du gène *Star* chez les porcs Meishan comparés aux porcs Large White (Tableau 2). Ce résultat suggère qu'un transport plus élevé de cholestérol à l'intérieur des mitochondries pourrait aussi contribuer à une synthèse supérieure de corticostéroïdes chez les porcs Meishan comparés aux porcs Large White. En revanche, la stimulation aiguë avec l'ACTH n'a pas d'effet sur l'expression de *Star* dans notre étude alors que des études antérieures conduites chez le rat ont montré que l'ACTH peut induire l'expression du gène *Star* dès 30 min (Lehoux et al., 1998). Toutefois, la phosphorylation de protéine StAR pré-existante en quantité supérieure chez les porcs Meishan, mécanisme impliqué dans la réponse aiguë à l'ACTH

(Miller et Strauss, 1999), pourrait être impliquée dans la réponse en cortisol supérieure chez les porcs Meishan comparés aux porcs Large White suite à une stimulation par l'ACTH.

## CONCLUSION

Notre étude présente une liste de gènes différentiellement exprimés dans les surrénales des porcs Large White et Meishan en condition basale et en réponse à une stimulation aiguë par l'ACTH. Certains de ces gènes sont déjà connus pour être impliqués dans le fonctionnement surrénalien, mais la plupart n'ont jamais été mis en relation avec la stéroïdogénèse ni décrits comme impliqués dans la régulation aiguë de la stéroïdogénèse. Ces gènes constituent d'excellents candidats pour expliquer les différences de réactivité surrénalienne à l'ACTH. L'exploration du rôle de ces gènes permettra de mieux comprendre la relation entre l'activité de l'axe corticotrope et l'adiposité des animaux, et leur intérêt pour la sélection.

## REMERCIEMENTS

Ces résultats ont été obtenus dans le cadre du projet européen SABRE (<http://www.sabre-eu.eu/>) financé par le 6<sup>ème</sup> PCRD. D. Hazard bénéficie d'une bourse post-doctorale de l'INRA. Nous remercions vivement Yvon Billon et son équipe de l'unité expérimentale GEPA du Magneraud pour l'élevage des animaux et leur aide technique lors des expérimentations. Nous remercions également le personnel de la plateforme CRGS du génopôle de Toulouse ainsi que les membres du groupe SIGENAE.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Benjamini Y., Hochberg Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Royal Stat. Soc. B*, 57, 289-300.
- Carey L. C., Su Y., Valego N. K., Rose J. C., 2006. Infusion of ACTH stimulates expression of adrenal ACTH receptor and steroidogenic acute regulatory protein mRNA in fetal sheep. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 291, E214-220.
- Cathelin R., Lopez F., Klopp C., 2007. AGScan: a pluggable microarray image quantification software based on the ImageJ library. *Bioinformatics*, 23, 247-8.
- Clark B., Wells J., King S., Stocco D., 1994. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J. Biol. Chem.*, 269, 28314-28322.
- De Matteis F., 1988. Toxicological aspects of liver heme biosynthesis. *Semin. Hematol.*, 25, 321-329.
- Désautés C., Bidanel J.-P., Mormède P., 1997. Genetic study of behavioral and pituitary-adrenocortical reactivity in response to an environmental challenge in pigs. *Physiol. Behav.*, 62, 337-345.
- Désautés C., Sarrieu A., Caritez J.-C., Mormède P., 1999. Behavior and pituitary-adrenal function in large white and Meishan pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 16, 193-205.
- Dragan C. A., Blank L. M., Bureik M., 2006. Increased TCA cycle activity and reduced oxygen consumption during cytochrome P450-dependent biotransformation in fission yeast. *Yeast*, 23, 779-794.
- Dragan C. A., Zearo S., Hannemann F., Bernhardt R., Bureik M., 2005. Efficient conversion of 11-deoxycortisol to cortisol (hydrocortisone) by recombinant fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res.*, 5, 621-625.
- Foury A., Geverink N. A., Gil M., Gispert M., Hortos M., Font i Furnols M., Carrion D., Blott S. C., Plastow G. S., Mormède P., 2007. Stress neuroendocrine profiles in five pig breeding lines and the relationship with carcass composition. *Animal*, 1, 973-982.
- Grion N., Repetto E. M., Pomeranic Y., Calejman C. M., Astorf F., Sanchez R., Pignataro O. P., Arias P., Cymerlyng C. B., 2007. Induction of nitric oxide synthase and heme oxygenase activities by endotoxin in the rat adrenal cortex: involvement of both signaling systems in the modulation of ACTH-dependent steroid production. *J. Endocrinol.*, 194, 11-20.
- Hennessy & Jackson, la référence exacte est : Hennessy D. P., Jackson P. N., 1987. Relationship between adrenal responsiveness and growth rate. In: *Manipulating pig production I*. Australasian Pig Science Association (APSA), p.23.
- Hennessy D. P., Stelmasiak T., Johnston N. E., Jackson P. N., Outch K. H., 1988. Consistent capacity for adrenocortical response to ACTH administration in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 49, 1276-1283.

- Hughes T. R., Marton M. J., Jones A. R., Roberts C. J., Stoughton R., Armour C. D., Bennett H. A., Coffey E., Dai H., He Y. D., Kidd M. J., King A. M., Meyer M. R., Slade D., Lum P. Y., Stepaniants S. B., Shoemaker D. D., Gachotte D., Chakraburttty K., Simon J., Bard M., Friend S. H., 2000. Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell*, 102, 109-126.
- Kirschbaum C., Wust S., Faig H. G., Hellhammer D. H., 1992. Heritability of cortisol responses to human corticotropin-releasing hormone, ergometry, and psychological stress in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 75, 1526-1530.
- Kraemer F. B., 2007. Adrenal cholesterol utilization. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 265-266, 42-45.
- Le Roy C., Li J. Y., Stocco D. M., Langlois D., Saez J. M., 2000. Regulation by Adrenocorticotropin (ACTH), Angiotensin II, Transforming Growth Factor- $\beta$ , and Insulin-Like Growth Factor I of bovine adrenal cell steroidogenic capacity and expression of ACTH Receptor, Steroidogenic Acute Regulatory Protein, Cytochrome P450c17, and 3  $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Endocrinology*, 141, 1599-1607.
- Lee J. J., Widmaier E. P., 2005. Gene array analysis of the effects of chronic adrenocorticotropic hormone in vivo on immature rat adrenal glands. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 96, 31-44.
- Leenhouwers J. I., Knol E. F., de Groot P. N., Vos H., van der Lende T., 2002. Fetal development in the pig in relation to genetic merit for piglet survival. *J. Anim. Sci.*, 80, 1759-70.
- Lehoux J.-G., Fleury A., Ducharme L., 1998. The acute and chronic effects of adrenocorticotropin on the levels of messenger ribonucleic acid and protein of steroidogenic enzymes in rat adrenal *in vivo*. *Endocrinology*, 139, 3913-3922.
- Manna P. R., Dyson M. T., Eubank D. W., Clark B. J., Lalli E., Sassone-Corsi P., Zeleznik A. J., Stocco D. M., 2002. Regulation of steroidogenesis and the Steroidogenic Acute Regulatory Protein by a member of the cAMP Response-Element Binding Protein Family. *Mol. Endocrinol.*, 16, 184-199.
- Martini C. N., de Avalos S. G. V., Romero D. G., de Viale L. S. M., del Carmen Vila M., 1997. Heme availability affects corticosterone and aldosterone biosynthesis in rat adrenal. *Steroids*, 62, 767-770.
- McCammon M. T., Epstein C. B., Przybyla-Zawislak B., McAlister-Henn L., Butow R. A., 2003. Global transcription analysis of Krebs tricarboxylic acid cycle mutants reveals an alternating pattern of gene expression and effects on hypoxic and oxidative genes. *Mol. Biol. Cell*, 14, 958-72.
- Miller W. L., Strauss J. F., 1999. Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 69, 131-141.
- Mountjoy K. G., Bird I. M., Rainey W. E., Cone R. D., 1994. ACTH induces up-regulation of ACTH receptor mRNA in mouse and human adrenocortical cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 99, R17-20.
- Schimmer B. P., Cordova M., Cheng H., Tsao A., Goryachev A. B., Schimmer A. D., Morris Q., 2006. Global profiles of gene expression induced by adrenocorticotropin in Y1 mouse adrenal cells. *Endocrinology*, 147, 2357-2367.
- Sewer M. B., Waterman M. R., 2003. ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc. Res. Tech.*, 61, 300-307.
- Stocco D., Clark B., 1996. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr. Rev.*, 17, 221-244.
- Stocco D. M., Wang X., Jo Y., Manna P. R., 2005. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol. Endocrinol.*, 19, 2647-2659.
- Zhang S. H., Hennessy D. P., Cranwell P. D., 1990. Pituitary and adrenocortical responses to corticotropin-releasing factor in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 51, 1021-1025.