THESE

Université de Pau et des Pays de l'Adour

Ecole Doctorale Sciences Exactes et leurs Applications (ED211)

Manuscrit de thèse par

Charlotte Andrieux

Pour l'obtention du grade de

DOCTEURE

Spécialité Physiologie et biologie des organismes, populations, interactions

Production de foie gras : Influence d'une manipulation thermique embryonnaire sur le métabolisme hépatique du canard mulard

Thèse soutenue le 6 décembre 2022 devant le jury composé de :

RAPPORTEURS	
Claude Duchamp	Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1 (LEHNA, UMR 5023 CNRS)
Hervé Rémignon	Professeur, Université de Toulouse (INTP-ENSAT)
EXAMINATEURS	
Anaïs Carvalho-Vitorino	Chargée de recherches, INRAE Université de Tours, Nouzilly (INRAE, BOA)
Anne Gabory	Chargée de recherches, INRAE Jouy en Josas (INRAE, BREED)
DIRECTEURS DE THESE	
Marianne Houssier	Maître de conférences, Université de Pau et des Pays de l'Adour (INRAE, NuMéA)
Stéphane Panserat	Directeur de recherche, INRAE Saint-Pée sur Nivelle (INRAE, NuMéA)

RÉSUMÉ

Le développement embryonnaire constitue une période critique de la mise en place et du fonctionnement de l'organisme. Chez les animaux, un stress survenu au cours du développement embryonnaire peut provoquer des changements physiologiques mesurables à plus ou moins long terme, faisant émerger le concept de programmation. Chez le canard mulard, il a pu être récemment montré qu'une modification de la température d'incubation des œufs (MT) engendrait une hausse du poids de foie après la période de gavage avec pour certaines conditions des effets néfastes, comme une augmentation du taux de fonte ou encore une baisse de l'éclosabilité.

Suite à l'observation d'effets non désirés chez les canards programmés après la période de gavage, nous nous sommes concentrés sur une même hausse de température d'incubation, sur six **nouvelles fenêtres de MT (Article 1)**, dont quatre **ont permis de maintenir les performances du groupe contrôle en sortie d'éclosoir.** Cette même étude a également pu mettre en avant qu'**il existait des périodes critiques (E9-E19 et E10-E20)** pendant lesquelles un stress environnemental engendrait de fortes mortalités. Finalement, pour l'essai concernant l'optimisation de la méthode, la fenêtre E11-E21 a été conservée pour tester deux hausses de température d'incubation pour l'étude suivante.

Après avoir observé des impacts de la MT en sortie d'éclosoir, nous nous sommes intéressés aux potentiels impacts de la MT à plus long terme, à partir de deux challenges nutritionnels et des nouvelles MT créées. Le **challenge mise à jeun/réalimentation** nous a permis de montrer qu'**il est possible de mesurer une programmation métabolique du foie, sans avoir à gaver les animaux (Article 2).** Effectivement, nous avons mesurés des réponses transcriptionnelles des métabolismes lipidique et glucidique spécifiquement modulées chez les animaux programmés. Suite à ce premier challenge, **le gavage** a été réalisé montrant, une nouvelle fois, une **hausse du poids de foie chez les canards programmés** (+ 1,7°C 16h/24 E11-E21) par rapport au groupe contrôle (**Article 3**).

Deux cinétiques embryonnaires (horaire et journalière) ont permis de **suivre les modulations directes des gènes impliqués dans le mécanisme de la programmation**, avec une modulation d'environ 10 % des gènes mesurés dans l'heure suivant le stimulus thermique (8 gènes sur 78). Cette proportion a augmenté les jours suivants, toujours pendant la MT (12 gènes sur 80), et une mémorisation du stress est observée trois jours après l'arrêt de la MT (7 gènes sur 80). Deux études préliminaires ont **corrélé la chémérine et un endocannabinoïde avec une hausse du poids du foie**. De plus, l'endocannabinoïde **AEA semble être suffisamment discriminant pour différencier le groupe programmé** présentant un engraissement plus important que le groupe contrôle après gavage.

Nos travaux ont permis de confirmer que la MT avait un impact sur le court et long terme, en modifiant les réponses métaboliques et la composition et structure du foie après le gavage. Parallèlement, nous avons aussi montré que la plupart de ces modifications pouvaient être prévisualisées grâce au challenge nutritionnel mise à jeun/réalimentation. Ce modèle pourrait donc permettre d'étudier de façon plus précoce (et sans gavage) la programmation des animaux. Finalement, deux biomarqueurs de la prise de poids du foie ont pu être mis en évidence chez le canard mulard, et l'un d'eux présente du potentiel pour être un marqueur de la programmation.

ABSTRACT

Embryonic development is a critical period in the establishment and functioning of the organism. In animals, stress during embryogenesis could cause measurable physiological changes, in short or long term, giving rise to the concept of programming. In mule duck, it has recently been shown that a change in egg incubation temperature (TM) induced an increase of *foie gras* after overfeeding, with adverse effects such as increased melting rate and decreased hatchability.

Following the observation of unwanted effects in programmed-overfed ducks, we focused on a same increase of incubation temperature, on **six new windows (Article 1), four of which maintained the hatchery performances of the control group**. This study also underlined that **there are critical embryonic periods (E9-E19, E10-E20)** during which environmental stress involves high mortalities. Finally, for the method optimization trial, the window E11-E21 was kept to test two new increases in incubation temperature.

After observing TM impacts at hatch, we were interested in the potential TM impacts in long-term, by the way of two nutritional challenges and the new TM created. The **fasting/refeeding challenge** showed that **it is possible to measure a metabolic programming of the liver, without overfeeding (Article 2)**. Indeed, we measured specific transcriptional responses of lipid and carbohydrate metabolisms in programmed animals. Following this first challenge, the **overfeeding** showed once again **a significant increase in liver weight in programmed ducks** (+1.7°C 16h/24 E11-E21) in comparison with the control group (**Article 3**).

Two embryonic kinetics (hourly and daily) have made it possible to **follow the direct modulations of the genes involved in the programming mechanism**, with a modulation of around 10 % of genes in the hour following the temperature increase (8 genes out 78). This proportion increased the following days, during the TM (12 genes out 80), and a memorization of the stress was observed three days after the stop of the TM (7 genes out 80). Two preliminaries studies **correlated plasmatic chemerin and endocannabinoids with the increase in liver weight**. Moreover, the endocannabinoid **AEA seems to be sufficiently discriminating to differentiate the programmed group with greater fattening than the control group after overfeeding.**

Our work therefore confirmed that embryonic TM had an impact at short and long term, by modifying metabolic responses, liver composition and structure after overfeeding. In parallel, we showed that most of its modifications could be previewed by the way of the fasting/refeeding challenge. In addition, this nutritional challenge could allow for an earlier study (and without overfeeding) of animal programming. Finally, two biomarkers of liver weight were highlighted in mule duck, one of which has the potential to be a programming marker.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Messieurs Claude Duchamp et Hervé Rémignon d'avoir accepté de participer à ce jury en tant que rapporteurs, et également Mesdames Anaïs Carvalho-Vitorino et Anne Gabory de participer en tant qu'examinatrices.

Un énorme merci à mes deux directeurs de thèse, Marianne Houssier et Stéphane Panserat, pour m'avoir aussi bien accompagnée tout au long de ces trois années de thèse. Merci de m'avoir fait autant confiance pour ce travail de cherche, qui m'a plus que passionné et dans lequel j'ai pris beaucoup de plaisir. Merci à toi Marianne, d'avoir fait le pari risqué de me choisir, de m'avoir aidé à m'épanouir au laboratoire, d'avoir été patiente et de si bon conseil, de m'apprendre à construire des articles ou encore des discussions, et surtout de m'avoir fait découvrir, je n'irai pas jusqu'à aimer, ce monde de la biologie moléculaire. Merci à toi Stéphane, pour m'avoir transmis ta passion et de ta curiosité infinie pour le monde de la recherche, pour ta bonne humeur et tous tes mots d'encouragement. Sans vous deux, cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle est actuellement, et si l'on me proposait de recommencer je le referai avec vous deux sans hésiter !

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Madame Mireille Morisson et Monsieur Vincent Coustham, qui ont toujours eu de bons conseils pour faire avancer ces travaux de thèse. Merci d'avoir été aussi bienveillant et motivant au cours de ces trois années.

Merci à l'UEPFG pour la réalisation de mes différents essais expérimentaux et pour leur excellent déroulement, malgré le Covid et la grippe aviaire ! Merci pour tous ces moments passés ensemble sur le terrain et surtout votre gentillesse. Merci plus particulièrement à Marie-Dominique Bernadet, Josette Barrieu, Phillipe Morganx et Azélie Hazard pour leur disponibilité et leur connaissance du terrain.

Je remercie l'ensemble de l'équipe de l'UMR NuMéA pour m'avoir accueillie sur ces trois années de thèse. Et plus particulièrement toutes les petites mains qui m'ont permis d'arriver à la fin de mes différentes analyses. Merci à Michaël Marchand pour toutes ces extractions d'ARN et ces RT que tu as réalisées, et qui m'ont permis de finir cette thèse en trois années au lieu de 10 ! Merci à Laurence Larroquet pour toutes ces analyses Folch, à Anne Surget pour la composition des aliments, à Vincent Verron et Alexandre Herman pour m'avoir accompagnée dans mes analyses. Merci à Maryse Pin pour sa patience et nos nombreux appels. Merci à Jérôme Roy pour sa bienveillance envers tous les doctorants et post-doctorants. Et merci aux doctorants de NuMéA pour leur accueil sur le site à chacun de mes passages.

J'adresse tous mes remerciements au CD40, à Mont de Marsan Agglo, au CIFOG et à l'UPPA qui ont permis le financement de ces trois années de travail. Merci également à l'école doctorale qui m'a permis de réaliser une collaboration avec le laboratoire IUCPQ à Québec (Canada).

Merci à tous mes collègues de l'IUT pour leur bonne humeur au quotidien et tous les moments que l'on a partagés. Merci à cette équipe palmipède, Karine Ricaud, Karine Gontier, Sandra Biasutti, Mikaël Rey, Stéphane Davail pour m'avoir accompagnée sur le terrain au cours de mes essais, pour m'avoir soutenue et encouragée dans mes différents projets. Merci à Marine Etchegoyhen pour ta bonne humeur et les ateliers cuisines. Merci à aux petites mains de l'ombre, Thierry, Véro, Stéphanie, Sabine, Jérôme, Michaël, qui sont toujours là pour m'aider dans mes différentes démarches. Merci à mes collègues du côté Réseau & Télécom pour leur bonne humeur. Merci à mes collègues de bureau pour tous nos moments de rire et d'amusement, au travail comme à l'extérieur. Je remercie tous les doctorants et docteurs qui sont à mes côtés, et plus particulièrement Tim, Léa, Lisa, Yoan, Nouha, Raphaël et bien sûr Samia, sur qui j'ai pu et je peux compter au quotidien. Et encore merci à tout le reste de l'équipe.

Je tiens à remercier également l'équipe de recherche de l'INRAE PRC de Nouzilly, avec qui j'ai pu réaliser des analyses complémentaires et surtout pour leur accueil et leur gentillesse quand je suis passée sur le site. Je tenais également à remercier l'équipe de recherche de l'IUCPQ (Québec, Canada), avec qui j'ai pu travailler deux mois sur les endocannabinoïdes et qui m'ont permis de découvrir une nouvelle facette du monde de la recherche.

Merci à Mont-de-Marsan, cette ville qui m'a accueillie avec sa chaleur et sa joie de vivre. Merci à mes deux clubs sportifs du stade montois et à tous mes camarades de balle et de volant.

Un dernier et grand merci au cercle solide qui m'entoure au quotidien, à mes parents, mes frères et sœur, ma famille, mes amis et mon soleil. Sans vous tous, ces trois années n'auraient pas eu la même saveur !

Table des matières

RÉSUMÉ 5
ABSTRACT 7
LSITE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 17
LISTE DES ABRÉVIATIONS 21
LISTE DES FIGURES/TABLEAUX 25
INTRODUCTION 29
CHAPITRE 1 : Bibliographie 35
1. Filière palmipède à foie gras et conduite des animaux 37
1.1 La filière palmipède à foie gras 37
1.2. Mise en élevage des animaux 39
2. Les mécanismes biologiques à l'origine du foie gras et de sa réversibilité 49
2.1. Stéatose hépatique 49
2.2. La réversibilité de la stéatose hépatique 61
2.3. La régulation des voies métaboliques d'intérêt 63
3. Le développement embryonnaire et l'éclosion 67
3.1. Les étapes du développement embryonnaire 67
3.2 Les conditions requises pour favoriser le développement de l'embryon 69
3.3. Les mesures en sortie d'éclosoir 71
4. La manipulation thermique : un outil pour la programmation 75
4.1. La programmation 75
4.2. La manipulation thermique 79
CHAPITRE 2 : Objectifs de la thèse et outils mis en place 83
1. Objectifs de la thèse 85
1.1. Rappel des résultats de la précédente thèse 85
1.2. Objectifs de thèse 87
2. Matériel et méthodes 91
2.1. Mesures zootechniques 91
2.2. Mesures histologiques du foie 93
2.3. Mesures biochimiques du plasma, du foie et des aliments 93
2.4. Mesures moléculaires 97
2.5. Traitement des données statistiques 101
CHAPITRE 3 : Optimisation de la manipulation thermique 103
1. Objectif et mise en place de l'essai 105
2. Résumé de l'étude : principaux résultats 107

CHAPITRE 4 : Impacts de la programmation en réponse à deux challenges nutritionnels 111

1. Objectif et mise en place de l'essai du chapitre 4 113
2. Résumé du challenge nutritionnel : Mise à jeun/réalimentation et programmation 115
3. Résumé du challenge nutritionnel : gavage et programmation 119
4. Résultats non publiés et présentés précédemment 123

CHAPITRE 5 : Impact de la manipulation thermique sur l'expression des gènes du métabolisme hépatique chez l'embryon 127

1. Objectifs 129
2. Mise en place des deux cinétiques 129
3. Données moléculaires : gènes et méthodes d'analyses 131
4. Résultats des impacts directs, cumulés et à l'éclosion de la manipulation thermique 133
5. Discussion des résultats 137
6. Conclusion 141

CHAPITRE 6 : Recherche de nouveaux indicateurs non invasifs de l'engraissement et de la manipulation thermique chez le canard 143

1. Réponse de la chémérine suite à une manipulation thermique 145
   1.1. La chémérine : brève description et objectif du travail 145
   1.2. Résultats de l'étude préliminaire sur la chémérine 147
2. La réponse des endocannabinoïdes suite à une manipulation thermique 153
   2.1. Les endocannabinoïdes : brève description et objectif du travail 153
   2.2. Résultats de l'étude préliminaire sur les endocannabinoïdes 155

DISCUSSIONS ET CONCLUSION GENERALE 159

Discussion et perspectives 161

Conclusion générale 185

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 187

ANNEXES 207

LSITE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications dans des journaux scientifiques internationaux :

En 1er auteur

Mini-review : **Charlotte Andrieux**, Angélique Petit, Anne Collin, Marianne Houssier, Sonia Métayer-Coustard, Stéphane Panserat, Frédérique Pitel, Vincent Coustham, *Early Phenotype Programming in Birds by Temperature and Nutrition : A Mini Review* (Frontiers in Physiology, 2022) **[Accepté]**

Article 1 : **Charlotte Andrieux**, Sandra Biasutti, Philippe Morganx, Mireille Morisson, Vincent Coustham, Stéphane Panserat, Marianne Houssier, *Identification of Critical Embryonic Periods to Modify Egg Incubation Temperature in Mule Ducks* (Animal, 2022) **[Accepté]**

Article 2 : **Charlotte Andrieux**, Michaël Marchand, Laurence Larroquet, Vincent Verron, Sandra Biasutti, Josette Barrieu, Philippe Morganx, Mireille Morisson, Vincent Coustham, Stéphane Panserat, Marianne Houssier, *Fasting/refeeding: an experimental model to study the impact of early thermal manipulation on hepatic metabolism in mule ducks* **[Am J Physiol, en révision]**

Article 3 : **Charlotte Andrieux**, Michaël Marchand, Laurence Larroquet, Vincent Verron, Sandra Biasutti, Josette Barrieu, Philippe Morganx, Mireille Morisson, Vincent Coustham, Stéphane Panserat, Marianne Houssier, *Optimization of Embryonic Thermal Programming Leading to Modified Lipid Metabolism in Duck Liver* **[Frontiers, soumis en Janvier 2023]**

Article 4 : **Charlotte Andrieux**, Michaël Marchand, Laurence Larroquet, Vincent Verron, Sandra Biasutti, Josette Barrieu, Philippe Morganx, Mireille Morisson, Vincent Coustham, Stéphane Panserat, Marianne Houssier, *Impacts of Early Thermal Manipulation on Gene Expressions at hatch in Mule Duck* **[En cours de rédaction]**

En collaboration

William Massimino, Stéphane Davail, Aurélie Secula, **Charlotte Andrieux**, Marie-Dominique Bernadet, Tracy Pioche, Karine Ricaud, Karine Gontier, Mireille Morisson, Anne Collin, Stéphane Panserat, Marianne Houssier, *Ontogeny of hepatic metabolism in mule ducks highlights different gene expression profiles between carbohydrate and lipid metabolic pathways* (BMC Genomics, 2020)

Charlotte Andrieux, William Massimino, Sandra Biassuti, Stéphane Davail, Marie-Dominique Bernadet, Tracy Pioche, Karine Ricaud, Karine Gontier, Mireille Morisson, Anne Collin, Stéphane Panserat, Marianne Houssier, *Impacts of Embryonic Thermal Programming on the Genes Involved in Mule Ducks* (Frontiers in physiology, 2021)

Communications lors de congrès :

Charlotte Andrieux, Sandra Biasutti, Josette Barrieu, Philippe Morganx, Mireille Morisson, Vincent Coustham, Stéphane Panserat, Marianne Houssier, *Identification of Critical Embryonic Periods to Modify Egg Incubation Temperature in Mule Ducks* (Incubation and fertility research group (IFRG), Web congrès 2021, **communication orale**)

Charlotte Andrieux, Biasutti Sandra, Michaël Marchand, Mireille Morisson, Vincent Coustham, Stéphane Panserat, Marianne Houssier, Le challenge nutrionnel jeûne/réalimentation : un nouveau modèle d'étude du métabolisme hépatique chez le canard mulard (14ème journée de la recherche avicole (JRA), **poster**)

Charlotte Andrieux, Sandra Biasutti, Josette Barrieu, Philippe Morganx, Michaël Marchand, Mireille Morisson, Vincent Coustham, Stéphane Panserat, Marianne Houssier, Impacts of Early Thermal Manipulation on Gene Expressions at hatch in Mule Duck (IFRG 2022 à Leiden (Pays-Bas), **communication orale**)

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-AG 2 Arachidonoylglycerol
6PF1K 6 PhosphoFructose 1 Kinase
ACAD Acyl CoA Deshydrogenase
ACC Acetyl CoA Carboxylase
ACLY ATP Citrate Lyase
ACOX Acyl CoA Oxidase
ACTB Actin Béta
ADN(c) Acide DésoxyRibonucléique (Complémentaire)
AEA Anadamide
AG acide gras
AGL acide gras libre
ALA acid alpha linoleic
AKT Protein Kinase A
APOB Apolipoprotein B
ATP Adénosine TriPhosphate
ARN Acide RiboNucléique
CACT Carnitine Acyl Carnitine Translocase
CCLR C-C Chemokine Receptor
Chol Cholestérol
ChREBP Carbohydrate Response Element Binding Protein
CMKLR Chemerin Chemokine Like Receptor
CNR Cannabinoid Recpetor
Ct Cycle threshold
CO2 Dioxyde de Carbone
CoA CoEnzyme A
CPT Carnitine Palmitoyl Transferase
DIO Iodothyronine Deiodinase
E Jour Embryonnaire
ELOVL Elongation of Very Long chain fatty acid proteins
ENO Enolase
FABP Fatty Acid Binding Protein
FADH Flavine Adénine Dinucléotide
FASN Fatty Acid Synthetase
FAT/CD36 Fatty Acid Translocase/ Cluster of Differenciation 36
G1P Glucose 1 Phosphate
G6P Glucose 6 Phosphate
G6PDH Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase
GAPDH Glyceraldehyde Phospho Deshydrogenase
GLU Glucose
GLUT Glucose Transporter
GPAT Glycerol 3 Phosphate Acyltransferase
HE Hematoxyline eosine
HDL High Density Lipoprotein
HK Hexokinase
HPRT Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase
HR Humidité Relative
HPS90AA1
IGP Indication Géographique Protégée
IHS Indice Hépato-Somatique
J Jour de vie
LA acid linoleic
LC-MS Chromatographie liquide-spectrométrique de masse
LDL Low Density Lipoprotein
LDN Lipogenèse *De Novo*
LPL Lipoprotein Lipase
LXRA Liver X Receptor Alpha
MS Matière sèche
MT Manipulation Thermique
MTTP Microsomal Triglyceride Transfer Protein
NADH Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NAFLD non alcoolic fatty liver disease
O2 Dioxygène
PA phosphatidate
PAS Periodic acid shiff
PC phosphatidicholine
PE phosphatidyléthanolamine
PPAR Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PCK Pyruvate Kinase
PEP 3 Phospho Enol Pyruvate
PDH Pyruvate Deshydrogenase
PSMD Proteasome 26S Subunit, Non ATPase
qPCR quantification en temps réel de la réaction en chaîne de la polymérase
RARRES Retinoic Acid Receptor Responder Protein

RT RétroTranscription
SCD1 Stearol CoA Desaturase
SGLT Sodium Glucose Like Transporter
SREBP Sterol Regulatory Element Binding Protein
STAB Stabilin
TG Triglycérides
TRIS Aminométhane
UBQLN Ubiquilin
UDP Uridine diphosphate
UE Union Européenne
USP9X Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-linked
VLDL Very Low Density Lipoprotein

LISTE DES FIGURES/TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Croisement du canard mulard et son effet d'hétérosis (Brun et al., 2005)
Figure 1.2. Organisation de l'œuf fertilisé (Freeman et al., 1974)
Figure 1.3. Illustration des courbes bimodales (Barott, 1937)
Figure 1.4. Suivi du mode d'élevage des canards de l'incubation au gavage
Figure 1.5. Coupes histologiques de foie gras avant (A) et après cuisson (B) (Théron et al., 2011)
Figure 1.6. Représentation des voies de stockage du glucose dans le foie
Figure 1.7. Absorption du glucose par les cellules intestinales
Figure 1.8. Représentation de la glycogénogénèse
Figure 1.9. Représentation de la glycolyse
Figure 1.10. Représentation du cycle de Krebs
Figure 1.11. Représentation de la lipogenèse de novo (LDN)
Figure 1.12. La formation du cholestérol
Figure 1.13. La formation des triglycérides
Figure 1.14. La formation des phospholipides via le phosphatidate (Han et Carman, 2013)
Figure 1.15. Les différentes lipoprotéines et leur composition (Das and Gursky, 1994)
Figure 1.16. Mise en place de la stéatose hépatique
Figure 1.17. Les mécanismes de la réversibilité de la stéatose hépatique
Figure 1.18. Représentation de la glycogénolyse
Figure 1.19. Représentation de la Béta-oxydation
Figure 1.20. Schématisation de la chaîne respiratoire
Figure 1.21. Mise en place de la stéatose hépatique et ses régulateurs lors de la prise alimentaire
Figure 1.22. Photographie des étapes embryonnaires chez le canard (Li et al., 2019)
Figure 1.23. Représentation de la programmation
Figure 2.2. Résultats principaux de l'impact des manipulations thermiques embryonnaires chez le canard mulard (Massimino et al., 2019)
Figure2.3. Résumé des objectifs de la thèse et des essais mis en place pour y répondre
Figure 2.4. Illustration des coupes histologiques de foie de canard
Figure 2.5. Illustration de l'utilisation de GeNorm (R)
Figure 3.1. Protocole expérimental des trois premiers essais de la thèse (Andrieux et al., 2022)
Figure 3.2. Relevés de température et d'humidité relative dans un incubateur
Figure 4.1. Protocole expérimental du chapitre 4 jusqu'au 1er challenge nutritionnel (mise à jeun/réalimentation)
Figure 4.2. Protocole expérimental du chapitre 4 jusqu'au 2ème challenge nutritionnel (Gavage)
Figure 4.3. Comparaison des poids de foie entre les deux articles de manipulation thermique
Figure 4.4. Expressions relatives de quelques gènes passés dans le muscle chez les canards gavés (Clara Lebreton)

Figure 5.1. Protocole expérimental des deux cinétiques (horaire et journalière)
Figure 5.2. Exemples de cinétique horaire pour la HSP90AA1 et journalière pour la FASN
Figure 5.3. Impacts moléculaires 1h après la hausse de température au 13ème jour embryonnaire (E13)
Figure 5.4. Impacts moléculaires de la hausse de température au 16ème jour embryonnaire (E16)
Figure 5.5. Impacts moléculaires de la hausse de température au 20ème jour embryonnaire (E20)
Figure 5.6. Impacts moléculaires de la hausse de température au 24ème jour embryonnaire (E24)
Figure 5.7. Impacts moléculaires de la hausse de température à l'éclosion (D1)
Figure 6.1. Représentation de la relation entre le poids de foie et la chémérine plasmatique lors de la mise à jeun/réalimentation
Figure 6.2. Expressions relatives de gènes liés à la chémérine lors de la mise à jeun/réalimentation dans le foie
Figure 6.3. Représentation de la relation entre poids de foie et chémérine plasmatique lors du gavage ou non
Figure 6.4. Expressions relatives de gènes liés à la chémérine pour les canards gavés ou non, dans le foie
Figure 6.5. Rappel de la synthèse des différents acides gras et des endocannabinoïdes associés
Figure 6.6. Structures des endocannabinoïdes AEA et 2-AG (Mechoulam et al., 1995)
Figure 6.7. Réponses des eCBs liés aux acides gras mono insaturés pour les deux conditions d'incubation et les 3 groupes d'abattage dans le sang
Figure 6. 8. Réponses des eCBs liés aux oméga 6 pour les deux conditions d'incubation et les 3 groupes d'abattage dans le sang
Figure 6.9. Expressions relatives du récepteur CB1 chez le canard gavé ou non dans le foie
Figure ccl.1. Potentiels nouveaux protocoles d'essai d'incubation pour optimiser les manipulations thermiques et/ou la potentielle programmation thermique
Figure ccl.2. Bilan des différents impacts de la manipulation thermique chez les canards programmés au cours de leur vie
Figure ccl.3. Représentation de l'évolution du poids de foie après le dernier repas et du potentiel décalage entre les deux conditions d'incubation

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1. Analyses complémentaires de la composition des aliments d'élevage
Tableau 2.2. Analyses des acides gras présents dans les aliments
Tableau 4.1. Les résultats d'incubation du groupe contrôle et des trois groupes programmés
Tableau 5.1. Liste des gènes utilisés pour les analyses statistiques au cours des deux cinétiques embryonnaires
Tableau 5.2. Mesures zootechniques à l'incubation et à l'éclosion

INTRODUCTION

La France fait partie des six derniers pays producteurs de foie gras et se place leader du marché avec 19 000 tonnes de foie gras produit en 2020, soit 75 % de la production mondiale. Les cinq autres pays producteurs sont la Hongrie (13,5 %), la Bulgarie (8,5 %), l'Espagne (2,5 %) et la Belgique (< 1 %) (EuroFoieGras, 2021). Depuis 1999, l'Union Européenne a interdit la production de foie gras par les pays non producteurs historiquement (UE, 1998), créant ainsi un marché de niche, bénéfique pour la France, mais a imposé aux pays historiquement producteurs de lancer des recherches sur les techniques d'alternatives au gavage. Effectivement, lors des deux dernières semaines d'élevage, l'acte de gavage est réalisé, consistant à introduire un tube dans l'œsophage pour y déposer de l'aliment en quantité croissante. Cette action de gavage, ainsi que les conditions de vie des animaux au cours de cette période (claustration), sont remises en question par la société et nécessitent des améliorations. En 2012, la règle des cinq libertés (Absence de faim et de soif, Absence d'inconfort, Absence de douleur, de blessures ou de maladie, Absence de peur et de détresse et Possibilité d'exprimer les comportements normaux de l'espèce (The_National_Archives, 2012)) permet de définir et de vérifier le bien-être des animaux, engendrant dans sa lancée une évolution de la réglementation relative au bien-être animal et à la protection des animaux. De nombreuses démarches de progrès ont été réalisées touchant principalement le fonctionnement du système d'élevage (tube souple, cage collective, ventilation des salles, utilisation de lumière naturelle, réduction de la période de gavage, expérimentation de gavage spontané…) et également l'éducation de la société vis-à-vis de la filière (Litt et al., 2021).

Dans le but de répondre aux nouveaux objectifs de la filière et d'évoluer en même temps que la société, de nombreuses études ont été lancées pour comprendre la mise en place de l'engraissement du foie lors du gavage et plus précisément les mécanismes biologiques sous-jacents.
Il a ainsi pu être montré que la formation du foie gras au cours du gavage résultait d'une accumulation de lipides (triglycérides) dans le foie, appelée stéatose hépatique (Hermier et al., 1999). Ce mécanisme de stéatose hépatique s'avère être un phénomène naturel et réversible qui survient lors d'évènements spécifiques, comme la migration des oiseaux (Hermier et al., 1999). De nombreux acteurs de la stéatose hépatique ont pu être identifiés comme les gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* (Hermier et al., 1999) ou encore dans le retour des lipides dans le foie (Tavernier et al., 2016). Ces différents acteurs sont spécifiques à l'espèce, et c'est le canard mulard qui présente les meilleures réponses pour la formation du foie gras, confirmant l'intérêt de cet hybride pour la filière palmipède à foie gras (Tavernier et al., 2019, 2016).

La réponse au gavage des animaux peut également être modulée par leur environnement de développement (Massimino et al., 2021, 2019). Effectivement, il a pu être montré qu'au cours des périodes critiques pré et post-natales des facteurs environnementaux peuvent entrainer des changements phénotypiques chez les individus, sur le court ou le long terme (Lucas, 1991). Le stress environnemental reçu au cours du développement embryonnaire peut être mémorisé puis révélé au cours de la vie de l'individu, lui permettant de répondre différemment à un nouveau stress. Ce phénomène définit le processus de programmation.

Ma thèse s'intéresse principalement à l'impact d'une hausse de la température d'incubation des œufs (manipulation thermique) sur les performances au gavage des canards et s'inscrit également dans la compréhension des mécanismes de mémorisation de ce stimulus embryonnaire (programmation thermique) et de sa révélation lors du gavage. Effectivement, une précédente étude a montré que différentes conditions de hausse de température d'incubation (entre 1 et 1,5°C) favorisaient la stéatose hépatique et augmentaient le poids de foie d'environ 16 % après le gavage par rapport au groupe contrôle (Massimino et al., 2019). Cependant, certaines des manipulations thermiques engendraient des effets non désirés comme une hausse significative de la mortalité embryonnaire, une baisse significative de l'éclosabilité ou encore une hausse significative du taux de fonte des foies (Massimino et al., 2019).

Ce manuscrit de thèse se décompose en six chapitres, incluant un chapitre bibliographique (**Chp 1**) et un chapitre « les objectifs, le matériel et les méthodes utilisés pour atteindre les objectifs » (**Chp 2**). Les quatre autres chapitres se concentrent sur les différents résultats obtenus au cours de la thèse et sont axés autour des articles publiés ou en cours de publication. Trois axes d'études sont abordés au cours de la thèse 1) l'optimisation de la manipulation thermique (**Chp 3**), 2) la caractérisation à long terme de la manipulation thermique (**Chp 4**) et 3) la mesure de l'impact direct de la manipulation thermique sur les embryons (**Chp 5**). Un dernier chapitre **(Chp complémentaire**) ouvre la thèse sur de potentiels nouveaux indicateurs de l'engraissement hépatique, comme la chémérine ou les endocannabinoïdes. La dernière partie fera l'objet de la conclusion générale, des discussions et perspectives de cette thèse.

CHAPITRE 1 :
Bibliographie

1. Filière palmipède à foie gras et conduite des animaux

1.1 La filière palmipède à foie gras

1.1.1. Historique et force de la filière française

La production de foie gras à partir de palmipèdes est une pratique ancienne, avec les premières traces d'apparition au temps des égyptiens (Guy et al., 2012). Cette production implique aujourd'hui la pratique du gavage : une alimentation manuelle des animaux visant à augmenter de manière significative la quantité d'aliments ingérés et donc leurs poids de foie. Cette pratique est, depuis le milieu du XXème siècle, à la source des discussions d'éthique et de bien-être des animaux de production. L'Union Européenne (UE) a publié en Décembre 1998 un communiqué sur la santé et le bien-être animal pour la production de foie gras (UE, 1998) et en 1999 elle a interdit aux membres de l'UE non historiquement producteurs de foie gras de développer une filière foie gras et aux producteurs historiques de continuer la production en contrepartie de lancer les recherches sur des techniques alternatives au gavage. Ces discussions autour de la pratique du gavage ont également mené plusieurs pays Européens et hors-Europe à bannir cette pratique (Luxembourg en 1965, Allemagne en 1972, Norvège en 1974, Danemark en 1991, République Tchèque en 1993, Finlande en 1996, Pologne en 1997, Angleterre en 2000, Italie en 2001, Argentine et Israël en 2003, USA en 2004).
En 2020, les 6 derniers pays Européens producteurs de foie gras produisaient 19 000 tonnes, réparties entre la France (75,4 %), La Hongrie (13,5 %), la Bulgarie (8,5 %), l'Espagne (2,5 %) et la Belgique (0,1 %) (EuroFoieGras, 2021). Cela représente environ 90 % de la production mondiale complétée par les 3 000 tonnes de la Chine et les autres pays producteurs comme le Canada (Agreste, 2021). Le foie gras est une denrée rare, lié à ses productions localisées, et est très demandé dans le monde (3 000 tonnes exportées mondialement tous les ans).

La France est le premier producteur mondial de foie gras (75 %), avec presque 15 000 tonnes de foie gras produit en 2020 (Agreste, 2021; ITAVI, 2020). Le grand bassin de production de foie gras se trouve dans le Sud-Ouest de la France (70 % de la production nationale) et il est complété par de plus petits, comme ceux d'Alsace ou de Loire Atlantique (Agreste, 2021).
Dans le but de valoriser et protéger le terroir Français, des indications géographiques protégées (IGP) ont été créées en 1992, incluant les produits de la filière palmipèdes à foie gras. Par exemple, nous trouvons l'IGP « foie gras du Sud-Ouest » ou « Magret du Sud-Ouest ». En plus de garantir une origine et une qualité des produits, les IGP permettent aux consommateurs de mieux connaître la filière et son mode de production. Effectivement, les productions sous IGP obligent les différents acteurs de la filière à suivre une charte spécifique. Par exemple, l'IGP « Canard du Sud-Ouest », spécifie que les canetons doivent vivre entre 11 et 14 semaines en plein air ou encore que le gavage ne peut commencer qu'après 81 jours de vie et après avoir atteint le poids minimal de 3,5 kg (INAO, 2015).

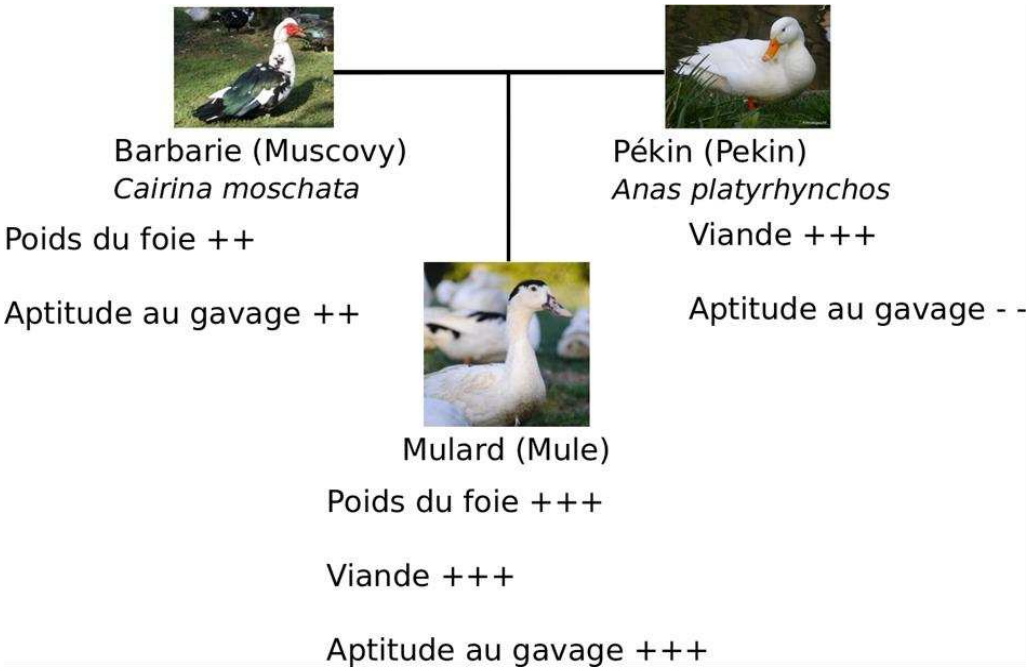


Figure 1.1. Croisement du canard mulard et son effet d'hétérosis (Brun et al., 2005)

Le canard mulard est issu du croisement d'un canard de Barbarie et d'une canne Pékin et bénéficie d'un effet d'hétérosis permettant une plus forte production de viande mais également de foie gras après gavage.

1.1.2. Les espèces concernées

Deux espèces sont utilisées pour la production de foie gras : les oies et les canards. Ces deux espèces sont caractérisées par des ancêtres migrateurs, capables de réaliser de fortes réserves énergétiques pour la migration. Dans la filière foie gras, les canards représentent près de 99 % de la production de foie gras, avec une majorité de canard mulard (Agreste, 2021). Les oies grises Landaises (*Anser anser*) ne représentent plus que 1 % de la production de la filière à cause de leur plus fort gabarit et de leur caractère (transition alimentaire difficile). Le canard mulard est issu du croisement entre une femelle Pékin (*Anas platyrhynchos*) et un mâle de Barbarie (*Cairina moschata*). Le canard mulard est un hybride stérile disposant d'un effet d'hétérosis de ses deux parents (**Figure 1.1**). Il possède donc des aptitudes pour la production de foie gras et pour la production de viande. De plus, seul le mâle est utilisé dans la filière (Brun et al., 2005).

1.2. Mise en élevage des animaux

1.2.1. Incubation

L'incubation des œufs est une méthode mise en place depuis plusieurs décennies dans le but de contrôler l'éclosion des jeunes individus et ainsi de les regrouper sur quelques jours. Cette période d'incubation des œufs est espèce-dépendante. Elle est de 32 jours en moyenne pour le canard mulard contre 28 chez le canard Pékin et de 35 chez le canard de Barbarie (Brun et al., 2005). Cette technologie fait entrer en jeu des facteurs environnementaux comme la température, le taux d'humidité, la quantité d'oxygène ou encore la rotation des œufs (Abd El-Hack et al., 2019; Boleli et al., 2016; El-Hanoun et al., 2012; Landauer, 1961; Yahav & Tzschentke, 2006). Ces différents paramètres ont de forts impacts sur les performances à l'éclosion mais également pendant la période d'élevage.

a. La température au sein de l'incubateur

La température est un des facteurs qui affecte le plus le développement embryonnaire (Al Sardary & Mohammad, 2016; Maatjens et al., 2016a). Les fluctuations de température sont habituelles dans la nature, liées aux activités de la mère (couvaison ou déplacement pour s'alimenter), et il a pu être montré que de fortes températures d'incubation (> 38°C) dégradaient plus les œufs que de faibles températures (< 37°C) (A. Ar, 1991; Owen, 1991). Effectivement, de fortes températures d'incubation engendrent une homogénéisation de la température interne de l'œuf et donc la disparition du gradient interne de température (Scott Turner, 1991). Le gradient interne permet à l'œuf de maintenir une température interne optimale. Dans notre étude, nous nous intéresserons particulièrement à la hausse de température d'incubation.

L'augmentation de température d'incubation a des impacts négatifs comme positifs sur les embryons. Par exemple, elle permet d'accélérer le développement embryonnaire et donc d'avoir des dates d'éclosion précoces (Al Sardary & Mohammad, 2016; Boleli et al., 2016; De Souza Morita et al., 2010; Maatjens et al., 2016a). Effectivement, une hausse de température d'incubation engendre des échanges gazeux plus importants, essentiels pour approvisionner un métabolisme plus rapide et ainsi garantir un développement plus rapide (De Souza Morita et al., 2010). Néanmoins, cette hausse de température peut entrainer une hausse de la mortalité embryonnaire en augmentant la perte en eau et la conductivité de l'œuf ainsi que la production de chaleur embryonnaire pouvant empêcher l'embryon de maintenir son homéostasie (De Souza Morita et al., 2010). Une température trop importante dans l'œuf peut entrainer un arrêt cardiaque de l'embryon (Ono and al., 1994).

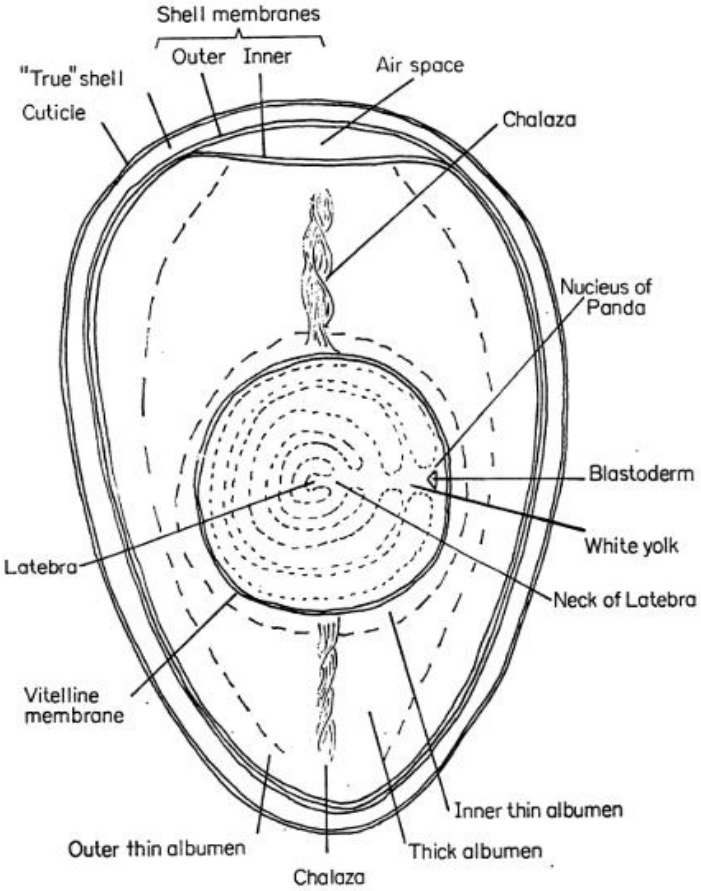


Figure 1.2. Organisation de l'œuf fertilisé (Freeman et al., 1974)

L'œuf est composé de différentes structures tissulaires comme la coquille (« True » shell), la membrane externe et interne de l'œuf (Shell membranes outer and inner), la chambre à air (Air space) ou encore l'embryon (blastoderm).

Il a pu être montré que la température d'incubation influençait le sexe ratio, le poids corporel, la morphologie et d'autres traits de la descendance chez les reptiles (S. E. DuRant et al., 2010). Un parallèle a pu être fait chez les oiseaux montrant que la température influençait la qualité des animaux à l'éclosion (Dayan et al., 2020) mais également le sexe ratio (Sarah E. DuRant et al., 2016; French, 1996). Les femelles semblent plus sensibles aux changements de température et en meurent plus facilement (Batellier, Marchal, et al., 2004; Sarah E. DuRant et al., 2016). Ces impacts, positifs comme négatifs, varient en fonction du niveau d'augmentation de température, de la période à laquelle elle est réalisée et bien sûr de sa durée (Owen, 1991).

b. L'humidité relative au sein de l'incubateur

L'humidité relative (HR) correspond à la saturation en eau au sein de l'incubateur et est exprimée en pourcentage. Le taux d'humidité appliqué dépend de l'espèce étudiée, en lien avec les propriétés différentes des œufs comme l'épaisseur de la coquille, la conductance de l'eau au sein de l'œuf ou encore la densité des pores (El-Hanoun et al., 2012). De plus, un embryon en début de développement embryonnaire sera plus sensible aux changements osmotiques qu'un embryon mature (A. Ar, 1991). L'humidité relative peut être augmentée entre la période d'incubation des œufs et la mise en éclosoir.

Une humidité trop importante dans l'incubateur induit une précocité de l'éclosion et augmente les chances de trouver des animaux aux duvets encore humides à la naissance (Boleli et al., 2016), et elle va en même temps limiter le développement de la chambre à air présente dans l'œuf (**Figure 1.2**). Une chambre à air contenant moins d'air empêche l'embryon de correctement gonfler ses poumons et donc risque de l'asphyxier. Une température trop élevée, quant à elle, va engendrer une évaporation de l'eau présente dans l'œuf, ce qui va causer une déshydratation de ce dernier. La déshydratation de l'œuf peut induire des poches d'air, la compression de l'embryon mais également des naissances de canetons paralysés ou collés à la coquille (Abd El-Hack et al., 2019; Narinç et al., 2016).
Au cours de l'embryogenèse, des fluctuations d'HR ont lieu, liées au fonctionnement du métabolisme, qui peuvent être corrigées par la température d'incubation dans le but de maintenir l'homéostasie de l'œuf (Boleli et al., 2016). En général, l'HR est fixée entre 60 et 65 % pendant la période d'incubation des œufs et elle est augmentée à 80 % lors de la mise en éclosoir.

c. Les échanges gazeux

Pendant l'embryogenèse, l'œuf doit capter de l'oxygène pour se développer et éliminer le dioxyde de carbone produit par le métabolisme (Boleli et al., 2016). Ces échanges dépendent des caractéristiques de l'œuf et de sa coquille. La diffusion des gaz est facilitée par l'augmentation de température, comme celle de la vapeur d'eau (Boleli et al., 2016).

d. La rotation des œufs

La rotation des œufs fait partie du comportement naturel des oiseaux pendant la couvaison (Boleli et al., 2016). Cette rotation permet de meilleurs échanges gazeux au sein de l'œuf, d'éviter la déshydratation et le mauvais développement de l'embryon. Elle favorise également la mise en place de la poche d'air dans l'œuf.

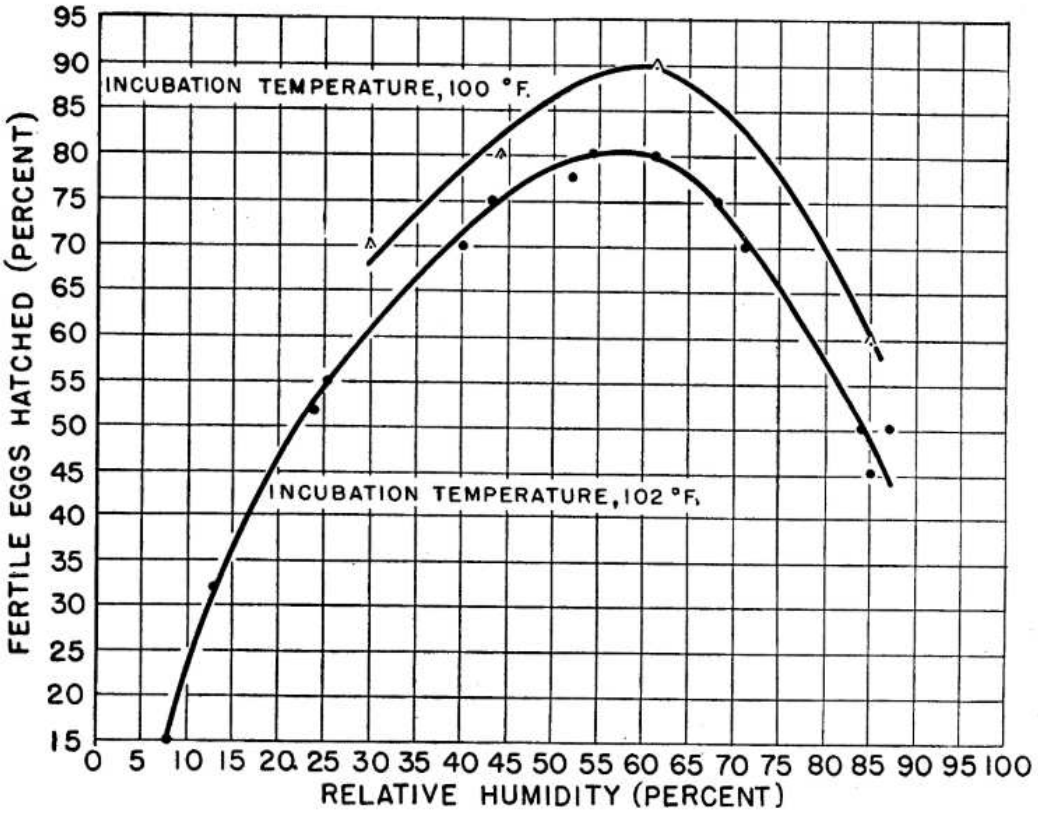


Figure 1.3. Illustration des courbes bimodales (Barott, 1937)

Les courbes bimodales sont représentées pour une température d'incubation donnée (100°F ou 102°F) en fonction de l'humidité relative (axe des abscisses, en %) et de l'éclosabilité (axe des ordonnés, en %).

e. La détermination des paramètres optimaux

Les paramètres optimaux d'incubation correspondent à la meilleure combinaison des paramètres pour lesquels on atteint la meilleure proportion de canetons nés, par rapport au nombre d'œufs mis en incubateur et en bonne santé, appelé éclosabilité (A. Ar, 1991; De Souza Morita et al., 2010; French, 1996). En générale, l'éclosabilité se trouve entre 65 et 82 % chez les canards et entre 81 à 85 % chez les poulets (Brun et al., 2005; Hodgetts, 1991).

Des courbes bimodales (**Figure 1.3**), représentant cette éclosabilité en fonction du taux relatif d'humidité pour une température donnée, peuvent être tracées dans le but de déterminer les paramètres optimaux (Amos Ar & Rahn, 1980; Barott, 1937). Ces dernières sont espèce-dépendantes mais restent proches parmi les volailles d'élevage avec une température entre 37 et 38°C et une HR proche de 60 % (French, 1996; Wilson, 1991). Les paramètres usuels d'incubation chez les canards mulards sont une température proche de 37,8°C et une HR comprise entre 60 et 65 % pendant les 28 premiers jours, puis les œufs sont déplacés dans un éclosoir avec une température de 37,3°C et 80 % HR (Abd El-Hack et al., 2019).

1.2.2. Début d'élevage

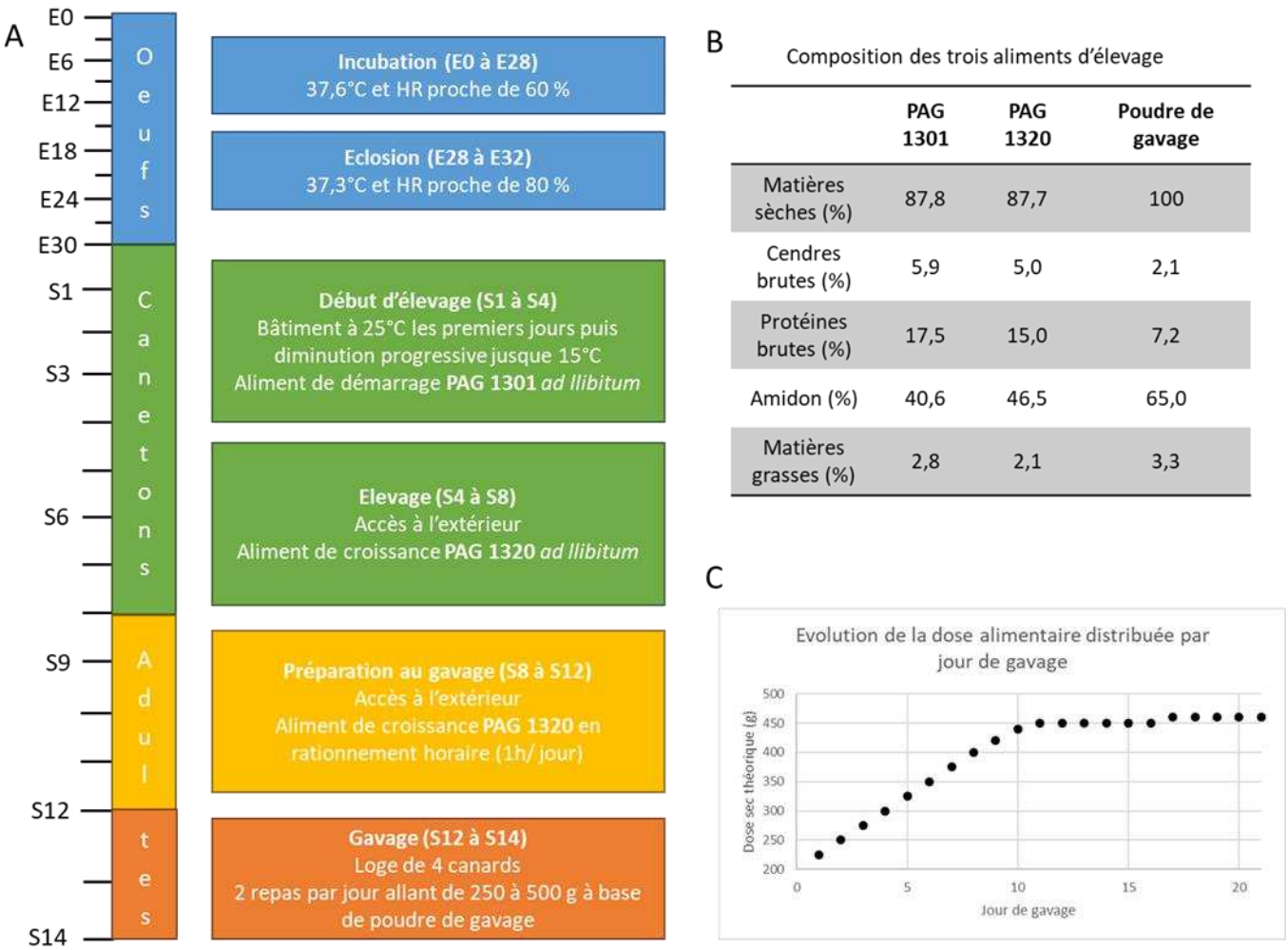
Après l'éclosion, les canetons sont déplacés en bâtiment chauffé pendant 4 semaines avant d'avoir un accès à un parcours extérieur (**Figure 1.4**). La première semaine, le chauffage est maintenu à 25°C puis est diminué d'un degré tous les deux jours pour atteindre une température aux alentours de 15°C avant d'être complétement stoppé. Les canetons sont nourris à partir d'un aliment dit de démarrage *ad libitum* (Aliment PAG 1301, SOAL Haut-Mauco, **Figure 1.4B et Annexe 3**). Cet aliment est riche en amidon (40,6 % de la matière sèche (MS)) et en protéines (17,5 % de MS), fournissant une grande quantité d'énergie aux canetons (18,8 kJ/g de MS, analyses complémentaires des aliments en **Chp 2**).

1.2.3. Période de croissance

A partir du moment où le chauffage du bâtiment est coupé, les animaux passent de l'aliment de démarrage à un aliment dit de croissance (Aliment PAG 1320, SOAL Haut-Mauco, **Figure 1.4B et Annexe 3**). Cet aliment sera distribué *ad libitum* jusqu'à la fin de la 7ème semaine d'élevage, semaine du début de la préparation au gavage (**Figure 1.4**). L'aliment est toujours très riche en amidon (46,5 % de MS) mais plus faible en protéines (15,0 % de MS) et énergie (14,9 kJ/g de MS, analyses complémentaires des aliments en **Chp 2**).

1.2.4. Période de finition

Les quatre semaines avant la période de gavage (semaines 8 à 12), un rationnement horaire est appliqué sur l'aliment de croissance (Poudre de gavage PALMA 146, SOAL Haut-Mauco, **Figure 1.4 et Annexe 3**). Le rationnement correspond à une ouverture de la mangeoire pendant une seule heure de la journée, faisant suite à une période de jeûne de 23h. Cette conduite alimentaire est utilisée afin de modifier le comportement alimentaire des animaux et leur anatomie (Babilié & Auvergne, 1984). Le rationnement entraine une prise alimentaire plus importante sur une courte durée, correspondant à une hyperphagie. Ces fortes prises alimentaires suivies de périodes de jeûne améliorent l'élasticité et la capacité de stockage du jabot. De plus, le métabolisme hépatique est lui aussi fortement stimulé par les périodes de forte ingestion et celles de jeûne. Ces stimulations du métabolisme par une période de jeûne, suivie par une réalimentation, sont étudiées dans le **Chapitre 5**.



	PAG 1301	PAG 1320	Poudre de gavage
Matières sèches (%)	87,8	87,7	100
Cendres brutes (%)	5,9	5,0	2,1
Protéines brutes (%)	17,5	15,0	7,2
Amidon (%)	40,6	46,5	65,0
Matières grasses (%)	2,8	2,1	3,3

Figure 1.4. Suivi du mode d'élevage des canards de l'incubation au gavage

L'élevage des canards est divisé en 6 périodes (A), au cours desquelles les conditions d'élevage varient, allant du développement embryonnaire (E0) à la fin de la période de gavage soit à 14 semaines (S14). La composition des trois aliments (B) utilisés est décrite et complétée par la courbe de gavage (C) des deux dernières semaines d'élevage.

E : jour embryonnaire

S : Semaine d'élevage

1.2.5 Gavage

a. Description de la pratique du gavage

Le gavage correspond à deux semaines d'alimentation forcée (20 repas minimum, avec 2 repas par jour, (INAO, 2015)) au maïs, avec une quantité journalière de poudre de maïs qui augmente au cours du temps (**Figure 1.4B et C**) et qui sera mélangée à de l'eau (ratio 53 % de poudre/47 % d'eau). La poudre de gavage est encore plus riche en amidon que l'aliment de croissance (65,0 %, analyses complémentaires des aliments en **Chp2**) et en matières grasses (3,3 % de MS). Le régime présente un déséquilibre nutritionnel et la quantité ingérée métabolisable est supérieure aux besoins de l'animal. Ces deux éléments engendrent la synthèse de lipides (triglycérides) et leur stockage dans différents tissus, dont principalement le foie, les tissus adipeux et les muscles. Le gavage induit également une modification de l'absorption et un ralentissement du transit digestif total (Babilié & Auvergne, 1984). Cette suralimentation mène donc à l'obtention du foie gras et du magret.

Seuls les mâles sont conservés après l'éclosion pour la mise en gavage. Les femelles présentent des performances au gavage plus faible que les mâles (Marie-Etancelin et al., 2015), avec de nombreuses veines dans le foie, un foie moins lourd et un taux de fonte supérieur. Ces différences sont liées à un dimorphisme sexuel et à une allocation des réserves différentes entre les femelles et les mâles pendant le gavage. Effectivement, à cette période les femelles atteignent une maturité sexuelle et l'organisme se prépare à la ponte.

La phase de gavage étant la période la plus critique de l'élevage des palmipèdes, de nombreuses améliorations ont été apportées et de nouvelles réflexions s'y intéressent. Les animaux sont gavés dans des bâtiments spécialisés comprenant dorénavant des cages collectives de quatre canards (depuis 2015). Les bâtiments sont ventilés et équipés de sorte à améliorer les conditions de vie des canards pendant les deux semaines de gavage et des grilles d'évaluation du bien-être des animaux ont même vu le jour (Litt et al., 2021).

b. Critères de qualité du foie gras

Le foie gras étant un produit reconnu dans la gastronomie Française, il a été nécessaire de créer des critères de qualité des produits incluant la provenance (IGP) ou encore les critères organoleptiques.
Les analyses sensorielles du foie gras se basent sur quatre critères organoleptiques : l'aspect, l'odeur, la flaveur et la texture. Ces différents critères se découpent en des listes de descriptifs et sont utilisés par un panel de dégustateurs spécialisés. Des mesures physiques peuvent également être réalisées pour caractériser la couleur du foie, à l'aide d'un chroma-mètre, ou encore pour prédire les caractéristiques biochimiques du foie, via des spectres infra rouge (Bonnefont et al., 2019).

Un autre critère critique est le taux de fonte du foie gras. Ce taux de fonte correspond au pourcentage de poids perdu entre avant et après la cuisson du foie, devant être au maximum égale à 30 % (Décret93-999, 1993). Le taux de fonte correspond à l'exsudation extra-hépatique des lipides, résultant d'une fragilisation des membranes sous l'effet de la chaleur, traitement de conservation ou cuisson (Hermier et al., 1999). Il a pu être montré que ce taux de fonte, et donc la fragilité des membranes, est lié à la taille des gouttelettes lipidiques présentes dans le foie (Théron et al., 2011).

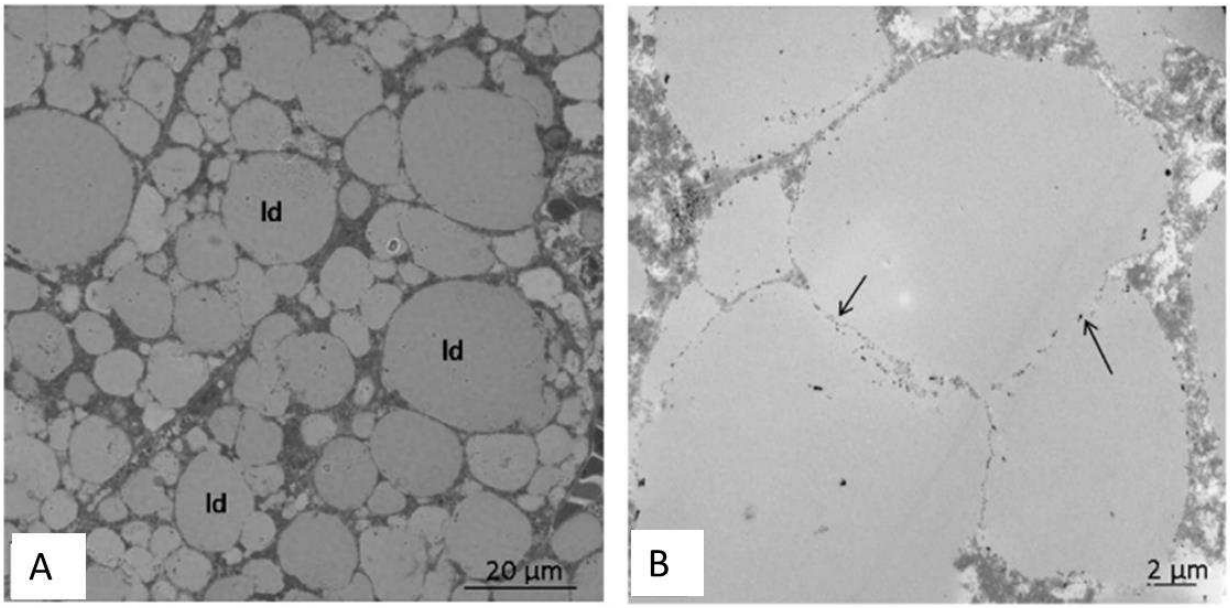


Figure 1.5. Coupes histologiques de foie gras avant (A) et après cuisson (B) (Théron et al., 2011)

Les coupes de foie gras observées par microscopie optique permettent d'observer les gouttelettes lipidiques (ld) avant (A) et après cuisson (B). Les matériaux denses aux électrons (ex : les protéines spécialement ciblées sur la surface des gouttelettes lipidiques) sont souvent situés à la périphérie des gouttelettes (flèches).

Lors du gavage, les gouttelettes lipidiques se regroupent en gouttelettes de plus grandes tailles lié à la pression exercée par l'engraissement des cellules et leur rapprochement physique. Il a également pu être observé que ces gouttelettes lipidiques de grandes tailles présentaient une intensité d'absorption de la lumière, en microscopie électronique, plus forte que chez les groupes présentant de plus petites gouttelettes (**Figure 1.5**). Cette différence d'intensité a hypothétiquement mis en lien avec la composition chimique des lipides, et en particulier leur insaturation. Un acide gras poly-insaturé présente une densité aux électrons supérieure qu'un acide gras mono insaturé. Finalement, ces grandes gouttelettes lipidiques, plus chargées en acide gras poly-insaturés, seraient plus enclines à fondre lors de la cuisson de par la modification chimique des acides gras (création de liaison double facilite l'oxydation des acides gras) et par la fragilité des nouvelles membranes fusionnées (Théron et al., 2011).

c. Indicateurs prédictifs de la qualité du foie gras

Au départ, les animaux ont été sélectionnés dans le but d'obtenir de plus gros foies gras après la période de gavage. La filière est passée du canard de Barbarie au canard mulard, un canard hybride favorisé par un effet d'hétérosis. Cependant, il a pu être mis en évidence une corrélation positive entre le taux de fonte et le poids du foie gras (r = + 0,65), ainsi qu'avec les lipides du foie (r = + 0,76) (Marie-Etancelin et al., 2011). Dorénavant la filière ne cherche plus à produire plus mais à produire mieux et pour cela des indicateurs de qualité du foie ont été développés. Ces évaluations ont lieu après l'abattage des animaux avec par exemple les mesures infra rouges pouvant prédire les caractéristiques biochimiques du foie gras, c'est-à-dire le taux de fonte, pour valoriser au mieux les produits sur la chaîne de transformation (ex : les foies avec un taux de fonte trop élevé étant utilisés pour la production de rillettes). La question est dorénavant de déterminer des indicateurs prédictifs du foie gras avant ou pendant la mise en gavage.

Des critères pré-gavage, prédictifs de la qualité des foies n'ont pas encore été déterminés. Cependant de nombreuses études montrent des relations entre des biomarqueurs plasmatiques et le poids de foie (Mozduri et al., 2021) ou entre une adipokine, la chémérine, et l'engraissement des volailles (Mellouk, Ramé, Barbe, et al., 2018). La chémérine est exprimée et secrétée majoritairement par les adipocytes, mais également par les hépatocytes, et se retrouve dans le sang. Des résultats contradictoires ont pu être observés chez les volailles. Effectivement, chez la dinde et les femelles reproductrices des poulets de chair, des corrélations négatives ont été obtenues entre la chémérine plasmatique et les acides gras circulants ou l'engraissement périphérique (Diot et al., 2015; Mellouk, Ramé, Barbe, et al., 2018). *A contrario*, chez le canard de Barbarie, il a été montré que la chémérine plasmatique était positivement corrélée avec la concentration en triglycérides plasmatiques (r = + 0,80) et la teneur en lipides hépatiques (r = + 0,67), en fin de période de gavage (Mellouk et al., 2019).

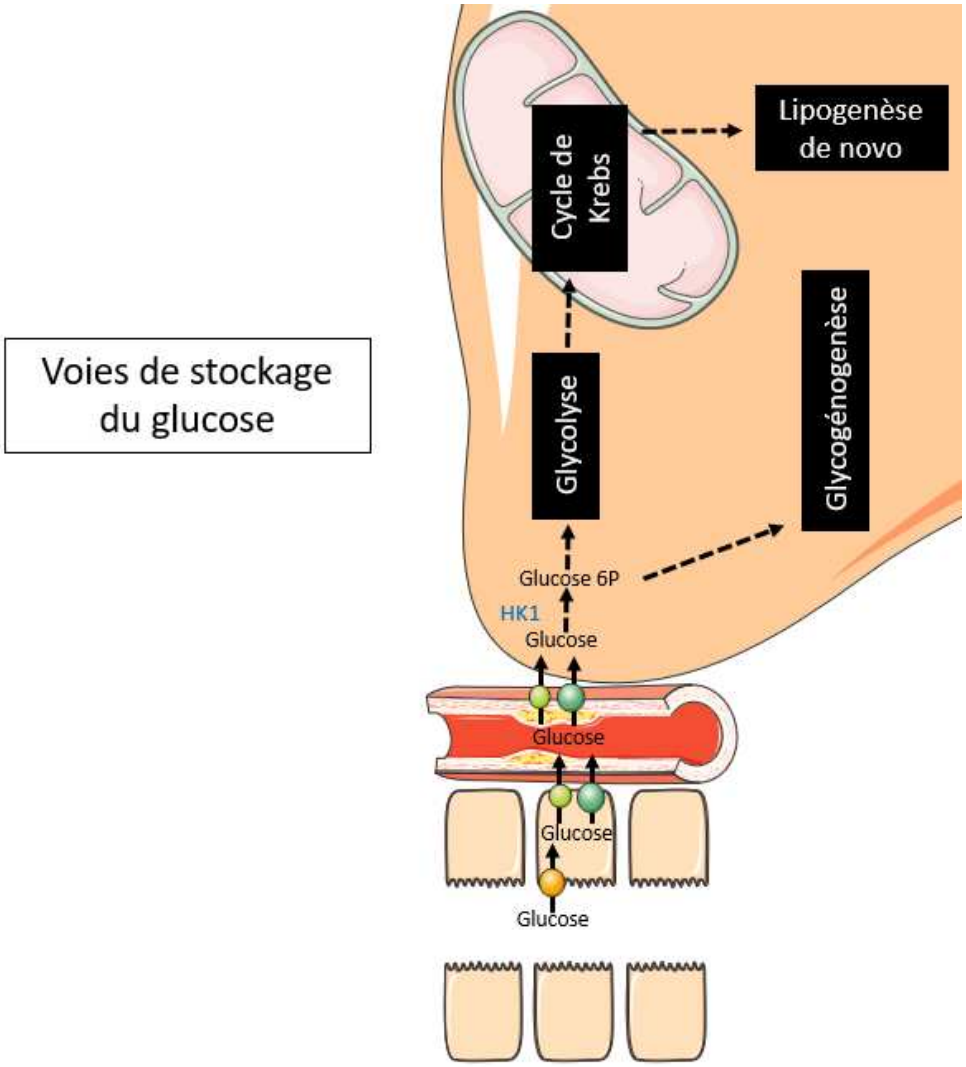


Figure 1.6. Représentation des voies de stockage du glucose dans le foie

Lorsque le glucose arrive dans les hépatocytes, ce dernier peut être stocké sous forme de lipides, via la lipogenèse *de novo* ou bien sous forme de polymères de glucose via la glycogénogénèse. Les deux voies nécessitent la transformation du glucose en glucose 6 phosphate (G6P) par l'hexokinase (HK).
La Figure a été réalisée à l'aide d'images libres de droit sur le serveur « Servier Medical Art » (http://smart.servier.com/).

2. Les mécanismes biologiques à l'origine du foie gras et de sa réversibilité

2.1. Stéatose hépatique

Certaines situations dans la nature, comme l'hibernation ou la migration, nécessitent des adaptations physiologiques afin de répondre aux besoins énergétiques. Pour cela, les animaux sauvages réalisent des stocks d'énergie sous forme de lipides, majoritairement dans les adipocytes chez les mammifères et dans les hépatocytes chez les oiseaux (Hermier et al., 1999; Tavernier, 2016). Ces stockages sont permis par la juxtaposition de deux métabolismes biologiques : le métabolisme glucidique et le métabolisme lipidique (**Figure 1.6**).

La stéatose hépatique est un mécanisme biologique qui permet l'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes chez les oiseaux migrateurs (Baéza et al., 2013). Elle est liée à une hyperphagie des individus, augmentation de la consommation alimentaire, et entraine donc un changement du ratio lipide/sucre dans l'organisme (Dolnik & Blyumental, 1967). La stéatose hépatique est donc chez les oiseaux migrateurs un phénomène naturel et réversible mis en place pour répondre à des besoins énergétiques exceptionnels (Geneviève Bénard et al., 2006). *A contrario*, ce mécanisme est connu chez l'homme pour engendrer une pathologie appelée Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) (Sanches et al., 2015). C'est ce mécanisme spécifique de la stéatose hépatique qui est à l'origine de la production de foie gras chez les canards et les oies (Gerzilov et al., 2013; Hermier et al., 1999). Effectivement, la stéatose peut être poussée à l'extrême lors des périodes de gavage multipliant par un facteur 10 le poids du foie d'une oie en une quinzaine de jours (Hermier et al., 1999). Il ne faut pas oublier que les réponses au gavage diffèrent selon la génétique des individus et que le canard mulard, hybride stérile, bénéficie d'un effet d'hétérosis lui permettant une production de foie gras plus efficace que le canard de Barbarie (Baéza et al., 2005; Larzul et al., 2006; Tavernier et al., 2016).

De par le croisement des canards, la sélection génétique et l'amélioration des techniques d'élevage, la production de foie gras a pu être améliorée et gagner en qualité. Cependant, il existe une très forte variabilité de poids de foie à la fin de la période de gavage. Cette variabilité n'est pas encore tout à fait expliquée par la génétique ou par des paramètres zootechniques, comme le poids de la carcasse. La variabilité des taux de fonte des foies est également problématique au vu de la commercialisation des produits. Dans le but de comprendre et de mieux maîtriser la stéatose hépatique, de nombreuses études ont cherché à expliquer les mécanismes biologiques sous-jacents à cette dernière (Annabelle et al., 2017; Baéza et al., 2013; Bonnefont et al., 2019; Chartrin, Bernadet, Guy, Mourot, Duclos, et al., 2006; Chartrin, Bernadet, Guy, Mourot, Hocquette, Rideau, Duclos, et al., 2006; Chartrin, Bernadet, Guy, Mourot, Hocquette, Rideau, Jacques, et al., 2006; Tavernier, Ricaud, Bernadet, Davail, et al., 2017).

La stéatose hépatique est mise en route par la grande quantité de maïs ingérée, riche en glucose, pendant les deux semaines de gavage. Le glucose apporté est rapidement transformé en lipides par les voies métaboliques de la glycolyse et de la lipogenèse, puis stocké dans le foie. En plus d'être riche en glucose, la poudre de maïs est carencée en choline réduisant l'exportation des lipides du foie vers les tissus périphériques (Hermier et al., 1999).

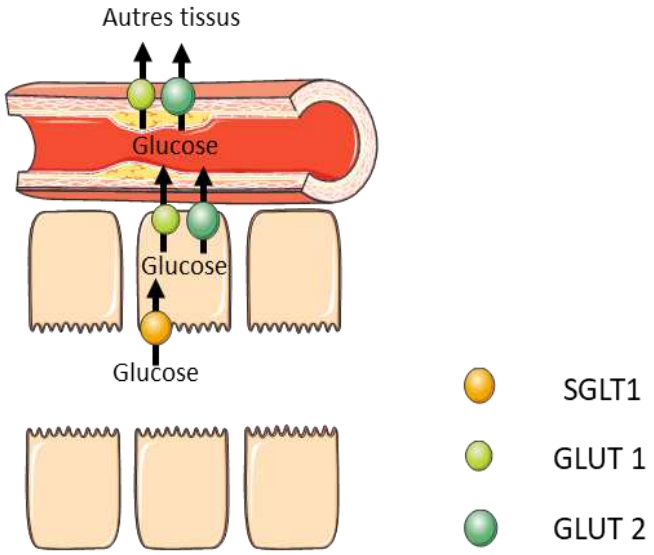


Figure 1.7. Absorption du glucose par les cellules intestinales

Le glucose entre dans les entérocytes via les Sodium Glucose Like Transporter 1 (SGLT1) et traverse les différents tissus via les glucose transporters (GLUT). Le schéma est basé sur le schéma de A. Tavernier (*Thèse, 2016*).
La Figure a été réalisée à l'aide d'images libres de droit sur le serveur « Servier Medical Art » (http://smart.servier.com/).

Glycogénogenèse

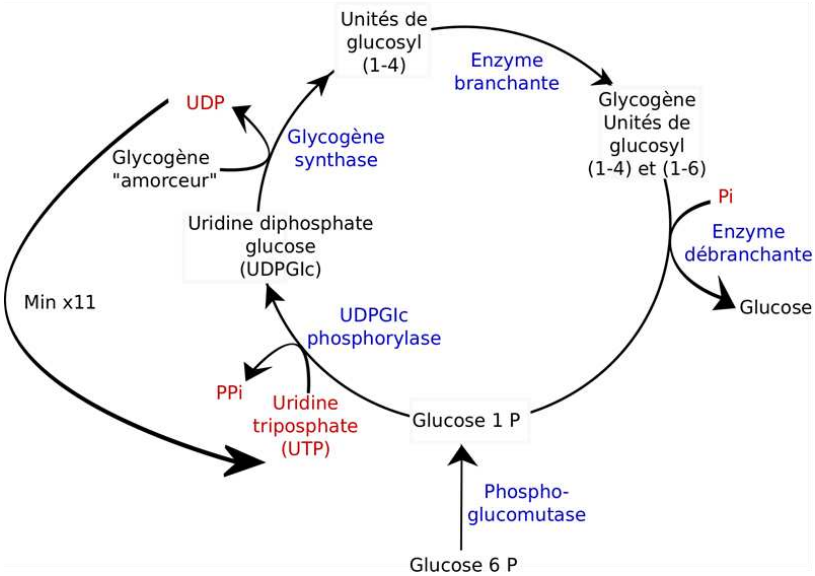


Figure 1.8. Représentation de la glycogénogénèse

La glycogénogénèse permet de stocker rapidement le glucose sous forme de glycogène, à partir du glucose 6 phosphate (G6P) puis du glucose 1 phosphate (G1P). Le schéma est basé sur les schémas de P. A. Mayes (*Thèse, 1995*) et le manuel « Biologie tout le cours en fiches (Licence, CAPES, prépas) » (*2nd édition, Dunod*).

2.1.1. Entrée du glucose dans le foie et sa circulation

Les oiseaux sont caractérisés par une forte glycémie avec des valeurs entre 1,4 et 2,4 g/L, et la glycémie ne semble pas être impactée par le jeûne (Chartrin, Bernadet, Guy, Mourot, Hocquette, Rideau, Jacques, et al., 2006; Farhat & Chavez, 2000; Massimino et al., 2019; Tavernier, Ricaud, Bernadet, Davail, et al., 2017). Cette circulation du glucose dans l'organisme est contrôlée par deux hormones pancréatiques qui seront décrites par la suite avec d'autres régulateurs des voies métaboliques.

L'alimentation des canards est riche en amidon (30 à 50 % de la matière sèche des aliments), polymère de glucose, qui est rapidement hydrolysé par des enzymes pancréatiques et intestinales avant de pouvoir être absorbé par l'organisme. Le glucose est le principal sucre absorbé par les cellules intestinales chez les oiseaux (Braun & Sweazea, 2008), via les transporteurs de glucose comme le SGLT1 (Sodium Glucose Like Transporter 1) ou bien les GLUT (Glucose Transporter) (**Figure 1.7**).
Les transporteurs SGLT1 présentent une forte affinité au niveau apical des cellules intestinales et permettent l'entrée du glucose dans les cellules intestinales en co-transportant du sodium. Les GLUT quant à eux permettent l'absorption du glucose dans les différents tissus via des diffusions facilitées. Les transporteurs GLUT se répartissent en plusieurs isoformes présents dans différents tissus et sont dits tissus spécifiques. Le GLUT1 a essentiellement été identifié dans l'intestin, le muscle, le cerveau, le foie ou le tissu adipeux et GLUT2 dans l'intestin, le foie et le pancréas chez le poulet (Kono et al., 2005).

2.1.2. Voies de stockages du glucose sous forme de glycogène et de lipide

Deux voies de stockage s'ouvrent au glucose après son entrée dans le foie. Il peut soit être stocké sous forme de glycogène soit sous forme de lipides.

a. Réponse rapide de la glycogénogenèse : formation de glycogène

La glycogénogenèse est une forme de stockage rapide sous forme de grands polymères ramifiés de glucose (**Figure 1.8**). Le glycogène est également rapidement mobilisable pour maintenir la glycémie entre les repas (Didier et al., 1983).

La glycogénogenèse débute par la transformation du glucose-6-phosphate (G6P) en glucose-1-phosphate (G1P) puis l'activation de G1P par l'uridine diphosphate (UDP) phosphorylase. Le glycogène synthétase peut ensuite venir créer une liaison glycosidique entre le carbone n°1 du G1P et le carbone n°4 d'une molécule de glycogène amorceur. Lorsque la chaîne se trouve rallongée d'au minimum 11 molécules de glucose, une enzyme dite « branchante » entre en jeu. L'enzyme branchante permet de transférer la nouvelle extension du glycogène, fixée en liaison glycosidique (1-4), vers une chaîne voisine en liaison glycosidique (1-6). Cette étape permet la ramification du glycogène.

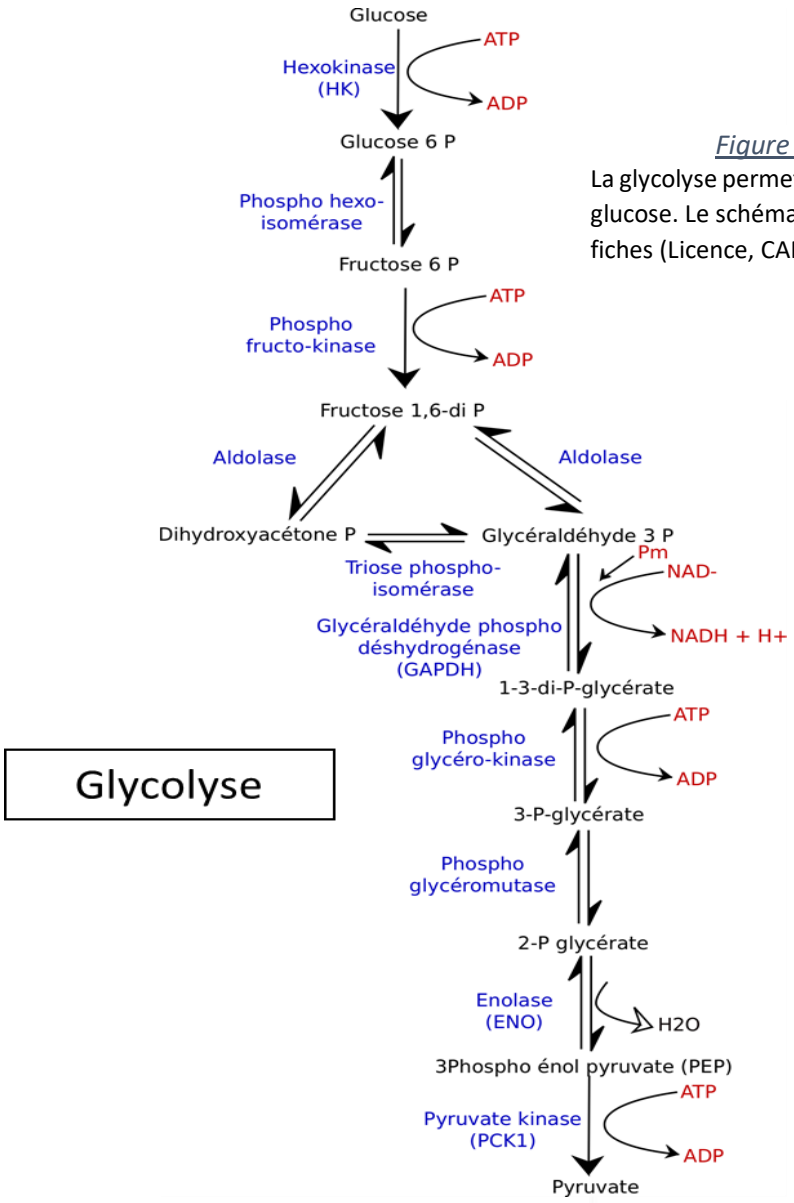


Figure 1.9. Représentation de la glycolyse

La glycolyse permet d'obtenir deux molécules de pyruvate à partir du glucose. Le schéma est basé sur le manuel « Biologie tout le cours en fiches (Licence, CAPES, prépas) » (*2nd édition, Dunod*).

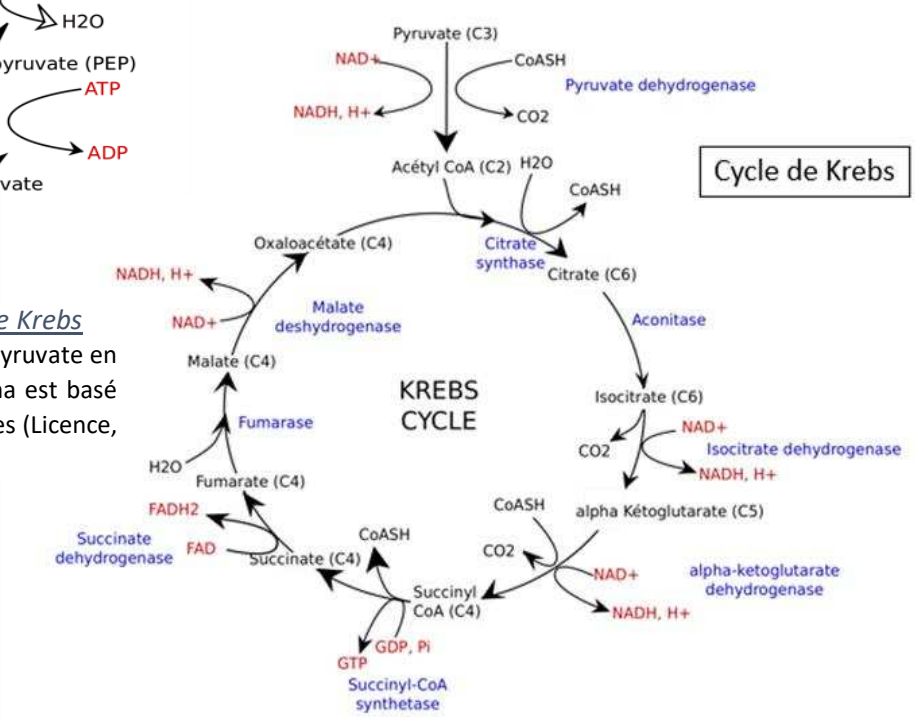


Figure 1.10. Représentation du cycle de Krebs

Le cycle de Krebs permet de transformer le pyruvate en malate au sein des mitochondries. Le schéma est basé sur le manuel « Biologie tout le cours en fiches (Licence, CAPES, prépas) » (*2nd édition, Dunod*).

b. Réponse secondaire : formation de lipides via la lipogenèse *de novo*

Les lipides sont utilisés pour couvrir les besoins de l'organisme. Ils constituent la réserve principale d'énergie. C'est majoritairement le processus de lipogenèse *de novo* (LDN) qui permet la synthèse des lipides et acides gras au sein des hépatocytes à partir de précurseurs non-lipidiques, comme les carbohydrates (Ding et al., 2012).

1° La glycolyse

Dès son entrée dans le cytoplasme, le glucose est dégradé par une série de réactions enzymatiques : la glycolyse (Chevalet et al., 2012). La glycolyse dégrade le glucose dans le cytoplasme donnant ainsi deux molécules de pyruvate (**Figure 1.9**).

Tout d'abord, le glucose est phosphorylé en G6P par l'action de l'hexokinase (HK). Les hexokinases sont les premiers acteurs de la glycolyse et présentent quatre isoenzymes (HK1, HK2, HK3 et HK4) chez les vertébrés (Printz et al., 1993). Les isoformes se distinguent par leur affinité avec le glucose et le G6P, les formes HK1, HK2 et HK3 ont une forte affinité et sont inhibées par le G6P contrairement à HK4 qui présente une faible affinité avec le glucose et n'est pas inhibé par le G6P (Printz et al., 1993). La présence de ce dernier isoforme n'a pas encore pu être démontrée chez les oiseaux mais une séquence présentant 80 % d'homologie, avec l'isoforme 4 humain, a pu être mise en évidence dans le génome de poulet (Berradi et al., 2005).

Après une première phosphorylation du G6P, une autre réaction endergonique a lieu, passant du fructose-6-phosphate au fructose-1,6-bisphosphate via la 6-phosphofructose-1-kinase (6PF1K). Après l'obtention du glycéraldéhyde-3-phosphate par l'aldolase, ce dernier sera transformé en 1-3-di-phosphate-glycérate par le glycéraldéhyde phosphodéshydrogénase (GAPDH).
Les deux dernières enzymes de la glycolyse sont également des enzymes clefs. L'enolase (ENO), qui permet le passage entre le 2-phosphate-glycérate et le 3-phosphoénol pyruvate, et la pyruvate kinase (PCK) qui catalyse la dernière étape de la glycolyse. La dernière étape de la glycolyse permet de passer du 3-phospho-énol-pyruvate (PEP) au pyruvate.

2° Le cycle de Krebs et le transfert des produits dans le cytoplasme cellulaire

Le pyruvate est ensuite transformé en acétyl co-enzyme A (CoA) par le pyruvate déshydrogénase (PDH) (**Figure 1.10**), et peut ensuite entrer dans le cycle de Krebs, qui se déroule entièrement dans la matrice mitochondriale. Le cycle de Krebs permet de transformer l'acétyl CoA en citrate via le citrate synthase (**Figure 1.10**) (Chevalet et al., 2012). La suite du cycle de transformation produit des transporteurs d'électrons (NADH, H^+, $FADH_2$) qui entreront en jeu dans la production d'énergie dans la chaîne respiratoire.
Le citrate quant à lui est une molécule qui est capable de traverser la double membrane mitochondriale pour amener de l'acétyl CoA dans le cytoplasme et ainsi produire des lipides et des acides gras via la lipogenèse *de novo*.

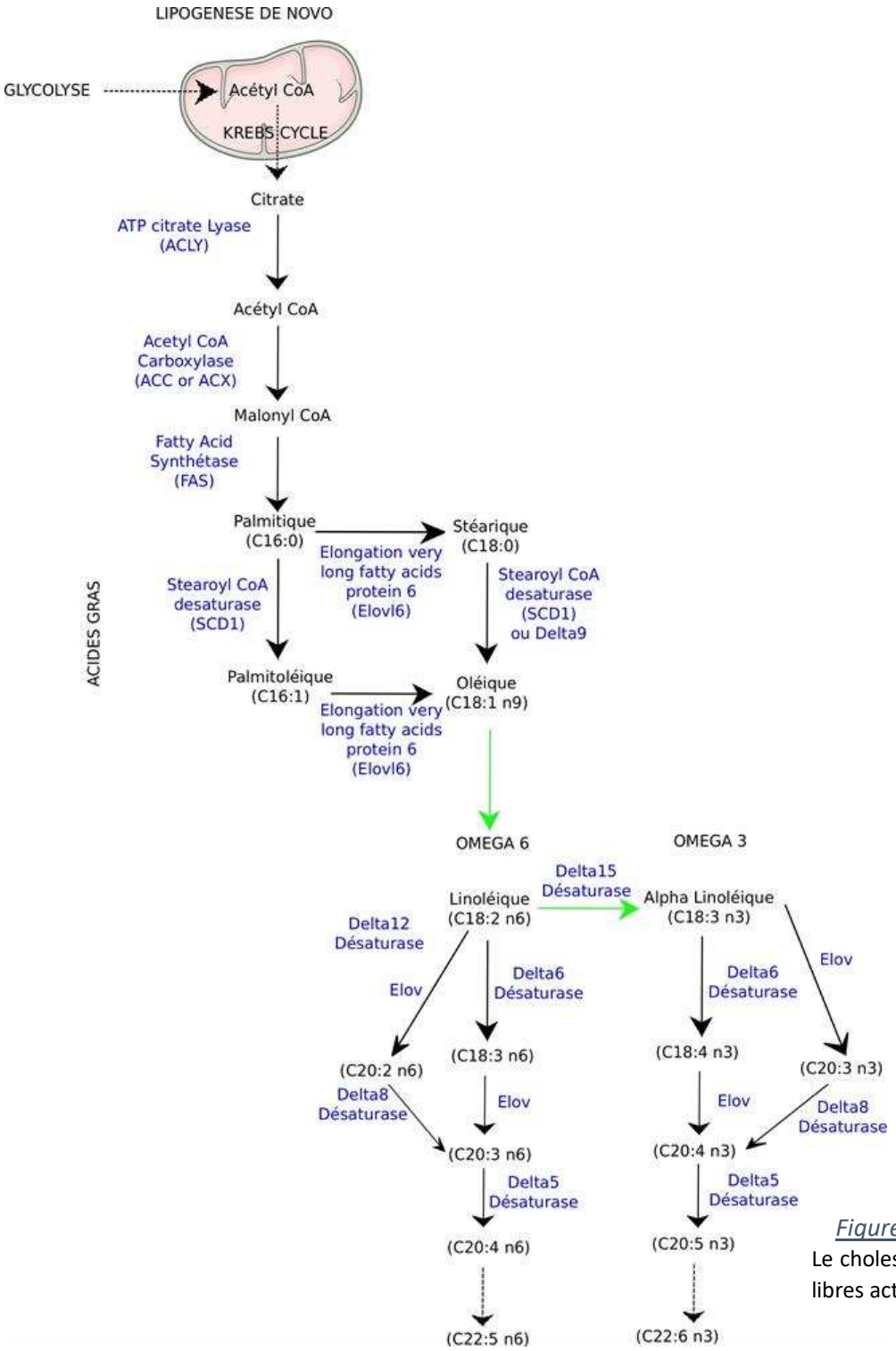


Figure 1.11. Représentation de la lipogenèse de novo (LDN)

La lipogenèse permet la synthèse des différents acides gras libres et principalement de l'acide palmitique (C16 :0), l'acide stéarique (C18 :0) et l'acide oléique (C18 :1). La synthèse des acides gras poly-insaturés (C18 :2 n6, C18 :3 n3) n'est pas possible chez les oiseaux et doivent être apporté par l'alimentation. Le schéma est basé sur les schémas de L. Théron et W. Massimino (*Thèses 2011 et 2019*) et le chapitre Lipids (*Benjamins, Murphy, Seyfried, 2012*).

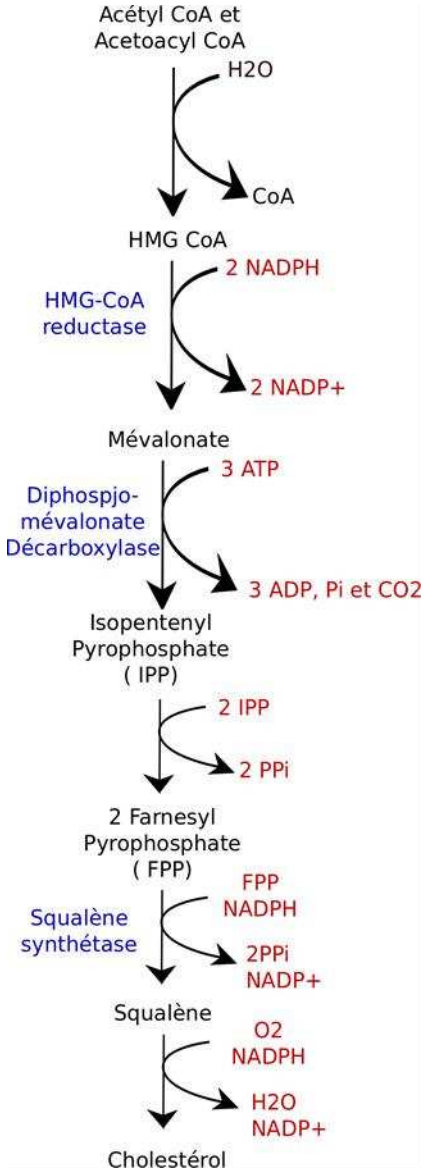


Figure 1.12. La formation du cholestérol

Le cholestérol est formé à partir des acides gras libres activés (acétyl CoA et acétoacyl CoA).

3° La lipogenèse *de novo* : formation des différents lipides

Contrairement au glucose qui arrive en excès dans l'organisme, les lipides ne représentent que 3 à 4 % de la matière sèche de la poudre de gavage. La synthèse *de novo* des lipides est donc nécessaire pour stocker un maximum d'énergie chez les oiseaux (**Figure 1.11**).

La synthèse des lipides et acides gras passe par la transformation du citrate formé par le cycle de Krebs en Acétyl CoA via l'adénosine triphosphate (ATP) citrate lyase (ACLY). L'acétyl CoA est le précurseur des acides gras, des triglycérides, du cholestérol et autres lipides.

Pour la synthèse des acides gras, l'Acétyl CoA est transformé en Malonyl CoA via l'acétyl CoA carboxylase (ACC) (Chevalet et al., 2012). Ce Malonyl CoA va être changé en acide gras, acide palmitique (C16 :0), via l'acide gras synthétase (FASN). Il s'en suit des réactions d'élongation (Elongation of very long chain fatty acid, ELOVL) ou de désaturation (Stearol CoA Desaturase, SCD1) de la chaîne carbonée de l'acide gras (AG) permettant la production des acides stéarique (C18 :0) ou palmitoléique (C16 :1) respectivement. L'élongation ou la désaturation de ces deux AGs permet l'obtention de l'acide oléique (C18 :1). La désaturation de ce dernier AG permet d'obtenir des AGs poly-insaturés n6 (Oméga 6) et leurs désaturations forment des AGs poly-insaturés n3 (Oméga 3). L'obtention des AGs poly-insaturés à partir des AGs mono-insaturés n'est pas possible chez les oiseaux. Effectivement, la création d'une liaison double autour du carbone 9 nécessite les désaturases 12 et 15, uniquement présentes chez les plantes (Bird et al., 2018; Cherian, 2015; Freitas et al., 2017). Les concentrations en acides linoléique (C18 :2 n6, LA) et alpha-linolénique (C18 :3 n3, ALA) ne dépendent que de la composition de l'aliment ingéré. Cependant, une fois que ces deux AGs sont présents dans le foie, ils peuvent subir des élongations pour atteindre des chaînes comprenant entre 20 et 22 carbones.
Ces nombreuses voies d'élongation et/ou de désaturation permettent l'obtention d'une grande diversité de lipides.

Ces AGs peuvent également être associés entre eux et/ou à d'autres molécules pour composer de nouveaux lipides comme le cholestérol, les triglycérides ou les phospholipides (Benjamins et al., 2012; G. S. Han & Carman, 2013).
Les triglycérides sont synthétisés en deux étapes (**Figure 1.12**). Dans un premier temps, du glycérol-3-phosphate s'associe avec deux acyl-CoA pour former un diglycéride. Un troisième acyl-CoA vient s'ajouter au diglycéride pour donner un triglycéride (TG). Lorsque l'apport alimentaire dépasse les besoins énergétiques, la production de triglycérides est d'autant plus importante et son stockage l'est également. Le cholestérol est formé à partir d'acétyl CoA et d'acétoacyl CoA et passe par une multitude d'intermédiaires avant l'obtention du cholestérol final (**Figure 1.13**).
Des phospholipides peuvent également être synthétisés à partir des AGs, mais leur synthèse nécessite de nombreux intermédiaires comme le phosphatidate. La synthèse du phosphatidate (PA) nécessite la synthèse des précurseurs (phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidicholine (PC)) qui font intervenir l'éthanolamine et la choline pour leurs synthèses (**Figure 1.14**).

Les lipides majoritairement stockés dans le foie lors de la stéatose hépatique correspondent aux triglycérides, composés en majorité par le palmitate (C16 :0), l'acide stéarique (C18 :0) et l'acide oléique (C18 :1) (Chartrin, Bernadet, Guy, Mourot, Hocquette, Rideau, Duclos, et al., 2006).

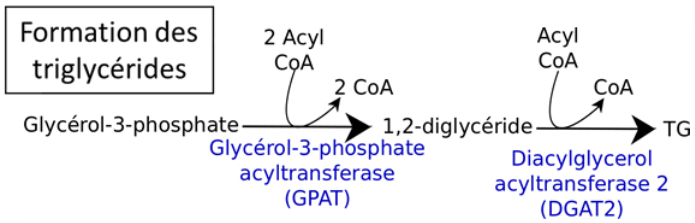


Figure 1.13. La formation des triglycérides

Les triglycérides (TG) sont formés à partir de trois acides gras libres activés (glycérol). Le schéma est basé sur le manuel « Biologie tout le cours en fiches (Licence, CAPES, prépas) » (*2nd édition, Dunod*).

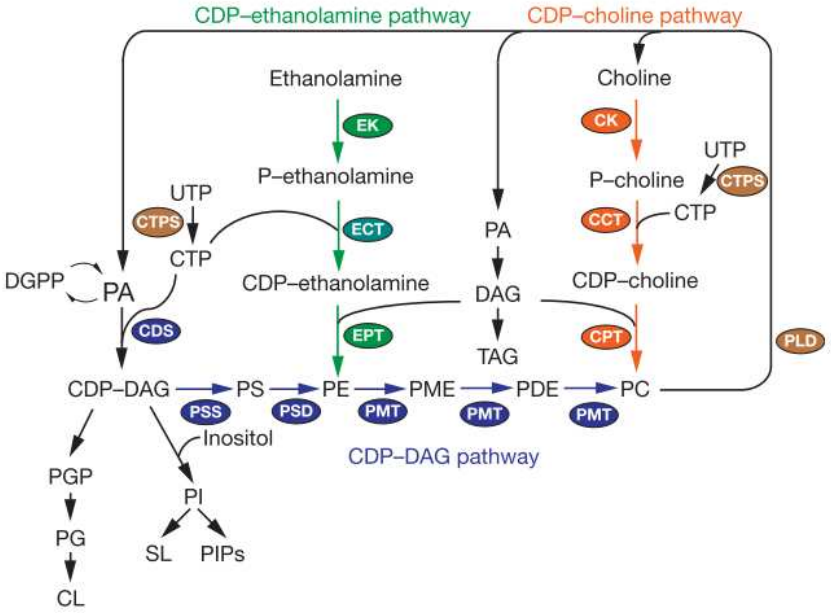


Figure 1.14. La formation des phospholipides via le phosphatidate (Han et Carman, 2013)

La synthèse des phospholipides inclut de nombreuses étapes intermédiaires comme représenté dans le schéma. Les voies de CDP–DAG, de CDP–choline, et de CDP–éthanolamine sont indiquées. Les enzymes CDP–DAG synthase (CDS), PS synthase (PSS), PS décarboxylase (PSD), et le PE méthyltransférases (PMT) catalysent les réactions permettant la formation de PC par la voie CDP–DAG (en bleu). La choline kinase (CK), choline–P cytidylyltransférase (CCT), et choline phosphotransférase (CPT) catalysent les réactions permettant la formation de PC via la voie de CDP–choline (en rouge). L'éthanolamine kinase (ET), éthanolamine-P cytidylyltransférase (ECT), and éthanolamine phosphotransférase (EPT) catalysent les réactions permettant la formation de PE par la voie CDP–ethanolamine (en vert). Les réactions catalysées par CTP synthétase (CTPS) et phospholipase D (PLD) sont montrées en marron.

PA phosphatidate, CDP–DAG CDP–diacylglycérol, PS phosphatidylsérine, PE phosphatidyléthanolamine, PME phosphatidyl mono méthyléthanolamine, PDE phosphatidyl diméthyl éthanolamine, PC phosphatidylcholine, DAG diacylglycérol, TAG triacylglycérol, PGP phosphatidyl glycérophosphate, PG phosphatidylglycérol, CL cardiolipine, SL sphingolipides, PIPs polyphosphoinositides, DGPP diacylglycérol pyrophosphate

4° Transport des lipides

La synthèse des lipides est majoritairement réalisée dans le foie, cependant leur stockage se répartit dans les différents tissus périphériques, avec 40 g de lipides dans 100 g de foie, 4 g de lipides dans 100 g de muscle et 91 g de lipides dans 100 g de tissu adipeux, après le gavage (Chartrin, Bernadet, Guy, Mourot, Hocquette, Rideau, Jacques, et al., 2006). Cette répartition des lipides n'est possible que par leur mise en circulation dans le sang et entre les différents tissus. La circulation des lipides dans le sang est importante et augmente de façon significative lors du gavage (Bonnefont et al., 2019; Tavernier, Ricaud, Bernadet, Gontier, et al., 2017). Les triglycérides plasmatiques peuvent atteindre les 5 mmol/L en fin de gavage contre les 2 mmol/L avant gavage (Tavernier, Ricaud, Bernadet, Gontier, et al., 2017).

Les lipides néosynthétisés vont être exportés vers d'autres tissus, en ayant été préalablement estérifiés en triglycérides (TG). Le transport des lipides est réalisé par des vésicules, appelées lipoprotéine. Pour être exportés, les TGs s'associent à des lipoprotéines comme les HDL (high density lipoprotein), les LDL (low density lipoprotein) ou les VLDL (very low density lipoprotein), qui sont les trois lipoprotéines majoritaires en circulation (Das & Gursky, 1994). Les VLDLs sont principalement composées de TGs et les HDLs et les LDLs transportent en majorité du cholestérol (**Figure 1.15**). Ces trois lipoprotéines sont secrétées par le foie et nécessitent pour leur formation des Apolipoprotéines B (ApoB) (Olofsson & Boren, 2005) ainsi que l'intervention de la microsomal triglycerides transfer protein (MTTP). La MTTP conduit les AGs du réticulum endoplasmique vers le site d'assemblage des lipoprotéines (Gibbons, 1990), avant leur exportation dans le sang. Le contour des lipoprotéines est majoritairement constitué de phospholipides (tête polaire). Une quantité restreinte de phospholipides, par une carence en choline, limite l'exportation des lipides vers d'autres tissus que le foie. Finalement, une alimentation pauvre en choline, comme le maïs ou le sorgho, facilite l'engraissement du foie (Arroyo et al., 2016).

Les lipoprotéines présentes dans le sang vont être dégradées par la Lipoprotéine Lipase (LPL). Cette enzyme est secrétée au niveau des tissus périphériques, comme les adipocytes ou les cellules musculaires, permettant aux lipides de franchir les membranes. Les triglycérides présents dans les VLDLs vont être dégradés sous forme d'AGs libres et de glycérol. Ces molécules pourront être soit stockées, soit utilisées comme source d'énergie ou soit utilisées pour la synthèse des VLDLs au sein du tissu récepteur. Les acides gras qui ne sont pas captés, ou non-utilisés, par les tissus périphériques pourront être retournés et recaptés dans le foie via des récepteurs d'AGs spécifiques : FABP (Fatty Acid Binding Protein) et FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase, homologue de l'antigène CD36) (Auguet et al., 2014; Furuhashi et al., 2014; Koonen et al., 2007).

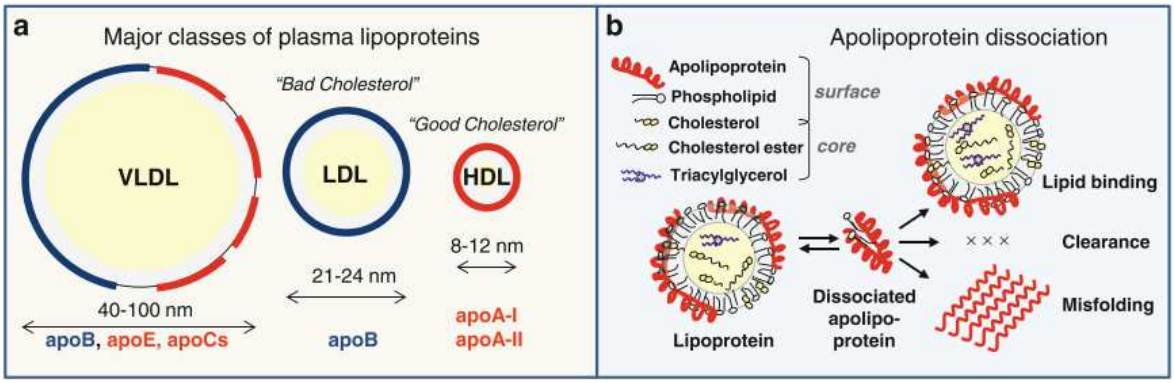


Figure 1.15. Les différentes lipoprotéines et leur composition (Das and Gursky, 1994)

Les grandes classes de lipoprotéines comprennent les VLDLs (very-low), LDLs (low-) et les HDLs (high-density lipoproteins) schématisé en A. Les lipoprotéines matures contiennent un cœur de lipides apolaires (esters de cholestérol et triglycérides, en jaune) entouré par une surface amphipathique incluant des lipides polaires (phospholipides et cholestérol, en gris) associés à des apolipoprotéines B (APOB).

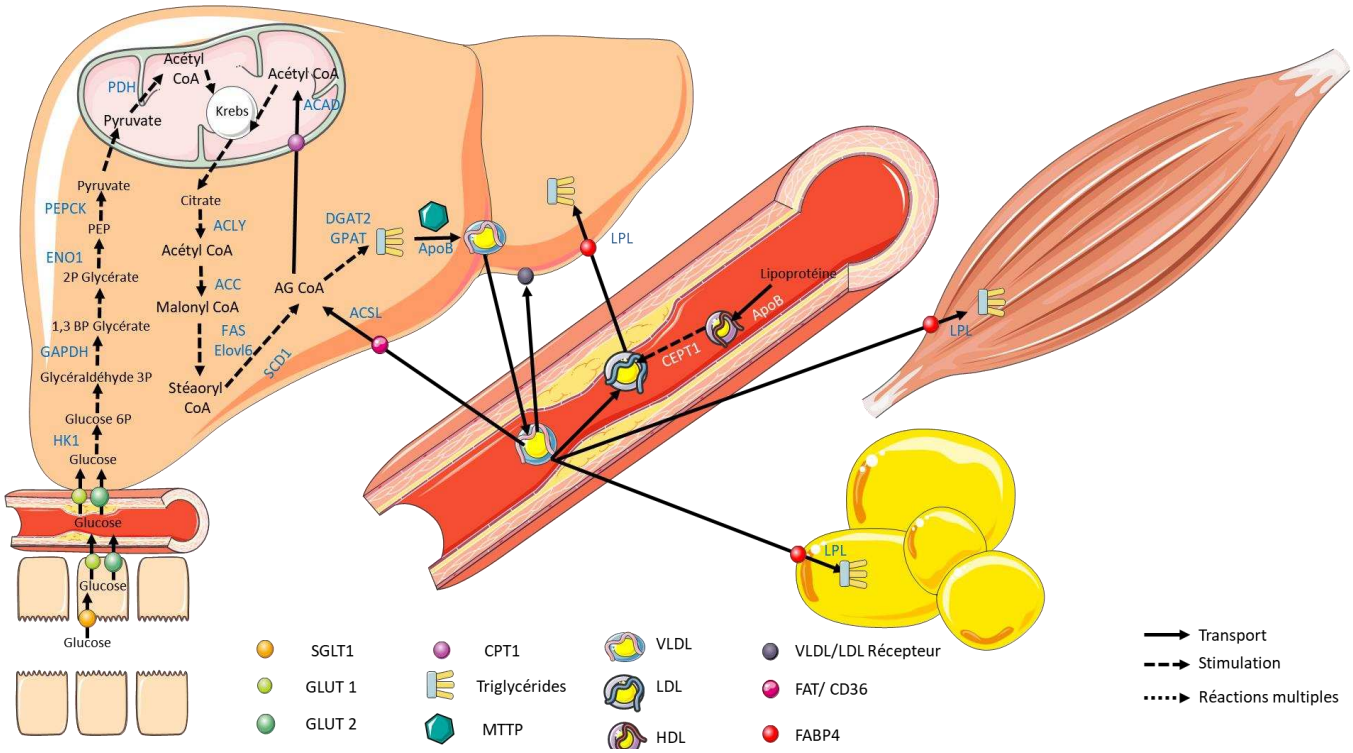


Figure 1.16. Mise en place de la stéatose hépatique

ACAD Acyl-CoA Dehydrogenase, ACC Acetyl CoA Carboxylase, ACLY ATP Citrate lyase, ACSL Acyl CoA Synthetase Long Chain, APOB Apolipoprotein B, CEPT1 Cholesteryl Ester Transfer Protein 1, CPT1 Carnitine Palmitoyl Transferase 1, DGAT2 DiacylGlycerol AcylTransferase 2, Elolv6 Elongation of Very Long Chain Fatty Acids Protein 6, ENO1 Enolase 1, FABP4 Fatty Acid Binding Protein, FAS Fatty Acid Synthetase, FAT/CD36 Fatty Acid Transporter/ Cluster of Protein, GLUT Glucose Transporter, GPA: Glycerol-3-Phosphate AcylTransferase, HDL High density Lipoprotein, HK1 Hexokinase 1, LDLR Low Density Lipoprotein Receptor, LPL Lipoprotein Lipase, MTTP Microsomal Triglyceride Transfer Protein, SGLT1 Sodium Glucose Linked Transporter 1, VLDLR Very Low Density Liporpotein Receptor

Le schéma est basé sur le schéma de A. Tavernier (*Thèse, 2016*), et a été réalisé à l'aide d'images libres de droit sur le serveur « Servier Medical Art » (http://smart.servier.com/).

FABP est une protéine membranaire qui permet le captage des AGs du plasma vers les sites des β-oxydations ou de la synthèse des phospholipides (He et al., 2012), et qui a été identifiée chez les mammifères, avec 12 isoformes dont trois (FABP4, FABP5 et FABP8) sont présents chez les poulets (R. Z. Liu et al., 2008). Il a pu être montré que dans les tissus hépatiques de canard l'isoforme 4 était présent et qu'il était surexprimé chez les mulards, permettant une plus importante accumulation des lipides dans le foie (Tavernier, 2016). FAT/CD36 a une activité plus faible que le précédent transporteur dans le foie cependant son expression est stimulée par des régimes alimentaires riches en graisses (Koonen et al., 2007), et également lors du gavage (Pioche et al., 2020)

Toutes les réactions vues précédemment permettent le stockage de l'énergie absorbée sous forme de lipides, et sont au cœur de la stéatose hépatique (**Figure 1.16**).

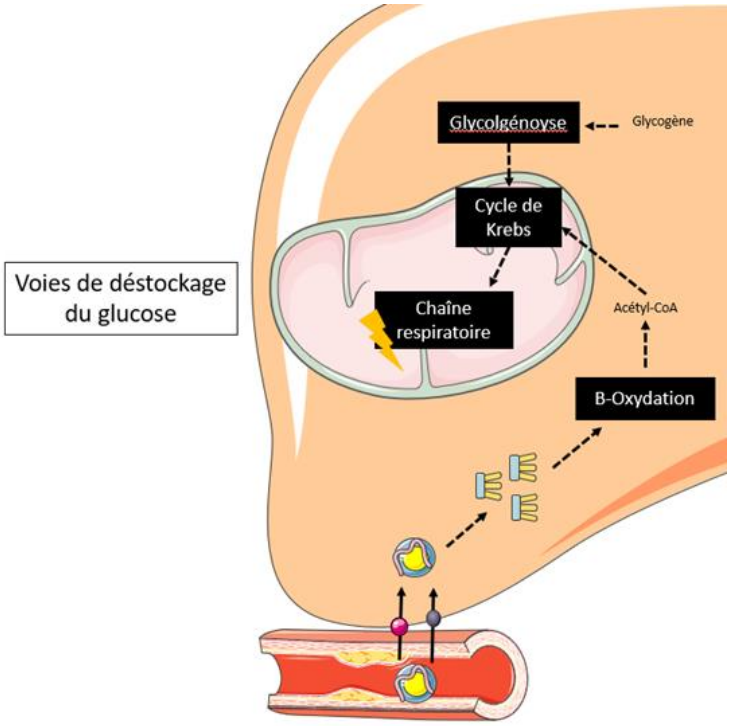


Figure 1.17. Les mécanismes de la réversibilité de la stéatose hépatique

Lorsque le métabolisme a besoin d'énergie (éclair), les lipides peuvent être utilisés via la Beta-oxydation et/ou le glycogène via la glycogénolyse, avant de passer dans le cycle de Krebs puis dans la chaîne respiratoire pour fournir de l'énergie.

La Figure a été réalisée à l'aide d'images libres de droit sur le serveur « Servier Medical Art » (http://smart.servier.com/).

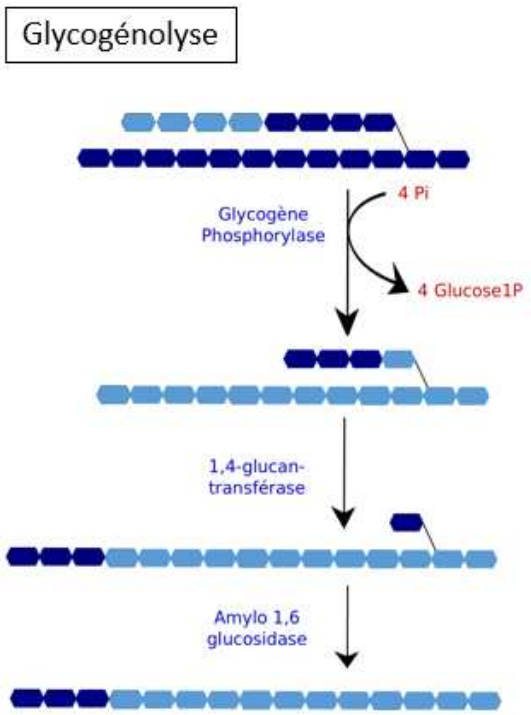


Figure 1.18. Représentation de la glycogénolyse

La glycogénolyse permet de dégrader le glycogène en molécules de glucose. Le schéma est basé sur le manuel « Biologie tout le cours en fiches (Licence, CAPES, prépas) » (*2nd édition, Dunod*).

2.2. La réversibilité de la stéatose hépatique

La stéatose hépatique est un phénomène réversible chez les oiseaux migrateurs (Baéza et al., 2013; Hermier et al., 1999). Effectivement, au-delà de 10h après le dernier repas de gavage, le foie commence à éliminer le surplus de lipides accumulés (Arroyo et al., 2018; Baudonnet-Lenfant et al., 1991). Le foie est capable d'accumuler de grandes quantités de lipides, mais également de les utiliser rapidement, comme au cours de la migration.

Dans le but d'étudier la réversibilité de cette accumulation, des oies ont été gavées selon trois durées de gavage (10, 13 et 16 jours) puis elles ont été replacées dans leurs conditions initiales d'élevage (Babilié et al., 1998). Après une quinzaine de jours, les oies ont rééquilibré leurs balances énergétiques et ont pu retrouver leur état physiologique d'avant gavage. De même, trois cycles de gavage/repos ont été testés sur des canards mulards, qui mettaient en moyenne quatre semaines avant de retrouver leur poids initial d'avant gavage sans développer de pathologie du foie (G. Bénard et al., 1998).

Ce retour du foie à son état initial est rendu possible grâce à l'utilisation des réserves énergétiques glucidique et lipidique précédemment constituées, dès l'arrêt du gavage (**Figure 1.17**). Cette utilisation des réserves a également lieu lors de petit challenge nutritionnel comme les périodes de jeûne entre les repas (Serr et al., 2009).

2.2.1. Utilisation du glycogène : glycogénolyse

L'enzyme principale de la glycogénolyse est la glycogène phosphorylase qui intervient au niveau des liaisons glycosidiques (1-4) des chaînes de glucose pour créer du G1P (**Figure 1.18**) (Chevalet et al., 2012).

Au niveau des ramifications, la glycogène phosphorylase s'arrête quand il reste environ quatre molécules de glucose, de part et d'autre de la ramification. Le reste de la ramification est transféré sur la chaine ramifiée via les enzymes amylo-1-6-glucosidase (enzyme débranchante) et l'alpha-1-4-glucan-transférase. La première enzyme peut reprendre la lyse de la chaîne jusqu'aux prochaines ramifications et jusqu'à la dégradation complète du glycogène.

Les molécules de G1P sont converties en G6P via la glucomutase, molécules pouvant être utilisées directement ou bien délocalisées dans d'autres tissus en passant par le sang.

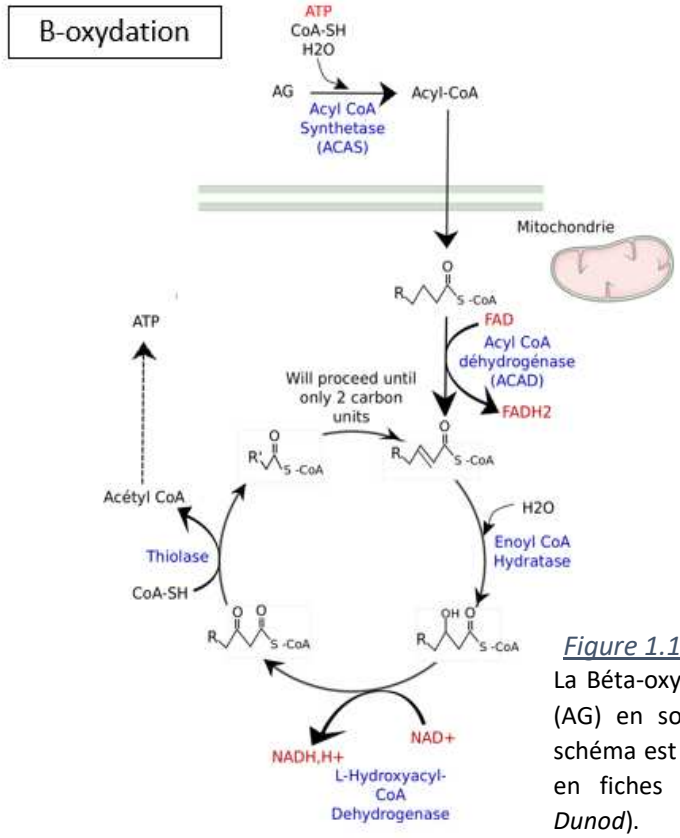


Figure 1.19. Représentation de la Béta-oxydation

La Béta-oxydation permet de dégrader les acides gras (AG) en source d'énergie dans la mitochondrie. Le schéma est basé sur le manuel « Biologie tout le cours en fiches (Licence, CAPES, prépas) » (*2nd édition, Dunod*).

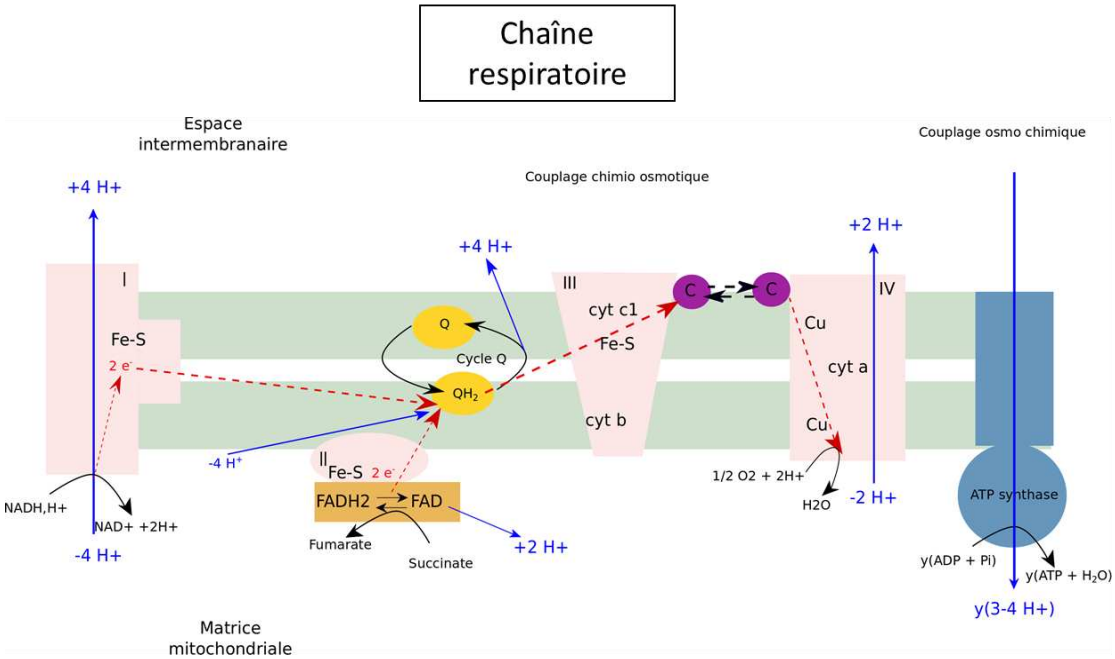


Figure 1.20. Schématisation de la chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire permet la synthèse d'énergie (ATP) à partir de gradient de protons (H+). Le schéma est basé sur le manuel « Biologie tout le cours en fiches (Licence, CAPES, prépas) » (*2nd édition, Dunod*).

2.2.2. Utilisation des lipides : Béta-oxydation

Lors du jeûne, les acides gras (AGs) sont activés en acyl-CoA, via l'acyl-CoA synthétase avant d'être transportés dans la matrice mitochondriale (Chevalet et al., 2012). Le mode de transport des acyl-CoA va se différencier en fonction de la longueur de chaîne. Les acyl-CoA à courtes (< 6 carbones) et moyennes (< 20 carbones) chaînes vont diffuser à travers les membranes par diffusion simple (ou facilitée). *A contrario* les acyl-CoA à chaînes longues (> 20 carbones) vont faire appel à un complexe enzymatique composé de trois protéines : la carnitine palmitoylé transférase 1 (CPT1), la carnitine acyl-carnitine translocase (CACT) et la carnitine palmitoyltransférase 2 (CPT2).
Ces acyl-CoA, composés de longues chaînes carbonées, sont découpés progressivement en plusieurs molécules d'acétyl CoA via des enzymes comme l'acyl-CoA déshydrogénase (ACAD), lors de la β-oxydation (**Figure 1.19**). Cette dégradation des acides gras est appelée la béta-oxydation et elle produit des cofacteurs utilisables par la chaîne respiratoire (NADH, H+, FADH2) et donc source d'énergie pour l'organisme (Lund et al., 2015).

2.2.3. Production d'énergie : la chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire se trouve sur la membrane interne de la mitochondrie et permet la production d'énergie (ATP) via la création d'un gradient protonique (**Figure 1.20**) (Chevalet et al., 2012). Tout d'abord, les translocations de protons, entre la matrice et l'espace intermembranaire, sont réalisés par des réactions d'oxydo-réduction de cofacteurs (NADH, H+ et FADH2) et la délocalisation d'électrons le long de la chaîne respiratoire. Les protons sont accumulés dans l'espace intermembranaire et vont permettre le fonctionnement de la pompe ATP synthase par un couplage osmo-chimique.

2.3. La régulation des voies métaboliques d'intérêt

La régulation des métabolismes glucidique et lipidique implique de nombreuses hormones et protéines que ce soit pour la voie anabolique ou catabolique.

Tout d'abord, l'insuline et le glucagon sont les principaux médiateurs hormonaux lors des périodes de jeûne et de réalimentation, et ils régulent l'activité de la lipogenèse, de la lipolyse et des enzymes associées (Alan G. Goodridge et al., 1984). L'insuline est impliquée dans le contrôle de la glycémie ainsi que de la lipogenèse *de novo* permettant le stockage du glucose sous la forme de triglycérides (Bedu et al., 2002). Cette hormone est principalement connue pour son action hypoglycémiante au sein de l'organisme. Elle est secrétée dans le sang, par les cellules β des îlots pancréatiques, lors de l'hyperglycémie, soit quand les concentrations en sucre circulant et en acides aminés circulants augmentent (Alan G. Goodridge et al., 1986). Le glucagon exerce des effets opposés à ceux de l'insuline en mobilisant les stocks d'énergie des cellules. Il est également produit par les îlots β-pancréatiques lors d'une baisse de concentration en sucre, dite hypoglycémie (Gerich et al., 1976).

La glycémie très élevée, chez les oiseaux, semble indiquer que ces deux acteurs clefs ne présentent pas les mêmes seuils d'action et réponses que les mammifères. Il a pu être montré que le canard gavé présentait une hyperglycémie en même temps qu'une hyper-insulinémie (Gontier et al., 2013).

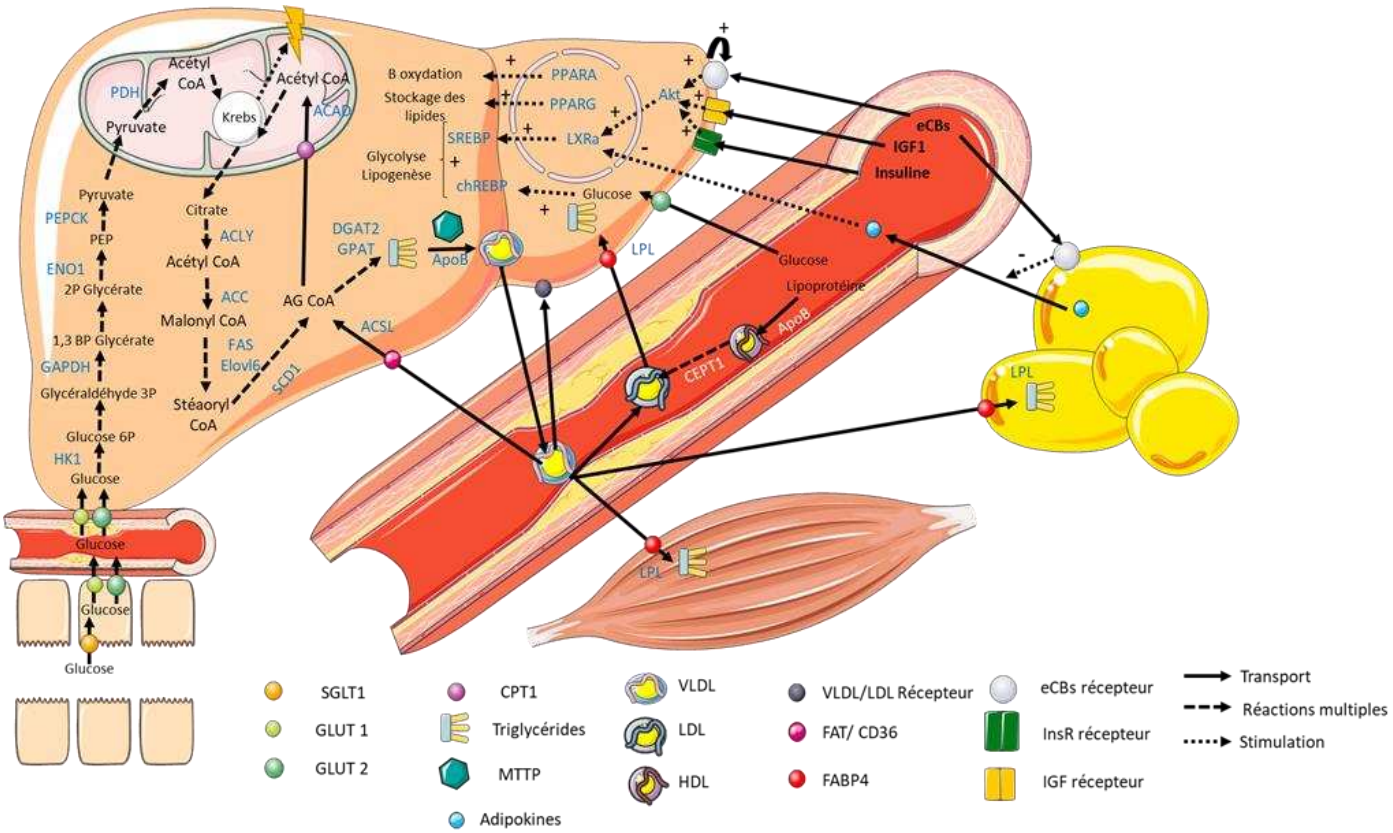


Figure 1.21. Mise en place de la stéatose hépatique et ses régulateurs lors de la prise alimentaire

Les différentes étapes de la stéatose hépatique, complété avec ses principaux régulateurs lors d'une prise alimentaire. ACAD Acyl-CoA Dehydrogenase, ACC Acetyl CoA Carboxylase, ACLY Akt Akt Protein kinase k, ATP Citrate lyase, ACSL Acyl CoA Synthetase Long Chain, APOB Apolipoprotein B, CEPT1 Cholesteryl Ester Transfer Protein 1,ChREBP Carbohydrate Response Element Binding Protein, CPT1 Carnitine Palmitoyl Transferase 1, DGAT2 DiacylGlycerol AcylTransferase 2, eCBs endocannabinoïdes, Elolv6 Elongation of Very Long Chain Fatty Acids Protein 6, ENO1 Enolase 1, FABP4 Fatty Acid Binding Protein, FAS Fatty Acid Synthetase, FAT/CD36: Fatty Acid Transporter/ Cluster of Protein, GLUT Glucose Transporter, GPAT Glycerol-3-Phosphate AcylTransferase, HDL High density Lipoprotein, HK1 Hexokinase 1, IGF1 Insulin like Growth factor, InsR Insulin Receptor, LDLR Low Density Lipoprotein Receptor, LPL Lipoprotein Lipase, LXRA Liver X Receptor Alpha, MTTP Microsomal Triglyceride Transfer Protein, PPARA/G Peroxysome Proliferator-Activated Receptor Alpha/Gamma, SREBP Sterol Regulatory Element Binding Protein, SGLT1 Sodium Glucose Linked Transporter 1, VLDLR Very Low Density Liporpotein Receptor

Le schéma est basé sur le schéma de A. Tavernier (*Thèse, 2016*) et complété par (*Silvestri et al., 2013*), et a été réalisée à l'aide d'images libres de droit sur le serveur « Servier Medical Art » (http://smart.servier.com/).

Les précurseurs du métabolisme glucidique peuvent également avoir un impact sur des acteurs clefs de la stéatose hépatique. Par exemple, le xylulose 5 phosphate (produit du cycle des pentoses phosphates) peut activer la translocation de facteurs de transcription comme ChREBP (*carbohydrate response element binding protein*) et ainsi induire l'expression de gènes cibles comme *l'ACC*, *l'ELOVL6* ou la *FASN* (Iizuka et al., 2013).

D'autres molécules permettent la régulation de la balance énergétique comme la leptine, la ghréline (Furuse et al., 2001) ou encore les récepteurs nucléaires PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*). Les PPAR se lient avec les acides gras polyinsaturés permettant de réguler l'expression des différents gènes impliqués dans les métabolismes glucidiques et lipidiques. Par exemple, PPARα est impliqué dans la régulation de la β-oxydation (Poulsen et al., 2012) et PPARγ stimule plutôt le stockage des lipides dans les tissus (Y. Wang et al., 2008). Des facteurs de transcription entrent également en jeu dans l'activation des deux métabolismes avec SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*), qui active la transcription des gènes de la glycolyse et de la lipogenèse, et l'insuline. L'insuline va stimuler la protéine kinase B (Akt) en se fixant à son récepteur membranaire du foie (InsR), qui va ensuite activer le récepteur nucléaire LXRA (*Liver X Receptor Alpha*) avant de stimuler SREBP (Dentin et al., 2005).

Les endocannabinoïdes sont liés au maintien de l'équilibre métabolique et sont souvent impliqués dans les cas d'obésité ou de troubles métaboliques chez l'homme (Lu & Mackie, 2020; Schulz et al., 2021). Il a pu être montré que ces molécules pouvaient contrôler les métabolismes glucidiques et lipidiques dans différents tissus, dont le foie (Silvestri & Marzo, 2013). Chez les mammifères, il existe deux principaux endocannabinoïdes, anandamide (AEA) et 2-arachidonoyl glycérol (2-AG) qui sont produits, par tous les tissus, en réponse aux repas et qui ne peuvent pas être stockés dans les tissus. Ce sont donc des marqueurs en temps réel des changements d'état du métabolisme de l'organisme. Ces deux endocannabinoïdes stimulent essentiellement les récepteurs des endocannabinoïdes CNR1 (ou CB1) et CNR2 (ou CB2), présents dans le foie, qui stimuleront la régulation de la lipogenèse (synthèse des lipides et leur accumulation) et bloqueront la réponse de l'insuline au glucose (phosphorylation du récepteur de l'insuline ou déphosphorylation de la protéine Akt) (Bazwinsky-Wutschke et al., 2019; Silvestri et al., 2011; Silvestri & Marzo, 2013).

Dans le but d'avoir une vue d'ensemble sur le mécanisme de l'engraissement du foie et de ses principaux régulateurs lors d'une prise alimentaire, ces régulateurs ont pu être ajoutés sur la **Figure 1.21**.

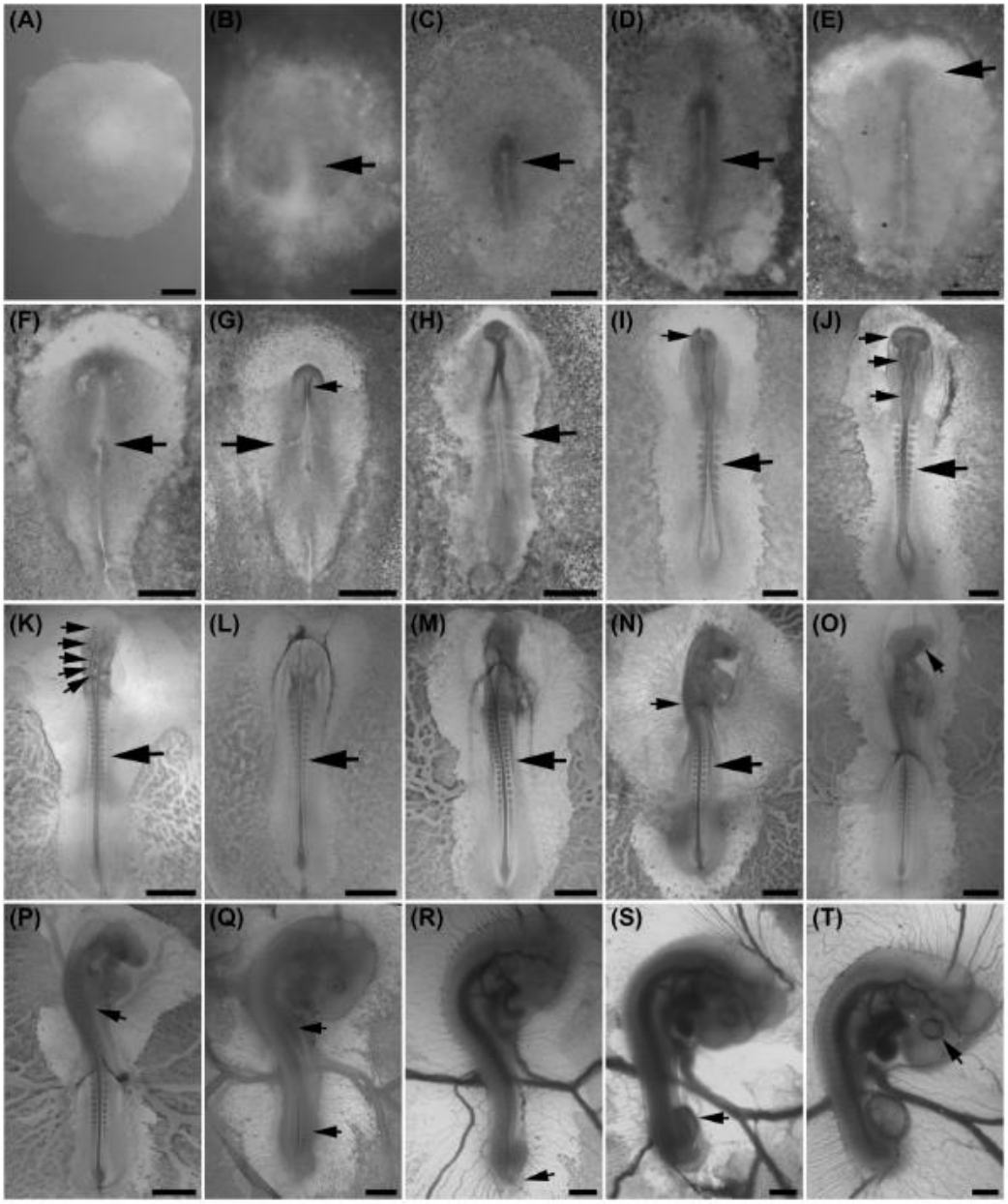


Figure 1.22. Photographie des étapes embryonnaires chez le canard (Li et al., 2019)

Les 20 premières étapes de développement embryonnaire du canard sont photographiées (A à T), et sont plus précisément décrites dans l'article de *Li et al., 2019*.

3. Le développement embryonnaire et l'éclosion

3.1. Les étapes du développement embryonnaire

Le développement embryonnaire est espèce-dépendante, avec une durée moyenne de 20 jours chez le poulet, 28 jours chez le canard Pékin, 35 jours chez le canard de Barbarie et de 32 jours chez le canard mulard (Abd El-Hack et al., 2019; Hamburger & Hamilton, 1951). La description des étapes du développement embryonnaire a été en premier réalisée chez le poulet par Hamburger et Hamilton et se décompose en 46 étapes (Hamburger & Hamilton, 1951).

Les premières étapes (1 à 6) correspondent aux premières heures d'incubation des œufs et au tout début de l'organisation des cellules pour créer les premières structures et fonctions de l'embryon. Les étapes n°7 à 14 vont se concentrer sur l'apparition des somites, organes embryonnaires transitoires à l'origine de l'organisation de la segmentation du corps chez les vertébrés. Le premier système à se mettre en place correspond au système cardio-vasculaire, avec la formation d'un cœur à l'étape n°9, soit après un jour d'incubation chez le poulet (Davey & Tickle, 2007; Hamburger & Hamilton, 1951). L'étape 15 (50-55h après le début de l'incubation) est associée au début de la mise en place des axes principaux et la suite de la segmentation des somites. L'épiphyse et les arches viscérales se dessinent à partir de l'étape n°17. Les étapes suivantes décrivent la mise en place des pattes, des ailes et autres sans entrer dans le détail de la mise en place des axes nerveux.

Ces étapes de développement embryonnaire du poulet ont pu être identifiées chez le canard commun (**Figure 1.22**) et l'oie (Li and al., 2019), cependant des lacunes sont toujours présentes et en particulier pour l'ontogenèse (développement des organes). Quelques études décrivent la mise en place de systèmes et/ou de structures spécifiques comme le tube digestif (De Oliveira and al., 2008 ; King and al., 2000), le système de régulation de la température corporelle (Baarendse and al., 2007), l'organisation des membranes (Baggott, 2009), le système immunitaire (Dibner and al., 1998) ou encore le système nerveux (Jenkins & Porter, 2004).

Pour les canards, comme pour les poulets, les différents systèmes physiologiques et organes apparaissent en début d'embryogenèse (Lilja & Olsson, 1987). Le tube digestif reste basique jusqu'à la fin de l'incubation des œufs chez la volaille (De Oliveira and al., 2008). Le système immunitaire commence à être actif six jours après le début de l'incubation (Dibner and al., 1998). Au 9ème jour d'embryogenèse, le diencéphale est déjà proche morphologiquement de celui à l'éclosion, chez le poulet (Baarendse and al., 2007). Également chez le poulet, l'axe plexus portail hypothalamo-hypophysaire est établi au 12ème jour embryonnaire (Jenkins & Porter, 2004). Néanmoins, même si les systèmes physiologiques sont mis en place dans l'embryon, une maturation est nécessaire pendant la dernière semaine embryonnaire et les premiers jours post-éclosion (Vern L. Christensen, 2009). Par exemple, le système digestif s'active avec l'utilisation du sac embryonnaire et la thermorégulation s'adapte en fonction de la température environnante des 10 premiers jours post-éclosion (Dietz, 1995; Visser, 1991). Le cœur et le système cardio-vasculaire sont parmi les premiers à être mis en place et sont matures les premiers jours de développement (Baggott, 2009). C'est pourquoi il est possible d'identifier les œufs non fertiles et les embryons morts après sept jours seulement d'incubation, grâce à la vascularisation de l'embryon.

La thermorégulation se développe en deux étapes, la mise en place pendant l'incubation du système nerveux et des mécanismes thermogéniques et thermolytiques de l'embryon (incluant l'endocrinologie) puis la maturation et les réponses du système de thermorégulation les premiers jours de vie (Baarendse et al., 2007). La thermo-réception est permise par les neurones et l'activité neuronale change selon les changements de température (Hammel, 1968) et ces récepteurs sont nombreux chez les oiseaux (peau, langue et bec) (Dawson & Whittow, 2000).

3.2 Les conditions requises pour favoriser le développement de l'embryon

L'incubation des œufs est le premier challenge expérimenté par les embryons, chez tous les oiseaux (Amos Ar & Rahn, 1980). De nombreuses conditions sont pré-requises pour favoriser la croissance et le développement de l'embryon dans l'œuf. Effectivement, l'embryon nécessite des apports suffisants en nutriments présents dans l'œuf, en énergie (chaleur), en eau et en dioxygène fourni par l'environnement.

L'œuf est composé de trois éléments : la coquille, l'albumen et le jaune d'œuf. La coquille assure la sécurité et les échanges gazeux de l'embryon. L'albumen correspond à une réserve majoritaire en eau (88 à 90 % d'eau) et inclut de faibles proportions de protéines (10 %), de sucre (1 %) et des traces de lipides. L'énergie nécessaire au développement embryonnaire est puisée au sein des réserves internes de l'embryon, et plus précisément dans le jaune d'œuf (D. M. Lamot et al., 2014). Le jaune d'œuf est composé de 49 % d'eau, de 33 % de lipides, de 17 % de protéines et de traces de sucre (Van der Wagt et al., 2020).
L'embryogenèse est dépendante des métabolismes glucidique et lipidique et ces deux métabolismes s'alternent en fonction des besoins (Maatjens et al., 2016b). Le métabolisme glucidique est mis en avant lorsque l'oxygène est limitant dans le milieu, ou lors de la première semaine de développement, lorsque le transfert de lipides entre le sac embryonnaire et l'embryon n'est pas mature et ne permet pas l'utilisation des réserves lipidiques (Yadgary et al., 2010). C'est également le cas lorsque le caneton doit sortir de l'œuf, soit au cours de la dernière semaine embryonnaire (V. L. Christensen et al., 1993; Pulikanti et al., 2010). A partir du 10ème jour embryonnaire l'échange de nutriments entre le sac embryonnaire et l'embryon est possible et également utilisable (Speake et al., 1998).

Il a été montré chez le poulet que le jaune d'œuf, encore présent à l'éclosion, représentait 20 à 25 % du poids corporel de l'animal à l'éclosion (Khan, 2004), et il est utilisé lors des premiers jours de vie (D. Lamot, 2017) et que cette quantité de réserve énergétique variait en fonction de l'heure d'éclosion (Özlü et al., 2018). Effectivement, la durée de jeûne, entre l'éclosion et le premier repas, stimule la consommation du jaune d'œuf chez les poussins (Bhanja et al., 2009). Les trois semaines suivant l'éclosion sont identifiées comme étant la période la plus critique du point de vue de la nutrition (King et al., 2000). Effectivement, l'absorption des acides aminés essentiels et la capacité d'absorption du tractus gastro-intestinal sont optimaux et sensibles aux carences.

Les nutriments proviennent de la mère et sont dépendants de son état de santé. La qualité du développement des embryons puis des canetons dépend par exemple de l'alimentation de la mère (Barbe et al., 2020; Cherian et al., 2005; Jiang et al., 1990) ou de son âge (Applegate et al., 1998; OnbaŞilar et al., 2011).

L'œuf perd au total une masse proche de 20 % de son poids initial en eau lors de son développement (Amos Ar & Rahn, 1980; Baggott, 2009). Cette forte perte provient du fonctionnement du métabolisme, qui pour un gramme de réserve utilisé, génère et évacue une masse proche en eau (Amos Ar & Rahn, 1980; Cogburn et al., 2018; El-Hanoun et al., 2012). La diffusion de l'eau, mais également de la chaleur, du dioxyde de carbone (CO_2) et du dioxygène (O_2), se fait via les micropores présents sur la coquille et selon différents gradients de concentration (Mueller and al., 2015). Ces différents échanges dépendent des propriétés des coquilles (Amos Ar & Rahn, 1980), c'est-à-dire de leur perméabilité, leur conductance … On comprend alors l'importance de l'humidité relative au sein de l'incubateur pour éviter soit une déshydratation soit une saturation en eau au sein de l'embryon. Lors du développement, l'O_2 peut également être le facteur limitant et ainsi restreindre l'utilisation des lipides présents dans le jaune d'œuf pour la production d'énergie (Maatjens et al., 2016b; Mueller et al., 2015).

Ces différents acteurs de l'embryogenèse peuvent être affectés par l'environnement de l'embryon, et donc des conditions d'incubation. Si l'un de ces paramètres devient limitant alors le risque de mortalité est encore plus important pendant cette période critique.

3.3. Les mesures en sortie d'éclosoir

Mortalités embryonnaires

La mortalité globale embryonnaire, entre la fécondation et l'éclosion, peut être subdivisée en trois sous-mortalités liées à des causes de mortalité différentes (Romanoff, 1949; Sauveur, 1988). La mortalité précoce, entre la fécondation et le premier mirage (jour embryonnaire 7, E7), est due à des difficultés de mise en place des premières structures embryonnaires. La mortalité intermédiaire, entre E7 et le second mirage (E28), est essentiellement liée au démarrage des fonctions vitales comme la respiration ou le fonctionnement des reins. La mortalité dans l'éclosoir, dite tardive, implique la difficulté des canetons à sortir de l'œuf. En conséquence, un changement environnemental durant ces périodes critiques peut être létale (T. Loyau et al., 2015; Ono et al., 1994; Romanoff, 1949).

Eclosabilité

L'éclosabilité correspond à la proportion de canetons nés par rapport au nombre d'œufs mis dans l'incubateur au tout début de l'incubation. Cette mesure permet d'englober la totalité des mortalités survenues au cours de l'incubation des œufs ainsi que les œufs non-fertiles. Cette variable est un excellent indicateur de la qualité de la fertilisation et de l'incubation des œufs, confondus.

Sexe ratio

Le sexe ratio des canards mulards est déséquilibré en faveur des mâles, avec 60 % de mâles en sortie d'éclosoir (Batellier, Marchal, et al., 2004), ce qui est souvent observé lors du croisement de deux espèces, et rapporté pour la première fois par Ramirez *et al.* (1976) chez le canard mulard.
En plus de l'impact du croisement, il a pu être montré que cette prépondérance de canetons mâles à l'éclosion est liée à un développement embryonnaire moins favorable des femelles (Batellier, Marchal, et al., 2004). Effectivement, chez le canard mulard, le sexe femelle est hétérogamétique (femelle ZW et mâle ZZ), et respecte la règle de Haldane : « Lorsqu'un des sexes d'une génération F1, issue d'un croisement interspécifique, est absent, rare ou stérile cela signifie que le sexe en question est hétérogamétique. ». Le sexe hétérogamétique présente un déficit de viabilité ou de fertilité lié à une fusion difficile de la paire de chromosomes sexuels (Haldane, 1922). Le déséquilibre a donc une origine cytogénétique (Batellier, Govoroun, et al., 2004; Batellier, Marchal, et al., 2004).

Lors de l'incubation des œufs, deux sexe-ratio peuvent être déterminés, un primaire et un secondaire. Le sexe ratio primaire, correspond à la proportion de l'un des sexes par rapport à l'autre au début de l'incubation. Le sexe ratio peut être déterminé par qPCR. Le sexe ratio secondaire, quant à lui, montre l'évolution de cette proportion en fonction des mortalités embryonnaires. Chez les canards mulards, il a pu être montré que le sexe ratio primaire ne présentait pas de déséquilibre contrairement au sexe ratio secondaire. Le déséquilibre du sexe ratio à l'éclosion est donc lié à des mortalités embryonnaires, intermédiaires et tardives, plus importantes des femelles (Batellier, Marchal, et al., 2004).

Qualité des canetons à l'éclosion

La qualité des canetons est dans un premier temps évaluée par l'éclosabilité des œufs, puis une seconde évaluation plus précise peut être réalisée en se basant sur les grilles d'évaluations mises en place pour les poussins (Tona et al., 2003). Les poussins sont évalués sur les points suivants : l'activité, le duvet et l'apparence, la rétractation de la réserve vitelline, les yeux, les pattes, l'ombilic, la membrane et le jaune restant autour de l'ombilic. Ces paramètres sont notés sur un total de 100 points et sont assez hédoniques (Tona et al., 2003). Ces critères d'évaluation ont pu être testés sur les canetons Pékin et Barbarie (Barrieu et al., 2015; OnbaŞilar et al., 2011). Les résultats d'évaluation des canetons ont seulement été corrélés avec des performances en jeune âge, il pourrait être intéressant de les corréler avec des performances au gavage pour faire le lien entre « notations à l'élevage et performances zootechniques de ces mêmes animaux en phase d'élevage et de gavage » (Barrieu et al., 2015).

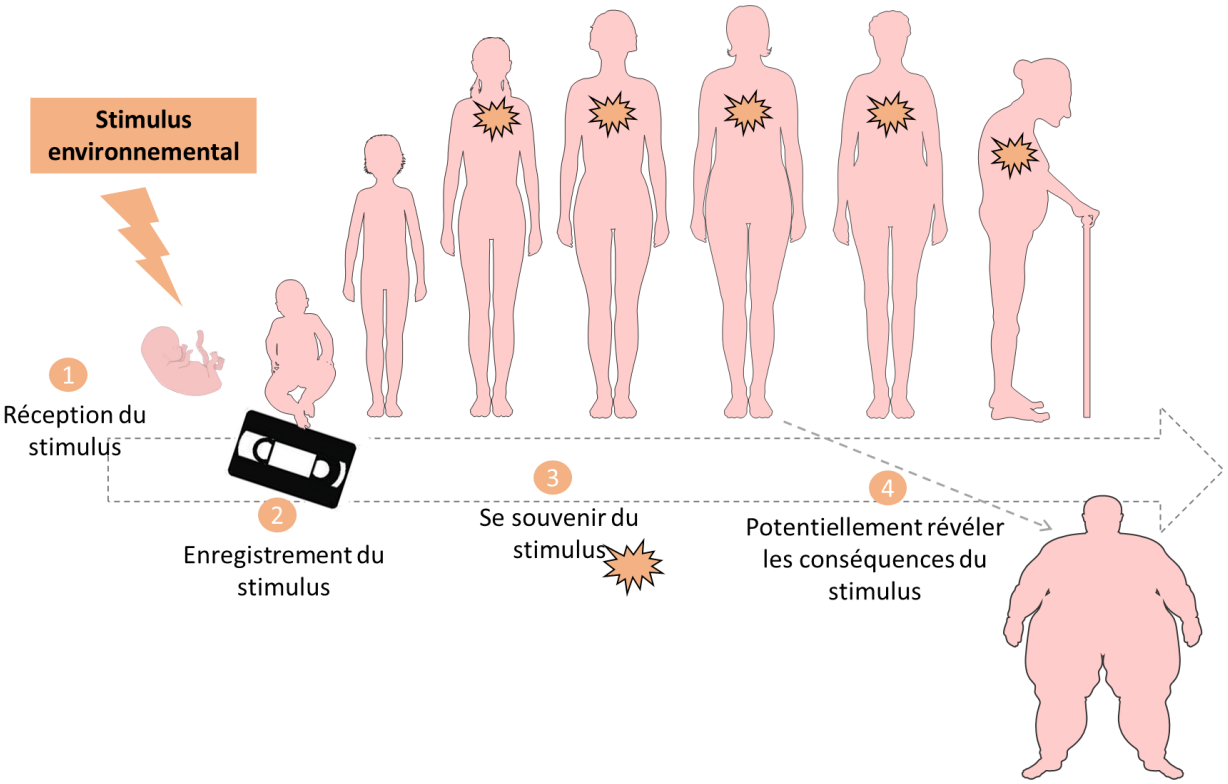


Figure 1.23. Représentation de la programmation

La programmation des individus passe par quatre étapes : la réception du stress (1), l'enregistrement (2), le souvenir du stress (3) et la révélation du stress (4). La Figure a été réalisée à l'aide d'images libres de droit sur le serveur « Servier Medical Art » (http://smart.servier.com/).

4. La manipulation thermique : un outil pour la programmation

4.1. La programmation

4.1.1. Contexte et définition de la programmation

La programmation correspond au fait qu'au cours des périodes critiques pré et postnatales des facteurs environnementaux peuvent influencer des changements phénotypiques chez les individus, sur le court ou le long terme (Lucas, 1991) (**Figure 1.23**). Cet impact, des facteurs environnementaux sur l'embryon, a été observé dans la population humaine lorsque *Hales et al*. ont souhaité expliquer une forte proportion de personnes touchées par un diabète dans une population donnée. Il a pu être observé que ces personnes touchées par un diabète présentaient un poids à la naissance en-dessous de la moyenne et que ce poids faible avait été engendré par la malnutrition des mères lors de leurs grossesses (Hales et al., 1991; Tarry-Adkins & Ozanne, 2011).

De nombreuses études ont ainsi pu souligner qu'une sous-nutrition au cours des périodes pré et post-natales prédisposait les individus à des maladies comme l'obésité, le diabète ou les maladies cardio-vasculaires chez différentes espèces animales (Barker, 1995; Hales et al., 1991; Hochberg et al., 2011; Lucas, 1991, 1998; Tarry-Adkins & Ozanne, 2011). Il a ensuite fallu déterminer les mécanismes reliant ces changements physiologiques et/ou de métabolismes avec le stimulus environnemental.

4.1.2. Les mécanismes de la programmation

Au cours du développement embryonnaire, des stimuli environnementaux peuvent être enregistrés par un individu. La mémorisation de ce stimulus (programmation) permet à l'individu de répondre différemment face à un nouveau stimulus (**Figure 1.23**).

Un point essentiel de la programmation correspond à la période de la perception du stimulus environnemental (Lucas, 1991). Au cours du développement, l'embryon présente une certaine plasticité de son phénotype, une sensibilité à l'environnement et une forte prolifération cellulaire. Ces périodes sont dites critiques ou sensibles, et peuvent varier en intensité. Plus cette période est critique, plus l'individu est susceptible d'être réceptif à la programmation (Hochberg et al., 2011; Mathers & McKay, 2009; Wells, 2017). Ces périodes permettent à l'individu de réceptionner le stimulus environnemental mais également de l'enregistrer. La réception (« *Receiving* ») et l'enregistrement (« *Recording* ») d'un stimulus environnemental sont les deux premières étapes de la programmation, décrites par *Vaiserman (2018)* sous la forme des « *4R* ».

Après avoir enregistré le stimulus, il faut que l'organisme arrive à garder en mémoire l'enregistrement du stimulus (« *Remembering* »). La mémorisation du stimulus embryonnaire peut correspondre à des changements organisationnels tissulaires et organiques, au développement du système immunitaire, à la modification du système hormonal, des télomères ou du microbiote intestinal, ou encore à l'apparition de marques épigénétiques (Lucas, 1991; Vaiserman et al., 2018). Les marques épigénétiques les plus connues sont la méthylation de l'ADN, la modification des histones et la modification des zones non codantes des ARNs. La conservation en mémoire du stimulus passe à travers les divisions cellulaires de l'organisme, conservant en même temps les marques épigénétiques.

Le stimulus environnemental embryonnaire est donc conservé en mémoire et pourra être révélé au cours de la vie de l'individu. Cette dernière étape est la révélation (« *Revealing* »), rendant l'individu capable de répondre différemment lorsqu'un nouveau stimulus apparait au cours de sa vie (Barker, 1995; Hales et al., 1991).

Ces stimuli environnementaux peuvent être de différentes nature comme liés à la nutrition, au stress, aux maladies, à l'hypoxie ou encore à la température. Le fait de pouvoir induire un phénotype par l'utilisation d'un facteur environnemental durant le développement embryonnaire a semblé très intéressant à comprendre et à savoir reproduire dans le but d'améliorer la production animale. Chez les volailles, il a pu être mis en avant des programmations précoces, thermiques et/ou nutritionnelles, permettant de modifier le phénotype des animaux. J'ai eu l'opportunité de pouvoir écrire une revue sur ce sujet, qui a été publiée cette année et qui se trouve en **Annexe 1** de cette thèse (Andrieux et al., 2022).

4.2. La manipulation thermique

4.2.1. Contexte et définition de la manipulation thermique

La manipulation thermique (MT) consiste à changer la température d'incubation des œufs, en-dessous ou au-dessus de la température standard, pendant un laps de temps donné (G. Han et al., 2018). Elle permet d'impacter les mécanismes biologiques dès leur mise en place dans l'embryon, et a pour but d'essayer d'améliorer les capacités et les performances des animaux à moyen et/ou long terme (Al Sardary & Mohammad, 2016; Yahav & McMurtry, 2001). Cette technique a été l'un des leviers d'amélioration dans la filière volaille. Effectivement, les animaux ovipares réalisent leur développement embryonnaire hors de la mère, contrairement aux mammifères, facilitant la réalisation de la manipulation thermique sur les œufs. De plus, les techniques d'incubation sont maitrisées depuis le XXème siècle chez les volailles, permettant de contrôler facilement les paramètres environnementaux embryonnaires, comme la température.

Entre 1957 et 2005, les poulets de chair sont passés d'un poids de 905 g à 4202 g après 56 jours d'élevage. Cette augmentation de poids est le fruit d'une forte pression de sélection sur la production de viande des poulets de chair (Zuidhof et al., 2014). En gagnant en masse corporelle les animaux ont également développé une sensibilité aux chocs thermiques, engendrant de fortes mortalités lors des pics de chaleur en bâtiment (Collin et al., 2005; Yahav & Tzschentke, 2006). Finalement, l'amélioration génétique des poulets de chair a eu un effet néfaste sur la cardio-vascularisation et donc sur la thermogenèse (Yahav & Tzschentke, 2006). Dans l'objectif de contrecarrer cet effet néfaste, des essais ont été réalisés en utilisant la technique de la manipulation thermique. La hausse de température d'incubation pendant le développement embryonnaire a induit une amélioration de la thermo-tolérance des poulets de chair (Al-Rukibat et al., 2016; Mohammad Borhan Al-Zghoul et al., 2015; Collin et al., 2005; T. Loyau et al., 2015; Piestun et al., 2008; Yahav et al., 2004; Yahav & McMurtry, 2001; Zaboli et al., 2016). Toutefois, en parallèle d'améliorer la thermo-tolérance des animaux, la manipulation thermique impactait négativement l'éclosabilité et le poids corporel des animaux. Au travers de ces nombreuses études chez le poulet de chair, il a pu être mis en évidence que la période, la durée et l'intensité de la hausse de température jouaient un rôle important sur les performances des animaux.

4.2.2. Mise en place de la manipulation thermique

Il y a trois paramètres à prendre en compte pour que la manipulation thermique (MT) soit efficace : 1) la période critique sur laquelle la MT va être appliquée, 2) l'intensité et 3) la durée de la MT (Al Sardary & Mohammad, 2016). De nombreuses combinaisons de ces trois paramètres ont été testées sur différentes espèces (Al-Rukibat et al., 2016; T. Loyau et al., 2015).

Tout d'abord, le choix de la période critique sur laquelle appliquer la MT se fait en fonction du développement embryonnaire et des systèmes physiologiques à impacter. Il est important de se rapprocher au maximum de la mise en place du système spécifique pour avoir un impact optimal (Piestun et al., 2015). Par exemple, la régulation des mécanismes physiologiques, comme la thermorégulation, se déroule au cours de l'embryogenèse en fonction de l'environnement l'entourant. Ce processus dispose de périodes dites « sensibles » ou « critiques » pendant lesquelles les paramètres du système de contrôle sont enregistrés et ce pour toute la vie de l'animal. Ces créneaux sont primordiaux au développement de l'embryon et peuvent être source de mauvaise ou de meilleure initialisation des systèmes de bases de l'animal (Tzschentke & Plagemann, 2006). C'est donc pendant ces périodes qu'il faudrait réaliser la manipulation thermique.

L'intensité de la manipulation thermique correspond à la différence entre la température standard et la nouvelle température. Il faut savoir trouver le juste milieu de l'intensité, car trop forte elle engendre de la mortalité et trop faible le stimulus n'est pas assez fort pour impacter le phénotype des animaux (T. Loyau et al., 2015). Dans l'intensité entre également le caractère continue (24h/24) ou discontinu (Xh/24) du stimulus. Il a pu être montré chez le poulet qu'une MT continue était source de mortalité embryonnaire et qu'une MT discontinue permettait de laisser l'embryon récupérer du stress engendré par le changement de température (Collin et al., 2005; T. Loyau et al., 2015; Piestun et al., 2008).

Le dernier paramètre, la durée de la MT, permet de réaliser une manipulation thermique sur toute l'embryogenèse comme sur une période précise du développement. Différentes fenêtres ont été étudiées en volailles, montrant que la fenêtre en milieu de développement embryonnaire (7ème jour embryonnaire au 16ème) semblerait être la période la plus intéressante pour programmer les animaux vis-à-vis de la thermorégulation. Des fenêtres trop précoces semblent impacter négativement les performances des animaux et des fenêtres trop tardives au contraire ne programmeraient pas les animaux sur les objectifs visés (thermorégulation) (T. Loyau et al., 2015).

Suite à ces premiers résultats positifs de la manipulation thermique, des études ont pu observer, en plus d'une amélioration de la thermorégulation, une augmentation de la production de muscle chez les poulets de chair (T Loyau et al., 2013; Piestun et al., 2013, 2011) mais également chez les canards Pékins (H. Liu et al., 2015). Chez les canards Pékins, un élargissement des fibres musculaires est observé chez le groupe programmé, sans gain de poids musculaire, après deux semaines d'élevage. *A contrario*, une hausse significative du poids de foie est mesurée dans le groupe programmé (H. Liu et al., 2015). **Suite à cette observation, des manipulations thermiques ont été réalisées dans notre laboratoire chez le canard mulard, dans le but d'observer une différence de poids de foie après le gavage. Il a pu être montré que trois différentes hausses de température pendant le développement embryonnaire impactaient à chaque fois positivement la production de foie gras après la période de gavage du canard mulard, avec une hausse globale de 16 %** (Massimino et al., 2019)**. Cette étude est décrite plus en détails dans le chapitre suivant.**

CHAPITRE 2 : Objectifs de la thèse et outils mis en place

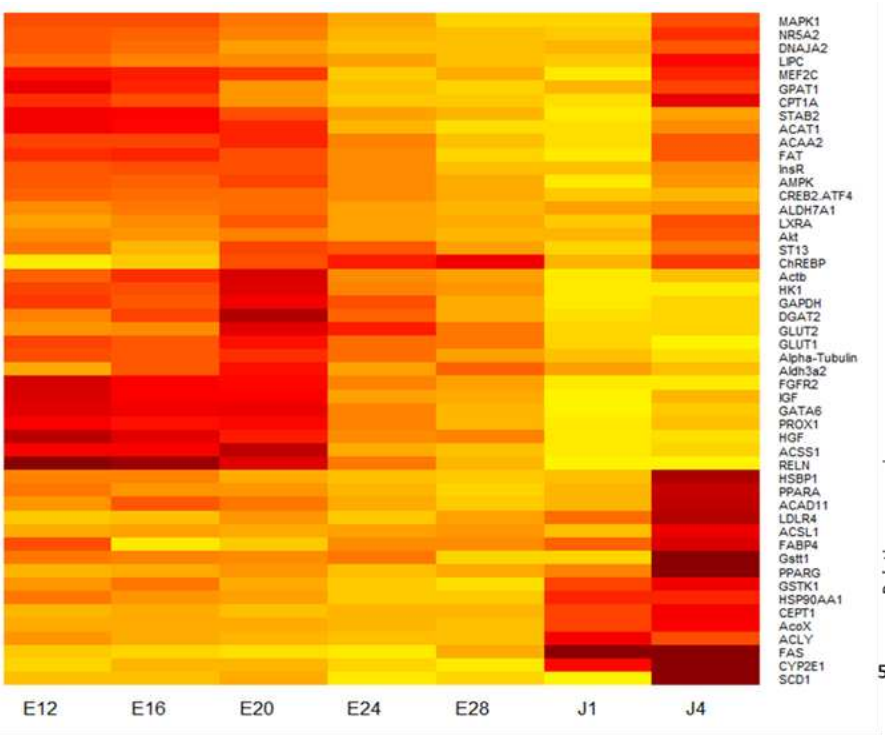


Figure 2.1. Illustration des expressions des gènes d'intérêt au cours de l'embryogenèse (Massimino et al., 2020)

Au cours du développement embryonnaire du canard mulard, des prélèvements de foie ont été réalisé tous les quatre jours à partir de E12 pour étudier l'expression relative de différents gènes d'intérêt impliqués dans le métabolisme glucidique et lipidique. Plus le rectangle est rouge, plus l'expression relative du gène est forte, plus il est jaune moins son expression relative est forte.

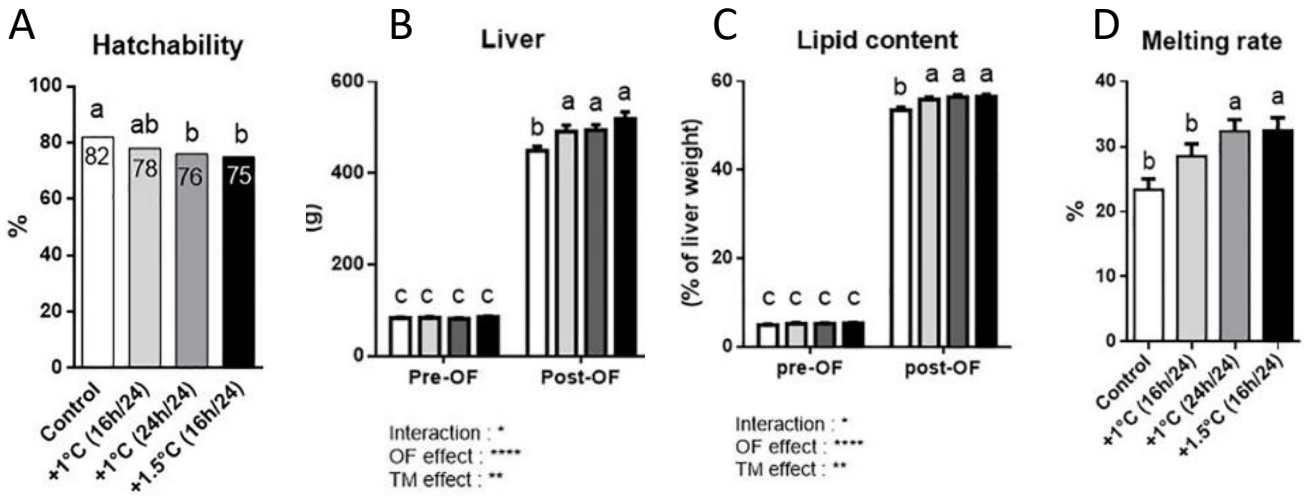


Figure 2.2. Résultats principaux de l'impact des manipulations thermiques embryonnaires chez le canard mulard (Massimino et al., 2019)

Quatre ont été étudié au cours de l'essai incluant un groupe contrôle et trois groupes dont la température d'incubation a été augmenté du 13ème jour embryonnaire au 27ème. Les résultats d'éclosabilité (A), des poids de foie avant/après gavage (B), des compositions lipidiques du foie (C) et des taux de fonte du foie (D) sont représentés.

OF gavage, TM manipulation thermique

1. Objectifs de la thèse

1.1. Rappel des résultats de la précédente thèse

La précédente thèse, de William Massimino, a réalisé les premières études des impacts d'une manipulation thermique embryonnaire chez le canard mulard.

Dans un premier temps, une étude ontogénique a permis de décrire la mise en place des métabolismes lipidique et glucidique hépatiques chez les canards mulards, dans l'objectif de sélectionner des fenêtres d'application du stimulus thermique (Massimino et al., 2020). Pour cela les expressions relatives d'un grand nombre de gènes impliqués dans ces deux métabolismes ont été étudiées au niveau du foie du 12ème jour embryonnaire (E12) au 4ème jour de vie (J4) des canards (**Figure 2.1**). Dans cette étude, différents pics d'expressions relatives sont observés, avec un pic embryonnaire entre E12 et E20 et un second pic à la naissance entre J1 et J4. Le pic à la naissance, d'expression relative des gènes impliqués dans les métabolismes du glucose et des lipides, est expliqué par la première prise alimentaire des canetons. Quant au deuxième pic, nous avons supposé, pour la suite de la thèse, qu'il s'agissait de la mise en place et de la maturation de ces deux métabolismes. Avant le stade E12, il n'était pas possible de prélever uniquement le foie, empêchant d'étudier les expressions plus précocement, ce qui n'écarte pas la possibilité de passer à côté d'informations intéressantes sur les deux métabolismes.

Dans un second temps, l'impact à plus ou moins long terme d'une programmation thermique embryonnaire a été étudié pour un groupe contrôle et trois groupes de programmés sur la fenêtre embryonnaire E13-E27 avec comme augmentation de température : + 1°C 16h/24, + 1°C 24h/24 et + 1,5°C 16h/24. Cette première étude a montré que la MT embryonnaire avait permis une programmation métabolique, mesurable après la période de gavage des canards mulards. Effectivement, les trois groupes de manipulations thermiques (MT) présentaient une hausse significative du poids de foie après le gavage (**Figure 2.2B**), en moyenne de + 16 % par rapport au groupe contrôle (Massimino et al., 2019). Cette hausse du poids de foie est associée à une augmentation des lipides hépatiques pour les trois groupes (**Figure 2.2C**). Cependant, pour deux des groupes programmés des effets négatifs ont pu être relevés. Les groupes +1°C 24h/24 et +1,5°C 16h/24 présentaient des taux d'éclosabilité significativement plus faibles ainsi que des taux de fonte du foie gras significativement plus élevés, que ceux du dernier groupe MT et celui du groupe contrôle (**Figure 2.2A et D**). Ces résultats montrent que la programmation thermique embryonnaire fonctionne mais qu'elle peut encore être améliorée en faisant varier le moment, la durée ou l'intensité du changement de température d'incubation.

Dans un dernier temps, pour mesurer cette programmation au niveau moléculaire, un grand nombre de gènes impliqués dans les métabolismes du glucose, des lipides, du stress et de la thyroïde ont été étudiés autour de la période de gavage. Pour la première fois, six gènes (*PSMD12*, *UBQLN1*, *HSPB1*, *DIO3*, *APOB* et *GPAT1*) ont pu être identifiés comme étant impactés par la manipulation thermique après le gavage, mais également de façon plus précoce au 27ème jour embryonnaire pour *DIO3* (Massimino et al., 2021).

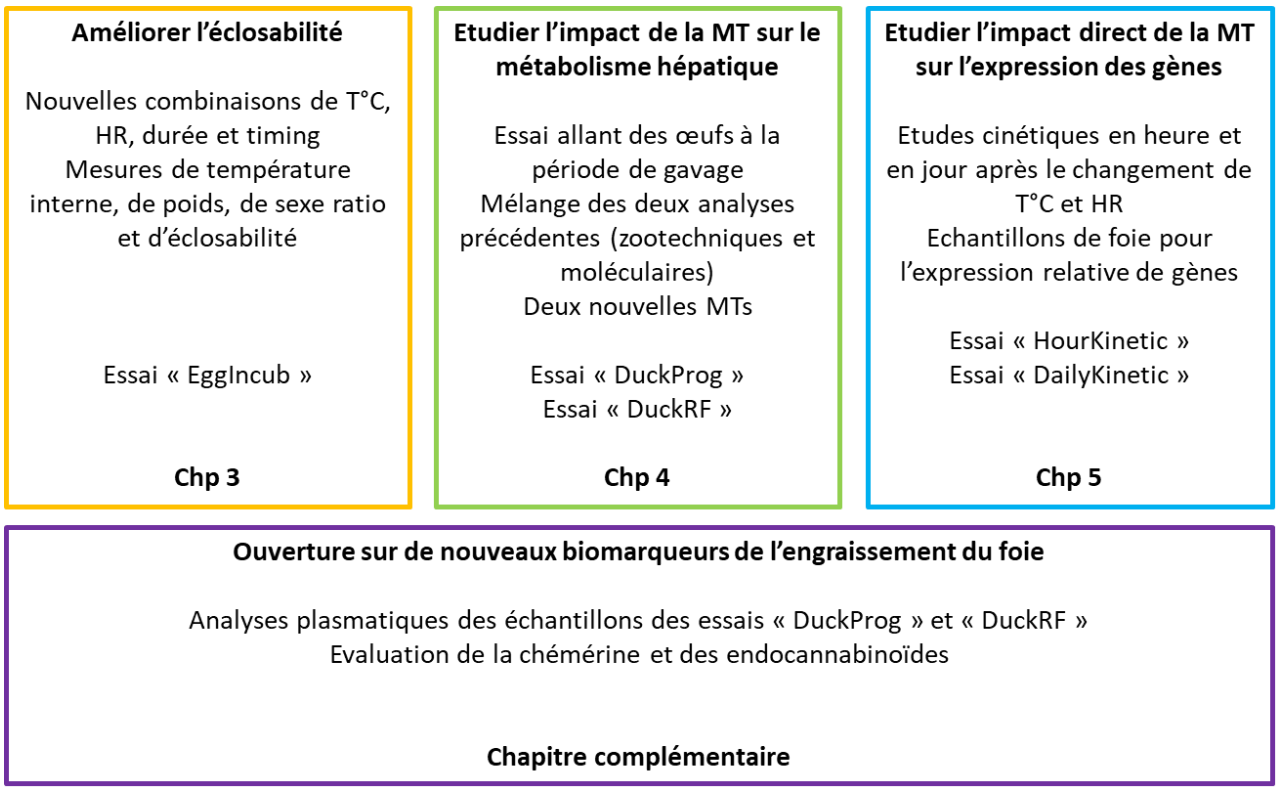


Figure2.3. Résumé des objectifs de la thèse et des essais mis en place pour y répondre

Cette première étude sur la manipulation thermique embryonnaire chez le canard mulard a pu montrer des résultats prometteurs et a ouvert sur de nouvelles questions et optimisations de la manipulation thermique. Effectivement, les trois manipulations thermiques appliquées montrent des baisses significatives de l'éclosabilité, qui pourraient être évitées en réduisant la fenêtre de manipulation et en utilisant les résultats de l'ontogenèse précédemment faite. De plus, la réponse moléculaire spécifique de la programmation thermique a été uniquement mesurée pour six gènes en fin de période de gavage. Cette faible différence de réponse en fin de gavage entre les canards programmés et les canards contrôles peut-être liée au prélèvement tardif des échantillons de foie (10h après le dernier repas). De plus, l'effet de la programmation a potentiellement été écrasé par l'effet gavage, qui compare des animaux à jeun depuis presque 24h et des canards gavés et abattus 10h après le dernier repas. Il pourrait être intéressant de comparer deux groupes d'animaux alimentés et abattu 2h après le dernier repas pour avoir une meilleure approche moléculaire. Finalement, il serait également intéressant de regarder la réponse directe de la manipulation thermique dès l'application de cette dernière pour caractériser les mécanismes de la programmation. **La thèse actuelle correspond au prolongement et à l'optimisation de cette précédente étude sur l'impact de la manipulation thermique sur la production de foie gras.**

1.2. Objectifs de thèse

La manipulation thermique embryonnaire semble être un nouveau levier pour impacter la stéatose hépatique des canards mulards et potentiellement pour améliorer la filière sur les plans économique et bien-être animal, en réduisant la durée du gavage. Les différents objectifs de la thèse vont être décris ci-dessous (**Figure 2.3**).

Au vu des nombreux papiers sur la manipulation thermique chez la volaille et des premiers résultats (positifs comme négatifs) chez le canard, **l'optimisation de la manipulation thermique** est le premier objectif cohérent pour la suite des recherches sur la programmation thermique embryonnaire (**Chp 3**). Cette étude s'est concentrée sur la **caractérisation de six nouvelles manipulations thermiques** et s'est arrêtée quelques jours après l'éclosion des canetons. Cet essai comprend exclusivement des **résultats zootechniques** comme les mortalités embryonnaires, l'éclosabilité ou encore le poids corporel ou la température interne à l'éclosion. L'optimisation de la manipulation thermique a pour but ici de limiter les effets négatifs sur les animaux (conserver une éclosabilité égale à celle du groupe contrôle) tout en conservant les marques d'une potentielle programmation des animaux (poids corporel et température interne plus faibles). Sur la base des résultats de cette première partie, **deux nouvelles manipulations thermiques ont été sélectionnées** pour les essais suivants qui iront jusqu'au gavage.

Dans un second temps, nous avons souhaité évaluer **l'impact à long terme des nouvelles manipulations thermiques sur le métabolisme hépatique au cours de deux challenges nutritionnels** (deuxième objectif, **Chp 4**). La première étude a évalué la réponse des canards face à un challenge de mise à jeun/réalimentation, en tant que nouveau modèle expérimental d'étude du métabolisme hépatique, et surtout a déterminé si la programmation thermique était mesurable au cours de ce challenge. La seconde étude a évalué l'optimisation potentielle de la programmation thermique sur la production de foie gras après l'application des nouvelles conditions déterminées précédemment Ces deux essais ont combiné des **résultats zootechniques**, sur toute la période d'incubation, d'élevage et de gavage, ainsi que des **données moléculaires**, après les deux challenges alimentaires. Le foie a été décrit avec les paramètres zootechniques (poids, taux de fonte) mais également moléculaires avec la caractérisation de sa composition (cellulaire, lipidique, glycogène). Les mécanismes sous-jacents à la stéatose hépatique et à la programmation ont été étudiés à l'aide des **expressions relatives des gènes d'intérêts**.

Le troisième objectif (**Chp 5**) s'est focalisé sur l'étude de **l'impact direct de la manipulation thermique** en étudiant un large panel de gènes impliqués dans les métabolismes des glucides, des lipides, du stress, de la thyroïde…L'impact direct est étudié à deux échelles, avec une **cinétique horaire**, et une **cinétique quotidienne**. Des échantillons de foie ont été prélevés au cours de ces deux cinétiques dans le but **d'étudier les expressions relatives des gènes d'intérêts**. Pour les cinétiques, il a été choisi de reprendre la manipulation thermique des précédentes études pour laquelle les résultats de programmation étaient les plus concluants (pas de baisse d'éclosabilité, plus de foie gras et pas de fonte supplémentaire), soit +1°C 16h/24 du 13ème jour embryonnaire (E13) au 27ème (E27).

Un chapitre complémentaire (**Chp 6**) s'est intéressé à l'étude de molécules innovantes comme **la chémérine** en tant qu'indicateur non invasif, voire biomarqueur de l'engraissement des canards pendant le gavage, ou bien **les endocannabinoïdes** en tant que régulateurs de l'équilibre énergétique et du comportement alimentaire des animaux.

2. Matériel et méthodes

Au cours de la thèse, les essais ont été réalisés dans l'unité expérimentale des palmipèdes à foie gras (UEPFG, INRAE, Artiguères, France) et leurs descriptions ont été réalisées en début de chaque chapitre.

2.1. Mesures zootechniques

Incubation et éclosoir

Durant l'incubation, différents paramètres ont été mesurés incluant la proportion d'œufs fertiles, la mortalité embryonnaire précoce, la mortalité embryonnaire de milieu de développement et la mortalité embryonnaire tardive. En sortie d'éclosoir, l'éclosabilité et le sexe ratio ont également été calculés.

Au 7ème jour embryonnaire (E7), un premier mirage est réalisé permettant de distinguer les œufs non fertiles, des embryons morts et des embryons vivants. Ces premiers paramètres ont permis de mesurer la **proportion d'œuf non fertiles** et la **mortalité précoce**. Ils correspondent au rapport entre le nombre d'œufs mis dans l'incubateur et celui d'œufs non fertiles/d'embryons morts, multiplié par 100. A E28, un second mirage est réalisé permettant de calculer le nombre d'embryons morts entre E7 et E28 par rapport au nombre d'embryons vivants après E7 (**mortalité en milieu de développement embryonnaire**). En fin d'éclosion (E32), la **mortalité tardive** est calculée à partir du nombre d'œufs non-éclos et celui des canetons non viables par rapport au nombre d'embryons vivants après E28, multiplié par 100. L'**éclosabilité** est un paramètre englobant les trois mortalités embryonnaires, et correspond au nombre de canetons nés par rapport au nombre total d'œufs mis en incubation, multiplié par 100. Les canetons ont été sexés en sortie d'éclosoir à l'aide de deux indicateurs 1) la tâche noire sur la tête des mâles (lignée autosexable) et 2) les yeux noirs pour les mâles (les femelles ont les yeux rouges), et en cas de doute les animaux sont facilement sexable via un retournement d'organe. Le **sexe ratio** est, quant à lui, calculé par rapport au nombre de canetons mâles nés et au nombre de canetons totaux nés, sur toute la période d'éclosion.

Période d'élevage

Dès la sortie de l'éclosoir, le **poids corporel** des animaux a été régulièrement mesuré (Système automatique de pesée) ainsi que la **température interne cloacal** (Thermomètre numérique express, Gilbert). Ces mesures ont nécessité la manipulation des animaux environ une fois par mois. Durant toute la période d'élevage, la consommation totale des animaux a été relevée dans les différentes loges d'élevage, permettant d'estimer la **consommation moyenne par individu**.

Résultats d'abattage

Suite à l'abattage des animaux, différents poids ont été mesurés (Système automatique de pesée) comme **le poids de la carcasse ressuyée** (après 24h dans la chambre froide), **de cuisse**, **de magret, de foie gras** et **de gras abdominal**. **L'indice hépato-somatique** (IHS) est également calculé en rapportant le poids de foie au poids corporel de chaque individu. **Le taux de fonte du foie gras** est mesuré, en pesant le foie avant et après cuisson, ce qui permet d'estimer le pourcentage de perte en lipides de ce dernier.

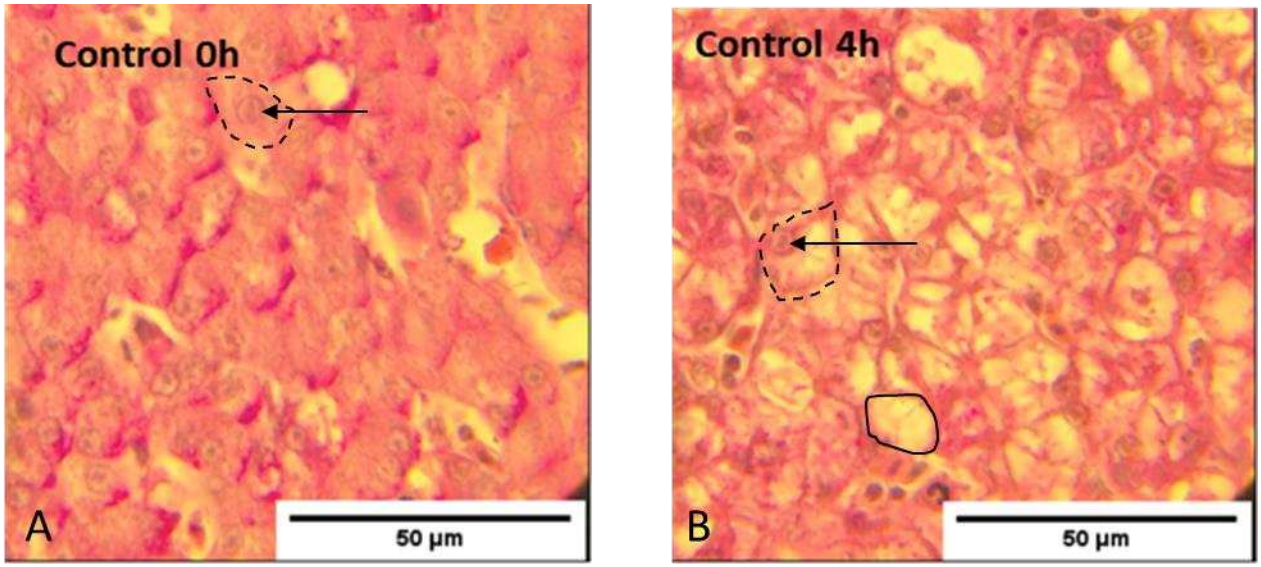


Figure 2.4. Illustration des coupes histologiques de foie de canard

Des coupes histologiques de foie de canard à jeun (A) et 4h après la réalimentation (B) du groupe contrôle ont pu être réalisées par Michaël Marchand, en coloration HE-PAS. La coloration permet de mettre en évidence les membranes (ligne pointillée), les noyaux des cellules (flèche) et les gouttelettes lipidiques (ligne continue).

2.2. Mesures histologiques du foie

Des échantillons de foie ont été prélevés au cours de l'essai du **chapitre 5** dans le but de réaliser des coupes histologiques. Toute la partie histologique a été réalisée par Michaël Marchand au sein du laboratoire de St Pée sur Nivelle.

Lors de l'échantillonnage, le foie a été directement fixé dans du paraformaldéhyde (4 %) pendant 24h. L'échantillon a ensuite été déshydraté par la succession de bains d'éthanol (70, 95 et 100 %) de différentes durées (24h, 3h, 12h) en finissant par un bain dans du xylène (100 %). Les étapes suivantes correspondent à l'inclusion en paraffine et les colorations des échantillons. Les colorations PAS (Periodic Acid Shiff) et HE (Hématoxyline Eosine) ont été combinées pour les différents échantillons, permettant la mise en évidence des groupements hydroxyles libres (ex glycogène), des noyaux et du cytoplasme des cellules respectivement (**Figure 2.4**).

A l'aide du logiciel ImageJ, des échelles ont pu être ajoutées sur les coupes histologiques (**Figure 2.4**). Le logiciel permet également de dénombrer **le nombre de cellules** présentes, leurs **surfaces individuelles (µm²)** et la **surface des gouttelettes lipidiques (µm²)** sur les différentes coupes. Pour les différentes mesures, deux coupes histologiques ont été réalisées aléatoirement, pour cinq foies prélevés dans chacun des groupes. Sur chacune des lames, entre quatre et six mesures ont été faites sur différentes zones de la lame.

2.3. Mesures biochimiques du plasma, du foie et des aliments

Analyses dans le plasma

Le plasma prélevé au cours des essais a été directement séparé du sérum par centrifugation (2000 g, 10 min, 4°C), puis congelé et stocké à -20°C pour toute la durée de l'étude.

La **glycémie**, les **triglycérides**, le **cholestérol** et les **acides gras libres** sont dosés à l'aide des kits enzymatiques basés sur des méthodes colorimétriques (Glucose GOD-POD, SOBIODA ; Triglycerides GPO POD, SOBIODA ; Cholesterol LD M, SOBIODA ; NEFA HR2, Wako Richmond, United States). Tous ces dosages sont réalisés à partir de 5 µL d'échantillon (pur ou dilué) et d'une solution enzymatique avant d'être incubés à 37°C. La réaction entraine la coloration des échantillons et l'intensité de la couleur obtenue est proportionnelle à la concentration de l'élément dosé. L'évaluation des quantités présentes dans les échantillons est faite à partir de gamme de standard dont les quantités sont connues. La lecture des échantillons et des gammes se fait par spectrophotométrie, à 505 nm.
Pour le glucose (GLU), 5 µL d'échantillon dilués au quart (1/4) est mélangé à 200 µL de glucose oxydase pour être incubé 15 minutes, avant la lecture de plaque. Le même protocole est suivi pour les triglycérides (TG, Lipoprotéine lipase, glycérol kinase et glycérol-3-oxydase) et le cholestérol (Chol, cholestérol estérase et cholestérol oxydase), avec des incubations de 20 et 15 minutes respectivement. Pour les acides gras libres (AGL), une dilution au quart (1/4) est également réalisée avant d'être mélangée à 150 µL d'acyl-CoA synthétase pour décomposer les AGLs en acyl-CoA. Après une incubation de 3 min, l'acyl-CoA oxydase est ajoutée (75 µL) avant d'être incubée pendant 4,5 minutes. Une conversion est nécessaire après lecture, uniquement pour les AGLs, pour obtenir les quantités réelles en g/L (x 0,282).

	Aliment de démarrage PAG 1301	Aliment de croissance PAG 1320	Poudre de gavage
Matière sèches (MS) %	88,58 ± 0,01	87,53 ± 0,02	86,30 ± 0,01
Cendres (% de MS)	6,08 ± 0,43	5,15 ± 0,27	2,64 ± 0,01
Protéines brutes (% de MS)	20,04 ± 0,27	17,57 ± 0,30	7,62 ± 0,13
Lipides brutes (% de MS)	2,53 ± 0,00	2,97 ± 0,07	3,34 ± 0,05
Amidon brute (% de MS)	37,54 ± 0,96	40,12 ± 0,15	64,67 ± 0,62
Energie brute (kJ/g de MS)	18,83 ± 0,08	14,89 ± 0,11	14,92 ± 0,04

Tableau 2.1. Analyses complémentaires de la composition des aliments d'élevage

Les analyses complémentaires des aliments ont été réalisées en duplicat et sont représentées dans le tableau ci-dessus, avec la moyenne et l'écart type entre les duplicats. Tous les composés sont exprimés en pourcentage de matières sèches.

La **chémérine** a également été dosée dans le plasma des canards au sein du laboratoire INRAE de Tours par Ophélie Bernardi à l'aide d'un test ELISA avec des antigènes adaptés.

Les lipides présents dans le plasma sont extraits à partir de 200 µL de plasma avec 2 ml de toluène, 5 µL de standard et 300 µL de TRIS (aminométhane). Après avoir vortexé et centrifugé les échantillons, ces derniers sont plongés dans un bain de glace sèche et d'éthanol dans le but de congeler la partie aqueuse de l'échantillon. La partie supérieure organique contenant les lipides peut être récupérée puis l'excédent de toluène est évaporé. Les lipides extraits sont suspendus dans 57 µL de phase mobile (Solution AB) qui est la même utilisée lors de la chromatographie liquide-spectrométrique de masse (LC-MS). L'identification des **endocannabinoïdes** présents dans le plasma est réalisée en LC-MS, et les quantités présentes dans le plasma sont exprimées en ratio par rapport au pic du standard, puis passé en quantification absolue toujours par rapport au standard.

Analyses de la composition du foie

Les échantillons de foie prélevés ont été directement congelés et stockés au – 80°C pour toute la durée de l'étude. La mesure de la composition du foie en lipides et en glycogène a été réalisée au laboratoire de St Pée sur Nivelle, supervisé par Laurence Larroquet et Vincent Verron.

Les **lipides totaux** sont extraits à partir de 1 g de foie à l'aide d'une homogénéisation dans du chloroforme/méthanol 2 :1 (v/v) et mesurés par gravimétrie avec la méthode de Folch (Folch et al., 1957). Les triglycérides sont saponifiés avec du dichlorométhane et du potassium alcoolique, puis méthylés par une solution méthanolique (14 %) et de l'hexane. Les **acides gras libres** sont séparés et identifiés par chromatographie en phase gazeuse après leur conversion en esters méthyliques volatiles.

La quantification du glycogène dans le foie passe par deux étapes. Tout d'abord, le glucose libre est mesuré à partir de 100 mg de foie broyé puis hydrolysé par du KOH à 100°C pendant 2h30. Le glucose libre et le glucose total sont mesurés en utilisant la précédente méthode colorimétrique du glucose plasmatique (Glucose GOD-POD, SOBIODA). Le glycogène présent dans le foie correspond à la différence entre le glucose total et le glucose libre pour chacun des échantillons. Le **glycogène présent dans le foie** est exprimé en mg de glucose par g de foie.

Analyses de la composition des aliments

Les trois aliments distribués aux animaux (aliment de démarrage, de croissance et la poudre de gavage, **Annexe 3**) sont fournis par SOAL Haut-Mauco (France). Ces aliments sont distribués avec leurs étiquettes de compositions commerciales, ne détaillant pas la composition des acides gras libres présents. Des analyses complémentaires ont donc été réalisées pour confirmer et compléter les étiquettes, supervisées par Anne Surget **(Tableau 2.1)**.

Le taux de **matière sèche (MS, %)** et **des cendres (%)** des aliments sont obtenus en calculant la différence entre le poids initial et le poids après dessication ou après incinération par four.
Les protéines brutes présentes dans les aliments sont, dans un premier temps, minéralisées par de l'acide sulfurique et fixées sous forme de sulfate d'ammonium (Rampe à minéralisation Digestor 40 Auto 2540 et Récupérateur de valeur Scrubber Tecator). Un titrage colorimétrique automatisé est ensuite réalisé (KJELTEC 8400) donnant **la quantité de protéines (%**).

	Aliment de démarrage PAG 1301	Aliment de croissance PAG 1320	Poudre de gavage
Acides gras saturés			
C14:0 (%)	0,08 ± 0,06	0,07 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C15:0 (%)	0,04 ± 0,00	0,28 ± 0,14	0,40 ± 0,07
C16:0 (%)	15,63 ± 0,68	15,39 ± 0,07	14,28 ± 0,71
C17:0 (%)	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,00
C18:0 (%)	1,74 ± 0,03	1,65 ± 0,01	1,70 ± 0,01
C20:0 (%)	0,32 ± 0,00	0,32 ± 0,0	0,36 ± 0,01
C22:0 (%)	0,20 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,12 ± 0,00
C24:0 (%)	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,03	0,17 ± 0,01
Acides gras mono insaturés			
C15:1 (%)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C16:1 (%)	0,32 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,18 ± 0,01
C18:1 (%)	25,75 ± 0,16	26,45 ± 0,10	27,47 ± 0,28
C20:1 (%)	0,44 ± 0,03	0,43 ± 0,01	0,32 ± 0,04
C22:1 (%)	0,16 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,03 ± 0,04
Acides gras poly insaturés n6			
C18:2 n6 (%)	51,23 ± 0,34	51,12 ± 0,30	53,00 ± 0,99
C20:2 n6 (%)	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C20:3 n6 (%)	0,05 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,00 ± 0,00
C22:2 n6 (%)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Acides gras poly insaturés n3			
C16:4 n3 (%)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C18:3 n3 (%)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C20:5 n3 (%)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C21:5 n3 (%)	2,77 ± 0,07	2,62 ± 0,00	1,45 ± 0,12
C22:6 n3 (%)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Tableau 2.2. Analyses des acides gras présents dans les aliments

Les acides gras présents dans la partie lipidique des aliments (%) ont également été identifiés et sont représentés dans le tableau ci-dessus. En vert, sont encadrés les acides gras principaux des quatre familles : saturé, mono insaturé et poly-insaturé n6 et n3.

L'**énergie brute (kJ/g)** est calculée à l'aide d'une bombe calorimétrique qui permet de déterminer le pouvoir calorifique et donc l'énergie dégagée par l'aliment (IKA CALORIMETER C5003 ADIABATIC).

L'**amidon (MS)** est dosé à partir du kit mégazyme et 100 mg d'aliment. L'échantillon est mélangé à une première enzyme (alpha-amylase) puis incubé 12 min à 100°C. Une seconde enzyme (amyloglucosidase) est ajoutée avant une incubation de 30 min. Les échantillons sont dilués au 1/50ème avant d'être dosés par colorimétrie.

Les **lipides totaux** et l'identification des **acides gras libres** suivent les mêmes méthodologies que celles précédemment décrites pour les échantillons de foie. **Toutes les mesures des aliments sont rapportées à la quantité de matière sèche (MS), (Tableau 2.1), et les acides gras correspondent au pourcentage de la partie lipidique de l'aliment (Tableau 2.2).**

2.4. Mesures moléculaires

Les analyses moléculaires sont réalisées à partir des échantillons de tissu conservés à -80°C et se limitent ici à des expressions relatives de gènes. Dans le but de déterminer ces expressions relatives, trois étapes sont nécessaires : l'extraction des ARNs totaux, la rétrotranscription des ARNs en ADNs complémentaires et l'amplification des séquences d'intérêt par quantification en temps réel de la réaction en chaîne par la polymérase (qPCR). La préparation des échantillons des cinétiques embryonnaires a été réalisée par Michaël Marchand.

Les ARNs totaux sont extraits à partir d'un échantillon compris entre 50 et 100 mg (foie) et de 500 mL de TriZol (Thermofisher). Après broyage et homogénéisation de l'échantillon, du chloroforme est ajouté permettant de séparer les ARNs de l'ADN et des protéines. Après centrifugation, la phase supérieure contenant en majorité les ARNs totaux est récupérée et mélangée à de l'isopropanol engendrant la précipitation des ARNs. Deux lavages successifs sont réalisés à l'éthanol pour purifier un maximum les ARNs totaux. La qualité des ARNs totaux extraits est confirmée par une migration dans un gel d'agarose à 1,2 %, ainsi que par une quantification par spectrophotomètre. Les échantillons sont ensuite tous dilués à 500 ng/µL.

Dans le but de passer des ARNs totaux à leurs ADNc, une rétrotranscription (RT) est nécessaire après une étape de dénaturation de l'ADN potentiellement présent dans l'échantillon (traitement à la DNAase). L'échantillon dilué en fin d'extraction est mélangé à 2µL de random primer, 2 µL de dNTP et 1 µL d'ARN de luciférase (ARN exogène ajouté pour servir de control de RT, Promega). Une première incubation est réalisée à 65°C pendant 5 min et 1 min à 4°C. La séparation des deux RT (RT1 et RT2) est faite en déposant 12 µL dans deux puits, à partir du précédent mélange. Dans chacun des puits, 1,5 µL d'eau RNase free, 4 µL de Tampon 5X, 1 µL de dTT, 1 µL de RNase out et 0,5 µL de Super script (SuperScript III RT, Thermofisher) sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite incubés selon le protocole suivant : 5 min à 25°C, 60 min à 55°C et 15 min à 70°C.

Les ADNc obtenus sont dilués au 1/80ème, avant d'être amplifiés par qPCR.

L'amplification nécessite des amorces d'ADN spécifiques à un gène pour pouvoir amplifier des séquences spécifiques. L'ADNc (2 µL) est mélangé avec 7,5 µL de Sybr Green (kit Sybr Green Fast Mix, VWR) et 5,5 µL du mélange des deux amorces, à 100mM avant mélange. Finalement des puits de 15 µL sont amplifiés en suivant le programme suivant : 10 min à 95°C, 40 cycles de 3 s à 95°C et 30 s à 60°C. Les échantillons sont déposés en duplicat. La quantification en temps réel de l'amplification de la séquence spécifique est enregistrée par la machine BIORAD CFX et nous permets d'obtenir une valeur de ct par échantillon. Il est possible de vérifier la qualité de l'amplification via les courbes d'amplification et de fusion des échantillons.
La première qPCR réalisée correspond à l'amplification de la luciférase dans les différents échantillons. Cette première qPCR permet de valider l'étape de la RT, puisque la luciférase doit être amplifiée de la même façon dans tous les échantillons. Tout d'abord, un échantillon n'est conservé que si l'écart entre ses deux duplicats est inférieur à 0,5 Ct. Au sein d'un même groupe, les points aberrants sont retirés (grubbs.test) et le groupe est validé uniquement si son étendue est inférieure à 2 Cts. Finalement, la vérification de l'homogénéité des échantillons compare les Cts moyens de tous les groupes entre eux, et la différence ne doit pas être supérieure à 2 Ct.

Dans le but d'amplifier un grand nombre de gènes d'intérêt pour un grand panel d'échantillons, un Fluidigm a été réalisé par le laboratoire Gentyane (UMR 1095 Génétique Diversité et Ecophysiologie des Céréales, Clermont-ferrand, FRANCE). Cette technique nous permet d'obtenir l'expression de 95 gènes sélectionnés pour 90 échantillons en une plaque.

Les amorces spécifiques sont dessinées sur la plateforme ncbi, produites par le laboratoire d'Eurogentec, et validées avec une gamme en qPCR, complétée par un séquençage de la séquence amplifiée (Genewiz, Germany GmbH Leipzig, ALLEMAGNE).

Une fois la quantification des ADNc réalisée (Ct, *cycle threshold* obtenu), il est possible de calculer les **expressions relatives des gènes d'intérêt**. La détermination des expressions relatives est faite via la méthode de Livaak, soit selon l'expression $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) avec ΔCt = Ct gène d'intérêt – Ct gènes de référence et ΔΔCt = ΔCt échantillon - ΔCt référence (moyenne de tous les Cts des échantillons).
Les gènes de référence peuvent être uniquement la luciférase ou bien la luciférase combinée à d'autres gènes stables (précisé dans chacune des expérimentations). Lors des Fluidigm, plusieurs gènes de référence ont pu être sélectionnés en utilisant l'outil GeNorm de R (détaillé dans la partie suivante).

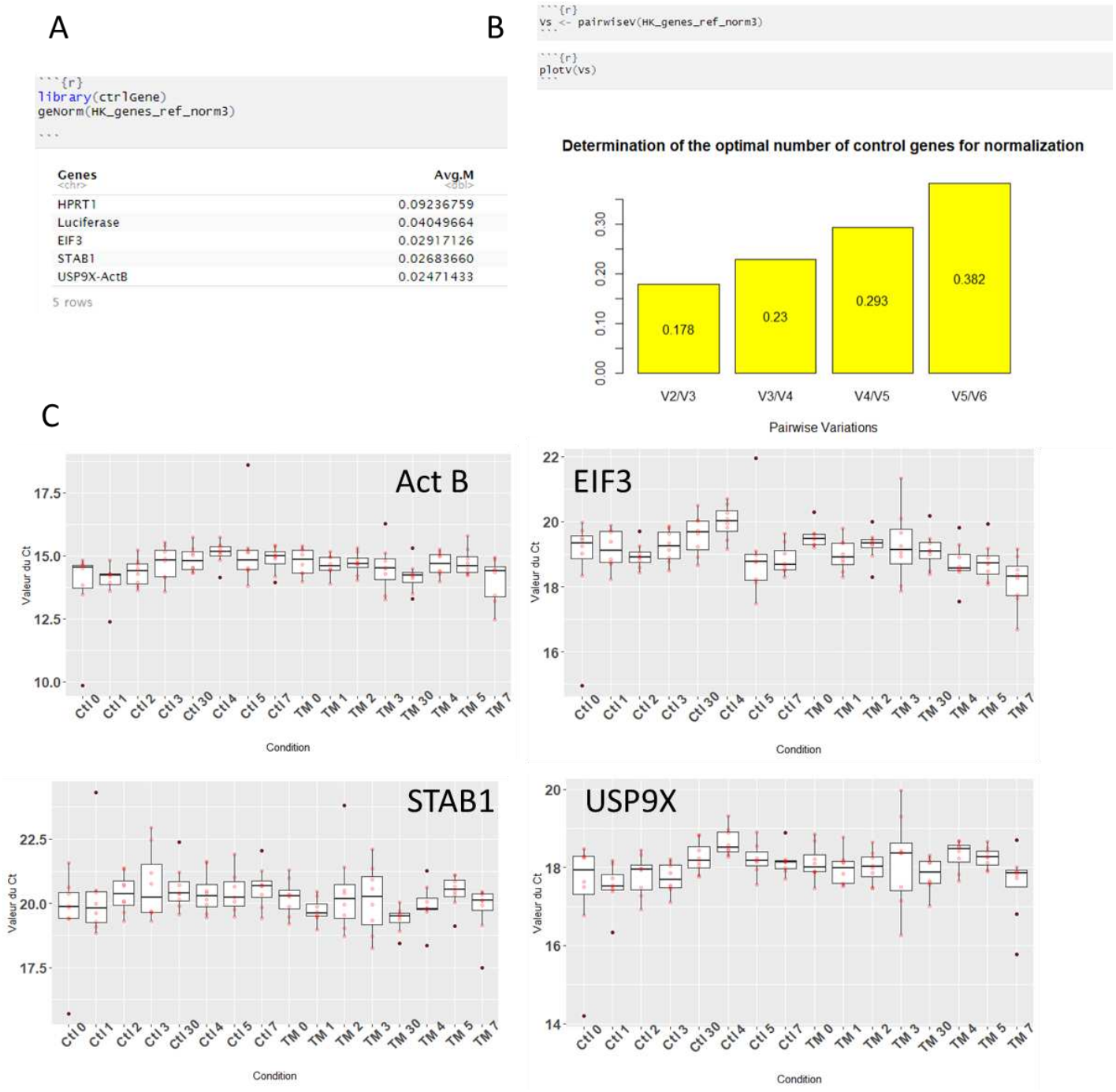


Figure 2.5. Illustration de l'utilisation de GeNorm (R)

Le package CtrlGene permet d'évaluer les différents potentiels gènes de référence. La recherche de gène a été réalisée sur les données de la cinétique horaire, avec la valeur de stabilité de l'association des différents gènes (A), le nombre optimal de gène de référence à choisir (B) et les représentations graphiques des Ct bruts pour les quatre gènes conservés en tant que gène de référence (C). Les Cts bruts sont représenté pour chacun des échantillons passé au Fluidigm, soit pour les deux groupes (Ctl et MT) et les huit prélèvements (0, 30min, 1h, 2h, 3h, 5h, 7h).

Ctl Contrôle, TM manipulation thermique

2.5. Traitement des données statistiques

Pour l'ensemble des études, le traitement des données a été réalisé avec R (version 3.6.2) et l'interface Rstudio. Pour des résultats comme l'éclosabilité, la mortalité embryonnaire ou encore le sexe ratio, une seule mesure, la comparaison des deux conditions a été faite à partir de Chi² test (*chisq.test*). *A contrario*, deux conditions, avec des mesures individuelles, sont comparées à l'aide de tests paramétriques (*t.student*), ou non paramétriques (*wilcox.test*) si les conditions d'application des tests paramétriques ne sont pas respectées (normalité des données avec *shapiro.test* et homoscédasticité des données avec *var.test*). Quand plus de deux conditions sont à comparer, des Anova deux voies sont appliquées si les conditions d'applications sont respectées (indépendance et normalité des résidus et homoscédasticité des données, avec *durbinWatsonTest*, shapiro.test et *leveneTest* respectivement). Sinon, de simples tests paramétriques ou non-paramétriques sont appliqués en comparant deux à deux les variables.

En général, les résultats sont représentés par la moyenne du groupe ± l'écart type et les différences entre deux conditions sont considérées significatives uniquement quand la p-value est strictement inférieure à 0,05. De plus, les tests sont réalisés uniquement si un effectif minimal de six est respecté, sinon le terme « tendance » sera utilisé pour décrire les résultats.

Un des outils de R très utile et détaillé dans cette partie est l'outil GeNorm (package CtrlGene). Cet outil permet de choisir les gènes de référence parmi ceux préalablement choisis comme potentiels gènes de référence (Carvalho et al., 2019). Effectivement, à partir des données brutes de Ct, la fonction *geNorm* va calculer la stabilité des différents gènes, la stabilité du gène le plus stable avec le 2ème gène le plus stable, celle des deux premiers associés avec le 3ème gène le plus stable, et cela jusqu'au dernier gène de la liste. Comme représenté en **Figure 2.5A**, avec en gènes les plus stables USP9X et ActB. Une seconde fonction, *pairwise*, vient compléter cette première indication, de la stabilité des combinaisons de gènes, en déterminant le nombre optimal de gènes de référence à sélectionner parmi ceux proposés au tout début (**Figure 2.5B**). Le test du pairwaise est réalisé dans le but d'évaluer la variation entre la normalisation des n premiers gènes et la normalisation si un nouveau gène est ajouté au groupe précédent (n+1 gènes). Il faut favoriser une valeur faible pour un maximum de gènes. Nous sélectionnons ainsi les gènes de référence qui sont rassemblés sous la forme d'une moyenne géométrique pour chaque échantillon.

CHAPITRE 3 :

Optimisation de la manipulation thermique

Article 1 (Andrieux et al., 2022, Animal)

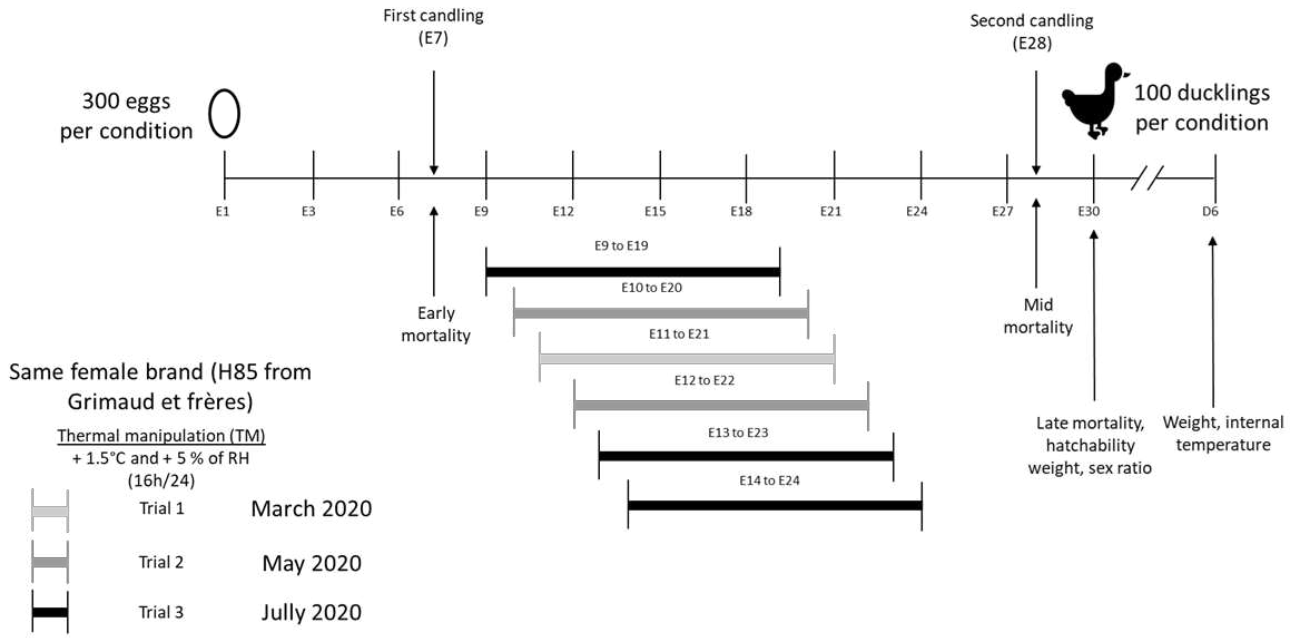


Figure 3.1. Protocole expérimental des trois premiers essais de la thèse (Andrieux et al., 2022)

Les différentes manipulations thermiques testées sont représentées sur la période d'incubation des œufs de canard mulard. Les changements de condition d'incubation (+ 1,5°C 16h/24 et une HR de + 5 %) sont appliqués sur une durée de 10 jours, représentée par les lignes verticales. La période E11-E21 a été testée au cours de l'essai n°1 (ligne gris clair), les périodes E10-E20 et E12-E22 au cours de l'essai 2 (ligne gris foncé) et les fenêtres E9-E19, E13-E23 et E14-E24 pendant l'essai 3 (ligne noire). Un groupe contrôle a été réalisé dans chacun des essais avec une température de 37,6°C et une humidité relative (HR) de 62,6 %.

E jour embryonnaire, D jour de vie



Figure 3.2. Relevés de température et d'humidité relative dans un incubateur

Chacun des incubateurs est équipé de deux sondes indépendantes mesurant toutes les 15 minutes la température (ligne bleue) et l'humidité relative (HR, ligne verte). Le relevé d'incubation, ci-dessus, correspond à un incubateur avec des changements de conditions d'incubation 16h/24 (+ 1,5°C et + 5 % HR) sur une période de 10 jours. Des pics d'humidité sont visibles quotidiennement, avant chaque changement de condition, lié à la vaporisation manuelle en eau quotidienne réalisée par les animaliers.

La température d'incubation est très stable comparée à l'humidité relative qui fluctue beaucoup plus et dont les créneaux 16h/24 sont moins visibles.

1. Objectif et mise en place de l'essai

L'essai de l'article 1 concerne l'optimisation de l'éclosabilité suite à une manipulation thermique (MT). Comme rappelé précédemment, la précédente thèse a montré que deux des MT entrainaient une augmentation de la mortalité embryonnaire et une baisse de l'éclosabilité. Les MT discontinues étant préférables pour la survie des animaux (T. Loyau et al., 2015), nous n'avons pas tenté de reproduire la condition +1°C 24h/24. Nous nous sommes donc intéressés à la condition + 1,5°C 16h/24 E13-E27 qui malgré une application discontinue présentait une hausse de la mortalité embryonnaire et une baisse de l'éclosabilité. Dans le but de réduire les impacts négatifs, la durée de la fenêtre de manipulation thermique a été réduite à 10 jours, contre 14 jours dans l'étude précédente. **L'objectif était d'identifier des périodes plus ou moins critiques, centrées autour du pic d'expression des gènes d'intérêt, pour une même intensité de MT (+ 1,5°C 16h/24).**

Au cours de l'étude, six fenêtres de 10 jours de MT ont été testées commençant de E9-E19 jusqu'à E14-E24, incluant des groupes contrôle (**Figure 3.1**). Au début de chaque incubation, 300 œufs (génotype H85, Grimaud Frères Sélection, Roussay France) sont répartis de façon aléatoire dans chacun des groupes, dans différents incubateurs (modèle SOLOGNE de LA NATIONALE, modèle reconditionné). Les groupes contrôles sont maintenus à 37,6°C avec une humidité relative (HR) proche de 60 % sur toute la durée d'incubation (E0 à E28). *A contrario*, les groupes dits MT, subissent une hausse de la température d'incubation pour atteindre les 39,1°C (+ 1,5°C) et une hausse de l'HR pour essayer de rester autour de 65 %, 16h/24, et ce sur les six fenêtres d'étude. Une rotation automatique des œufs de 90°, toutes les 3h, est effectuée et une humidification manuelle des œufs est faite quotidiennement avant les changements de condition d'incubation. La température et l'humidité relative sont contrôlées via deux sondes indépendantes (LoRa® SPY U) dans chacun des incubateurs. Les deux principaux paramètres sont ainsi mesurés toutes les 15 minutes (**Figure 3.2**). A E28, tous les groupes sont regroupés dans l'éclosoir (modèle BRETAGNE de LA NATIONAL, modèle reconditionné) à 37,3°C et 80 % d'HR. Pendant quatre jours, les naissances sont enregistrées une fois par jour.
Uniquement des données zootechniques ont été mesurées, au cours de cette étude, pendant toute la durée de l'embryogenèse et les premiers jours de vie. La proportion d'œufs non fertiles et la mortalité précoce sont mesurées à E7. La mortalité en milieu de développement embryonnaire est calculée à E28 et celle tardive à la fin de la période d'éclosion (E32). L'éclosabilité, le sexe ratio, la proportion de mâles nés, la température interne et le poids corporels sont également mesurés à E30.
Parmi les cantons nés le jour du pic d'éclosion (jour où le plus de canetons sont nés), 50 canetons mâles et 50 canetons femelles sont mis en élevage dans le but de relever leurs poids corporels et leurs températures internes cloacales.

2. Résumé de l'étude : principaux résultats

Parmi les six différentes fenêtres d'augmentation de température pendant le développement embryonnaire, il a pu être mis en évidence **qu'une hausse de température précoce engendrait une forte mortalité embryonnaire (E9 et E10)**. De plus, **cette forte mortalité semble impacter essentiellement les embryons femelles**. *A contrario*, une hausse de température tardive (E13 et E14) ne semble pas impacter le développement des embryons, la mortalité embryonnaire et l'éclosabilité sont égales au groupe contrôle.

Les fenêtres **E11-E21 et E12-E22**~~,~~ présentent une hausse significative de la mortalité en milieu de développement embryonnaire qui **n'impacte pas l'éclosabilité** en sortie d'éclosoir. Ces résultats laissent penser que l'augmentation de température sur ces deux fenêtres engendrerait **une pré-élimination des embryons dits « faibles »,** qui sont éliminés plus tardivement chez les groupes contrôles. De plus, tous les canetons programmés thermiquement, présentent une **différence significative du poids corporel à l'éclosion ainsi qu'une température interne plus basse après six jours d'élevage**. Ces deux points peuvent être interprétés comme des **marqueurs de la programmation thermique** des animaux.

Nous avons donc pu montrer qu'une hausse de la température d'incubation de **1,5°C pouvait ne pas avoir d'impact négatif** sur le développement embryonnaire en réduisant de quatre jours la manipulation thermique et en la réalisant à partir du milieu de développement embryonnaire (de E11-E21 à E14-E24). Il faut dorénavant voire si ces nouvelles manipulations thermiques peuvent impacter sur le long terme la production de foie gras. **Pour espérer un impact de la manipulation thermique, nous avons choisi la fenêtre la plus précoce des quatre, soit E11-E21, pour la suite de nos études.**

Ce **chapitre 3** a fait l'objet d'un article publié dans Animal :

Article 1 : **Charlotte Andrieux**, Sandra Biasutti, Philippe Morganx, Mireille Morisson, Vincent Coustham, Stéphane Panserat, Marianne Houssier, *Identification of Critical Embryonic Periods to Modify Egg Incubation Temperature in Mule Ducks* (Animal, 2022) **[Accepté]**

Article 1: *Identification of Critical Embryonic Periods to Modify Egg Incubation Temperature in Mule Ducks* (Animal, 2022)

Résumé

L'incubation des œufs de canards mulards, essentiellement utilisés pour la production de foie gras, est l'une des périodes les plus critiques dans la filière. Les meilleurs paramètres d'incubation ont déjà été bien décris chez les volailles en se basant sur l'éclosabilité, cependant les paramètres pour les canards manquent dans la littérature. Dans cette étude, nous avons testé différentes conditions d'incubation en faisant varier deux paramètres : la température et l'humidité relative, chez le canard mulard. Ces variations sont appliquées à différentes périodes du développement embryonnaire dans le but de mesurer l'impact des changements environnementaux sur les performances zootechniques. La température a été augmentée de 1,5°C (16h/24) et l'humidité relative a été réglée sur 65 %, et ce pendant 10 jours. Les six fenêtres de 10 jours ont été appliquées du 9ème jour embryonnaire jusqu'au 14ème. Nos résultats rejoignent ceux des précédentes études montrant qu'une hausse de la température d'incubation, même si l'humidité relative est ajustée, peut avoir des conséquences négatives sur la mortalité embryonnaire s'élevant jusqu'à 24,5 % pour la condition E10-E20 (P value < 10^{-5}). Cependant, l'éclosabilité peut être maintenue égale à celle du groupe contrôle quand les changements de conditions ont lieu plus tardivement dans le développement embryonnaire (à partir du 11ème jour embryonnaire). Le sexe-ratio, l'éclosabilité, le poids corporel à l'éclosion et la température interne à l'éclosion sont également sensible à ces changements, et leurs modifications peut avoir des impacts majeurs sur les performances à plus long terme. Ces résultats peuvent contribuer au développement de l'approche de la programmation thermique embryonnaire, plus particulièrement pour la filière palmipède à foie gras.

Mots clefs : Embryogenèse, Eclosabilité, Incubation, Mortalité, volailles

Animal 16 (2022) 100416

Contents lists available at ScienceDirect

Animal
The international journal of animal biosciences

Identification of different critical embryonic periods to modify egg incubation temperature in mule ducks

C. Andrieux [a], S. Biasutti [b], J. Barrieu [c], P. Morganx [c], M. Morisson [d], V. Coustham [a], S. Panserat [a], M. Houssier [a,*]

[a] Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, INRAE, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Saint Pée sur Nivelle 64310, France
[b] Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, IUT Génie Biologique, 40000 Mont de Marsan, France
[c] INRAE Bordeaux-Aquitaine, UEPFG (Unité Expérimentale Palmipèdes à Foie Gras), Domaine d'Artiguères 1076, route de Haut Mauco, 40280 Benquet, France
[d] GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31326 Castanet Tolosan, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 June 2021
Revised 4 November 2021
Accepted 5 November 2021

Keywords:
Embryogenesis
Hatchability
Incubating
Mortality
Poultry

ABSTRACT

Egg incubation of mule ducks, mainly used for fatty liver production, is one of the critical phases in this sector. Based on hatching rate, the best incubation parameters have already been well described for poultry, but the literature on ducks is lacking. In this study, we tested different incubation conditions by varying two important factors, temperature and relative humidity, in mule ducks. These variations were applied at different periods during embryogenesis in order to measure the impact of environmental disturbances on different zootechnical performances. The temperature was increased by 1.5 °C (16 h/24) and the relative humidity was set up to 65%, during 10 days. Six 10-day developmental windows were tested, from embryonic day 9 to embryonic day 14. Our results are in line with previous reports showing that increasing incubation temperature, even when relative humidity is adjusted, can have a negative impact on duck embryonic mortality up to 24.5% for the condition E10-E20 ($P < 10^{-5}$). However, the hatchability can be maintained at the level of the control groups when these modifications are applied on the latest windows (from the 11th embryonic day). Sex ratio, hatching BW, and internal temperature are also sensitive to these incubation changes, and their modification could have a major impact on later zootechnical performance. These results should contribute to the development or embryonic temperature programming approaches, especially for the fatty liver production industry.
Published by Elsevier B.V. on behalf of The Animal Consortium. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Implications

Egg incubation technology is constantly evolving, with high-precision machines allowing better control of environmental factors. One of the main environmental factors is the temperature inside the incubator and it has been observed that an increase in incubation temperature can improve performance at prehatch, hatch and posthatch periods. However, we show in this study that this temperature increase cannot be made at any time during mule duck embryogenesis if a decrease in hatchability is to be avoided. These results could be of great use to the fatty liver duck industry, especially in projects wishing to use embryonic thermal programming.

Introduction

The technology of egg incubation is already well known in poultry field and is a key to obtain good performances at hatch and posthatch (Wilson, 1991; Mueller et al., 2015). Conditions of incubation depend not only on the temperature and the relative humidity but also on gas exchanges and several other parameters to mimic the natural phenomena, such as rotation of eggs or light exposure. These conditions are the centre of many studies to optimise zootechnical performances at birth (Landauer, 1961; Yahav and Tzschentke, 2006; El-Hanoun et al., 2012; Boleli et al., 2016; Abd El-Hack et al., 2019; El-shater et al., 2021). The most published measures are weight, internal temperature, sex ratio and also hatchability, defined as the percentage of fertile eggs that produce a live animal (King'ori, 2011). The best conditions of incubation are based on the optimum hatchability (Barott, 1937; Bruzual et al., 2000; Harun et al., 2001).

In recent decades, increasing incubation temperature has emerged as a promising way to programme the physiology of avian

* Corresponding author at: 371 rue du ruisseau, 40000 Mont de Marsan, France.
E-mail address: marianne.houssier@univ-pau.fr (M. Houssier).

https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100416
1751-7311/Published by Elsevier B.V. on behalf of The Animal Consortium.
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

species, resulting in improved thermal tolerance of adults (Piestun et al., 2008), and increased meat production in chickens (Piestun et al., 2013) or increased fatty liver production after a period of overfeeding in ducks (Massimino et al., 2019). However, since the temperature of incubation is the factor with the strongest impact on growth and development of embryos (Al Sardary and Mohammad, 2016; Maatjens et al., 2016), its modulation can easily impair hatchability. The relative humidity (**RH**) is a parameter that can be used to avoid egg dehydration during a rise in temperature and to improve hatching performances (Barott, 1937) but it is also one of the most difficult to control. Nevertheless, depending on the duration, period, level and direction of temperature change applied, the consequences of survival on the hatching rate are highly variable and difficult to predict (Halle et al., 2012; Loyau et al., 2013; Piestun et al., 2013; Al-Rukibat et al., 2016; Narinç et al., 2016; Massimino et al., 2019). In addition, the species studied may also greatly influence performance after a change in temperature during a certain incubation period, since opposite results were measured after a relatively similar short-term heat treatment during the last days of incubation between chickens (*Galliform*) (Halle and Tzschentke, 2011) and Pekin ducks (*Anseriform*) (Halle et al., 2012). These differences may be due to a different timing of the ontogeny of thermoregulatory mechanisms between these two species of different orders (Tzschentke and Basta, 2000; Halle et al., 2012), and could therefore also be seen within the same subspecies (animals of the same order and family) with different incubation times.

In fatty liver production, two species of male duck are used: Muscovy and mule. Mule duck is a sterile hybrid from the crossbred between a female Pekin (*Anas platyrhynchos*) and a male Muscovy (*Cairina moschata*) and is used for more than 99% of the production with around 16 000 tonnes of fresh fatty liver per year (Litt et al., 2021). The hatchability of duck is lower than hatchability of other poultry species, ranging from 65 to 82% against 79 to 85% for the other birds (Hodgetts, 1991), but the literature is not as broad as for other species such as broilers. The period of incubation of crossbred eggs is around 32 days for the mule duck, compared to 28 days for the Pekin and 35 days for the Muscovy (Brun et al., 2005). Conditions of incubation of the three species are relatively close, with an optimal ambient temperature comprised between 37 and 38 °C and a relative humidity between 60 and 80%, according to the embryogenesis period (Abd El-Hack et al., 2019).

The purpose of this study is therefore to measure, for the first time, a set of zootechnical parameters around the birth of mule ducks after a discontinuous (16 h/24 h) increase of 1.5 °C of the incubation temperature with an adjusted targeted RH of 65%. Six 10-day developmental windows were tested, from embryonic day 9 (**E9**) to embryonic day 14 (**E14**), to assess the impact of temperature on these parameters by measuring zootechnical performance before, during and after hatching.

Material and methods

Experimental design

Three experimental trials were done to test seven conditions of egg incubation (Fig. 1), including the control condition. Each condition was performed using 299, 300 and 289 eggs per incubator for trials 1, 2 and 3, respectively. In each trial, a control group was added, with an average temperature of 37.6 °C and an average RH of 61.5%, 62.8% and 63.6% for the trials 1, 2 and 3, respectively. The six other conditions differed from control groups by the temperature (+1.5 °C, 16 h/24) and RH (+5% targeted) during 10 days, but at different developmental stages during the incubation. In the trial 1, we applied the changes in conditions from embryonic day 11 (**E11**) until E21, first window chosen according to the high expression level of genes involved in lipid and carbohydrate metabolism measured during this period (Massimino et al., 2020). In the trial 2, windows E10 to E20 and E12 to E22 were tested. In the trial 3, windows E9 to E19, E13 to E23 and E14 to E24 were tested in order to cover a wide incubation period and to see if the periods are more or less traumatic for the embryos. The target of temperature has been reached for all the conditions but the targeted RH was more difficult to attain, and most of the time remained close to the control group (E9-E19: 62.5%, E10-E20: 64.3%, E11-E21: 59.8%, E12-E22: 61.9%, E13-E23: 63.0% and E14-24: 62.3%).

For the experimental trials 1, 2 and 3, eggs were obtained from the same females, aged 36, 42 and 49 weeks, respectively. The genotype H85 was provided by Grimaud Frères Selection company (Roussay, France). Eggs were collected on a day and stored at ambient temperature 3 days before incubation. Eggs were dispatched randomly between treatments to obtain an equal number of eggs in each group with 299, 300 and 289 eggs in trials 1, 2 and 3, respectively. In each trial, eggs were incubated in identical automated commercial incubators with the regulation of temperature, humidity and ventilation (SOLOGNE model of LA NATIONALE, reconditioned model). Incubation parameters were recorded during the whole incubation period, and temperature and RH were confirmed by two independent sensors (LoRa® SPY U). Each incubator had its own pair of sensors fixed on incubator inner wall close to the doors. All eggs were subjected to an automatic rotation of 90° every 3 h and were sprayed manually the afternoon before the changing of conditions of incubation.

Two light controls, called candling, were done during the incubation period in order to estimate the viability of the egg. The first was done at the 7th embryonic day (**E7**) and the second, after conditions of incubation change, at the 28th embryonic day (**E28**). Unfertile eggs were removed from incubators, and the remaining eggs were pooled to avoid local temperature disturbance.

On the 28th day of incubation, all eggs were placed in the same hatchery (BRETAGNE model of LA NATIONALE, reconditioned model) at 37.3 °C and 80% of RH. During 4 days, the number of newly hatched ducks was recorded once a day.

Egg incubation measurements

The temperature and the relative humidity, in incubators, were recorded every 15 min by sensors (LoRa® SPY U), and results were available on a software. Targeted at 60% for control conditions and 65% for treated conditions, means of RH throughout the 10-day incubation period were 61.5% for control and 59.8% for changes conditions in trial 1; 62.8% for control, 64.3% for E10-E20 and 61.9% for E12-E22 conditions in trial 2; 63.6% for control, 65.5% for E9-E19, 63.0% for E13-E23 and 62.3% for E14-E24 in trial 3.

At the first candling (E7), the number of non-fertile eggs and dead embryos was recorded. At the second candling (E28), only the number of dead embryos was recorded. Fertility, early (up to E7), medium (between E7 and E28) and late (in hatchery) mortality rates were therefore measured. Fertility was the ratio of the number of fertilised eggs, observed at E7, to the number of eggs in the incubator. Mortalities were the ratio of the number of dead eggs, recorded at E7, E28 and at hatch, to the number of eggs fertilised in the incubator.

Hatch and posthatch measurements

Once a day, the number and gender of hatched ducklings were recorded. The identification of the sex was based on two criteria: black spots on the duckling head and black eyes for males and no black spot and red eyes for females, completed by vent sexing

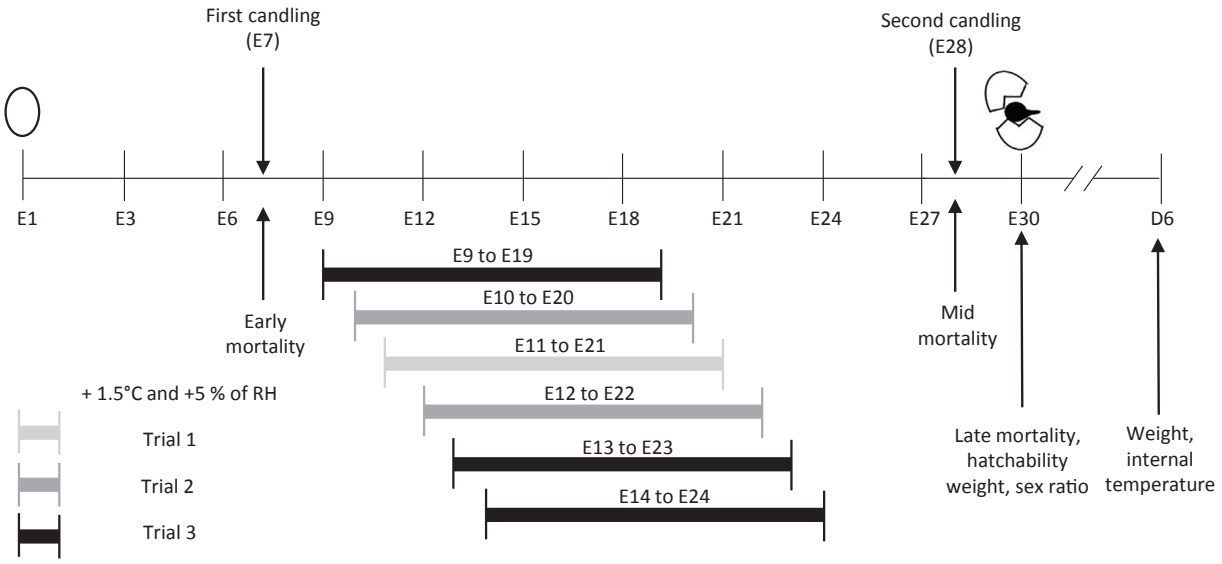


Fig. 1. Experimental design. The chronology of the different trials is schematised on this frieze representing the incubation time of mule duck eggs. Changes in conditions (+1.5 °C 16 h/24 and target +5% RH) applied for 10 days are illustrated by the horizontal lines representing 10-day intervals. The period from E11 to E21 was tested on trial 1 (light grey line), periods E10-E20 and E12-E22 on trial 2 (dark grey lines) and periods E9-E19, E13-E23 and E14-E24 on trial 3 (black line). A control group was present for each trial with a temperature of 37.6 °C and a mean relative humidity (RH) of 62.6%.

when it is not clear. The weight of male and female ducklings was recorded using a scale (SARTORIUS Signum 1, model SIWRDCP.1.3.1) during the peak hatching day corresponding to the day with the highest proportion of hatched ducklings (n = 129–214 excepted trial 1 n = 10). For each group, hatchability, sex ratio, mean weight and internal temperature, by using digital express thermometers (Digital Express Thermometer from Gilbert), were measured.

Around 50 male ducklings and 50 female ducklings, born at the hatching peak, were arbitrarily kept to do measurements of weight (Automatic weighing system) and internal temperature after 6 days of life. Internal temperatures were measured using digital express thermometers (Digital Express Thermometer from Gilbert), inserted into the cloaca. During the rearing period, water and food were supplied *ad libitum*.

Because of the health crisis related to COVID19, the trial 1 (March 2020 to April 2020) had to be stopped at D1. Only the weight and internal temperature of 10 animals at hatching were recorded due to staff limitations.

Statistical analysis

Within a single trial, statistical tests were done to compare the control group and groups with a change in incubation conditions. Hatchability, mortalities and sex ratio were compared by using a Chi-squared test. Weights and internal temperatures were compared by using one-way Anova or student and Wilcoxon tests depending on normality and homoscedasticity. For these tests, the individual was used as the experimental unit, and the variable response was studied according to the treatment. All statistical analyses were performed with R software version 3.6.2. Statistical testing was performed on datasets at a statistical significance of 5%.

Results

In each trial, an incubation control was done with constant conditions of incubation. Even if conditions were similar, we observed a variation between controls of the different trials, named the inter-trial dispersion (Fig. 2). Inter-trial dispersions were estimated by the difference between the highest value and each value of the two other trials. Regarding mid-embryonic mortalities, the maximum inter-trial dispersions were 2.0% between trials 1 and 2 and 3.8% between trials 3 and 2, although not significant (Fig. 2a). In contrast, for the late embryonic mortalities, differences were significant (Fig. 2b) and these maximal inter-trial dispersions were 3.5% between trials 1 and 2 and 5.7% between trials 3 and 2. Interestingly, the most variable factor also proved to be the most critical: hatchability. The maximum inter-trial dispersions were as high as 8.0% between trials 2 and 3, thus becoming significant with a p-value lower than 0.01 (Fig. 2c). Between trials 1 and 3, the dispersion was 3.7% and was not significantly different. Similarly, we did not measure a significant difference between the three trials for the sex ratio (Fig. 2d), despite a maximum inter-trial dispersion of 3.8% between trials 2 and 3.

For all the conditions, fertility of eggs was around 93% and the embryonic mortality at the first candling varied around 1% (data not shown). The second candling was done after the change of incubation conditions and reflected the impact of this change on the embryo mortality. The results of three trials conducted at different time with their own variability can only be compared statistically with their internal control (within the same row, Table 1). However, even considering the maximal inter-trial dispersion, it is possible to distinguish two groups among the experimental early change groups (with E9-E19 and E10-E20) and the late change groups (with E11-E21, E12-E22, E123-E23, and E14-E24) that appeared to respond differently to incubation changes. The average mid-embryonic mortality of the control groups was 8.3% while the increase of 1.5 °C (16 h/24, with the adjusted RH) in the early stages of development (from the 9th or 10th embryonic day), resulted in a strong increase of this rate in the second candling, reaching 24.5% for trial 2. This observation was then confirmed by the statistical tests performed within each trial (Table 1, first panel). In trial 3, the mid-embryonic mortality was significantly higher for the condition E9-E19 (reaching 20.5%) compared to the control of the trial 3, and conditions E13-E23 and E14-E24 (6.4%, 13.0% and 13.1%, respectively; $P < 0.05$). In trial 2, the mid-embryonic mortality was significantly higher for the condition E10-E20 (24.5% mortality) compared to the control of the trial 2 (10.2%), and the condition E12-E22 (15.9%) ($P < 0.05$). Changes in

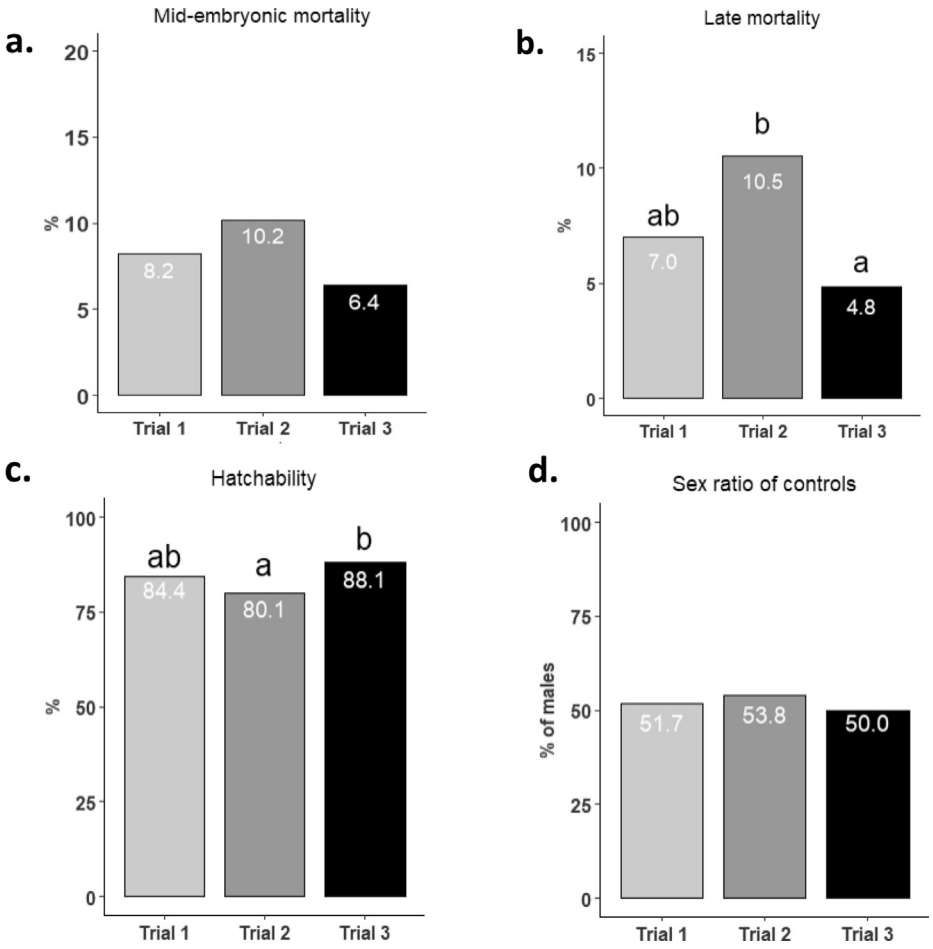


Fig. 2. The inter-trial dispersion between controls for 4 parameters: mid-embryonic mortality, late embryonic mortality, hatchability and sex ratio in mule ducks. Measurement of mid-embryonic mortality (n = 265–279) (a), late embryonic mortality (n = 247–256) (b), hatching rate (c) (n = 265–279), and sex ratio (d) (n = 221 to 238) for the control conditions of trials 1, 2, and 3. χ^2 statistical tests were used. Bars with different superscript letters are significantly different (P < 0.05).

condition from E11 to E14 led to a significantly lower increase in mortality than earlier stages and one condition (E12-E22) did not show a significant difference compared to its control from trial 2.

The measurement of late mortality was done inside the hatchery after the incubation period, and all results were grouped in the second panel of the Table 1. However, no statistical difference has been detected at this stage.

For all the conditions, the hatching peak occurred on embryonic day 30 (**E30**), with an average hatchability of 84.2% for control groups (Table 1, third panel). Again, the two earliest groups (trials 2 and 3) presented the strongest impact on hatchability, with a significant decrease compared to their own control (P < 0.001), dropping below 70%. On the other hand, among the four late condition changes, only the E14-E24 differed significantly from its control.

In the last panel of the Table 1, the proportion of total males born appeared to be higher with earlier temperature change. If we looked at groups with early condition changes, we observed a significantly higher sex ratio in favour of males, compared to their own control. Groups E9-E19 and E10-E20 raised indeed a rate of 67.6% and 65.5% of males compared to controls with an average around 52% (P < 0.05). Three out of the four other experimental groups have the same sex ratio as the controls.

Posthatch BW and internal temperature measurements are listed in Table 2 all groups with condition of incubation changes presented lower BWs than their control group on the day of hatching (Table 2, first panel). The condition E11-E21 appeared to have a lower average birth weight than the other groups but this result was not statistically different, due to the fact that only 10 animals were sampled. However, 6 days later (**D6**), most of the experimental groups had caught up to the weight of their control group (Table 2, second panel). At this stage, only the condition E12-E22 remained significantly below its own control (P < 0.001). At D6, the internal temperature was also lower for all groups with changes in incubation conditions, compared to their own controls (Table 2, third panel) and these differences were significant (P < 0.01).

Discussion

In ducks, the incubation is one of the most delicate periods in terms of survival (Wilson, 1991; Mueller et al., 2015). In recent years, the concept of embryonic thermal programming has implied that changes in egg incubation conditions could optimise animal resistance and even production (Yahav et al., 2004; Piestun et al., 2011; Massimino et al., 2019; Carvalho et al., 2020). In this study, we tested six embryonic periods during which we increased temperature and RH, in a discontinuous way (16 h/24 h) to measure the consequences of such variations on early performances.

Evidence of variability between trials

Many external parameters may explain differences in hatchability within the same species, such as age of females, quality of transport, storage of eggs before incubation and incubation condi-

Table 1
Impact of changing incubation conditions on embryonic mortality and birth parameters in mule ducks. The results of mid-mortality (first panel), late mortality (second panel), hatchability (third panel) and proportion of males born (fourth panel) are listed according to the embryonic window (E). The maximum of inter-trial dispersion (ITD) and the average ± SD of controls complete the table.

		+1.5 °C 16 h/24 65% of relative humidity targeted					
Incubation results	Control	E9-E19	E10-E20	E11-E21	E12-E22	E13-E23	E14-E24
Mid-embryonic mortality (%)							
Trial 1	8.2[b]			13.8[a]			
Trial 2	10.2[b]		24.5[a]		15.9[b]		
Trial 3	6.4[c]	20.5[a]				13.0[b]	13.1[b]
Estimation of max ITD		+3.8		+2.0		+3.8	+3.8
Average ± SD	8.3 ± 1.9						
Late mortality (%)							
Trial 1	7.0			5.5			
Trial 2	10.5		13.9		9.1		
Trial 3	4.8	9.0				4.7	4.0
Estimation of max ITD		+5.7		+2.5		+5.7	+5.7
Average ± SD	7.5 ± 2.9						
Hatchability (%)							
Trial 1	84.4			76.1			
Trial 2	80.1[a]		62.1[b]		76.1[a]		
Trial 3	88.1[a]	69.5[c]				82.7[a]	80.5[b]
Estimation of max ITD			+8.0	+3.7	+8.0		
Average ± SD	84.2 ± 4.0						
Proportion of males born (%)							
Trial 1	51.7			60.3			
Trial 2	53.8[b]		65.5[a]		60.5[ab]		
Trial 3	50.0[c]	67.6[a]				60.7[ab]	55.5[bc]
Estimation of max ITD		+3.8		+2.1		+3.8	+3.8
Average ± SD	51.8 ± 1.9						

[a] Within a row, mean values without a common superscript letter differ significantly ($P < 0.05$).

Table 2
Impact of changing incubation conditions on rearing parameters in mule ducks. The results of weight at hatch (first panel), weight at 6 days (D6) (second panel) and internal temperature at 6 days (third panel) are represented according to the embryonic window (E). The condition E11-E21 has no data at D6 for BW and internal temperature.

		+1.5 °C 16 h/24 65% of relative humidity targeted					
Rearing parameters	Control	E9-E19	E10-E20	E11-E21	E12-E22	E13-E23	E14-E24
Weight at hatch (g)							
Trial 1	49.0			46.5			
Trial 2	53.7[a]		52.5[b]		51.8[b]		
Trial 3	54.7[a]	52.9[b]				51.8[b]	52.3[b]
Weight at D6 (g)							
Trial 2	174.2[a]		175.6[a]		158.6[b]		
Trial 3	215.7	251.0				209.5	212.3
Internal temperature at D6 (°C)							
Trial 2	41.8[a]		41.3[c]		41.5[b]		
Trial 3	41.9[a]	41.7[b]				41.8[b]	41.7[b]

[a] Within a row, means values without a common superscript letter differ significantly ($P < 0.05$).

tions (El-Hanoun et al., 2012) However, the contribution of these parameters should be minimal in your trials since we were careful to reproduce the same control conditions between trials. Besides, the same incubator was used for all the control conditions in the three trials to avoid an incubator effect, but an inter-trial dispersion was still observed. The age of the females providing the eggs changed between trials, but the results do not show a correlation between this factor and hatching, since the oldest females were not the ones that gave the worst yields. Only the relative humidity was difficult to control and varied between 61.5% and 63.6% despite a target of 60%. This difference could be at least partially responsible for the variability in hatching measured at the end of the trial, since RH was a very important parameter for the proper conduct of embryogenesis (Barott, 1937; Bruzual et al., 2000; Peebles et al., 2001). The RH variation could be related to the manual part of its control by spraying, and therefore to the spraying duration, the amount of water sprayed or the duration of door opening... Finally, the observed inter-trial dispersion could also be due to random but significantly different inter-individual variability between groups in different trials.

Consequently, the actual impact of the treatment was tempered by this inter-trial dispersion which was allowed by the realisation of a control in each of the trials.

Early embryonic stages are more sensitive to temperature changes

Three critical periods have been described in poultry to explain embryonic mortality (Romanoff, 1949; Sauveur, 1988). The early mortality was linked to difficulties in setting up the first embryonic structures. The mid-mortality was mainly due to the start of essential functions as the respiration or the kidney function. The mortality in the hatchery, also called late mortality, involved the difficulty of getting out of the eggshell. In consequence, a change of environmental factors during these critical periods could be lethal for embryos (Romanoff, 1949; Ono et al., 1994; Loyau et al., 2015).

Here, the changes in incubation conditions were applied for 10 days, over six different periods from E9 to E14, thus over a fairly wide range of time corresponding to the middle of the incubation and known to have high plasticity at a molecular level in duck (Massimino et al., 2020). We measured early embryonic mortality

(E7), mid-mortality (E28) and late mortality in the hatchery. The early embryonic mortalities were identical between all groups, due to the lack of change in incubation conditions at this time. In contrast, we showed an increase in mid-mortality in almost all treated groups compared to their own control. These results confirmed that incubation must respect very strict parameters to obtain good hatch performance (Wilson, 1991; Mueller et al., 2015) and that the application of new incubation conditions for the purpose of embryonic programming requires careful analysis of its impact on survival.

However, we also found an interesting result regarding the period of change, with two groups standing out. Indeed, trials 2 and 3 allowed us to statistically compare early change conditions (starting at E9 and E10) with later changes (starting at E12, E13 and E14), and these comparisons showed us that the earlier the changes, the greater the impact on embryonic mortality.

These results suggest that our incubation parameter changes were more likely to disrupt the early settlement of embryonic structures, than the later functionality of essential organs. Because several systems are organised during the first 2 weeks of embryogenesis, (the digestive system, the body temperature regulation system, the organisation of embryonic membranes, the immune system, the nervous system, etc.), this period appeared to be more critical and the embryo appeared to be more vulnerable to external factors (Dibner et al., 1998; King et al., 2000; Jenkins and Porter, 2004; Baarendse et al., 2007; De Oliveira et al., 2008; Baggott, 2009). Consistent with previous studies in poultry, these results in ducks confirm that early embryonic stages are more sensitive to changes in environmental factors, and that a modification in condition can therefore become lethal (Yan et al., 2015; Al Sardary and Mohammad, 2016; Carvalho et al., 2020).

Changes in incubation conditions provide a first challenge before hatching

A few days later, almost all late change conditions (after E11) showed no significant decrease in hatchability compared to their own control, unlike the two earliest conditions. These data demonstrated that although mid-term mortality was increased by the later changes in incubation condition, hatching performance was the same as the control groups. Finally, this assessment indicated that total mortality during embryogenesis was less impacted by a discontinuous temperature increase of 1.5 °C and 5% RH, when applied from the 11th embryonic day, confirming previous study in chicken (Collin et al., 2005; Piestun et al., 2008). On the contrary, when these increases in temperature and RH were applied from E9 or E10, hatchability was definitely lower compared to the control condition. This decrease, visible even considering the theoretical maximum dispersion, was probably directly related to the high mortality measured at the second candling. This information could be a valuable aid for the design of new embryonic thermal programming conditions in mule ducks.

These results led us to hypothesise a pre-elimination of weak embryos during the late changes of incubation conditions, and a proportional reduction in hatchery mortality. Unfortunately, we did not measure a significant decrease in late mortality, certainly because of the low number of deaths at this period for all groups. However, it can be assumed that in the control groups, mortality spread over time because the weakest embryos were not exposed to environmental changes until hatching, but ultimately the final survival rate was the same as for the late treated groups. This observation also suggests that there was no selection of animals despite the high mid-mortality observed with these new incubation conditions, but potentially a time lag, which could therefore be worth further investigating in the context of embryonic programming. On the contrary, the earlier changes (starting from E9 or E10) actually induced a higher overall mortality, and not a time lag.

An unbalanced sex ratio linked to the crossbred but also influenced by environmental factors

The unbalance in the sex ratio of mule duck is well known with a preponderance of males at hatching (Batellier et al., 2004a), explained by an alteration of female embryo development (Byerly and Jull, 1935). This unbalanced sex ratio follows the rule of Haldane (Haldane, 1922), explaining the greater fragility of the heterogamous sex (the female in ducks) during cellular division.

In contrast to a recent study that showed no effect of the incubation temperature on sex ratio in Mallard ducks (Koláčková et al., 2019), our results suggest that increasing temperature and RH at the earliest stages of embryogenesis may further increase female mortality in mule ducks. In chicken, the last days of incubation seem to be also critical and impact the sex ratio in favour of males (Tzschentke and Halle, 2009; Elmehdawi et al., 2015). These data tend to confirm the greater fragility of heterogamous sex in hybrid species, and could be investigated as a precocious method of selection of males for fatty liver production (Batellier et al., 2004b).

The catch-up growth, a mechanism that could influence long-term physiology

At hatch, all groups with incubation condition changes had lower weights than control groups. Numerous studies on chickens (Piestun et al., 2008; Al-Rukibat et al., 2016; Zaboli et al., 2016) and mule ducks (Massimino et al., 2019) have already shown that an increase in incubation temperature leads to a decrease in hatching BW. These observations can be explained in part by an acceleration of embryonic development (Al Sardary and Mohammad (2016; Boleli et al., 2016; Maatjens et al., 2016) resulting in increased yolk sac consumption prior to the first meal (Lamot et al., 2014). Although here all groups had their peak hatch on the same day (E30), hatcher surveys were only done once a day at 8:00 am, leaving a 24-h window for the animals to emerge from their shells. It was therefore possible that animals treated with the new incubation conditions were born on average a few hours earlier than the control group resulting in a decreased hatch weight. To support this hypothesis, it has been shown in quail that when hatchings are synchronised taking into account the acceleration of development induced by a rise in temperature, the birth weight of thermally treated individuals is not different from controls (Carvalho et al., 2020).

However, this growth delay was totally recovered in only a few days by most of the treated groups, since at D6, only the E12-E22 condition still presented a significant difference with its control. This catch-up growth has already been observed in poultry exposed to increased temperature during embryogenesis (Piestun et al., 2013; Zaboli et al., 2016; Massimino et al., 2019), but also in mammals with delay of growth at birth for different reasons (McLaughlin et al., 2020). This phenomenon is not yet fully understood, but two main theories seem to emerge (Wit and Boersma, 2002): the neuroendocrine (involving Growth Hormone, thyroid, Insulin-like Growth Factor-I axis) and the growth plate hypothesis. Whatever the mechanism, the long-term consequences on metabolism are no longer to be demonstrated (Bieswal et al., 2006; Singhal, 2017; Berends et al., 2018) and may be of interest to study in the context of embryonic programming.

Finally, as previously shown in chicken (Loyau et al., 2015) and duck (Massimino et al., 2019), all groups treated with increased incubation temperature had lower body temperatures compared to their own control after birth. In chickens, this decrease in body temperature is often associated with a better thermotolerance of

the animals (Al-Zghoul et al., 2015; Al-Rukibat et al., 2016), and can be explained by the application of a temperature increase during the embryonic development of the axes responsible for thermal regulation (Jenkins and Porter, 2004; Piestun et al., 2008). Our results in mule ducks suggest that incubation changes from E9 to E14 during 10 days may alter the same axes of thermal regulation, but no differences were measured between the earliest and latest treated groups.

Conclusion

Although changes in temperature and RH during incubation might improve certain animal performances. This study also confirms that incubation parameters are critical to the zootechnical performance of male ducks, a sterile hybrid from the crossbred between a female Pekin and a male Muscovy, at hatch and that the timing of changes, is an important factor in maintaining optimal hatchability.

Ethic approval

All experimental procedures were in accordance with the French national guidelines for the care of animals for research purposes. The protocols were approved by the committee of the Care and Use of Animals of the Grand Sud-Ouest (n°73) under the file reference APAFIS#25163-2020062311266761 v5.

The present study was carried out in the certified Experimental Station for Waterfowl Breeding (INRAE, UEPFG, France), which received the accreditation number C40–037-1.

Data and model availability statement

None of the data were deposited in an official repository. The data that support the study findings are available upon request.

Author ORCIDs

Marianne Houssier: https://orcid.org/0000-0002-5329-4597
Mireille Morisson: https://orcid.org/0000-0002-5279-6675
Vincent Coustham: https://orcid.org/0000-0002-5399-2723
Stéphane Panserat: https://orcid.org/0000-0002-4479-9868.

Author contributions

Conceptualization and methodology: **C. Andrieux, S. Panserat** and **M. Houssier**; investigation: **C. Andrieux, S. Biasutti, J. Barrieu, P. Morganx and M. Houssier**; data analysis and software: **C. Andrieux**; writing-original draft: **C. Andrieux** and **M. Houssier**; writing-review & editing: **C. Andrieux, M. Morisson, V. Coustham, S. Panserat** and **M. Houssier**; supervision: **S. Panserat** and **M. Houssier**

Declaration of interest

The authors state that this work was supported by a grant from the Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras (CIFOG) but that these funders played no role in the design of the study and in the collection, analysis and interpretation of the results.

Acknowledgements

We thank all the technicians of the experimental station of Artigueres for the daily care given to the animals and the monitoring of the good conditions for the experiments.

Financial support statement

This work was supported by grants from the "Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras (CIFOG agreement 2020/05) and from "Comité Départemental des Landes" (CD40- CA salary for 3 years).

References

Abd El-Hack, M.E., Hurtado, C.B., Toro, D.M., Alagawany, M., Abdelfattah, E.M., Elnesr, S.S., 2019. Impact of environmental and incubation factors on hatchability of duck eggs. Biological Rhythm Research 2019, 1–10.
Al-Rukibat, R.K., Al-Zghoul, M.B., Hananeh, W.M., Al-Natour, M.Q., Abu-Basha, E.A., 2016. Thermal manipulation during late embryogenesis: Effect on body weight and temperature, thyroid hormones, and differential white blood cell counts in broiler chickens. Poultry Science 96, 234–240.
Al-Zghoul, M.B., Ismail, Z.B., Dalab, A.E.S., Al-Ramadan, A., Althnaian, T.A., Al-ramadan, S.Y., Ali, A.M., Albokhadaim, I.F., Al Busadah, K.A., Eljarah, A., Jawasreh, K.I., Hannon, K.M., 2015. Hsp90, Hsp60 and HSF-1 genes expression in muscle, heart and brain of thermally manipulated broiler chicken. Research in Veterinary Science 99, 105–111.
Al Sardary, S., Mohammad, S., 2016. Effect of Thermal Manipulation during Embryogenesis on Hatching Traits. International Journal of Agricultural Science 1, 190–195.
Baarendse, P.J.J., Debonne, M., Decuypere, E., Kemp, B., Van Den Brand, H., 2007. Ontogeny of avian thermoregulation from a neural point of view. World's Poultry Science Journal 63, 267–276.
Baggott, G.K., 2009. Development of extra-embryonic membranes and fluid compartments. Avian Biology Research 2, 21–26.
Barott, H.G., 1937. Effect of temperature, humidity and other factors on the hatch of hens' eggs and on energy metabolism of chick embryos. Technical Bulletin No 553, United States Department of Agriculture, 553, 1–46.
Batellier, F., Marchal, F., Scheller, M.F., Gautron, J., Sellier, N., Taouis, M., Monbrun, C., Vignal, A., Brillard, J.P., 2004a. Sex ratios in mule duck embryos at various stages of incubation. Theriogenology 61, 573–580.
Batellier, F., Govoroun, M., Brillard, J.P., 2004b. Sex-ratio chez les oiseaux sauvages et domestiques. Productions Animales 17, 365–372.
Berends, L.M., Dearden, L., Tung, Y.C.L., Voshol, P., Fernandez-Twinn, D.S., Ozanne, S. E., 2018. Programming of central and peripheral insulin resistance by low birthweight and postnatal catch-up growth in male mice. Diabetologia 61, 2225–2234.
Bieswal, F., Ahn, M.T., Reusens, B., Holvoet, P., Raes, M., Rees, W.D., Remacle, C., 2006. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. Obesity 14, 1330–1343.
Boleli, I.C., Morita, V.S., Matos, J.B., Thimotheo, M., Almeida, V.R., 2016. Poultry egg incubation: Integrating and optimizing production efficiency. Brazilian Journal of Poultry Science 18, 1–16.
Brun, J.M., Richard, M.M., Marie-Etancelin, C., Rouvier, R., Larzul, C., 2005. Le canrd mulard: déterminisme génétique d'un hybride intergénérique. Productions Animales 18, 295–308.
Bruzual, J.J., Peak, S.D., Brake, J., Peebles, E.D., 2000. Effects of relative humidity during incubation on hatchability and body weight of broiler chicks from young breeder flocks. Poultry Science 79, 827–830.
Byerly, T.C., Jull, M.A., 1935. Sex Ratio and Embryonic Mortality in the Domestic Fowl. Poultry Science 14, 217–220.
Carvalho, A.V., Hennequet-Antier, C., Crochet, S., Bordeau, T., Couroussé, N., Cailleau-Audouin, E., Chartrin, P., Darras, V.M., Zerjal, T., Collin, A., Coustham, V., 2020. Embryonic thermal manipulation has short and long-term effects on the development and the physiology of the Japanese quail. PLoS ONE 15, e0227700.
Collin, A., Picard, M., Yahav, S., 2005. The effect of duration of thermal manipulation during broiler chick embryogenesis on body weight and body temperature of post-hatched chicks. Animal Research 54, 105–111.
De Oliveira, J.E., Uni, Z., Ferket, P.R., 2008. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. World's Poultry Science Journal 64, 488–499.
Dibner, J.J., Knight, C.D., Kitchell, M.L., Atwell, C.A., Downs, A.C., Ivey, F.J., 1998. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. Journal of Applied Poultry Research 7, 425–436.
El-Hanoun, A.M., Rizk, R.E., Shahein, E.H.A., Hassan, N.S., Brake, J., 2012. Effect of incubation humidity and flock age on hatchability traits and posthatch growth in Pekin ducks. Poultry Science 91, 2390–2397.
El-shater, S.N., Rizk, H., Abdelrahman, H.A., Awad, M.A., Khalifa, E.F., Khalil, K.M., Khalil, K.M., 2021. Embryonic thermal manipulation of Japanese quail: effects on embryonic development, hatchability, and post-hatch performance. Tropical Animal Health and Production 53, 1–10.
Elmehdawi, A., Hall, M., Skewes, P., Wicker, D., Maurice, D.V., Smith, J., Benton, R., 2015. Low-intensity, short-duration thermal stimulation during the late phase of incubation alters secondary sex ratio in favour of males. British Poultry Science 56, 381–388.
Haldane, J.B.S., 1922. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. Journal of Genetics XII, 101–109.

Halle, I., Tzschentke, B., 2011. Influence of temperature manipulation during the last 4 days of incubation on hatching results, post-hatching performance and adaptability to warm growing conditions in broiler chickens. Journal of Poultry Science 48, 97–105.
Halle, I., Tzschentke, B., Henning, M., Köhler, P., 2012. Influence of temperature stimulation during the last 6 days of incubation on hatching results and later performance in Pekin ducks. Archiv für Geflugelkunde 76, 176–183.
Harun, M.A.S., Veeneklaas, R.J., Visser, G.H., Van Kampen, M., 2001. Artificial incubation of Muscovy duck eggs: Why some eggs hatch and others do not. Poultry Science 80, 219–224.
Hodgetts, B., 1991: Current hatchabilities in species of domestic importance and the scope for improvement. In Proceedings of the Avian incubation conference, sine dato 1990, sine loco, pp. 139–144.
Jenkins, S.A., Porter, T.E., 2004. Ontogeny of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in the chicken embryo: A review. Domestic Animal Endocrinology 26, 267–275.
King'ori, A.M., 2011. Review of the factors that influence egg fertility and hatchability in poultry. International Journal of Poultry Science 10, 483–492.
King, D.E., Asem, E.K., Adeola, O., 2000. Ontogenetic development of intestinal digestive functions in white pekin ducks. Journal of Nutrition 130, 57–62.
Koláčková, M., Kreisinger, J., Albrecht, T., Hořák, D., 2019. Effect of incubation temperature on sex-dependent embryo mortality and morphological traits in Mallard. Journal of Thermal Biology 83, 95–102.
Lamot, D.M., Van De Linde, I.B., Molenaar, R., Van Der Pol, C.W., Wijtten, P.J.A., Kemp, B., Van Den Brand, H., 2014. Effects of moment of hatch and feed access on chicken development. Poultry Science 93, 2604–2614.
Landauer, W., 1961. The Hatchability of Chicken Eggs as Influenced by Environment and Heredity. University of Connecticut, Storrs Agricultural Experiment Station, Storrs, CT, USA.
Litt, J., Leterrier, C., Fortun-Lamothe, L., 2021. Conditions d'élevage des palmipèdes à foie gras : des demandes sociétales à une démarche de progrès. INRAE Productions Animales 33, 203–222.
Loyau, T., Berri, C., Bedrani, L., Praud, C., Duelos, M.J., 2013. Thermal manipulation of the embryo modifies the physiology and body compositiob of broiler chickens reared in floor pens without affecting breast meat processing quality. American Society of Animal Science 91, 3674–3685.
Loyau, T., Bedrani, L., Berri, C., Métayer-Coustard, S., Praud, C., Coustham, V., Mignon-Grasteau, S., Duclos, M.J., Tesseraud, S., Rideau, N., Hennequet-Antier, C., Everaert, N., Yahav, S., Collin, A., 2015. Cyclic variations in incubation conditions induce adaptive responses to later heat exposure in chickens: A review. Animal 9, 76–85.
Maatjens, C.M., Van Roovert-Reijrink, I.A.M., Engel, B., Van Der Pol, C.W., Kemp, B., Van Den Brand, H., 2016. Temperature during the last week of incubation. I. Effects on hatching pattern and broiler chicken embryonic organ development. Poultry Science 95, 956–965.
Massimino, W., Davail, S., Bernadet, M. dominique, Pioche, T., Ricaud, K., Gontier, K., Manse, H., Morisson, M., Collin, A., Panserat, S., Houssier, M., 2019. Impact of thermal manipulation during embryogenesis on hepatic metabolism in mule ducks. Frontiers in Physiology 10, 1–12.
Massimino, W., Davail, S., Secula, A., Andrieux, C., Bernadet, M., Pioche, T., Ricaud, K., Gontier, K., Morisson, M., Collin, A., Panserat, S., Houssier, M., 2020. Ontogeny of hepatic metabolism in mule ducks highlights different gene expression profiles between carbohydrate and lipid metabolic pathways. BMC Genomics 21, 1–13.
McLaughlin, E.J., Hiscock, R.J., Robinson, A.J., Hui, L., Tong, S., Dane, K.M., Middleton, A.L., Walker, S.P., MacDonald, T.M., 2020. Appropriate-for-gestational-age infants who exhibit reduced antenatal growth velocity display postnatal catch-up growth. PLoS ONE 15, e0238700.
Mueller, C.A., Burggren, W.W., Tazawa, H., 2015. The physiology of the avian embryo. In: Scanes, C.G. (Ed.), Sturkie's Avian Physiology. sixth ed. Elsevier, Denton, TX, USA, pp. 739–766.
Narinç, D., Erdo, S., Tahtabiçen, E., Aksoy, T., 2016. Effects of thermal manipulations during embryogenesis of broiler chickens on developmental stability, hatchability and chick quality. Animal 10, 1328–1335.
Ono, H., Hou, P.C.L., Tazawa, H., 1994. Responses of developing chicken embryos to acute changes in ambient temperature: Noninvasive study of heart rate. Israel Journal of Zoology 40, 467–479.
Peebles, E.D., Burnham, M.R., Gardner, C.W., Brake, J., Bruzual, J.J., Gerard, P.D., 2001. Effects of incubator humidity and hen age on yolk composition in broiler hatching eggs from young breeders. Poultry Science 80, 1444–1450.
Piestun, Y., Shinder, D., Ruzal, M., Halevy, O., Brake, J., Yahav, S., 2008. Thermal manipulations during broiler embryogenesis: Effect on the acquisition of thermotolerance. Poultry Science 87, 1516–1525.
Piestun, Y., Halevy, O., Shinder, D., Ruzal, M., Druyan, S., Yahav, S., 2011. Thermal manipulations during broiler embryogenesis improves post-hatch performance under hot conditions. Journal of Thermal Biology 36, 469–474.
Piestun, Y., Druyan, S., Brake, J., Yahav, S., 2013. Thermal treatments prior to and during the beginning of incubation affect phenotypic characteristics of broiler chickens posthatching. Poultry Science 92, 882–889.
Romanoff, A.L., 1949. Critical Periods and Causes of Death in Avian Embryonic Development. The Auk 66, 264–270.
Sauveur, B., 1988. Développement embryonnaire et incubation. In: Sauveur, B. (Ed.), Reproduction des volailles et production d'œufs. Inra, Paris, France, pp. 229–265. ebook 00859NUM.
Singhal, A., 2017. Long-term adverse effects of early growth acceleration or catch-up growth. Annals of Nutrition and Metabolism 70, 236–240.
Tzschentke, B., Basta, D., 2000. Development of hypothalamic neuronal thermosensitivity in birds during the perinatal period. Journal of Thermal Biology 25, 119–123.
Tzschentke, B., Halle, I., 2009. Influence of temperature stimulation during the last 4 days of incubation on secondary sex ratio and later performance in male and female broiler chicks. British Poultry Science 50, 634–640.
Wilson, H.R., 1991. Physiological requirements of developing embryo: temperature and turning. In: Tullett, S.G. (Ed.), Avian incubation. Butterworth & Co (Publishers) Ltd, London, UK, pp. 145–156.
Wit, J.M., Boersma, B., 2002. Catch-up growth: definition, mechanism, and models. Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism 15, 1229–1241.
Yahav, S., Collin, A., Shinder, D., Picard, M., 2004. Thermal manipulations during broiler chick embryogenesis: Effects of timing and temperature. Poultry Science 83, 1959–1963.
Yahav, S., Tzschentke, B., 2006: Perinatal thermal manipulations in poultry, does it cause long-lasting thermoregulatory memory ? In Proceedings of the 12th European Poultry Conference, 10–14 September 2006, Verona, Italy, pp. 1–6.
Yan, X.P., Liu, H.H., Liu, J.Y., Zhang, R.P., Wang, G.S., Li, Q.Q., Wang, D.M.C., Li, L., Wang, J.W., 2015. Evidence in duck for supporting alteration of incubation temperature may have influence on methylation of genomic DNA. Poultry Science 94, 2537–2545.
Zaboli, G.R., Rahimi, S., Shariatmadari, F., Torshizi, M.A.K., Baghbanzadeh, A., Mehri, M., 2016. Thermal manipulation during pre and post-hatch on thermotolerance of male broiler chickens exposed to chronic heat stress. Poultry Science 96, 478–485.

CHAPITRE 4 : Impacts de la programmation en réponse à deux challenges nutritionnels

Article 2 (Andrieux et al., 2022, Am. J. Physio)

Article 3 (Andrieux et al., 2023, Frontiers in Physio)

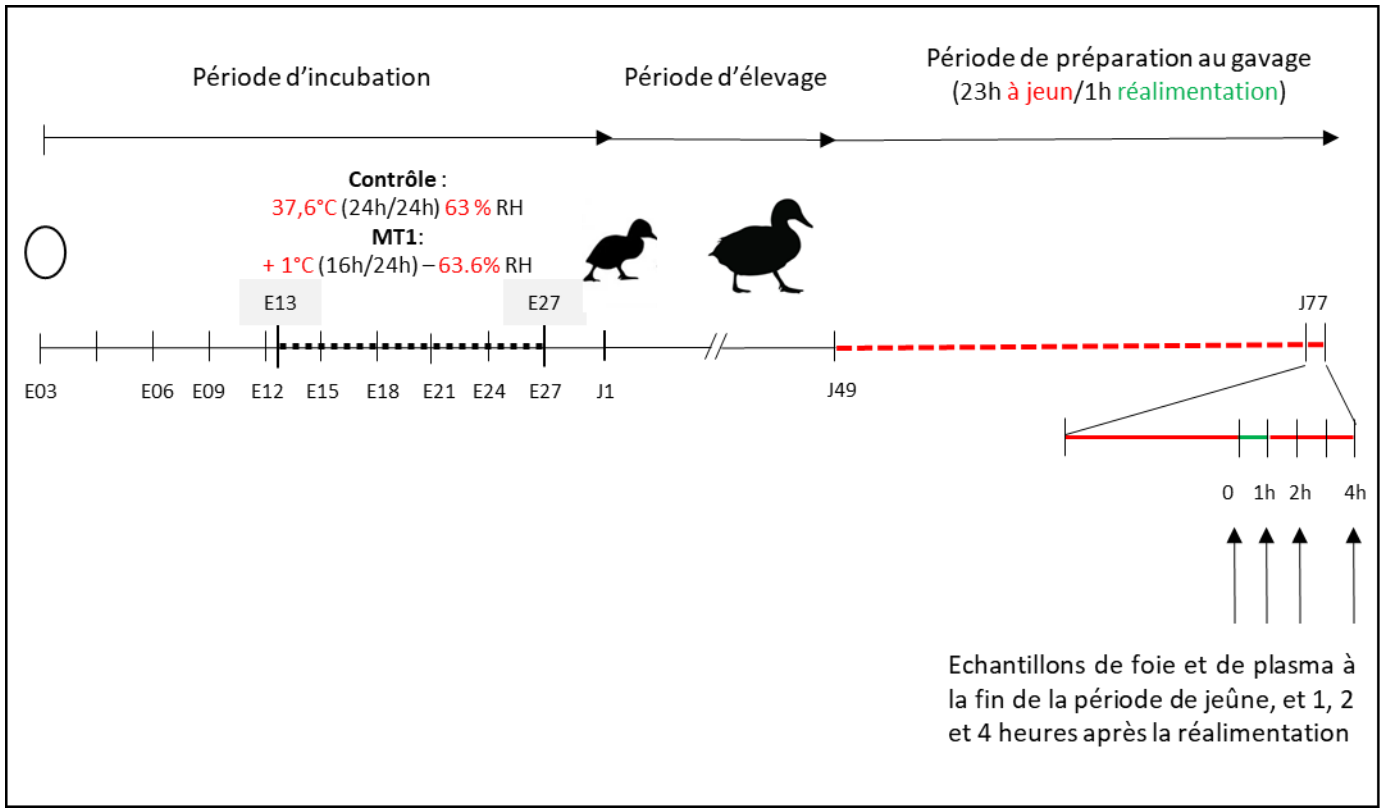


Figure 4.1. Protocole expérimental du chapitre 4 jusqu'au 1er challenge nutritionnel (mise à jeun/réalimentation)

Ce protocole va des œufs aux canards en période de préparation au gavage et inclus deux conditions d'incubation : le groupe contrôle, et le groupe + 1°C (16/24). Pour ces deux groupes, des analyses sont réalisées à la fin de la période de jeûne (0) et 1h, 2h et 4h après la réalimentation.

E jour embryonnaire, J jour d'élevage, RH humidité relative, MT manipulation thermique

1. Objectif et mise en place de l'essai du chapitre 4

La manipulation thermique embryonnaire entraine des impacts à l'éclosion comme une baisse du poids corporel, un décalage de la date du pic d'éclosion, une baisse de la température interne ou encore de l'éclosabilité (Andrieux et al., 2021; Massimino et al., 2019). Une programmation des animaux à plus long terme, après le gavage, est également visible avec des poids de foie plus gros, mais également des tailles de gouttelettes lipidiques plus grosses ou des taux de fonte plus élevés. Ce dernier impact négatif sur la production de foie gras a été observé pour deux des trois MT, suggérant qu'une optimisation de programmation reste possible. Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la manipulation thermique du 11ème jour embryonnaire au 21ème (+1,5°C, 16h/24, E11-E21) ne présentait pas d'impact négatif sur le développement embryonnaire (éclosabilité égale au groupe contrôle) et qu'il pourrait permettre une programmation thermique des animaux sur le long-terme (**Chp3**).

L'objectif de cet essai est d'évaluer la programmation des animaux à long terme sur leur réponse métabolique hépatique face à deux challenges nutritionnels. :

- Le premier challenge correspond à un protocole de mise à jeun puis réalimentation des animaux en période de fin de préparation au gavage, appelé « **Mise à jeun/réalimentation** » (**Figure 4.1**).
- Le second challenge correspond au **gavage** des canards (**Figure 4.2**).

Ces deux challenges nutritionnels sont réalisés au cours du même essai, c'est-à-dire avec des animaux élevés ensemble. Cet essai comprend quatre conditions d'incubation des œufs : 37,6°C de E0 à E28 et une HR de 63,2 % (Contrôle), + 1°C 16h/24 de E13 à E27 avec une HR de 63,6 % (MT1, précédente thèse), + 1,5°C 16h/24 de E11 à E21 et une HR de 60,1 % (MT2) et + 1,7°C 16h/24 de E11 à E21 et une HR de 58,6 % (MT3). Dans chacun des incubateurs (modèle SOLOGNE de LA NATIONALE, modèle reconditionné), 750 œufs (génotype H85, Grimaud Frères Sélection, Roussay France) sont aléatoirement répartis. La température et l'humidité relative (HR) sont relevées toutes les 15 minutes par des sondes indépendantes (LoRa® SPY U), complété par une rotation automatique des œufs (90°C toute les 3h) et une humidification manuelle quotidienne avant les changements de conditions d'incubation. Au cours de l'incubation deux mirages sont réalisés (E7 et E28) pour vérifier la fertilité des œufs et l'arrêt du développement embryonnaire des embryons. Les œufs non fertiles et les embryons morts sont retirés des incubateurs et les œufs restants sont rapprochés. A E28, tous les groupes sont regroupés dans l'éclosoir (modèle BRETAGNE de LA NATIONAL, modèle reconditionné) à 37,3°C et 80 % d'HR. Pendant quatre jours, les naissances sont enregistrées une fois par jour.

Pour chacune des conditions, 150 canetons mâles sont mis en élevage en suivant la même conduite d'élevage. Le dernier jour de la 11ème semaine d'élevage (période de finition), après 23h de jeûne et avant la réalimentation, 15 canards des groupes contrôle et MT1 sont abattus (challenge nutritionnel mis à jeun/réalimentation, **Figure 4.1**). Une quinzaine de canard de ces deux mêmes groupes sont abattus 1h et 2h après la réalimentation et une dizaine de canard sont abattus 4h après la réalimentation. Ces premiers prélèvements sont réalisés dans le but d'évaluer la potentielle programmation métabolique des animaux avant le challenge du gavage en se basant sur les performances zootechniques et des analyses chimiques et moléculaires du foie.

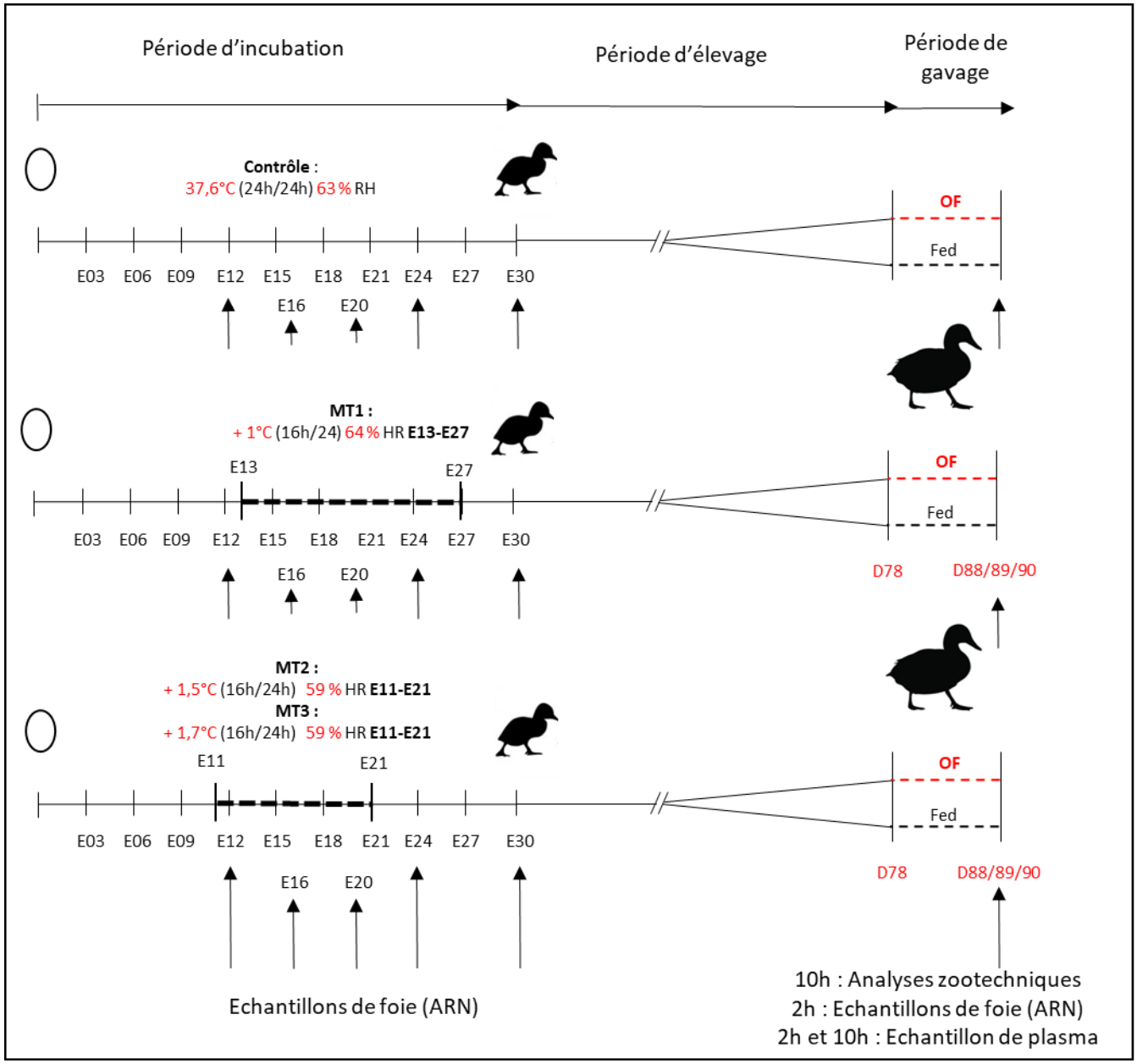


Figure 4.2. Protocole expérimental du chapitre 4 jusqu'au 2ème challenge nutritionnel (Gavage)

Cet essai va des œufs aux canards après gavage et inclus 4 conditions d'incubation : le groupe contrôle, 1°C (16/24) E13-E27, 1,5°C (16h/24) E11-E21 et 1,7°C (16h/24) E11-E21. Les quatre groupes vont aller jusqu'au gavage où des prélèvements sont réalisés 2h et 10h après le dernier repas.

E jour embryonnaire, J jour d'élevage, OF gavage, Fed alimentation rationnée, MT manipulation thermique

Les animaux restants sont divisés en deux sous-groupes par condition d'incubation. Une partie des animaux est conduite en salle de gavage l'autre reste en alimentation rationnée en bâtiment d'élevage (15 par condition) (challenge nutritionnel gavage, **Figure 4.2**). Les animaux sont donc élevés 11 jours supplémentaires en gavage, ou bien en rationnement (1h/jour). Pour les animaux en gavage, deux repas par jour sont distribués. Les repas sont constitués de poudre de maïs (53 %, Palma Maisadour, **Tableau 2.1**) et d'eau (47 %). Les animaux sont regroupés à 4 dans les loges de gavage, avec des poids similaires et si possible un canard de chaque condition. Les groupes d'animaux sont formés à partir de la pesée pré-gavage, réalisée une semaine avant le début du gavage.
Deux créneaux d'abattage sont réalisés, l'un 2h après le dernier repas de gavage, pour analyser les expressions relatives des gènes, l'autre 10h après le dernier repas de gavage, pour obtenir les données zootechniques optimales (poids de foie). Après 88 jours d'élevage (J88), une première partie des animaux est abattue 2h après le dernier repas, soit tous les canards conservés en alimentation rationnée et entre 10 et 15 canards mis en gavage par condition d'incubation. Tous les autres canards mis en gavage sont abattus sur deux jours, mais cette fois-ci 10h après le dernier repas (40 à 60 canards par condition).

2. Résumé du challenge nutritionnel : Mise à jeun/réalimentation et programmation

La réalimentation des animaux après une mise à jeun induit une hausse significative du poids de foie, dès 2h après la réalimentation**. Cette hausse du poids de foie est associée à un élargissement des cellules hépatiques, une hausse du glycogène dans le foie et une stimulation des voies métaboliques glucidique et lipidique.** Ce challenge nutritionnel s'est montré prometteur dans le but d'identifier des marqueurs de la programmation à long terme de nos canards. De plus, ce challenge de mise à jeun/réalimentation a permis de confirmer certains des gènes cibles de la programmation étudiés dans la précédente thèse, et d'en découvrir de nouveaux (Massimino et al., 2021).
Ce challenge nutritionnel apparait comme **un modèle intéressant pour révéler la potentielle programmation des animaux sans avoir à aller jusqu'au gavage**. De plus, il a pu être observé que **les réponses métaboliques des canards face à la mise à jeun/réalimentation sont comparables à celles mesurées lors du gavage.** Cette dernière observation laisse entendre que ce challenge nutritionnel pourrait donner des indices quant aux futures réponses des animaux programmés au cours du gavage ou dans des modèles d'alternative au gavage.

La première étude du **chapitre 4** a fait l'objet d'un article en révision dans American Journal of Physiology :

> Article 2 : **Charlotte Andrieux**, Michaël Marchand, Laurence Larroquet, Vincent Verron, Sandra Biasutti, Josette Barrieu, Philippe Morganx, Mireille Morisson, Vincent Coustham, Stéphane Panserat, Marianne Houssier, *Fasting/refeeding: an experimental model to study the impact of early thermal manipulation on hepatic metabolism in mule ducks* **[Am J Physiol, en révision depuis le 20/09/2022]**

Article 2: Fasting/refeeding: an experimental model to study the impact of early thermal manipulation on hepatic metabolism in mule ducks (Am J Physiol, 2023)

Résumé

Il a déjà été démontré qu'une hausse de température d'incubation des œufs améliorait le métabolisme des canards mulards ainsi que l'engraissement du foie après le gavage, via des mécanismes de programmation du métabolisme lipidique. Ici, nous examinons si le jeûne (F) suivi par une réalimentation (RF), chez des canards de 11 semaines, peut devenir un modèle plus rapide pour l'étude des mécanismes de la programmation liés à une manipulation thermique embryonnaire.
Cette étude investit la réponse hépatique des canards mulards qui sont mis à jeun pendant 23h avant d'être réalimentés pendant 1h, pour des animaux contrôles et des animaux programmés thermiquement (avec une hausse de 1°C, 16h/24 E13-E27). Le poids de foie et sa composition énergétique, la structure des hépatocytes, les paramètres plasmatiques et les niveaux d'expressions des gènes ont été mesurés 1h, 2h et 4h après la réalimentation. Tous ces paramètres sont significativement affectés par la réalimentation, alors que des impacts significatifs de la manipulation thermique sont mesurés au niveau de la taille des cellules (+ 1 µm en moyenne), la composition lipidique (+ 4,2 % d'acides gras saturés 4h après le dernier repas), et des expressions relatives des gènes (incluant *HK1*, *SCD1*, *ELOV6* et *FASN*). En plus de confirmer des gènes précédemment identifiés comme étant des gènes cibles de la manipulation thermique, cette étude permet d'en mettre des nouveaux en évidence par le biais de la cinétique suivant la réalimentation.
Finalement, la description détaillée de l'impact du challenge mise à jeun/réalimentation sur la structure, la composition et les niveaux d'expressions des gènes du foie, mais également sur les paramètres plasmatiques, nous permettent de réaliser un parallèle avec ces mêmes paramètres impactés par le gavage. Cette étude comparative suggère que ce protocole pourrait être un modèle pertinent pour étudier les mécanismes impliqués dans la programmation thermique embryonnaire du foie, sans passer par le gavage.

Mots clefs : mis à jeun, réalimentation, métabolisme hépatique, manipulation thermique, canard mulard

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY
REGULATORY, INTEGRATIVE AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 324: R45–R57, 2023.
First published October 31, 2022; doi:10.1152/ajpregu.00158.2022

RESEARCH ARTICLE

Fasting/refeeding: an experimental model to study the impact of early thermal manipulation on hepatic metabolism in mule ducks

Charlotte Andrieux,[1] Michaël Marchand,[1] Laurence Larroquet,[1] Vincent Veron,[1] Sandra Biasutti,[2] Josette Barrieu,[3] Philippe Morganx,[3] Mireille Morisson,[4] Vincent Coustham,[1] Stéphane Panserat,[1] and Marianne Houssier[1]

[1]*Unité Mixte de Recherche, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, Univ Pau and Pays Adour, E2S UPPA, Saint Pée sur Nivelle, France;* [2]*Institut universitaire Technologique Génie Biologique, Univ Pau and Pays Adour, E2S UPPA, Mont-de-Marsan, France;* [3]*Unité Expérimentale Palmipèdes à Foie Gras, Domaine d'Artiguères, Institut National de Recherche pour l'Agriculture Bordeaux-Aquitaine, Benquet, France; and* [4]*GenPhySE, Université de Toulouse, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Castanet-Tolosan, France*

Abstract

An increase in egg incubation temperature was previously shown to enhance the metabolism of mule ducks and increase liver fattening after overfeeding, through a metabolic programming mechanism. Here, we examined whether fasting (F) followed by refeeding (RF) in 11-wk-old mule ducks could become an accelerated model to study the mechanisms of metabolic programming following embryonic thermal manipulation. This study investigated the hepatic response of mule ducks subjected to 23 h of fasting and 1 h of refeeding, in control or thermally programmed animals (with an increase of 1°C, 16 h per day from *days 13* to *27* of embryogenesis). Liver weight and energy composition, hepatocyte structure, plasma parameters, and gene expression levels were measured at 1, 2, and 4 h after RF. All these parameters were strongly affected by RF, whereas significant impacts of embryonic programming were measured in cell size (+1 µm on average), lipid composition (+4.2% of saturated fatty acids 4 h after the meal), and relative gene expressions (including *HK1*, *SCD1*, *ELOVL6*, and *FASN*). In addition to confirming previously identified molecular targets of thermal manipulation, this study revealed new ones, thanks to kinetic sampling after RF. Finally, the detailed description of the impact of the F/RF challenge on the liver structure, composition, and gene expression, but also on plasma parameters allowed us to draw a parallel with these same traits measured during overfeeding. This comparative analysis suggests that this protocol could become a pertinent model to study the mechanisms involved in embryonic liver thermal programming, without overfeeding.

duck; fasting; hepatic metabolism; liver; metabolism; mule ducks; nutrition; refeeding; thermal manipulation

INTRODUCTION

The liver is a major organ for regulating systemic metabolism, especially to regulate the amount of glucose available to the rest of the organism (1). During periods of fasting, the liver delivers glucose into the circulation by degrading its glycogen stores or producing glucose via gluconeogenesis, whereas after a meal, excess carbohydrates are stored as glycogen or even fatty acids via de novo lipogenesis. The fasting/refeeding (F/RF) challenge is therefore a procedure of choice to study metabolic responses of the liver in mammals (2–4) but also in poultry (5–8). In ducks, the enormous capacity of the liver to store excess energy as lipids has led to the practice of overfeeding to produce *foie gras*, during which all storage pathways are activated (9, 10).

Recently, changes in egg incubation temperature, called embryonic thermal manipulation (TM), have been shown to program the hepatic metabolism of adult mule ducks and to improve its response to overfeeding by increasing lipid depositions (11, 12). Several mechanisms are suspected to play a role in this early life-programming phenomenon, such as permanent structural changes, appearance of epigenetic marks (13), or cellular aging modulation (14). To explain this programming-induced increase in liver fattening in thermally manipulated ducks, some specific transcriptional modulations have been recently reported (15). However, only a few metabolic genes were identified as targets of embryonic TM, probably because the timing of sampling was determined by the target liver weight after overfeeding.

Therefore, our objective was to test whether metabolic programming of the liver by embryonic TM was also measurable in a fasting/refeeding model, allowing greater flexibility for sampling and thus potentially facilitating the study of its mechanisms. To this end, we performed a kinetic study to

Correspondence: M. Houssier (marianne.houssier@univ-pau.fr).
Submitted 30 June 2022 / Revised 24 October 2022 / Accepted 24 October 2022

0363-6119/23 Copyright © 2023 the American Physiological Society.

Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpregu by Krysia Moore (073.086.090.149) on January 2, 2023.

follow the response of hepatic metabolism at different levels (development of liver weight and structure, energetic composition, gene expression, plasma parameters) and to compare it with that measured during the overfeeding period in mule ducks. Liver and plasma samples were taken after 23 h of fasting and 1, 2, and 4 h after refeeding, from control or thermally programmed ducks (programmed with an increase of 1°C, 16 h/24 h from the 13th to the 27th day of embryogenesis).

MATERIALS AND METHODS

Ethics Approval Statement

All experimental procedures were carried out in the certified experimental station for the breeding of waterfowl (UEPFG, INRAE, Artiguères, France; accreditation number B40-037-1), in accordance with the French national guidelines for the care of animals for research purposes. The protocols were approved by the committee of the Care and Use of Animals of the Grand Sud-Ouest (no. 73) under the file reference APAFIS no. 25163–2020062311266761 v5.

Animals

Mule duck eggs [1,500; Grimaud Frères Selection company (Roussay, France), genotype H85] were collected on the same day and stored at ambient temperature for 3 days before being dispatched randomly into two groups of 750 eggs each for incubation. Incubation took place in identical automated commercial incubators with a maximum capacity of 2,430 eggs and regulation of temperature, humidity, rotation of eggs (90° every 3 h), and ventilation (model SOLOGNE bought in the 1980s from the company LA NATIONALE) for a duration of 28 days. The temperature and the relative humidity of incubation were recorded every 15 min by two independent sensors (LoRa SPY U) in each incubator.

The first incubator contained the control group with the following measured conditions: 37.6°C and 62.3% average relative humidity (RH), throughout the entire incubation period. The second incubator received the thermal manipulated group (TM). Incubation changes occurred from the 13th to the 27th embryonic days (E13–E27) with a temperature of 38.6°C 16 h/day and a RH closed to 63.6% to avoid dehydration (Fig. 1). Only the change of temperature, the change of RH, and the egg spraying were done manually at the same moment in the afternoon of E13. The daily cooling took place from embryonic *day 8* to the end of incubation, by opening the incubator doors during humidification using room temperature water for a few minutes.

Two candling were performed during incubation: at E8 to assess early embryonic mortality and at E28 to assess mid-embryonic mortality. From 28th embryonic day until hatch, eggs of the two groups were placed in the same hatcher (BRETAGNE model of LA NATIONALE, reconditioned model with a capacity of 2,520 eggs) at 37.3°C and 80% of RH. The number of newly hatched ducks was recorded once a day for 3 days until E30, and unborn ducklings were counted after the three days to obtain late mortality and hatchability.

Groups of 150 male ducklings were formed for each treatment. They were raised under the same conditions and fed

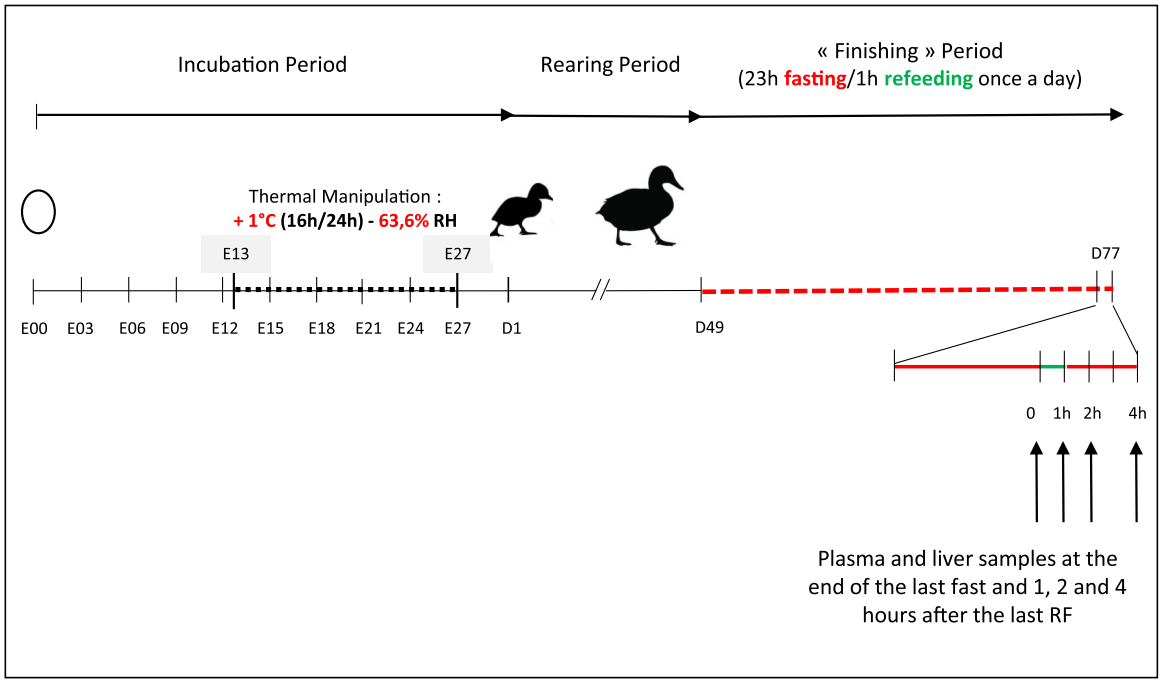


Figure 1. Experimental design. The chronology of the two treatments were schematized on this frieze representing the incubation time of the eggs, the rearing period, and the finishing period of mule ducks (11 wk). Changes in conditions (+1°C 16 h/24 *E13–E27* 63.6% RH) applied for 14 days were illustrated by the horizontal black dotted line representing 14-day intervals. A control group was present with a temperature of 37.6°C and a mean relative humidity (RH) of 63.2%. The finishing period, illustrated by the horizontal red dotted line, started at *D49* (7 wk) until the slaughtering day (*D77*) where plasma and liver samples were collected after 23 h of fasting or 1, 2, or 4 h after the refeeding (RF).

Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpregu by Krysia Moore (073.086.090.149) on January 2, 2023.

ad libitum with the starting diet (PAG1301, SOAL Haut Mauco, France; main composition: 87.8% dry matter, 40.6% crude starch, 17.5% crude protein, and 2.8% crude fat) until 4 wk of age, then an ad libitum growing diet (PAG1320, SOAL Haut Mauco, France; main composition: 87.7% dry matter, 46.5% crude starch, 15% crude protein, and 2.1% crude fat) until 7 wk of age and a daily hourly ration until the end of the trial (from *week 7* to *11*). The ducks were raised in a slatted building with windows, including an outdoor pen (not used due to avian flu). The density was 0.6 m^2/duck, and the temperature was maintained between 15°C and 25°C during the first 4 wk of life, then kept at room temperature (December to January). Only 55 male ducks per treatment of the 150 were used in this study. At the end of this period, 15 animals per group were euthanized at three different times: after the 23-h fast (0), 1 h after the meal (1 h), and 2 h after the meal (2 h). The last sampling point was 4 h after the meal (4 h), after euthanizing 10 animals per group. These different slaughter points were used to perform zootechnical measurements and to obtain liver and plasma samples.

Sampling and Measurements

Late embryonic mortality (in the hatcher), sex ratio, hatchability, body weight, and body temperature (cloacal) at hatch were recorded. Ducks were euthanized by bleeding after stunning in an electric water bath (stunning time of 85 s, with 8 impulsions per seconds, 100 V and 20 mA per duck) in line with European Council Regulation (Ec) No. 1099/2009 (2009) [Council Regulation (EC) No. 1099/2009 of24 September 2009 on the protection of animals at the time of killing Text with EEA relevance] at the Experimental Station for Waterfowl breeding (INRAE, Artiguères, France). Liver weights were recorded at the end of the fasting (0), 1 (1 h), 2 (2 h), and 4 (4 h) hours after the refeeding for 10–15 ducks.

Pieces of liver were sampled in the middle of the large lobe for the study of liver lipid and glycogen content (0, 2, and 4 h) and gene relative expressions (0, 1, 2, and 4 h) and were stored at −80°C (10–15 samples per condition), or immediately fixed in 4% paraformaldehyde for histological analysis (5 samples per condition, at 0 and 4 h). Moreover, at 0 and 2 h after, the refeeding blood samples were collected from all ducks in disodium EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) tubes, after carotid section.

Histological Analysis

Liver samples were fixed in formaldehyde (4%) during 24 h, dehydrated by successive ethanol baths with increasing concentrations (of 70%, 95%, and 100%), before xylene baths (100%) and inclusion in paraffin. Liver cut thickness varied between 7 and 10 μm and were performed on KNITEL slides. Slice coloration was performed by a combination of two methods: PAS (periodic acid Shiff) and HE (hematoxylin eosin).

Measurements of cell size and number of nuclei per μm^2 were performed randomly on five livers from different individuals for each group. For each liver, two slides were used to perform between 4 and 6 counts (on each slide) on different areas. Statistics were performed on the average of the counts of each slide for each individual, i.e., 10 measurements for each group.

Plasma Analyses

Plasmas were separated by centrifugation at 2,000 *g* for 10 min at 4°C. Plasma samples were frozen at −20°C for further analysis. Glucose, triglycerides, cholesterol, and nonesterified fatty acids (NEFA) were quantified by the colorimetric method using enzymatic kits (glucose GOD-POD, SOBIODA; triglycerides GPO POD, SOBIODA; cholesterol LD M, SOBIODA; NEFA HR2; Wako, Richmond, VA).

Liver Composition

Total lipids were extracted from 1 g of liver tissue, sampled at 0 and 4 h for each treatment, by homogenization in chloroform/methanol 2:1 (vol/vol) and measured by gravimetry by following Folch method (16). Total lipids were separated on a silica membrane with dichloromethane as eluent for neutral lipids and methanol for polar lipids. Triglycerides were saponified with dichloromethane and alcoholic potassium and methylated by a methanolic solution (14%) and hexane. Fatty acids were separated by gas chromatography (GC, Varian 3800, capillary column, temperature of dispenser of 260°C and of detector 250°C) after their conversion into volatile methyl ester. The identification of fatty acids was done by using the software "Star" (Varian). Free glucose was measured from 100 mg of crushed liver, then glycogen was hydrolyzed by using potassium hydroxide (KOH) at 100°C during 2 h 30 min. Free glucose and total glucose were measured by colorimetric method (glucose GOD-POD, SOBIODA). Liver glycogen corresponded to the difference between total glucose and free glucose for each sample, measured in milligrams of glucose per gram of liver tissue.

Gene Expression Measurements

To measure the relative expressions of genes involved in carbohydrate and lipid metabolisms, total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen—Life technologies) from 50 mg of frozen liver tissue. Total RNA concentration was measured by spectrophotometry (optical density at 260 nm) using a Biotek EPOCH 2 microplate reader (Take 3 Plate), and all the samples were normalized at 100 ng/μL. A first mix of reverse-transcription preparation was done including 20 μL of samples, 1 μL of an exogenous RNA (Luciferase, Promega), 2 μL of random primers, and 2 μL of DNTP. The RNA retrotranscription was done in duplicate from 12 μL of the first mix with 0.5 μL of the Super script (Life Technologies SAS), 1 μL of RNAseOUT (Life Technologies SAS), 1 μL of DTT, 4 μL of 5× buffer, and 1.5 μL of RNAse free water. The RNA retrotranscription was done in the CFX384 (Bio-Rad) according to the following program: 25°C/5 min, 55°C/60 min, and 70°C/15 min.

Gene expression levels were determined by real-time PCR (CFX384 qPCR Detection System, Bio-Rad) using the Perfecta SYBR Green FastMix (Quantabio), with a reaction volume of 15 μL per sample including 7.5 μL of SYBR Green, 2 μL of cDNA, and 2.75 μL of each primer. This program was followed: 95°C/10 min, 40 cycles of 95°C/3 s, 60°C/30 s. Specific primers are listed in Table 1.

The cDNA quantification was normalized with the exogenous gene (luciferase) according to the expression $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (17) with ΔCt = Ct target gene − Ct reference gene and ΔΔCt = ΔCt sample − ΔCt reference. The reference that determined the

Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpregu by Krysia Moore (073.086.090.149) on January 2, 2023.

Table 1. *Informative table on primers used for the study*

Gene Same	Gene Symbol	Primer Sequence
Hexokinase 1	*HK1*	GAGGGAGCAGACGTTGTGAA
		GCCGCATCTCCTCCATGTAA
Phosphooenolpyruvate carboxykinase 1	*PCK1*	ATCGACACACTGATGAACGGG
		AGGATGCCCTTATCTATAGCCT
Glucose-6-phosphate catalytic subunit 1	*G6PC1*	GGCGTGTACTACGTGATGGT
		CCAAAGCACCAGCCACAAAA
Fatty acid synthase	*FASN*	TGAAGAAGGTCTGGGTGGAG
		CTCCAATAAGGTGCGGTGAT
Fatty acid elongase 6	*Elovl6*	CTACTTTGTGCTCTTCTGCCATTTT
		TGGCTTCTGTCTCATTTCTACCAC
Stearoyl-CoA desaturase 1	*SCD1*	AGTGCTGCTCACATGTTTGG
		TGAAGTCGATGAAGGCTGTG
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1	*GPAT1*	ACAACTTCAGCGGTCCTGTT
		GCGCTGAGGTAGGAACGTAG
Acyl-CoA oxidase 1	*ACOX1*	CATGTTTGAGTGGGAAAGA
		TTTTCAGGGCAGGAAAATTG
Carnitine palmitoyl transferase 1 A	*CPT1A*	GATTTGGACCAGTGGCTGAT
		GAAGGTTGCTTTGCACCAAT
Apolipo protein B	*APOB*	TCTCACCGTGACTTGAGTGC
		TCCCAGCAGAAGGTGAAGAT
Ubiquilin 1	*UBQLN1*	GTAAGAATGGTGGCCTTGGA
		TCTGAACGAATGGGTTTTCC
Proteasome non-ATPase regulatory subnit 12	*PSMD12*	AGGAGGGGAGACTGCAAGAA
		AAACCATGTCAGAGGCCGTT
Iodothyronine deiodinase 3	*DIO3*	GCGAGCTTTCGAGCAAGATG
		ATCCCGAAGGAAGAGAGCCT
Heat shock factor binding protein 1	*HSBP1*	CAAGCCCGGAGTCGAACT
		TTTCAGGCATGAGGCTGAGAC

ΔCt reference value corresponded to the average of Ct across all groups.

Statistical Analysis

Statistical analyses were carried out using Rstudio and R version 3.6.2. Hatchability, late embryonic mortality and sex ratio were compared by busing a λ^2 test. Liver weights were compared using ANOVA or Student's and Wilcoxon tests depending on normality and homoscedasticity.

Plasma contents were compared using two-way ANOVA tests or parametric/nonparametric tests to compare two treatments at two different times.

The data are presented as the means ± standard deviation (SD). In every case, differences between the groups were considered statistically significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Incubation and Hatching Data

The late embryonic mortality measured after the thermal stimulus was not significantly different between the two groups, consistent with nonsignificantly different hatchability, ranging from 78.8% to 84.2% (Table 2). Sex ratio was also not affected by temperature with 55.7% and 54.7% of male for control and thermal manipulated (TM) groups, respectively. However, at hatch, the weight of TM ducklings was significantly lower than that of control ducklings, with an average of 48.8 g versus 50.2 g respectively as was internal temperature (39.9°C vs. 40.1°C). However, the decrease in weight was no longer significant from 6 days after hatching (with 173.9 ± 18.9 g and 178.2 ± 16.8 g for the control and the TM group, respectively).

Development of the Liver According to the Nutritional Status

Liver weight and histological structure.

Liver weights increased significantly between 0 and 4 h ($P < 0.001$), from 65.9 to 96.6 g on average for Control and TM groups (Fig. 2), without any impact of the thermal programming. To confirm and characterize the increased liver weight in both groups, histological measurements were performed. The refeeding resulted in a significant increase in cell size from 100 to 140 μm^2 in the control group (Fig. 3, *A* and *B*)

Table 2. *Incubation and hatching data*

Condition	Late Mortality, %	Hatchability, %	Male Proportion, %	Weight at Hatch, g	Internal Temperature at Hatch, °C
Control	3.2	78.8	55.7	$50.2^a \pm 4.5$	$40.1^a \pm 0.5$
+1°C 16 h/24 E13–E27	3.0	84.2	54.7	$48.8^b \pm 4.1$	$39.9^b \pm 0.4$
Number of animals (*n*)	435–506	501–554	404–475	217–255	98–101

Analysis table of late embryonic mortality, hatchability, male proportion, and weight and internal temperature at hatch for both treatments (control and TM: +1°C 16 h/24 E13–E27), with standard deviations (SD). λ^2 Tests were performed for late mortality, hatchability, and male proportion between the two treatments. Student's or Wilcoxon's tests were performed for weight and internal temperature data. Within each column, values with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpregu by Krysia Moore (073.086.090.149) on January 2, 2023.

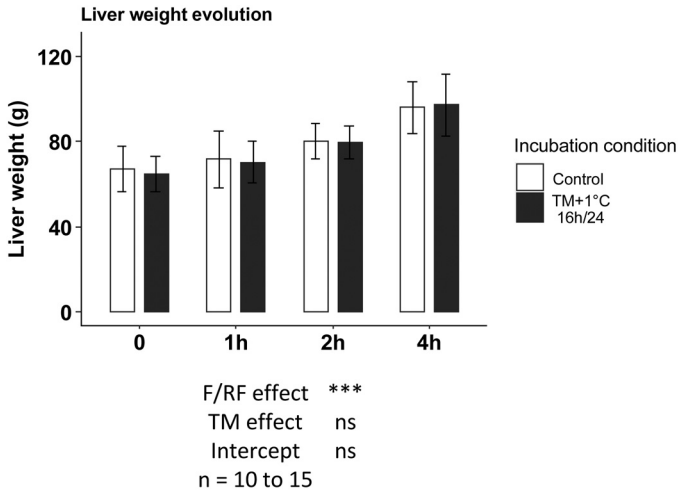


Figure 2. Liver weight according to nutritional status at 11 wk of age. Liver weights are represented for each time point and for both treatments at the end of the fasting period (0) and 1, 2, and 4 h after the refeeding. A two-way ANOVA was applied to compare the two treatments and the different time points (n = 10–15). F/RF, fasting/refeeding; TM, thermal manipulation. n, number of animals; ns, nonsignificant. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$.

along with a significant decrease in cell number on the same area from 4.6×10^{-4} to 2.9×10^{-4} nuclei per μm^2 in the control group (Fig. 3*C*). The impact of thermal programming on liver structure was significant on the cell size, with an increase of ~1 μm^2 in the average cell surface area at both feed stages compared with control animals ($P < 0.0004$). This increase in cell size was confirmed by a slight decrease in the number of nuclei per μm^2 compared with the control group, 4 h after the refeeding ($P < 0.02$).

Liver glycogen and lipid content.

Both groups were similarly affected by refeeding, with a large increase in liver glycogen content 2 h after the meal, from less than 10 mg/g tissue to over 78 mg/g tissue in average for the two groups (Fig. 4*A*), with no impact of thermal programming.

In contrast, total liver lipid content was not affected by nutritional status, remaining at ~6% in both groups, at the end of the fasting period and 4 h after the meal (Fig. 4*B*).

However, liver lipid composition was strongly affected by nutritional status (Fig. 4, *C* and *D*, and Table 3). First, neutral and polar lipids were oppositely affected after RF as reflected by the increased proportion of glycerides (neutral lipid) and decreased proportion of polar lipids in control group (Fig. 4, *C* and *D*). Second, refeeding significantly increased the content of saturated fatty acids (SFA), and decreased the n6 and n3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) content in both groups compared with the end of the fasting period (Table 3). A major fatty acid mainly mediated the modulation of each group with a strong increase in C16:0 for SFA and a strong decrease in C20:4 n6 for PUFA n6. Only the total monounsaturated fatty acid (MUFA) content was not affected by the nutritional status, although a significant increase in C16:1 and an increasing trend (significant in two-tailed test) for C18:1 were observed for the control group after RF. The proportion of SFA varied from 39.4% to 48.1% and the PUFA from 32.2% to 21.5% for n6 and from 1.7% to 1.0% for n3 between 0 and 4 h, in average for the two groups.

Interestingly, the programming had a significant impact on total level of SFA, with a significantly higher proportion 4 h after the meal in the TM group (50.2%) compared with the control group (46.0%). This difference was mostly due to the content in stearic acid (C18:0), the second major SFA in the liver, which was not decreased after RF in the TM group unlike the control group. This imbalance was not found in the proportion of total unsaturated fatty acids (mono or poly). However, although their small proportion did not affect their entire class, it should be noted that significant differences were measured for palmitic acid content (C16:1) with no increase in the TM group after refeeding compared with the control group, and a lower overall amount of C20:3 n6.

In addition, several significant interactions were observed for all classes of fatty acids, linked to an opposite effect of the two factors (nutritional status and temperature treatment) when, for the same condition (Control or TM), 0 and 4 h were compared.

Changes in Plasma Parameters according to the Nutritional Status

Refeeding affected all plasmatic parameters, except glucose concentration (Fig. 5). Plasma levels of nonesterified fatty acids (NEFA) and cholesterol were decreased 2 h after the meal compared with the end of fasting, from 0.20 to 0.11 g/L and from 3.1 to 2.1 g/L, respectively, on average for both treatments (Fig. 5, *A* and *B*), whereas triglycerides increased from 0.80 to 2.28 g/L (Fig. 5*C*).

Plasmatic responses between fasting and refeeding did not differ according to the incubation condition (TM or Control), although an interaction between the two groups was significantly measured for cholesterol level, showing a stronger difference in the TM group between 0 and 2 h.

Gene Expression in the Liver

To corroborate the physiological changes observed above, we then measured gene expressions relevant for carbohydrate and lipid metabolisms in the liver, at several time points after the refeeding (Fig. 6). We first investigated genes related to carbohydrate metabolism, for which we observed a decrease in the expression levels of *G6PC1* and *PCK1*, involved in glucose synthesis, and an increase in *HK1*, involved in its oxidation from the first hour after RF (Fig. 6, *A*–*C*).

Then, we evaluated lipid metabolism at the transcriptional level. A progressive increase in the expression of two genes involved in lipid synthesis (*FASN* and *SCD1*) and a decrease in the expression of *CPT1* involved in lipid oxidation were highlighted with RF (Fig. 6, *D*, *E*, and *H*). In contrast, relative expressions of *ACOX1* and *ELOVL6* were not significantly impacted by the nutritional status (Fig. 6, *F* and *G*).

Regarding the impact of TM on these genes, we measured significantly lower expression of *HK1*, *FASN*, *SCD1*, and *ELOVL6* in the programmed group compared with control. Interestingly, a strong interaction effect between nutritional status and thermal programming was measured for *HK1* gene expression. This interaction highlighted that when RF first induced an increase followed by a decrease in *HK1* expression in the control group, TM caused the opposite effect.

Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpregu by Krysia Moore (073.086.090.149) on January 2, 2023.

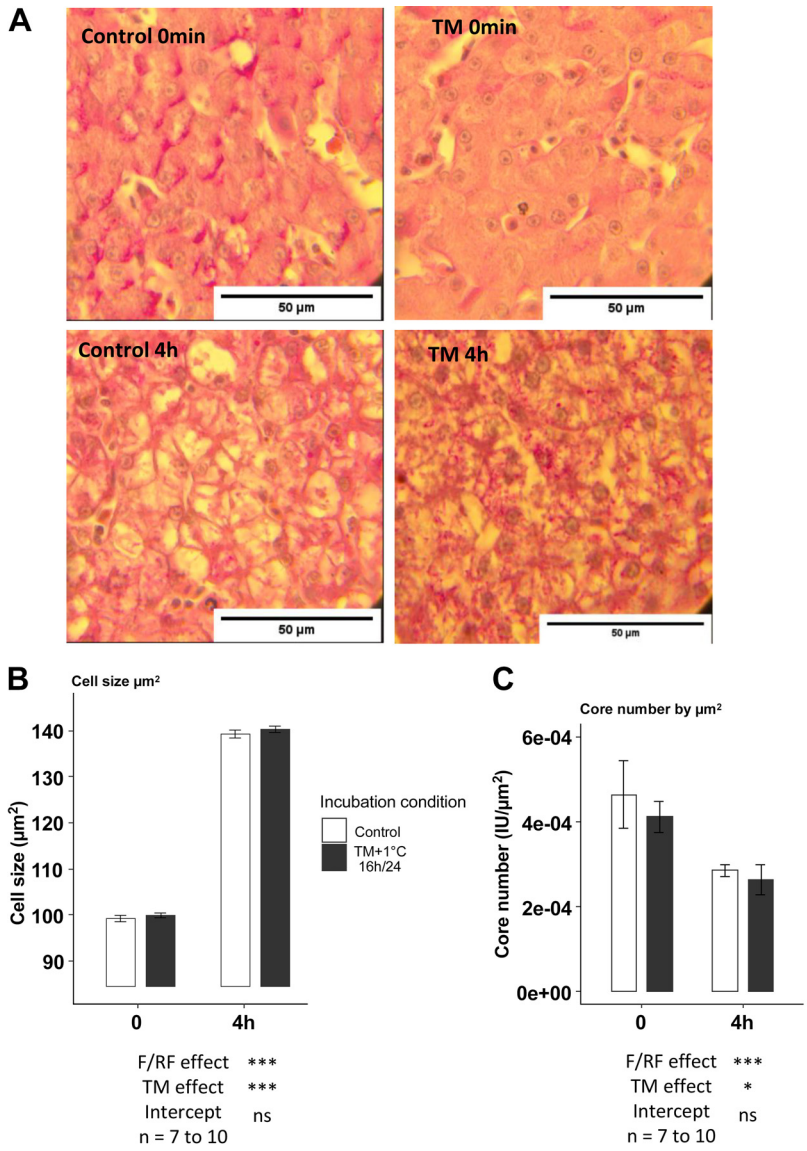


Figure 3. Liver histological sections in the control and TM groups according to their nutritional status at 11 wk of age. Representative images of liver section at the end of fasting (0 h) and 4 h after the refeeding (4 h) for the two treatments (*A*) reinforced by the graphical representation of the average cell size (*B*) and the average number of nuclei per unit area (*C*). Two-way ANOVA was used to compare the two treatments at the two different timings (0 and 4 h) for core number and cell size. TM, thermal manipulation. *n*, number of animals; ns, nonsignificant. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, and $***P < 0.001$.

Finally, we examined the expression of the six genes previously identified as TM target genes (15): *GPAT1*, *APOB*, *DIO3*, *PSMD12*, *UBQLN1*, and *HSBP1* (Fig. 7). Among them, *GPAT1*, *APOB*, *PSMD12*, and *UBQLN1* were confirmed as specific programming targets as we measured a significant impact of TM on their expression during the RF kinetics. On the contrary *HSBP1* were not affected by TM during the nutritional challenge. Regarding *DIO3* expression, the number of samples with measurable CT after 40 PCR cycles dropped to less than 4 in the control group, 1 h after RF. This information suggests that RF induced a strong reduction in its expression in the control group but unfortunately prevented statistical testing of the impact of RF or TM on the expression of this gene.

DISCUSSION

This study was interested in measuring the impact of embryonic thermal programming on the liver metabolism of mule ducks during a fasting/refeeding challenge. We therefore studied the impact of embryonic TM on the global hepatic response of 11-wk-old ducks after fasting for 23 h, then 1, 2, and 4 h after refeeding.

Thermal Stimulus Application and Hatching Performances

Being the best thermal programming condition tested previously (11), with a significant increase in liver fattening and no negative impact on the hatchability and quality of the finished product, we chose to reproduce the thermal stimulus of $+1°C$ 16 h/24 h from the 13th day to the 27th day of incubation in this study. Here we confirmed the absence of negative impact on late mortality, hatching and sex ratio compared with the control group, as well as a decrease in body temperature and weight at hatching. These last two factors have been demonstrated many times in thermal programming studies in poultry and might be identified as the good perception of the stimulus (11, 18–22). The frequently observed catch-up growth was measured as early as the age of 6 days.

Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpregu by Krysia Moore (073.086.090.149) on January 2, 2023.

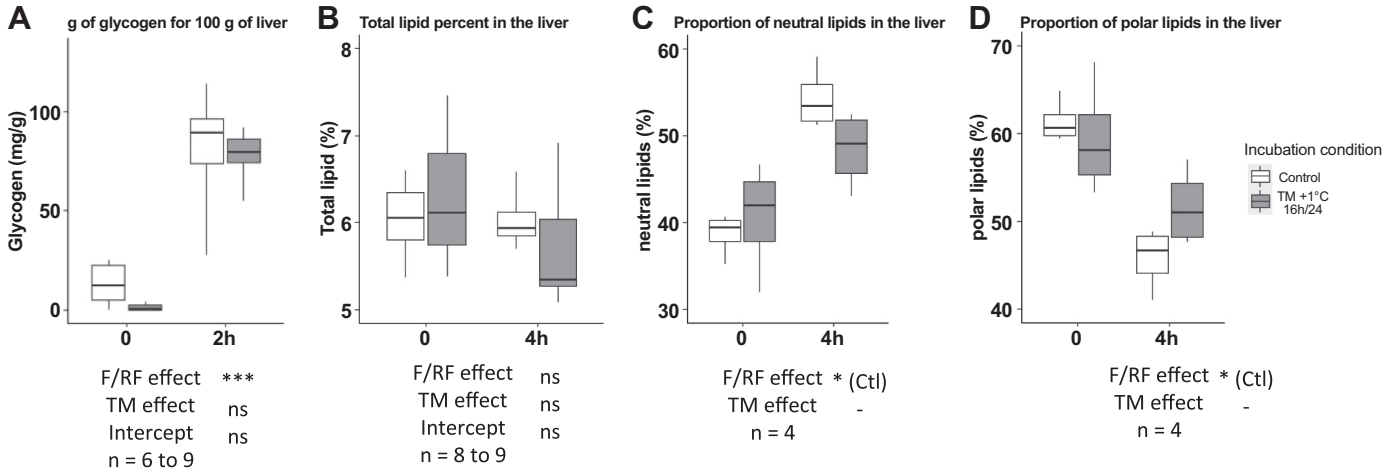


Figure 4. Energetic composition of the liver in the control and TM groups according to their nutritional status at 11 wk of age. Box-and-whisker plots representations of liver glycogen (6–9 samples; *A*), total lipids (8–9 samples; *B*), neutral lipids (4 samples; *C*), and polar lipids (4 samples; *D*) levels in the liver of animals at the end of the fasting period (0), 2 h, or 4 h after refeeding. Two-way ANOVA tests were performed to compare the two treatments at the different timing when $n > 6$, otherwise Wilcoxon tests were performed. *n* = number of samples. Ctl, control; RF, refeeding; TM, thermal manipulation. *n*, number of animals; ns, nonsignificant. -Statistic not relevant, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, and $***P < 0.001$.

The Fasting-Refeeding Challenge Allowed to Measure an Impact of the Embryonic Thermal Programming

The main objective of this study was to assess the ability of the F/RF challenge to highlight an impact of embryonic thermal programming at the metabolic level in mule duck.

Indeed, several parameters allowed us to highlight a significant effect of thermal manipulation (TM). First, although the refeeding-induced increase in liver weight was not affected by TM, we observed a slight but overall increase in cell size confirmed by a decrease in the number of nuclei per unit area in the TM group compared with control. Then, no TM effect was measured for the global energetic composition of the liver, but it should be noted that only the control group showed a significant nutritional impact 4 h after RF with an increase in neutral lipid content and a decrease in

Table 3. *Liver lipid content in the control and TM groups according to their nutritional status at 11 wk of age*

	0		4 h		Statistical Effects (*P* Values)		
	Control	TM	Control	TM	F/RF effect	TM effect	Interaction
SFA, %	40.0 ± 1.5	38.7 ± 2.1	46.0 ± 1.1	50.2 ± 2.1	<0.001	0.017	<0.001
C14:0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.1	<0.001	NS	0.038
C15:0	1.0 ± 1.1	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.4	0.1 ± 0.0		*n* too small	
C16:0	20.4 ± 1.5	20.9 ± 1.0	30.5 ± 1.6	31.3 ± 1.9	<0.001	NS	NS
C17:0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0				*n* too small	
C18:0	18.3 ± 1.3	17.2 ± 1.6	15.1 ± 1.3	18.2 ± 1.4	0.02	0.01	NS
MUFA, %	22.5 ± 3.9	26.8 ± 5.4	29.7 ± 1.7	23.2 ± 2.4	NS	NS	<0.001
C16:1	1.1 ± 0.2	1.4 ± 0.4	2.5 ± 0.4	1.5 ± 0.4	<0.001	0.009	<0.001
C18:1	21.2 ± 3.6	25.0 ± 5.0	28.0 ± 3.1	22.4 ± 3.4	NS	NS	0.001
C20:1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	NS	NS	
PUFA n6, %	33.5 ± 2.7	30.9 ± 3.7	19.8 ± 3.5	23.1 ± 3.7	<0.001	NS	0.022
PUFA 14	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0			*n* too small	
C18:2 n6	7.8 ± 1.3	7.5 ± 1.2	6.7 ± 1.2	7.4 ± 1.0	NS	NS	NS
C18:3 n6	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	NS	NS	NS
C20:2 n6	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	<0.001	NS	0.035
C20:3 n6	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	<0.001	0.02	NS
C20:4 n6	20.1 ± 1.6	17.9 ± 2.8	10.0 ± 1.8	12.0 ± 2.1	<0.001	NS	0.006
C22:4 n6	1.9 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.2 ± 0.2	<0.001	NS	0.009
C22:5 n6	2.3 ± 0.5	2.5 ± 0.8	1.5 ± 0.3	1.6 ± 0.4	<0.001	NS	NS
PUFA n3, %	1.8 ± 0.3	1.6 ± 0.4	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.2	<0.001	NS	0.025
C16:4 n3	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	<0.001	NS	NS
C18:3 n3	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0		*n* too small	
C22:5 n3	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	<0.001	NS	NS
C22:6 n3	1.4 ± 0.2	1.2 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.2	<0.001	NS	0.033

Detailed composition of saturated fatty acids (SFAs), monounsaturated fatty acids (MUFAs), poly-unsaturated fatty acids n6 (PUFA n6), and n3 (PUFA n3) in the liver of control or TM groups at the end of fasting (0) and 4 h after refeeding (4 h). Values are expressed as a percentage of total lipids. Two-way ANOVA tests were performed to compare the two treatments at the different timing, $n = 8$ or 9 for all data (except when "*n* too small" is specified). F/RF, fasting/refeeding; TM, thermal manipulation. *n*, number of animals, NS, nonsignificant.

Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpregu by Krysia Moore (073.086.090.149) on January 2, 2023.

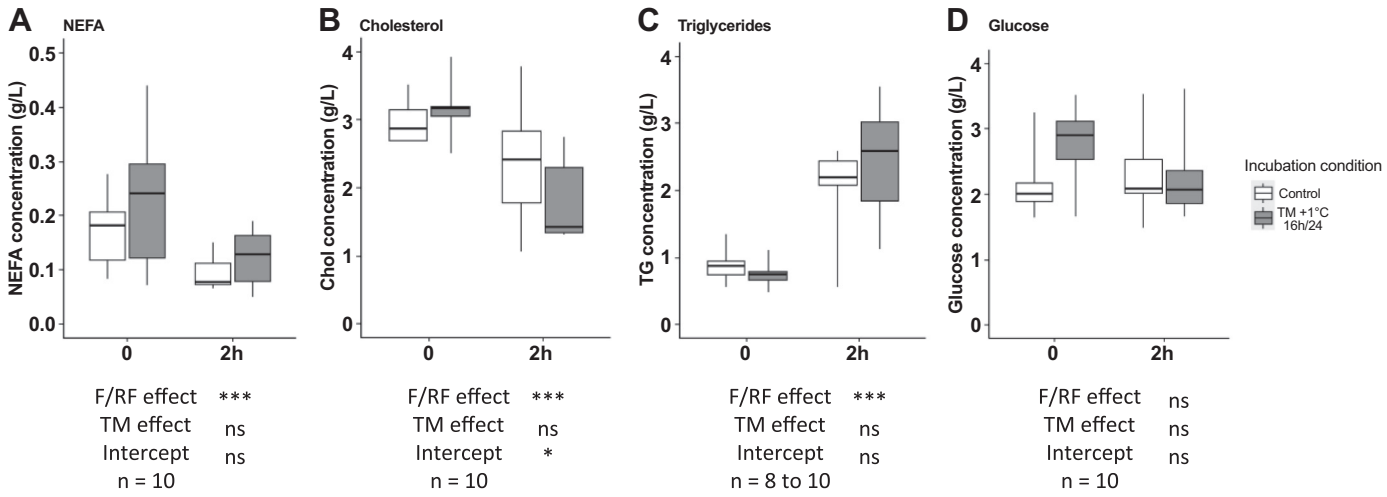


Figure 5. Plasma content in the control and TM groups according to their nutritional status at 11 wk of age. Average plasma concentrations of nonesterified fatty acids (NEFA; *A*), cholesterol (*B*), triglycerides (*C*), and glucose (*D*) at the end of fasting (0) and 2 h after refeeding (2 h). Two-way ANOVA tests were performed to compare the two treatments at different timings (*n* = number of samples). TM, thermal manipulation. *n*, number of animals, ns, nonsignificant. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$.

polar lipids. In programmed animals, a larger cell size could explain the absence of a significant decrease in the percentage of phospholipids in liver (being the major component of the cell membrane), 4 h after RF, contrary to what was observed in the control group. We can hypothesize that this parameter could facilitate the enlargement of the surface of lipid droplets during overfeeding as measured in our previous study (11). However, other experiments will have to explore more precisely the role of these factors in liver fattening before concluding on the role of programming.

Knowing that most of the energy provided by the diet comes in the form of carbohydrates (46%), with a lipid content of ~2% (Growing diet 1320, from SOAL Haut-Mauco, France), we then analyzed the specific fatty acid (FA) composition of the liver lipids before and after refeeding, thus resulting mostly from de novo lipogenesis. The analyses revealed that the content of three FA was significantly affected by programming. C18:0 and C16:1 remained stable during the F/RF challenge in the TM group, although they were respectively decreased and increased by RF in the control group, whereas C20:3n6 was lower overall in the TM group. Moreover, C18:1 was also not increased 4 h after RF, whereas a two-by-two comparison confirmed a RF effect in the control group. The decrease in MUFA (C16:1 and C18:1) could be explained by a lower expression of the desaturase *SCD1* highlighted in the TM group after RF (see below), and confirmed by the higher proportion of C18:0. Overall, these few modulations on lipid composition in the liver added to the huge interaction effect between RF and TM strongly support the idea that metabolic programming mediated by thermal manipulation can be measured in this nutritional model. In addition, plasma parameter analyses confirmed the results previously observed during the overfeeding challenge, namely, a lack of impact of TM for plasma concentrations of glucose, FA, cholesterol, and triglycerides (TG).

Finally, several gene expressions were significantly impacted y programming. Surprisingly, *HK1*, *GPAT*, *FASN*, *ELOVL6*, and *SCD1* were significantly decreased by TM, whereas this programming condition was shown to be effective in increasing liver fattening after overfeeding (11). A lower expression of genes involved in carbohydrate oxidation or lipid synthesis may therefore seem paradoxical. Interestingly, a temporal shift seems to appear between the two groups concerning the regulation of these genes, in particular for *HK1*, *GPAT1*, and *SCD1* whose increase tends to appear later (from 2 h) in TM group compared with control. It should be noted that overfed ducks are usually slaughtered 10 h after the last meal, as this is the best time for liver fattening and sanitary conditions (23–25). Therefore, it is possible that thermal programming does not induce an overall increase in the hepatic metabolic response, but a delayed response that results in fatter livers specifically 10 h after the last meal.

In the last instance, we also analyzed the expression of the 6 genes previously identified as targets of thermal programming during overfeeding (15). Four of them were confirmed as targets during the F/RF challenge since they were significantly affected by TM (*GPAT1*, *APOB*, *UBQLN1*, and *PSMD12*), whereas *DIO3* and *HSBP1* were not (small number of samples for *DIO3*). The impact of TM in both nutritional challenges (overfeeding and RF) was identical for *APOB*, *UBQLN1* and *PSMD12* all three downregulated in the TM group compared with the control group (15), added to *DIO3,* which was overexpressed in the thermally programmed ducks during overfeeding and appears (nonsignificant data) to be expressed more strongly here in the refeeding TM group. For the latter two genes, *HSBP1* was completely unaffected after RF, although it decreased overall around the period of overfeeding, and *GPAT1*, which was upregulated in the TM group at the end of overfeeding, was here significantly downregulated throughout the period of nutritional challenge.

The differences in transcriptional regulation observed here between the two models may be caused by different mechanisms [time after the meal (4 h vs. 10 h), the amount of food ingested, the impact of an accumulation of large meals vs. the response to a single meal, etc]. However, ultimately, the effect of programming on metabolic gene expression is clearly recorded in this new model.

Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpregu by Krysia Moore (073.086.090.149) on January 2, 2023.

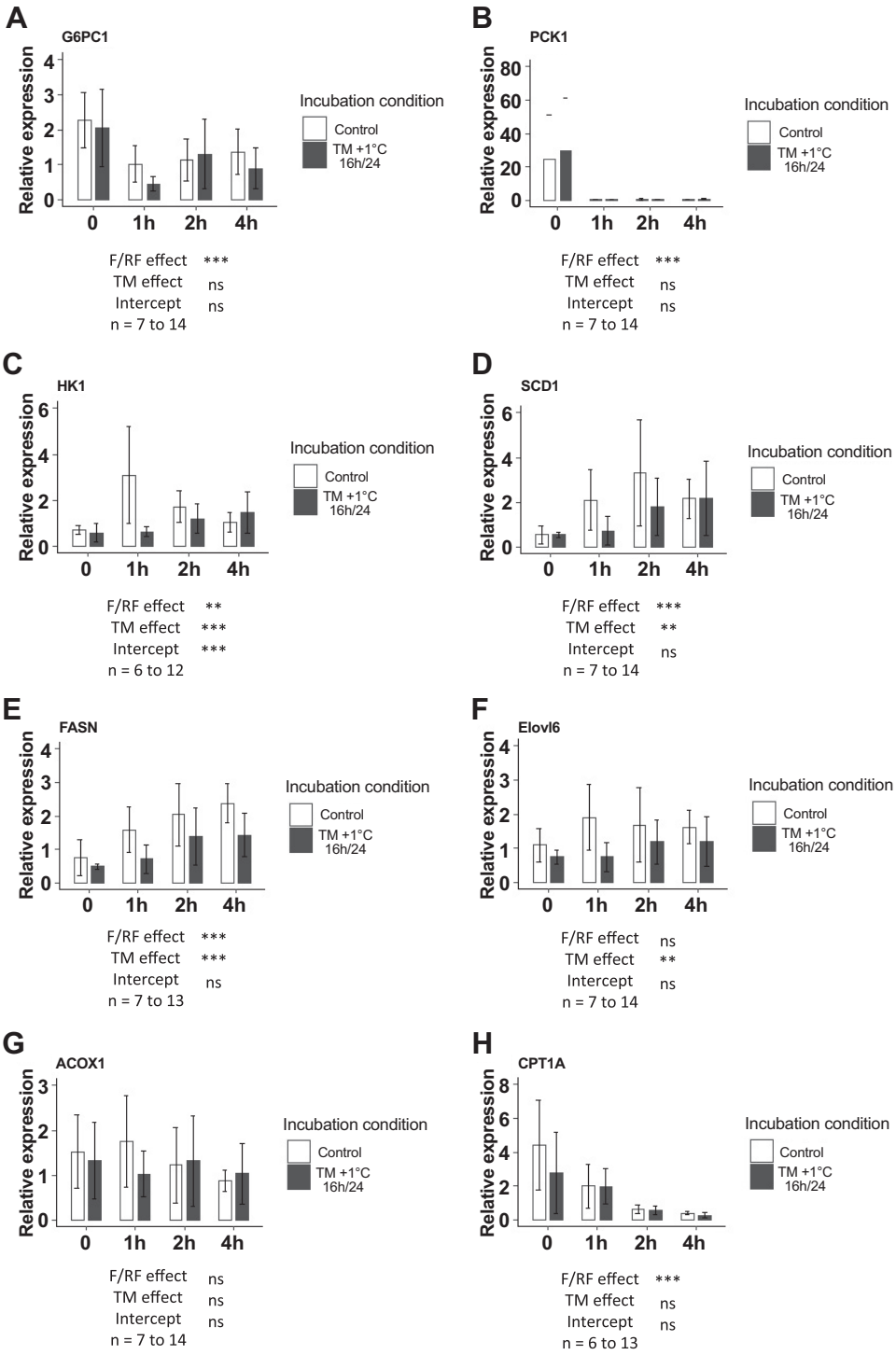


Figure 6. Relative expression of metabolic genes in the liver according to nutritional status at 11 wk of age. Mean relative expression of genes for glucose metabolism: G6PC1 (*A*), PECK1 (*B*) and HK1 (*C*), and lipid metabolism: SCD1 (*D*), FASN (*E*), ELOVL6 (*F*), ACOX1 (*G*), and CPT1A (*H*), represented at the end of fasting (0) and 1, 2, and 4 h after refeeding. Two-way ANOVA tests were performed to compare the two treatments at the different timing. *n* = number of samples. *n*, number of animals; ns, nonsignificant. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$.

The Fasting-Refeeding Model Induced Several Metabolic Responses Comparable to Those Measured during Overfeeding

During the overfeeding period, the daily accumulation of ingested food leads to a sharp increase in liver weight, up to more than five times the initial weight (11, 26). This increase in weight is initially due to the increase in glycogen and lipid content in parallel, and from the 6th day of overfeeding, the glycogen level decreases in favor of the lipid content (27), reaching up to more than 50% of total liver weight at the end of the overfeeding period (26, 28, 29).

Here, we measured a significant, gradual but rapid increase in liver weight after refeeding (RF), reaching a 46% increase in initial weight, 4 h after RF. This increase in weight correlated with an increase in hepatocyte size, as measured by cell enlargement and a decrease in the number of nuclei per unit area. This refeeding-induced increase in liver weight has been already documented in previous studies in mammals but also in avian species (2, 30–32). According to these studies, the

Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpregu by Krysia Moore (073.086.090.149) on January 2, 2023.

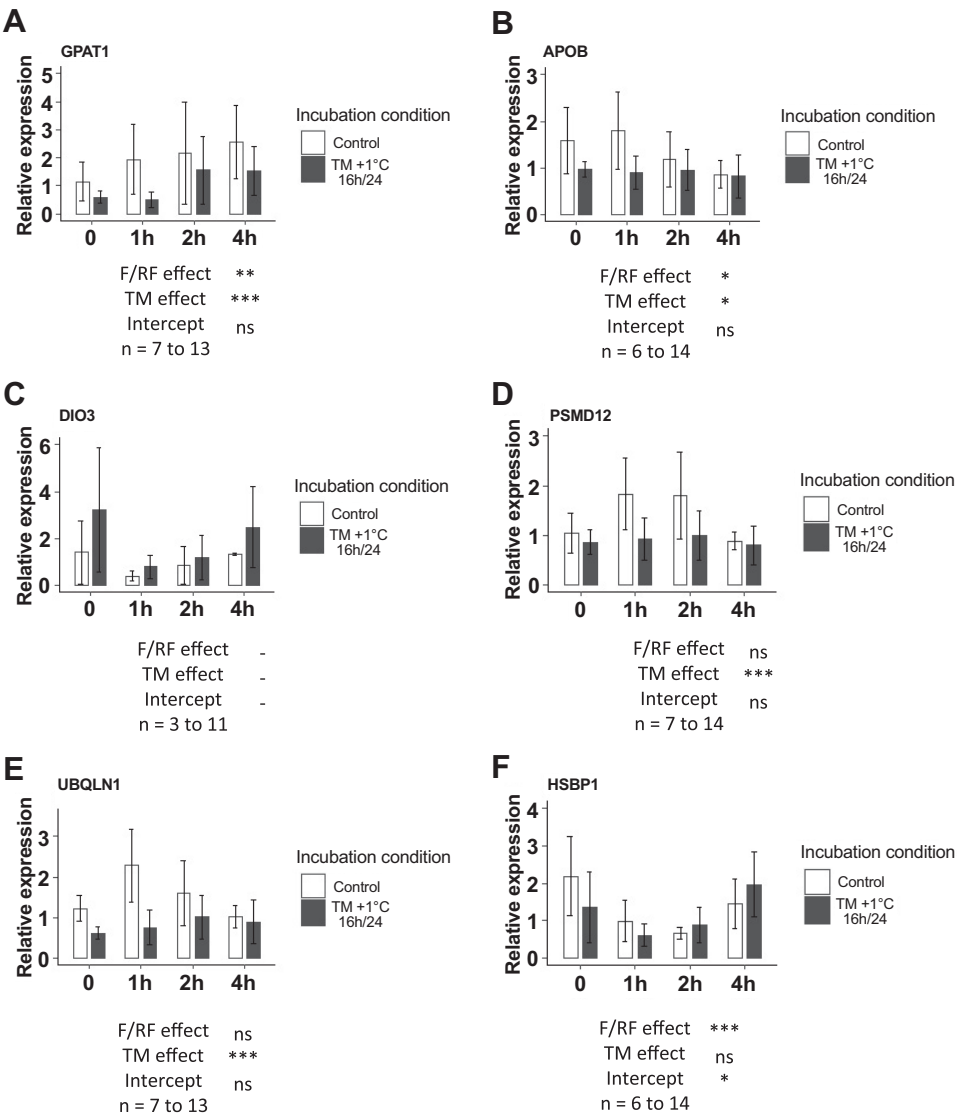


Figure 7. Relative expressions of genes previously identified as TM target in the liver. Mean relative expression of six TM target genes [*GPAT1* (*A*), *APOB* (*B*), *DIO3* (*C*), *PSMD12* (*D*), *UBQLN1* (*E*), and *HSBP1* (*F*)], represented at the end of fasting (0) and 1, 2, and 4 h after refeeding at 11 wk of age. Two-way ANOVA tests were performed to compare the two treatments at the different timing (n = 6–14), except for DIO3 with n too small in control group. TM, thermal manipulation. n, number of animals; ns, nonsignificant. -Statistic not relevant, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$.

increase in liver weight could be due to two main factors: glycogen storage but also lipids synthesis (2, 4, 5, 30, 31, 33).

In the present study, analysis of the liver energy composition of mule ducks confirmed a large increase in glycogen content 2 h after the RF (from 1% at the end of the fasting to 7.8% 2 h after the RF), but no difference in total lipid content even after 4 h (around 6% regardless of nutritional status). This result suggests that the increase in liver weight was mainly due to the glycogen storage metabolism. However, it has been demonstrated in chicken that the increase in lipid content after RF was measurable after 12 h (30), whereas transcriptional activation of lipid metabolism can be measured much earlier (2, 4, 31, 34). These data suggest that there is a time lag between the activation of synthesis pathways and the actual measurement of an increase in total hepatic lipid level.

Therefore, to better determine the development of lipid metabolism in ducks after the feeding challenge, we next analyzed the overall hepatic lipid composition. We first measured an opposite regulation of the two major lipid classes with a decrease in polar lipids 4 h after RF whereas neutral lipids increased. Phospholipids are with cholesterol the major constituents of biological membranes (35) whereas triglycerides constitute an energy store in the form of lipid droplets. The increase in the proportion of triglycerides (major neutral lipids) to polar lipids in hepatocytes shows that lipid energy storage is indeed activated 4 h after RF, although the total lipid content is not yet changed.

Plasma measurements confirm this activation of hepatic anabolism with a significant decrease in plasma NEFA and cholesterol 2 h after the meal, whereas TG increased, confirming previous studies on the impact of fasting or refeeding in mammals and chickens (2, 33, 36–39). Overfeeding also induces an increase in plasma TG content (40) as well as a slight decrease in NEFA (11), since circulating storage lipids are increased (41). As enlightened in Table 4, only plasma cholesterol seems to be regulated in an opposite way when comparing the results of the F/RF model versus overfeeding. Indeed, an increase in plasma cholesterol is progressively measured during overfeeding (11, 29) whereas a decrease was observed here 2 h after RF. However, it has been shown that plasma cholesterol levels are strongly correlated with liver

Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpregu by Krysia Moore (073.086.090.149) on January 2, 2023.

Table 4. *Comparative evaluation between global impact of overfeeding and F/RF challenge on hepatic metabolism*

	Overall Impact of Overfeeding	Overall Impact of F/RF
Liver		
Weight	Increase (42)	Increase
Glycogen content	Increase (27)	Increase
Total lipids content	Increase (26, 28)	**No change**
Triglycerides proportion	Increase (26, 42)	Increase
Phospholipid proportion	Decrease (26, 28)	Decrease
Liver fatty acid composition		
SFA	Increase C16:0 (28, 42)	Increase C16:0
	Decrease C18:0 (42)	Decrease C18:0
MUFA	Increase C16:1 and C18:1 (42)	Increase C16:1 and C18:1
PUFA n6	Decrease C18:2n6 and C20:4n6 (28, 42)	Decrease C20:4n6
PUFA n3	Decrease (28, 42)	Decrease
Plasma content		
NEFA	Decrease (11)	Decrease
Cholesterol	Increase (10) or no change (28)	**Decrease**
Triglycerides	Increase (28, 42)	Increase
Glucose	Increase (10) or no change (28, 43)	No change
Gene expressions		
Glucose oxidation	Increase (10, 12)	Increase
Glucose synthesis	No data	Decrease
Lipid synthesis	Increase (10, 12)	Increase
Lipid oxidation	Decrease (12)	Decrease

Metabolic responses between the two nutritional challenges are listed according to statistical analyses obtained in this study (F/RF) and in different studies on overfed animals (10–12, 26–28, 42, 44). F/RF, fasting/refeeding; MUFA, monounsaturated fatty acid; NEFA, nonesterified fatty acid; PUFA, poly-unsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid.

weight and thus fattening (10). It is therefore not surprising that no rise in plasma cholesterol was measured in our study since total lipids were not yet increased. This discordant result suggests that the F/RF model proposed here could be optimized by attempting to obtain an increase in the quantity of hepatic lipids after the RF, perhaps by extending the time of food intake.

The analysis of FA composition of liver lipids showed that despite initial appearances, lipid metabolism was strongly modulated by the dietary challenge. Indeed, we measured a strong increase in total SFA 4 h after the RF, in parallel with a decrease in total PUFA (n3 and n6). Among SFA, C18:0 was the only one decreased by RF and only in the control group. This decrease was concomitant with an increase in C18:1 (significant when testing only the RF effect in the control group by the Wilcoxon test) and suggests an activation of the *SCD1* desaturase allowing the production of C18:1 from C18:0, confirmed by the higher gene expression level in the control group.

All these results confirm that the F/RF challenge does influence the hepatic energy metabolism of the mule duck, in a sense that can be paralleled with what is observed during overfeeding (Table 4). First, glycogen content was greatly increased by RF, similar to the early days of overfeeding (27). Then, even if the total lipid content was not yet modified 4 h after RF, the global lipid composition of the liver was already strongly affected. We measured an increase in the proportion of triglycerides, an increase in C16:0, C16:1, and C18:1 fatty acids, in parallel with a decrease in C18:0 and total PUFAs (n3 and n6) and specifically in the major C20:4n6, i.e., modulations that have all been previously measured in overfed mule ducks (28, 42). Finally, Molee et al. described an overfeeding-induced increase in the amount of phospholipids in the hepatocyte membrane, but it has been shown that the proportion of PL to total lipids in the liver is greatly decreased during overfeeding (26), just as here in our F/RF challenge.

To assess the activation of metabolic pathways in the liver, we measured the expression of key genes involved in lipid and carbohydrate metabolism, which have previously been shown to be affected by RF (2, 31, 33, 39). The results showed that RF led to an increase in genes involved in carbohydrate oxidation (*HK1*) and lipid synthesis (*FASN*, *SCD1* and *GPAT1*), as well as a decrease in lipid oxidation (*CPT1*) and carbohydrate synthesis (*G6PC1* and *PCK1*), confirming the activation of de novo lipogenesis in the liver. All of these transcriptional modulations were also measured in overfed animals (15, 40, 43), suggesting that this nutritional model may indeed lead to increased lipid content in the liver with a longer RF period.

Perspectives and Significance

The use of the fasting/refeeding protocol therefore allowed us to measure impacts, at different levels, of embryonic thermal programming on the liver metabolism of mule ducks. The greater flexibility of this protocol even allowed us to propose a new hypothesis on the mechanisms of metabolic programming. Indeed, the observation of a slight time lag between the metabolic responses of the control group and programmed group suggests that the greater liver fattening observed 10 h after the last overfeeding meal may be related to this lag.

Furthermore, the different modulations of liver weight, liver fatty acid composition (SFA and MUFA) as well as gene expression and plasma parameters induced by these two nutritional challenges lead us to suggest that the fasting-refeeding protocol could become a very good model for studying embryonic thermal programming, without overfeeding.

Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpregu by Krysia Moore (073.086.090.149) on January 2, 2023.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the technicians of the experimental station of Artiguères (UEPFG) for the daily care given to the animals and monitoring the good conditions for the experiments.

GRANTS

This work was supported by grants from the nongovernmental "Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras" (CIFOG-agreement 2021/15; to M.H.) and from "Comité Départemental des Landes" (CD40; to M.H.).

DISCLAIMERS

The sources of support had no influence on the design, implementation, interpretation, or publication of the results of this study.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.A., J.B., M. Morisson, V.C., S.P., and M.H. conceived and designed research; C.A., M. Marchand, L.L., V.V., S.B., J.B., P.M., and M.H. performed experiments; C.A., M. Marchand, L.L., V.V., S.B., S.P., and M.H. analyzed data; C.A., M. Marchand, S.P., and M.H. interpreted results of experiments; C.A., M. Marchand, and M.H. prepared figures; C.A., M. Morisson, V.C., S.P., and M.H. drafted manuscript; C.A., M. Morisson., V.C., S.P., and M.H. edited and revised manuscript; C.A., M. Marchand, L.L., V.V., S.B., J.B., P.M., M. Morisson, V.C., S.P., and M.H. approved final version of manuscript.

REFERENCES

1. **Han HS**, **Kang G**, **Kim JS**, **Choi BH**, **Koo SH.** Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med* 48: e218, 2016. doi:10.1038/emm.2015.122.
2. **Palou M**, **Priego T**, **Sánchez J**, **Villegas E**, **Rodríguez AM**, **Palou A**, **Picó C.** Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting. *Pflugers Arch* 456: 825–836, 2008. doi:10.1007/s00424-008-0461-1.
3. **Fujita S**, **Yamaguchi M**, **Hiramoto D**, **Saneyasu T**, **Honda K**, **Kamisoyama H.** Effects of fasting and refeeding on the mRNA levels of insulin-like growth factor-binding proteins in chick liver and brain. *J Poult Sci* 55: 269–273, 2018. doi:10.2141/jpsa.0180005.
4. **Chen Z**, **Xing Y**, **Fan X**, **Liu T**, **Zhao M**, **Liu L**, **Hu X**, **Cui H**, **Geng T**, **Gong D.** Fasting and refeeding affect the goose liver transcriptome mainly through the PPAR signaling pathway. *J Poult Sci* 58: 245–257, 2021. doi:10.2141/jpsa.0200095.
5. **Goodridge AG.** The effect of starvation and starvation followed by feeding on enzyme activity and the metabolism of [U-14C]glucose in liver from growing chicks. *Biochem J* 108: 667–673, 1968. doi:10.1042/bj1080667.
6. **Goldman MJ**, **Back DW**, **Goodridge AG.** Nutritional regulation of the synthesis and degradation of malic enzyme messenger RNA in duck liver. *J Biol Chem* 260: 4404–4408, 1985. doi:10.1016/s0021-9258(18)89279-1.
7. **Krestel-Rickert DH**, **Baile CA**, **Buonomo FC.** Changes in insulin, glucose and GH concentrations in fed chickens. *Physiol Behav* 37: 361–363, 1986. doi:10.1016/0031-9384(86)90246-5.
8. **Désert C**, **Duclos MJ**, **Blavy P**, **Lecerf F**, **Moreews F**, **Klopp C**, **Aubry M**, **Herault F**, **Le Roy P**, **Berri C**, **Douaire M**, **Diot C**, **Lagarrigue S.** Transcriptome profiling of the feeding-to-fasting transition in chicken liver. *BMC Genomics* 9: 611, 2008. doi:10.1186/1471-2164-9-611.
9. **Tavernier A**, **Ricaud K**, **Bernadet M-D**, **Davail S**, **Gontier K.** Kinetics of expression of genes involved in glucose metabolism after the last meal in overfed mule ducks. *Mol Cell Biochem* 430: 127–137, 2017. doi:10.1007/s11010-017-2960-x.
10. **Pioche T**, **Skiba F**, **Bernadet MD**, **Seiliez I**, **Massimino W**, **Houssier M**, **Tavernier A**, **Ricaud K**, **Davail S**, **Skiba-Cassy S**, **Gontier K.** Kinetic study of the expression of genes related to hepatic steatosis, glucose and lipid metabolism and cellular stress during overfeeding in mule ducks. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 318: R453–R467, 2020. doi:10.1152/ajpregu.00198.2019.
11. **Massimino W**, **Davail S**, **Bernadet M**, **Pioche T**, **Ricaud K**, **Gontier K**, **Manse H**, **Morisson M**, **Collin A**, **Panserat S**, **Houssier M.** Positive impact of thermal manipulation during embryogenesis on hepatic metabolism in mule ducks. *Fontiers Physiol* 10: 1495, 2019. doi:10.3389/fphys.2019.01495.
12. **Massimino W**, **Andrieux C**, **Biasutti S**, **Davail S**, **Bernadet M**, **Pioche T**, **Ricaud K**, **Gontier K**, **Morisson M**, **Collin A**, **Panserat S**, **Houssier M.** Impacts of embryonic thermal programming on the expression of genes involved in foie gras production in mule ducks. *Front Physiol* 12: 779689, 2021. doi:10.3389/fphys.2021.779689.
13. **David SA**, **Vitorino Carvalho A**, **Gimonnet C**, **Brionne A**, **Hennequet-Antier C**, **Piégu B**, **Crochet S**, **Couroussé N**, **Bordeau T**, **Bigot Y**, **Collin A**, **Coustham V.** Thermal manipulation during embryogenesis impacts H3K4me3 and H3K27me3 histone marks in chicken hypothalamus. *Front Genet* 10: 1207, 2019. doi:10.3389/fgene.2019.01207.
14. **Tarry-Adkins JL**, **Ozanne SE.** Mechanisms of early life programming: current knowledge and future directions. *Am J Clin Nutr* 94*Suppl 6*: 1765S–1771S, 2011. doi:10.3945/ajcn.110.000620.
15. **Massimino W**, **Andrieux C**, **Biasutti S**, **Davail S**, **Bernadet MD**, **Pioche T**, **Ricaud K**, **Gontier K**, **Morisson M**, **Collin A**, **Panserat S**, **Houssier M.** Impact of embryonic thermal programming on the expression of genes involved in *Foie gras* production in mule ducks. *Front Physiol* 12: 779689, 2021. doi:10.3389/fphys.2021.779689.
16. **Folch J**, **Lees M**, **Sloane Stanley GH.** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497–509, 1957. doi:10.1016/s0021-9258(18)64849-5.
17. **Livak KJ**, **Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402–408, 2001. doi:10.1006/meth.2001.1262.
18. **Piestun Y**, **Shinder D**, **Ruzal M**, **Halevy O**, **Brake J**, **Yahav S.** Thermal manipulations during broiler embryogenesis: effect on the acquisition of thermotolerance. *Poult Sci* 87: 1516–1525, 2008. doi:10.3382/ps.2008-00030.
19. **Al-Rukibat RK**, **Al-Zghoul MB**, **Hananeh WM**, **Al-Natour MQ**, **Abu-Basha EA.** Thermal manipulation during late embryogenesis: effect on body weight and temperature, thyroid hormones, and differential white blood cell counts in broiler chickens. *Poult Sci* 96: 234–240, 2017. doi:10.3382/ps/pew298.
20. **Loyau T**, **Berri C**, **Bedrani L**, **Métayer-Coustard S**, **Praud C**, **Duclos MJ**, **Tesseraud S**, **Rideau N**, **Everaert N**, **Yahav S**, **Mignon-Grasteau S**, **Collin A.** Thermal manipulation of the embryo modifies the physiology and body composition of broiler chickens reared in floor pens without affecting breast meat processing quality. *J Anim Sci* 91: 3674–3685, 2013. doi:10.2527/jas.2013-6445.
21. **Al-Zghoul MB**, **Ismail ZB**, **Dalab AES**, **Al-Ramadan A**, **Althnaian TA**, **Ramadan SY**, **Ali AM**, **Albokhadaim IF**, **Al Busadah KA**, **Eljarah A**, **Jawasreh KI**, **Hannon KM.** Hsp90, Hsp60 and HSF-1 genes expression in muscle, heart and brain of thermally manipulated broiler chicken. *Res Vet Sci* 99: 105–111, 2015. doi:10.1016/j.rvsc.2014.12.014.
22. **Andrieux C**, **Biasutti S**, **Barrieu J**, **Morganx P**, **Morisson M**, **Coustham V**, **Panserat S**, **Houssier M.** Identification of different critical embryonic periods to modify egg incubation temperature in mule ducks. *Animal* 16: 100416, 2022. doi:10.1016/j.animal.2021.100416.
23. **Leclercq B**, **De Carville H**, **Guy G.** Pertes de poids du canard de Barbarie mâle lors du jeûne avant abattage. *INRAE Prod Anim* 2: 353–356, 1989. doi:10.20870/productions-animales.1989.2.5.4429.
24. **Baudonnet-Lenfant C**, **Auvergne A**, **Babilé R.** Influence de la durée de jeûne avant l'abattage et du poids à la mise en gavage des canards de Barbarie sur la composition chimique hépatique. *Ann Zootech* 40: 161–170, 1991. doi:10.1051/animres:19910303.
25. **Arroyo J**, **Molette C**, **Lavigne F**, **Knudsen C**, **Deneufbourg C**, **Fortun-Lamothe L.** Influence of the corn form in the diet and length of fasting before slaughter on the performance of overfed mule ducks. *Poult Sci* 98: 753–760, 2019. doi:10.3382/ps/pey432.

Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpregu by Krysia Moore (073.086.090.149) on January 2, 2023.

26. **Hermier D**, **Guy G**, **Guillaumin S**, **Davail S**, **André JM**, **Hoo-Paris R.** Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 135: 663–675, 2003. doi:10.1016/S1096-4959(03)00146-5.
27. **Bonnefont CMD**, **Molette C**, **Lavigne F**, **Manse H**, **Bravo C**, **Lo B**, **Rémignon H**, **Arroyo J**, **Bouillier-Oudot M.** Evolution of liver fattening and foie gras technological yield during the overfeeding period in mule duck. *Poult Sci* 98: 5724–5733, 2019. doi:10.3382/ps/pez359.
28. **Chartrin P**, **Bernadet MD**, **Guy G**, **Mourot J**, **Hocquette JF**, **Rideau N**, **Duclos MJ**, **Baéza E.** Does overfeeding enhance genotype effects on liver ability for lipogenesis and lipid secretion in ducks? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 145: 390–396, 2006. doi:10.1016/j.cbpa.2006.07.014.
29. **Marie-Etancelin C**, **Basso B**, **Davail S**, **Gontier K**, **Fernandez X**, **Vitezica ZG**, **Bastianelli D**, **Baéza E**, **Bernadet MD**, **Guy G**, **Brun JM**, **Legarra A.** Genetic parameters of product quality and hepatic metabolism in fattened mule ducks. *J Anim Sci* 89: 669–679, 2011. doi:10.2527/jas.2010-3091.
30. **de Beer M**, **Rosebrough RW**, **Russell BA**, **Poch SM**, **Richards MP**, **Coon CN.** An examination of the role of feeding regimens in regulating metabolism during the broiler breeder grower period. 2. Plasma hormones and metabolites. *Poult Sci* 86: 1726–1738, 2007. doi:10.3382/ps.2007-00196.
31. **Bazhan N**, **Jakovleva T**, **Feofanova N**, **Denisova E**, **Dubinina A**, **Sitnikova N**, **Makarova E.** Sex differences in liver, adipose tissue, and muscle transcriptional response to fasting and refeeding in mice. *Cells* 8: 1529, 2019. doi:10.3390/cells8121529.
32. **Wang JS**, **Hu HJ**, **Xu YB**, **Wang DC**, **Jiang L**, **Li KX**, **Wang YY**, **Zhan XA.** Effects of posthatch feed deprivation on residual yolk absorption, macronutrients synthesis, and organ development in broiler chicks. *Poult Sci* 99: 5587–5597, 2020. doi:10.1016/j.psj.2020.08.032.
33. **Geisler CE**, **Hepler C**, **Higgins MR**, **Renquist BJ.** Hepatic adaptations to maintain metabolic homeostasis in response to fasting and refeeding in mice. *Nutr Metab* 13: 62, 2016. doi:10.1186/s12986-016-0122-x.
34. **Donaldson WE.** Lipid metabolism in liver of chicks: response to feeding. *Poult Sci* 69: 1183–1187, 1990. doi:10.3382/PS.0691183.
35. **Wang B**, **Tontonoz P.** Phospholipid remodeling in physiology and disease. *Annu Rev Physiol* 81: 165–188, 2019. doi:10.1146/annurev-physiol-020518-114444.
36. **Leveille GA**, **Romsos DR**, **Yeh Y**, **O'Hea EK.** Lipid biosynthesis in the chick. A consideration of site of synthesis, influence of diet and possible regulatory mechanisms. *Poult Sci* 54: 1075–1093, 1975. doi:10.3382/ps.0541075.
37. **Swaner JC**, **Connor WE.** Hypercholesterolemia of total starvation: its mechanism via tissue mobilization of cholesterol. *Am J Physiol* 229: 365–369, 1975. doi:10.1152/ajplegacy.1975.229.2.365.
38. **García-Fuentes E**, **Gil-Villarino A**, **Zafra MF**, **García-Peregrín E.** Influence of fasting status on the effects of coconut oil on chick plasma and lipoprotein composition. *J Physiol Biochem* 59: 101–110, 2003. doi:10.1007/BF03179875.
39. **Serr J**, **Suh Y**, **Lee K.** Regulation of adipose triglyceride lipase by fasting and refeeding in avian species. *Poult Sci* 88: 2585–2591, 2009. doi:10.3382/ps.2009-00265.
40. **Tavernier A**, **Davail S**, **Ricaud K**, **Bernadet M-D**, **Gontier K.** Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks. *Mol Cell Biochem* 424: 147–161, 2017. doi:10.1007/s11010-016-2850-7.
41. **Davail S**, **Rideau N**, **Guy G**, **André JM**, **Hermier D**, **Hoo-Paris R.** Hormonal and metabolic responses to overfeeding in three genotypes of ducks. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 134: 707–715, 2003. doi:10.1016/S1095-6433(02)00365-3.
42. **Molee W**, **Bouillier-Oudot M**, **Auvergne A**, **Babilé R.** Changes in lipid composition of hepatocyte plasma membrane induced by overfeeding in duck. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 141: 437–444, 2005. doi:10.1016/j.cbpc.2005.05.007.
43. **Tavernier A**, **Ricaud K**, **Bernadet M-D**, **Gontier K**, **Davail S.** Pre- and post-prandial expression of genes involved in lipid metabolism at the end of the overfeeding period of mule ducks. *Mol Cell Biochem* 438: 111–121, 2017. doi:10.1007/s11010-017-3118-6.
44. **Berradi H**, **Guy G**, **Rideau N.** A glucokinase-like enzyme induced in mule duck livers by overfeeding. *Poult Sci* 83: 161–168, 2004. doi:10.1093/ps/83.2.161.

Downloaded from journals.physiology.org/journal/ajpregu by Krysia Moore (073.086.090.149) on January 2, 2023.

3. Résumé du challenge nutritionnel : gavage et programmation

Deux conditions d'incubation ont été conservées pour la publication des résultats : la condition contrôle et la manipulation thermique +1,7°C 16h/24 de E11 à E21. **Les animaux programmés ont présenté un poids de foie gras significativement plus lourd (+ 50g) que ceux du groupe contrôle après la même période de gavage.** Ce groupe programmé n'a pas présenté d'impact négatif de la hausse de température d'incubation, comme cela avait pu être le cas pour l'éclosabilité ou le taux de fonte dans la précédente thèse (Massimino et al., 2019), montrant que **l'optimisation de la manipulation thermique pour la production de foie gras a pu être réalisée.**

De plus, cette étude a permis de caractériser la différence de poids de foie entre les deux conditions d'incubation, 10h après le dernier repas. Effectivement, les canards programmés ont montré une prise de masse du foie plus importante, accompagnée par un plus grand nombre de larges gouttelettes ainsi que par des modulations des expressions relatives des gènes d'intérêt par rapport au groupe contrôle. Il a également pu être remarqué que 2h après le dernier repas, le groupe programmé présentait une composition lipidique du foie significativement différente de celle du groupe contrôle, avec moins d'acides gras saturés et plus d'acides gras oméga 6. **Ces différences décrites précédemment entre les deux groupes 2h puis 10h après le dernier repas, suggèrent que le foie des canards programmés pourrait présenter un décalage d'engraissement par rapport au groupe contrôle.** Effectivement, la courbe d'engraissement du foie augmente avec la prise alimentaire jusqu'à atteindre son optimum de poids de foie (proche de 10h après le dernier repas) avant de rediminuer. Le décalage entre les deux groupes pourrait être lié au fait que le groupe MT se trouve encore sur la partie montante voir optimale de la courbe d'engraissement du foie alors que le groupe contrôle lui se trouverait dans la partie perte de masse du foie. Cette réponse décalée chez les animaux programmés a également pu être remarquée lors du challenge nutritionnel de la mise à jeun/réalimentation. **Finalement, la MT a permis d'obtenir un foie gras plus lourd, par rapport au groupe contrôle, pouvant être expliqué par une réponse plus tardive du métabolisme hépatique (synthèse des lipides et oxydation du glucose) chez les canards programmés.**

Cette seconde étude du **chapitre 4** a fait l'objet d'un article soumis (Janvier 2023) dans Frontiers Physiology :

> Article 3 : **Charlotte Andrieux**, Michaël Marchand, Laurence Larroquet, Vincent Verron, Sandra Biasutti, Josette Barrieu, Philippe Morganx, Mireille Morisson, Vincent Coustham, Stéphane Panserat, Marianne Houssier, *Optimization of Embryonic Thermal Programming Leading to Modified Lipid Metabolism in Duck Liver* **[Frontiers, soumis en Janvier 2023]**

Article 3- Optimization of Embryonic Thermal Programming Leading to Modified Lipid Metabolism in Duck Liver (to be submitted in Frontiers in Physiology, Janvier 2023)

Résumé

La manipulation thermique embryonnaire peut engendrer une augmentation du poids de foie et de son engraissement après la période de gavage, chez les canards mulards. Cependant, une diminution de l'éclosabilité et de la qualité du foie gras sont également observés, suggérant que cette technique peut être optimisée. Ici, nous avons testé une nouvelle condition de manipulation thermique sélectionnée dans le but d'éviter les effets négatifs tout en maintenant ou améliorant les précédents bénéfices.

Les œufs du groupe contrôle sont incubés à 37,6°C pendant toute la période d'incubation alors que le groupe expérimental est incubé à 39,3°C 16h/24 du 11ème jour embryonnaire au 21ème. Après l'éclosion, tous les animaux sont alimentés et élevés dans les mêmes conditions jusqu'à l'âge de 12 semaines. A cette période d'élevage, une partie des animaux est gavée puis abattus 2h (pour mesurer les changements rapides du métabolisme) ou 10h après le dernier repas (pour obtenir les meilleurs rendements technologiques), alors que la seconde partie n'est pas gavée et abattue 2h après le dernier repas, au même âge.

La production de foie gras est augmentée de 8 % dans le groupe programmé par rapport au groupe contrôle, sans altérer la qualité du foie, confirmant l'optimisation réussie de la programmation du métabolisme. Curieusement, les mesures réalisées à 2h et 10h après le dernier repas nous permettent de confirmer un potentiel décalage temporel de la réponse métabolique impliquée dans la prise de masse du foie chez les animaux programmés, appuyés par des différences lipidiques et des niveaux d'expressions des gènes hépatiques.

Cette étude valide l'optimisation de la programmation métabolique par une manipulation thermique, de l'engraissement du foie de canard mulard mais permet également d'ouvrir de nouvelles pistes d'études par rapport aux mécanismes de la programmation.

Mots clefs : Manipulation thermique, foie gras, métabolisme lipidique, canard mulard

Optimization of Embryonic Thermal Programming Leading to Modified Lipid Metabolism in Duck Liver

C. Andrieux[1], M. Marchand[1], L. Larroquet[1], V. Veron[1], S. Biasutti[2], M. Morisson[3], V. Coustham[1], S. Panserat[1], M. Houssier[1]

[1]Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, INRAE, NUMEA, 40000 Mont de Marsan, France

[2]Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, IUT Génie Biologique, 40000 Mont de Marsan, France

[3]GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31326 Castanet Tolosan, France

*** Correspondence:**
Marianne Houssier
marianne.houssier@univ-pau.fr

Keywords: thermal manipulation, lipid metabolism, mule duck, overfeeding, foie gras

Abstract

Embryonic thermal manipulations (TM) can induce hepatic metabolic programming increasing liver weight and liver fattening after overfeeding in mule ducks. However, a decrease in hatchability and *foie gras* quality was also observed, suggesting that this technique needs to be optimized. Here, we tested a new thermal manipulation condition determined with the objective of avoiding negative impacts while maintaining or improving liver properties.

The eggs of the control group were incubated at 37.6°C during the whole incubation period while those of the experimental group (TM group) were incubated at 39.3°C 16h/24h from the 11th day of incubation to the 21st. After hatching, all the animals were fed and raised under the same conditions until the age of 12 weeks. At this stage, one part of the animals was overfed and then slaughtered 2h (to measure rapid changes in metabolism) or 10h after the last meal (to obtain the best technological yields), while the other part was not overfed and was slaughtered 2h after the last meal, at the same age.

An 8 % increase in *foie gras* production was measured in the TM group compared to the control group without alteration of quality, confirming the successful optimization of the metabolic programming. Interestingly, measurements performed 2h or 10h after the last meal allowed us to confirm a potential delay in metabolic processes involved in liver fattening in programmed animals, evidenced by differences in lipid composition (saturated and poly unsaturated fatty acids) and hepatic gene expression (lipid and carbohydrate metabolisms).

This study therefore validates the optimization of metabolic programming by embryonic thermal manipulation for duck liver fattening but also opens new exploratory ways of the mechanisms involved.

1 Introduction

In poultry, a change in temperature during the critical period of embryogenesis can result in differential phenotype during the later life of the animal, known as a programming indicator. The timing, the duration and the intensity of the thermal manipulation had to be accurately chosen according to the purpose of the programming and to avoid deleterious effects (1–4). This concept of embryonic thermal programming has been used in broiler field to improve their thermoregulation and resistance to heat shock during the rearing period (2,4,5). It was also shown that this type of programming could improve other performances such as meat production in broiler (6) or more recently *foie gras* production in mule duck. Indeed, it was demonstrated that three different conditions of increasing the incubation temperature, between 1°C and 1.5°C during 14 embryonic days, allowed to enhance the production of *foie gras* up to 16 % (7). Nevertheless, this study also showed that the two most intense conditions reduced the hatchability rate as well as the quality (melting rate) of the final product. Therefore, we conducted two studies to identify the best conditions for embryonic thermal programming in order to optimize liver fattening. In the first one, we described the ontogeny of hepatic energy metabolism during mule duck embryogenesis, revealing several potentially interesting windows for a thermal stimulus (8). In the second study, five embryonic programming windows were tested, revealing a greater fragility of duck embryos to temperature increase during the earliest stages (7,9). Based on these results, we determined a ten embryonic day period with a discontinuous (16h/24h) increase in temperature to design our new thermal programming condition in mule ducks. We therefore applied here an increase of 1.7°C from the 11th day (E11) to the 21th day (E21) of incubation, more intense but shorter than in our previous studies, in order to optimize metabolic programming and liver fattening previously observed.

Concerning the mechanisms that could explain this programming-induced increase in duck liver fattening, a recent study (10) showed that six target genes were differentially expressed around the overfeeding period in the livers of TM animals compared to controls, which may at least partially explain the greater fattening. However, this low number of molecular targets led us to hypothesize that the postprandial timing of tissue sampling (10 hours after the last meal) may not have been the most appropriate. Indeed, two studies that measured kinetic molecular responses of mule duck liver up to 12h after the last overfeeding meal, demonstrated that most of the gene responses took place in the first 5h after the meal (11,12). According to these studies, we determined that gene expression analyses in particular could be more informative 2 hours after the last meal.

Given all this information, we applied in this study a thermal programming of + 1.7°C, 16h/24h from E11 to E21, and maintained liver sampling 10h after the last meal to compare zootechnical measurements to previous studies, while adding sampling 2h after the last meal to increase our chances to better understand the molecular mechanisms through the identification of genes altered in the short term.

2 Materials and methods

2.1 Animals

A total of 1,500 mule duck eggs (750 eggs per group) of the H85 genotype were provided by Grimaud Frères Selection company (Roussay, France).

The incubation period took place inside two identical incubators with regulation of temperature, humidity and ventilation (SOLOGNE model of LA NATIONALE reconditioned model). During the

whole incubation, temperature and relative humidity (RH) were recorded every 15 minutes by two independent sensors (LoRa® SPY U). Each incubator had its own pair of sensors. All eggs were subjected to an automatic rotation of 90° every three hours and were sprayed manually the afternoon before the incubation conditions were changed. In the first incubator, the temperature was maintained at 37.6°C and RH around 63.2 % throughout the entire incubation period, representing the control group. In the second incubator, an embryonic thermal manipulation (TM) was done with a temperature increase of + 1.7°C (39.3°C), 16h/24 from the 11th to the 21st embryonic day (E11-E21) as well as a RH around 58.6 % (**Figure 1**).

One light-check, called candling, was done during the incubation to estimate the mid-embryonic mortality just before the transfer to hatchery (E28). Dead eggs were removed from incubators and the remaining eggs were pooled to avoid local temperature disturbance. All eggs were moved into the same hatcher (BRETAGNE model of LA NATIONALE, reconditioned model) maintained at 37.3°C and 80 % of RH during four days. Once a day, the number of newly hatched eggs was recorded. Hatchability (%) was calculated by the ratio of the number of ducklings born in total on the four days to the number of eggs put inside incubator the first day, multiplied by 100.

A total of 150 male ducklings for each group were reared under the same life conditions and fed *ad libitum* with a starting diet until 4 weeks of age. Then, they were fed with a growing diet *ad libitum* from 4 to 7 weeks of age and hourly rationed from 8 to 12 weeks, with the same diet. At 12 weeks, each treatment was divided into two groups, based on similar weight ducks, (**Figure 1**). One group was subjected to overfeeding with a powder diet (OF) and the other group was still hourly rationed with the growing diet, thus non-overfed (Fed). The overfeeding period was characterized by a duration of 11 days, corresponding to two meals per day for a total of 21 meals (53 % corn and 47 % water, Palma Maisadour).

The slaughter at day 88 was done 2 hours after the last meal (10 to 15 ducks). Slaughters at 89 and 90 days were carried out 10 hours after the last meal (40 to 60 ducks). Ducks were killed by bleeding after stunning in an electric water bath in line with European Council Regulation (Ec) No 1099/2009 (2009) (Council Regulation (EC) No 1099/2009 of24 September 2009 on the protection of animals at the time of killing Text with EEA relevance) at the Experimental Station for Waterfowl breeding (INRAE, Artiguères, France).

2.2 Sampling and measurements

Mid-embryonic mortality was recorded during incubation (E28) and late embryonic mortality, sex ratio, hatchability and body weight were measured at hatch. Body weights were also recorded at 5 rearing period: after one day (D1), six days (D6), 43 days (D43), 70 days (D70) (data not shown) and at the slaughtering day (D88 or D89 or D90).

At D88 (10h after the last meal), liver, breast muscle, leg muscle, abdominal fat and subcutaneous adipose tissue (SAT) were weighed for all the animals. At D89 and D90 (2h and 10h after the last meal), pieces of liver were sampled in the middle of the large lobe and stored at -80°C. For the study of liver lipid content, glycogen content measurements were done on samples from 2h and 10h after the last meal. Gene relative expressions (10 to 15 samples) only concern samples from 2h after the last meal. Finally, samples from 10h after the last were immediately fixed in 4 % paraformaldehyde for histological analyses (5 samples).

Moreover, blood samples were collected from ducks slaughtered 2h after the last meal in disodium EDTA tubes, after carotid section.

2.3 Histological analysis

Liver (10h after the last meal, when the liver weight is heaviest) were fixed in formaldehyde (4 %) during 24 hours, dehydrated by successive ethanol baths, with a croissant concentration, before xylene baths and inclusion in paraffine. Liver cut thickness varied between 7 to 10 µm and were performed on KNITELL lames. Slide coloration were performed by the 2-coloration method combination: PAS (Periodic Acid Shiff) and HE (Hematoxyline Eosin).

Measurements of number of nuclei per µm² and lipid droplet surface (µm²) were performed on 5 livers from different individuals for each group. For each liver, two slides were used to perform different counts on each slide on different areas, with 4 counts per slide for number of nuclei and all lipid droplets on the area were done. Statistics were performed on all the counts of each slide for each individual, i.e. 40 measurements for each group for number of nuclei and more than 5,000 surfaces. Lipid droplets size were divided into four categories,< 100µm², between 100 and 320 µm², between 320 and 640 µm² and > 640 µm² according to (13).

2.4 Plasma assays

Individual plasmas were collected 2h after the last meal to evaluate the rapid response. They were separated by centrifugation at 2,000 g for 10 min at 4°C and frozen at -20°C for further analysis. Glycemia, triglyceridemia, cholesterol and non-esterified fatty acids (NEFA) were quantified by the colorimetric method using an enzymatic kit (Glucose GOD-POD, SOBIODA; Triglycerides GPO POD, SOBIODA; Cholesterol LD M, SOBIODA, NEFA HR2, Wako Richmond, United States).

2.5 Liver lipid and glycogen contents and melting rate

For 9 fatty livers collected from overfed and non-overfed ducks (2h and 10 h after the last meal), the total lipid content was extracted form 1.0 g of liver by homogenization in chloroform methanol 2:1 (v/v) and measured by gravimetry by following Folch method (14). Triglycerides were saponified with dichloromethane and alcoholic potassium and gas chromatography (GC) after their conversion into volatile methyl ester, to obtain fatty acids profile.

Free glucose was measured from 100 mg of crushed liver (6 to 9 samples), then glycogen was hydrolyzed by using KOH at 100°C during 2h30. Free glucose and total glucose were measured by the same method as glucose in plasma. Liver glycogen corresponding to the difference between total glucose and free glucose, was evaluated for each sample and given in mg of glucose by g of liver tissue.

The melting test was done for all overfed ducks (36 to 58 samples, 10h after the last meal). Samples of liver were placed in a tin can used for the melting test. The tin cans were cooked in an autoclave at 85°C for 60 minutes and stored overnight at 4°C. The melted fat was removed and the remaining sample was placed on absorbent paper. The melting rate was then measured as the percentage of loss from the initial liver weight.

2.6 Total RNA extraction, reverse-transcription, Fluidigm and gene relative expression

Total RNA was isolated from 50 mg of frozen tissue according to the TRIZol protocol (Invitrogen/ Life technologies). Their concentration was measured by spectrophotometry (optical density at 260 nm) using a Biotek EPOCH 2 microplate reader (Take 3 Plate), and all the samples were diluted at 100

ng/µL. The RNA reverse-transcription (RT) was done in duplicate, from 12 µL of sample with 0.5 µL of Super Script (Life Technologies SAS) and 1 µL RNase out (Life Technologies SAS), and by using 1 µL of an exogenous RNA (Luciferase, Promega) to ensure the stability of the RT. The RNA reverse-transcription was performed in the CFX384 PCR machine (BioRad, USA) using the following program: 25°C/5 min, 55°C/60 min, 70°C/15 min.

Gene expression levels were determined by high throughput real-time quantitative PCR from Fluidigm (Gentyane platform, Clermont-Ferrand, France). Two 96 well plates were prepared, one with samples at 5 ng/µL and the second with gene primers (46 genes analyzed) at 20 µM, listed in **Supplementary tables 1 and 2**. Genes were validated when their efficiency ranged from 1.85 to 2.15 calculated from cascade dilution of a pool of cDNA and after amplicon sequencing. The sample amplifications were realized in two steps by using the Fluidigm method. A first pre-amplification with Preamp Master Mix (Fluidigm) was done to normalize all samples following program: 95°C/10 min and 14 cycles of 95°C/15 sec and 60°C/4 min. Pre-amplified samples were treated by exonuclease (NEB) before a TE low EDTA dilution and before moving samples to a 96x96 chip for Fluidigm Gene Expression Array. The reaction was made using 20× EvaGreen (Interchim) dye following the program:70°C/2400 sec, 60°C/30 sec, 30 cycles of 96°C/5 sec and 60°C/20 sec. Real time quantitative PCR results were analyzed using the Fluidigm real-time PCR analysis software v.4.1.3.

The cDNA quantification was normalized with four reference genes (*ActB*, *EIF3*, *STAB1* and *USP9X*) selected according to the function GeNorm from the package CtrlGene of Rstudio (v.3.6.2). Moreover, the cDNA quantification was calculated according to the expression $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (15) with ΔCt = Ct target gene – Ct reference genes (4 previous genes) and $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ sample - ΔCt reference. The reference that determined the ΔCt reference value corresponded to the average of Ct across all groups.

2.7 Statistical analysis

To compared results of the two treatments, statistical analyses were carried out using R and Rstudio (version 3.6.2). Hatchability, mortalities and sex ratio were compared by using a Chi-squared test. Student or Wilcoxon tests were done depending on normality and homoscedasticity for weights (body and organs), somatic-hepatic index (SHI) and other parameters at D88.

Two-ways ANOVA tests were applied to Fluidigm results, plasma parameters or liver composition at D89 or D90. Moreover, if the conditions for applying parametric test were not respected, nonparametric tests were applied.

The data are presented as the average +/- standard error of deviation (SD). In every case, differences between the groups were considered statistically significant if the p value was below 0.05.

3 Results

3.1 Pre and post-hatching zootechnical data

First, we studied the direct impact of thermal manipulation on embryonic mortality and hatching rate (**Table 1**). At E28, i.e. after the thermal manipulation, the mid embryonic mortality of the TM group was significantly higher than the control group (15.2 % against 10.0 %). In the hatcher, late embryonic mortality was equal between the two groups, as was the final hatching rate. At hatching, the sex ratio was not different between the two groups.

3.2 Zootechnical performances 10h after the last meal

The zootechnical performances were measured 10 hours after the last meal for control and TM overfed animals. The weight of different tissues and the melting rate of the fatty livers were listed in the **Table 2**. Only the liver weight was significantly different with an average gain of about 50 g for the TM group compared to the control group, confirmed by an increase in the hepato-somatic index (HSI). However, the melting rate of fatty livers after cooking did not show any significant difference between the two groups, remaining around 20 %.

At this sampling time, a focus on the liver energy composition revealed no significant differences between the control and TM groups in the proportion of total lipids or the proportion of glycogen (approximately 60 % and 3 % of liver weight respectively) (**Figure 2A**). Nevertheless, histological analysis of liver sections showed a significant decrease in the number of nuclei per µm² in the TM group compared to the control group ($2.3x10^{-5}$ vs. $2.75x10^{-5}$), confirmed by a significant decrease in the number of small-diameter droplets (<100 µm²) and an increase in the number of large-diameter droplets (between 100 µm² and 640 µm²) (**Figures 2A, 2B and 2C**).

3.3 Plasma parameters 2h after the last meal

Plasma levels of glucose, triglycerides, cholesterol and free fatty acids, measured 2h after the last meal of overfeeding or daily ration, were listed in **Table 3**. Overfeeding resulted in a significant increase in all of these parameters compared to the rationing meal, with glucose levels increasing on average from 3.8 to 5 g/L, triglycerides from 3.4 to 5.9 g/L, cholesterol from 3.1 to 4.4 g/L and free fatty acids from 0.2 to 0.4 g/L. In contrast, embryonic thermal programming only had an impact on plasma glucose levels, with an overall higher level in the TM group compared to the control group.

3.4 Hepatic metabolic response 2h after the last meal

To study the impact of embryonic thermal programming at the molecular level during overfeeding, we measured the expression of over 40 genes in the liver of overfed animals (OF) and animals fed a daily ration (Fed), 2h after their last meal. Gene expression results are listed and classified by metabolic pathway in **Tables 4 and 5**.

Among the 11 tested genes involved in lipid synthesis (**Table 4**), 7 were significantly increased by overfeeding (*DGAT2*, *SCD1*, *ACLY*, *ELOV6*, *PLIN2*, *ME* and *GPAT1*), compared to ration-fed animals measured at the same postprandial time. These increases were associated with an upregulation of the regulator *PPARG*, but no genes involved in lipid oxidation were impacted by OF under these conditions.

Concerning carbohydrate metabolism, only two genes involved in their oxidation (*GAPDH* and *ENO1*) were significantly increased by overfeeding.

In contrast, the measurement of gene expression 2h after the last meal allowed us to measure many modulations significantly linked to embryonic thermal manipulation (TM), whether for carbohydrate or lipid metabolism. Indeed, TM increased the expression of two major regulators, the *LXRA* and *PPARA* genes, genes involved in lipid synthesis (*ACC*, *ELOVL6*, *CEPT1*, *ACAT1* and *ME*), carbohydrate oxidation (*GAPDH*, *ENO1*, *CREB2*), but also in lipid oxidation (*ACOX1*, *ACAD11*, *LIPC and ALDH7A1*). Finally, *APOB* involved in lipid transport was also increased by TM, compared to ducks undergoing conventional incubation.

Table 5 showed the expression measurements of genes involved in the thyroid, stress and cell proliferation pathways in duck liver 2h after the last meal in control and TM groups. Among these genes, only 3, involved in the cellular stress pathway (*HSP70*, *ST13* and *HSF3*), were significantly increased by overfeeding, compared to rationed animals, when both are sampled 2h after the last meal.

Interestingly, TM impacted five genes spread across the three pathways. *DIO1*, *ST13* and *TUBa1C* were increased while *DNAJB12* was decreased by TM compared to the control group. NCOR presented a different profile according to nutritional status with a decrease in its expression in fed TM and an increase after overfeeding in TM group compared to controls.

3.5 Lipid composition of the liver 2h after the last meal

To assess whether these TM-induced modulations of gene expression could be related to a rapid change in liver energy composition, we then analyzed the glycogen and lipid content in the liver of fed and overfed ducks 2 h after their last meal (**Table 6**)**.** First, OF induced a decrease in the proportion of glycogen (from an average of 73 mg/g of liver to 38 mg/g of liver), as well as a strong increase in the proportion of total lipids (from an average of 6.5 % to 55 %), compared to the non-overfed animals. Interestingly, 2 h after the last meal, total lipid level in the TM group was significantly lower than in the control group (**Table 6**), in contrast to what was observed at 10 h after the last meal (**Figure 2**).

Overfeeding also induced large changes in the lipid composition of the liver. In particular, we measured a significant decrease in saturated fatty acids (SFA), mainly due to a decrease in C16:0, an increase in overall monounsaturated fatty acids (MUFA), and a large decrease in polyunsaturated fatty acids (PUFA) n6 and to a lesser extent PUFA n3. The decrease in SFA observed after overfeeding was significantly stronger in TM ducks compared to controls, which was mainly explained by a greater decrease in C18:0. Finally, the very low amount of PUFA n3 did not allow to statistically measure the impact of the dietary challenge, but the decrease in PUFA n6 was significantly lower in the TM group than in the control group after overfeeding.

4 Discussion

The effects of embryonic thermal programming on the acquisition of thermotolerance are well known in poultry (2,6,16), but the impact of such programming strategy on *foie gras* production in mule ducks has only recently been revealed (7,10). The objectives of this study were to test a new programming condition to optimize *foie gras* production and quality and to measure a broad spectrum of molecular modulations induced by this programming. For this purpose, two types of samples were taken, the first 10 hours after the last meal (to obtain optimal weight and liver quality) and the second 2 hours after the last meal (to measure rapid metabolic changes).

4.1 The new TM improved hatching, zootechnical performances and *foie gras* production

To avoid the negative impacts of embryonic thermal programming (+1.5°C 16h/24 E11-E27) on hatching and *foie gras* quality observed in our previous study (7), we applied a shorter thermal stimulus (10 days versus 14 days), and focused on a period of high transcriptional activity of liver metabolism (Massimino et al. 2020). This period (E11-E21) corresponds to an early developmental window but mature enough not to be too sensitive to temperature changes, and previously shown to maintain normal hatchability (9). The choice of increasing the temperature by 1.7°C (against 1.5°C) during this

embryonic period was therefore intended to improve the metabolic programming previously described, in order to optimize the performance of the overfed mule ducks.

Thus, although we measured a significant increase in mid mortality in the TM group compared to the control, this new embryonic thermal manipulation (TM) significantly improved hatching performance since hatchability was maintained at the same level as the control group.

Then, regarding the performances after overfeeding, this new condition of TM has also improved the yield compared to the first study, as liver weight was significantly higher than that of the control group (about 8 %), and melting rate was maintained at the same level, at around 20 % therefore below the 30% threshold accepted in *foie gras* production (17). However, here, the increase in the liver weight in the TM group was not directly related to an increase in total lipid compared with the control group, but remained associated with an increase in the number of large lipid droplets in the hepatocytes.

4.2 Numerous molecular modulations in liver associated with the TM

We then focused on the modulations induced by TM on gene expressions involved in hepatic metabolism. For this purpose, we chose to take samples 2 h after the last meal, in order to measure the level of activation of the pathways of interest in both groups and thus try to better understand the mechanisms of this metabolic programming. These analyses allowed us to confirm the impact of OF on the hepatic metabolism of overfed ducks by comparing them to non-overfed ducks, but also to measure many effects of thermal manipulation in response to OF.

First of all, the overfeeding (OF) increased all measured plasma parameters: glucose, triglycerides, cholesterol and free fatty acid levels, as already demonstrated in different studies (12,18–20), compared to non-overfed animals. Animals in the TM group had significantly higher blood glucose levels than those in the control group, suggesting either better intestinal absorption (21–23) or slower diffusion to consumer tissues (24). Only additional analyses on other tissues could allow to discriminate these two hypotheses.

Regarding the relative expression of genes involved in hepatic lipid metabolism, we confirmed under these conditions that OF induced an increase in the expression level of several genes involved in lipid synthesis and carbohydrate oxidation, compared to animals not overfed but slaughtered at the same postprandial stage (2h after their last meal). Contrary to previous studies (10,20), the expression of genes involved in lipid oxidation did not decrease in the overfed animals compared with rationed animals. These results suggest that two hours after a meal, whether under rationing or overfeeding conditions, lipid oxidation is modulated in the same way. Interestingly, TM itself significantly increased many genes involved in lipid synthesis and carbohydrate oxidation compared to the control group, supporting their greater fattening. On the contrary, TM significantly increased the expression of genes involved in lipid oxidation, compared to the relative expressions of the control group, which is not consistent with greater fattening. Recently published data from our laboratory suggest that after a meal, mule ducks that have undergone TM may exhibit a temporal shift in their hepatic transcriptional response (25). It is therefore possible that the decrease in lipid oxidation normally induced by OF is not yet measurable 2 hours after the last meal in the control group, and that the increase measured in the TM group reflects only a delay in the upcoming decrease. It is also interesting to note that the genes involved in lipid synthesis (*ACC, CEPT1, ACAT1)*, carbohydrate oxidation (*CREB2)* or regulators (*LXRA, PPARA*) that are upregulated by TM are not exactly the same as those specifically induced by

OF at that time. This observation may reinforce the idea that the response of the TM group may be phase-shifted relative to the control group.

Observing the expression of genes involved in the expanded metabolic pathways, only *HSP90*, *ST13* and *HSF3* involved in the stress pathway and *TUBA1C* involved in cell proliferation are significantly increased by OF, compared to animals fed a ration 2h before. These results confirm previous data from animals slaughtered 10 hours after the last meal (10), while in contrast no genes involved in the thyroid hormone pathway is influenced by OF here. These differences can be at least partially explained by the timing of sampling, and prove that it would be very interesting in a future study to explore expression kinetics of the genes of interest, to know precisely the evolution of relative expressions in those conditions. The specific change in relative expression induced by TM here affected genes in all three pathways, even in the proliferation pathway. These impacted genes are all different from the previous study (10), confirming the idea that sampling 2h after the last meal does indeed help identify additional TM target genes. Again, it would be very interesting and informative to study these gene expressions on postprandial kinetics in order to understand the set of regulations that may lead to increased liver fattening.

4.3 TM also had an impact on plasma and liver composition

In addition to changes in gene expression, samples taken 2 h after the last meal also showed alterations in the energy content of liver cells.

First of all, it is interesting to note the differences observed in glycogen and total lipid content between the samples taken 10 and 2 hours after the last meal. Measurements taken 2 hours after the last meal showed a significantly lower amount of lipids in the TM-overfed group compared to the control-overfed group, while 10 hours after the last meal, the TM group had completely recovered this deficit and even started to exceed the control group. This decrease in total lipids measured at 2 h, is concomitant with a higher proportion of hepatic glycogen in TM-overfed compared to control-overfed (45.1 mg/g of liver vs 30.2 mg/g of liver), while at 10 h these trends are completely reversed. These observations support the hypothesis of a temporal shift induced by embryonic thermal programming, which could explain a higher liver weight specifically in the TM group 10 hours after the last meal.

The more precise analysis of liver lipid content, carried out only 2h after the last meal, allowed us to highlight overfeeding effects but also embryonic thermal manipulation effects (TM). First, the proportions of SFA, MUFA and PUFA measured 2 hours after the last overfeeding meal in the control group were very close to those measured even after 10 hours in previous studies (26,27). The proportion of MUFA was strongly increased by overfeeding (from 25.6 % to 56.1 %) while that of PUFA was strongly decreased (from 25 % to 1.5 %). We recently showed that a conventional (non-overfed) meal following a fasting period could also significantly affect lipid proportions 4 h after the meal (25), but overall SFA, MUFA, and PUFA levels remained close to those measured in non-overfed animals (48 %, 25 %, and 23 %, respectively). These data suggest that the high MUFA and low PUFA levels measured after OF in this present study are mainly due to the accumulation of overfeeding meals and not to the last meal effect. However, it is still possible here, 2 h after the last overfeeding meal, to measure an impact of the embryonic thermal programming, since we measured a significant decrease in the proportion of SFA in the TM-overfed group compared to the control-overfed group, mainly due to a decrease of C18:0. SFAs are the first fatty acids produced during *de novo* lipogenesis (28), and then serve as substrates to produce MUFAs, which therefore accumulate during OF. Here, the decrease in SFAs measured in the TM group did not correlate with a modulation of their MUFAs, either because the cumulative effect of the OF meals was stronger than the modulation induced by TM after the last

meal, or because the timing was too short (2h after the last meal, the SFAs may not yet desaturated into MUFA). It would be very interesting in a future trial to measure lipid composition just before the last overfeeding meal, and 10 h after, to check the evolution of these modulations in hourly kinetics. This would certainly allow a better understanding of the metabolic kinetics of liver fattening in mule ducks, but also to draw conclusions about the existence of a time lag in the metabolic response in TM ducks.

5 Conclusion

First, we managed to optimize the embryonic thermal programming technique for *foie gras* production through new incubation conditions that allowed an increase in liver weight, while eliminating the negative effects previously observed. Secondly, we identified many new TM targets linked to liver composition, structure and gene relative expressions, which allowed us to open a hypothesis on the mechanism involved in the programming. These data now open up a whole field of study concerning the mechanisms at the origin of the hepatic metabolic programming, while giving tracks of research, in particular on the existence of a temporal shift by carrying out a longer kinetic study.

6 Ethics statement

All experimental procedures were in accordance with the French national guidelines for the care of animals for research purposes. The protocols were approved by the committee of the Care and Use of Animals of the Grand Sud-Ouest (n°73) under the file reference APAFIS#25163-2020062311266761 v5.

7 Data Availability Statement

None of the data were deposited in an official repository. The data that support the study findings are available upon request.

8 Supplementary material

Not applicable

9 Conflict of Interest

The authors state that this work supported by a grant from the CIFOG, but that these funders played no role in the design of the study and in the collection, analysis and interpretation of the results.

10 Author Contributions

Design and methodology: C. Andrieux, M. Morisson, V. Coustham, S. Panserat and M. Houssier. Experiments and analyses C. Andrieux, S. Biasutti, M. Marchand, L. Larroquet, V. Verron and M. Houssier. Data analysis and software: C. Andrieux. Writing-original draft: C. Andrieux and M. Houssier.

11 Funding

This work was supported by grants from the “Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras” (CIFOG, agreement 2022/05) and from “Comité Départemental des Landes” (CD40, CA salary for 3 years).

12 Acknowledgments

A specific thank for the team of the Experimental Station for Waterflowl Breeding (INRAE, Artiguères, France) for raising ducks in the best possible conditions.

13 References

1. Piestun Y, Harel M, Barak M, Yahav S, Halevy O. Thermal manipulations in late-term chick embryos have immediate and longer term effects on myoblast proliferation and skeletal muscle hypertrophy. J Appl Physiol. 2009;106(1):233–40.

2. Loyau T, Bedrani L, Berri C, Métayer-Coustard S, Praud C, Coustham V, et al. Cyclic variations in incubation conditions induce adaptive responses to later heat exposure in chickens: A review. Animal. 2015;9(1):76–85.

3. Al-Rukibat RK, Al-Zghoul MB, Hananeh WM, Al-Natour MQ, Abu-Basha EA. Thermal manipulation during late embryogenesis: Effect on body weight and temperature, thyroid hormones, and differential white blood cell counts in broiler chickens. Poult Sci Assoc Inc. 2016;96(1):234–40.

4. Tainika B. Thermal Manipulation: Embryonic Development, Hatchability, and Hatching Quality of Broiler Chicks. In: intech open, editor. Broiler Industry [Working Title]. 2022.

5. Yahav S, McMurtry JP. Thermotolerance acquisition in broiler chickens by temperature conditioning early in life - The effect of timing and ambient temperature. Poult Sci. 2001;80:1662–6.

6. Piestun Y, Halevy O, Shinder D, Ruzal M, Druyan S, Yahav S. Thermal manipulations during broiler embryogenesis improves post-hatch performance under hot conditions. J Therm Biol [Internet]. 2011;36(7):469–74. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2011.08.003

7. Massimino W, Davail S, Bernadet M, Pioche T, Ricaud K, Gontier K, et al. Impact of thermal manipulation during embryogenesis on hepatic metabolism in mule ducks. Fontiers Physiol. 2019;10:1–12.

8. Massimino W, Davail S, Secula A, Andrieux C, Bernadet M, Pioche T, et al. Ontogeny of hepatic metabolism in mule ducks highlights different gene expression profiles between carbohydrate and lipid metabolic pathways. BMC Genomics. 2020;1–13.

9. Andrieux C, Biasutti S, Barrieu J, Morganx P, Morisson M, Coustham V, et al. Identification of different critical embryonic periods to modify egg incubation temperature in mule ducks. Animal [Internet]. 2022;16(1):100416. Available from: https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100416

10. Massimino W, Andrieux C, Biasutti S, Davail S, Bernadet MD, Pioche T, et al. Impact of

Embryonic Thermal Programming on the Expression of Genes Involved in Foie gras Production in Mule Ducks. Front Physiol. 2021;In Press.

11. Tavernier A, Ricaud K, Bernadet M-D, Gontier K, Davail S. Pre- and post-prandial expression of genes involved in lipid metabolism at the end of the overfeeding period of mule ducks. Mol Cell Biochem. 2017;438(1–2):111–21.

12. Tavernier A, Ricaud K, Bernadet M-D, Davail S, Gontier K. Kinetics of expression of genes involved in glucose metabolism after the last meal in overfed mule ducks. Mol Cell Biochem. 2017;430(1–2):127–37.

13. Théron L, Astruc T, Bouillier-Oudot M, Molette C, Vénien A, Peyrin F, et al. The fusion of lipid droplets is involved in fat loss during cooking of duck "foie gras." Meat Sci [Internet]. 2011;89(4):377–83. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.018

14. Folch J, Lees M, Sloane stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957;226(1):497–509.

15. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods. 2001;25(4):402–8.

16. Piestun Y, Druyan S, Brake J, Yahav S. Thermal treatments prior to and during the beginning of incubation affect phenotypic characteristics of broiler chickens posthatching. Poult Sci. 2013;92(4):882–9.

17. Décret93-999. Décret n°93-999 du 9 août 1993 relatif aux préparations à base de foie gras. Journal officiel de la république française. 1993.

18. Hermier D, Guy G, Guillaumin S, Davail S, André JM, Hoo-Paris R. Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol. 2003;135(4):663–75.

19. Marie-Etancelin C, Basso B, Davail S, Gontier K, Fernandez X, Vitezica ZG, et al. Genetic parameters of product quality and hepatic metabolism in fattened mule ducks. J Anim Sci. 2011;89(3):669–79.

20. Tavernier A, Davail S, Ricaud K, Bernadet M-D, Gontier K. Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks. Mol Cell Biochem. 2016;424(1–2):147–61.

21. Marathe CS, Horowitz M, Trahair LG, Wishart JM, Bound M, Lange K, et al. Relationships of early and late glycemic responses with gastric emptying during an oral glucose tolerance test. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100(9):3565–71.

22. Fiorentino TV, Suraci E, Arcidiacono GP, Cimellaro A, Mignogna C, Presta I, et al. Duodenal sodium/glucose cotransporter 1 expression under fasting conditions is associated with postload hyperglycemia. J Clin Endocrinol Metab. 2017;102(11):3979–89.

23. Trico D, Mengozzi A, Frascerra S, Scozzaro MT, Mari A, Natali A. Intestinal glucose absorption is a key determinant of 1-hour postload plasma glucose levels in nondiabetic

subjects. J Clin Endocrinol Metab. 2019;104(6):2131–9.

24. Dimitriadis GD, Maratou E, Kountouri A, Board M, Lambadiari V. Regulation of postabsorptive and postprandial glucose metabolism by insulin-dependent and insulin-independent mechanisms: An integrative approach. Nutrients. 2021;13(1):1–33.

25. Andrieux C, Marchand M, Larroquet L, Veron V, Biasutti S, Barrieu J, et al. Fasting / refeeding : an experimental model to study the impact of early thermal manipulation on hepatic metabolism in mule ducks. Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol. 2023;324:R45–57.

26. Molee W, Bouillier-Oudot M, Auvergne A, Babilé R. Changes in lipid composition of hepatocyte plasma membrane induced by overfeeding in duck. Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol. 2005;141(4):437–44.

27. Chartrin P, Bernadet MD, Guy G, Mourot J, Duclos MJ, Baéza E. The effects of genotype and overfeeding on fat level and composition of adipose and muscle tissues in ducks. Anim Res. 2006;55(3):231–44.

28. Collins JM, Neville MJ, Pinnick KE, Hodson L, Ruyter B, Van Dijk TH, et al. De novo lipogenesis in the differentiating human adipocyte can provide all fatty acids necessary for maturation. J Lipid Res. 2011;52(9):1683–92.

Figure captions

Figure 1. Global experimental design

The chronology of the two treatments was schematized on this frieze representing the incubation time of the eggs, the rearing period and the overfeeding period of mule duck.

Changes in conditions (+1.7°C 16h/24 E11-E21 58.6 % RH) applied for 10 days was illustrated by the horizontal dotted line representing a 10-day interval. A control group was present with a temperature of 37.6°C and a mean relative humidity (RH) of 63.2 %. The finishing period started at 49 days (7 weeks) and the overfeeding period started at 78 days (D78) until the slaughtering day (D88, D89 or D90) where plasma and liver samples were collected. A subdivision of group were done at D78, with animal overfed (OF) and animal fed as during the finishing period (Fed). Samples 10h after the last meal were taken for zootechnical measurements, liver composition and histological analysis and samples 2h after the last meal were taken for genetic relative expression, plasma analysis and liver composition.

Figure 2. Energy composition and histological characteristics of the liver 10 hours after the last overfeeding meal

(A) Hepatic energy composition is represented by total lipid levels (%) and glycogen content (mg/g liver). The histological structure is described by the number of nuclei per unit area and the number of lipid droplets classified by size into 4 subgroups (<100µm², between 100 and 320µm², between 320 and 640%m² and > 640µm²).

Student tests were applied when the normality and the homoscedasticity were met, otherwise Wilcoxon tests were applied. (B) Histological slide of liver 10h after the last overfeeding meal in the control group and (C) in the TM group.
Within a row, means with no common superscript differed at $P < 0.05$.
na : non applicable, ns : non significant.

Table 1. Incubation and hatching measurements

During the incubation, the mid mortality was measured at the second candling (E28). In the hatchery, late mortality, hatchability and sex ratio were calculated. Chi² tests were performed between the two groups for the different variables.
Within a column, means with no common superscript differed at $P < 0.05$.
TM: thermal manipulated

	Mid mortality (%)	Late mortality (%)	Hatchability (%)	Male proportion (%)
Control	10.0[a]	3.2	78.8	55.7
TM	15.2[b]	3.1	76.3	57.0
Animal number (n)	501 to 554	435 to 506	668 to 669	404 to 475

Table 2. Zootechnical performances 10h after the last overfeeding meal

10h after the last force-feeding meal, the weight of total body, abdominal fat, pectoral and thigh muscles, skin and liver were measured for both group. The hepato-somatic index (HSI) was calculated from liver weight and body weight.
Student tests were applied when the normality and the homoscedasticity were respected, otherwise Wilcoxon tests were applied. Within a row, means with no common superscript differed at $P < 0.05$.
n=36-58.

	Control	TM
Body weight (g)	5917 ± 357	5842 ± 322
Abdominal fat weight (g)	159 ± 32	163 ± 28
Pectoral muscle weight (g)	306 ± 27	305 ± 25
Skin weight (g)	151 ± 26	145 ± 27
Thigh muscle weight (g)	453 ± 49	437 ± 37
Liver weight (g)	601[a] ± 100	653[b] ± 111
HSI	10.2[a] ± 1.7	11.2[b] ± 1.8
Melting rate (%)	19.0 ± 12.3	21.9 ± 12.3

Table 3. Plasma analysis on fed and overfed ducks slaughtered 2 hours after the last meal

Average plasma concentrations of glucose, triglycerides, cholesterol and free fatty acid (FFA) measured 2 hours after the last meal in overfed animals and animals fed a daily ration (Fed) (n = 9 in each group). Two-way ANOVA was applied when normality, non-correlation and homoscedasticity of residuals were met. Otherwise (FFA) a Wilcoxon test was applied to compare all conditions, with differences represented by different superscript letters in the table.
TM : thermal manipulated, ns : non significant

	Fed (2h)		Overfed (2h)		2 ways ANOVA			Nonparametric test
	Control	TM	Control	TM	OF effect	TM effect	Interaction	
Glucose (g/L)	3.7 ± 1.0	3.8 ± 0.9	4.6 ± 0.7	5.9 ± 1.1	< 0.001	0.033	ns	-
Triglycerides (g/L)	3.2 ± 1.2	3.5 ± 1.3	5.9 ± 1.1	5.9 ± 0.8	< 0.001	ns	ns	-
Cholesterol (g/L)	2.9 ± 1.1	3.3 ± 0.8	4.5 ± 0.7	4.3 ± 0.8	< 0.001	ns	ns	-
FFA (g/L)	0.2^{b} ± 0.1	0.2^{b} ± 0.0	0.5^{a} ± 0.3	0.3^{a} ± 0.1	-	-	-	significant

Table 4. Relative expressions of genes involved in lipid and carbohydrate metabolism in the liver of fed and overfed ducks slaughtered 2 hours after their last meal (2h)

Average of relative expressions of genes classified by metabolic pathway in fed and overfed animals (n = 6 to 8).
Two-way ANOVA was applied when normality, non-correlation and homoscedasticity of residuals were respected. Otherwise (*DGAT2*), nonparametric tests were applied and significant differences were represented by superscript letters in the table.
TM: thermal manipulation; OF: overfeeding; ns: non significant

	Fed		Overfed		2 ways ANOVA			Nonparametric test
	Control	TM	Control	TM	OF effect	TM effect	Interaction	
Lipid synthesis								
FAS	1.17 ± 0.55	1.13 ± 0.45	1.10 ± 0.40	0.97 ± 0.43	ns	ns	ns	-
DGAT2	0.93^{b} ± 0.75	0.27^{b} ± 0.17	2.99^{a} ± 1.65	3.60^{a} ± 2.03	-	-	-	significant
ACC	0.90 ± 0.43	1.08 ± 0.28	1.02 ± 0.35	1.27 ± 0.28	ns (0.06)	0.02	ns	-
SCD1	0.78 ± 0.28	0.85 ± 0.32	1.36 ± 0.68	1.27 ± 0.28	0.02	ns	ns	-
ACLY	1.17 ± 0.83	0.63 ± 0.36	1.47 ± 0.39	1.48 ± 0.69	0.004	ns	ns	-
ELOVL6	0.62 ± 0.23	0.84 ± 0.30	1.58 ± 0.58	1.54 ± 0.51	0.002	0.04	ns	-
PLIN2	0.37 ± 0.14	0.56 ± 0.31	2.92 ± 0.86	2.25 ± 0.64	< 0.001	ns (0.06)	ns	-
CEPT1	0.73 ± 0.41	1.80 ± 0.41	0.95 ± 0.33	1.34 ± 0.79	ns	0.02	ns	-
ACAT1	1.24 ± 0.80	1.82 ± 1.05	0.56 ± 0.26	1.06 ± 0.45	ns	0.008	ns	-
ME	1.02 ± 0.96	2.06 ± 0.87	1.62 ± 0.55	2.06 ± 0.34	< 0.001	0.04	ns	-
GPAT1	0.78 ± 0.42	0.92 ± 0.66	1.41 ± 0.66	1.39 ± 0.50	0.02	ns	ns	-
Lipid oxidation								
ACOX1	0.75 ± 0.29	1.13 ± 0.22	1.13 ± 0.37	1.09 ± 0.40	ns	0.03	ns (0.05)	-
ACAD11	0.80 ± 0.63	2.94 ± 2.35	0.30 ± 0.17	2.61 ± 2.35	ns	0.002	ns	-
ACSL1	1.12 ± 0.54	1.05 ± 0.65	0.89 ± 0.39	0.93 ± 0.40	ns	ns	ns	-
LIPC	1.20 ± 0.84	2.66 ± 1.05	0.54 ± 0.28	0.81 ± 0.46	ns	0.01	ns	-

ALDH7A1	0.90 ± 0.40	1.27 ± 0.20	1.08 ± 0.27	0.96 ± 0.40	ns	0.03	ns (0.05)	-
Lipid transport								
APOB	1.18 ± 0.26	1.63 ± 0.29	0.71 ± 0.25	0.84 ± 0.11	ns	0.01	ns	-
Regulator								
ChREBP	1.14 ± 0.70	1.05 ± 0.53	0.91 ± 0.20	1.26 ± 0.54	ns (0.06)	ns(0.05)	ns	-
LXRA	1.08 ± 0.58	1.67 ± 0.66	0.85 ± 0.32	0.98 ± 0.43	ns	0.03	ns	-
PPARA	1.17 ± 0.42	1.69 ± 0.52	0.85 ± 0.31	0.75 ± 0.28	ns	0.03	0.04	-
PPARg	1.18 ± 0.95	0.50 ± 0.26	2.05 ± 1.32	1.18 ± 0.68	0.007	ns	ns	
Carbohydrate oxidation								
PDHA1	0.88 ± 0.36	1.23 ± 0.58	1.26 ± 0.43	0.95 ± 0.23	ns	ns (0.06)	ns	-
GAPDH	0.86 ± 0.36	1.01 ± 0.30	1.13 ± 0.35	1.34 ± 0.60	0.04	0.04	ns	-
HK2	1.40 ± 0.28	0.82 ± 0.61	1.04 ± 0.19	1.47 ± 1.18	ns	ns	ns	-
ENO1	0.72 ± 0.26	1.16 ± 0.42	1.13 ± 0.27	1.34 ± 0.53	0.02	0.01	ns (0.05)	-
HK1	1.25 ± 0.68	0.68 ± 0.42	1.59 ± 0.54	1.04 ± 0.45	ns	ns	ns	-
CREB2 ATF4	1.15 ± 0.57	1.54 ± 0.44	0.97 ± 0.43	0.87 ± 0.45	ns	0.048	ns	-
Carbohydrate transport								
GLUT2	1.07 ± 0.47	0.94 ± 0.23	1.27 ± 0.65	1.30 ± 0.90	ns	ns	ns	-

Table 5. Relative expressions of genes involved in thyroid, stress and proliferation pathways in the liver of fed and overfed ducks slaughtered 2 hours after their last meal (2h)

Average of relative expressions of genes classified by physiological pathway in fed and overfed animals (n = 6 to 8).
Two-way ANOVA was applied when normality, non-correlation and homoscedasticity of residuals were respected. Otherwise (*TIA1*) student and wilcoxon tests were applied to compare all conditions.
TM: thermal manipulation; OF: overfeeding; ns: non significant

	Fed		Overfed		2 ways ANOVA			Nonparametric test
	Control	TM	Control	TM	OF effect	TM effect	Interaction	
Thyroide								
THRB	0.94 ± 0.68	1.34 ± 0.49	1.42 ± 0.46	1.08 ± 0.51	ns	ns	ns	-
NCOR	1.85 ± 0.82	1.56 ± 0.78	0.43 ± 0.12	0.87 ± 0.39	ns	0.02	ns	-
JMJD1C	1.34 ± 0.51	0.99 ± 0.30	0.83 ± 0.32	0.90 ± 0.57	ns	ns	ns	-
DIO1	1.12 ± 0.58	1.40 ± 0.22	0.93 ± 0.35	0.99 ± 0.12	ns	0.02	ns	-
ALB	1.85 ± 0.42	1.90 ± 0.68	0.62 ± 0.27	0.61 ± 0.23	ns	ns (0.06)	ns	-
Stress								
TIA1	2.18 ± 2.06	0.93 ± 0.55	1.06 ± 0.52	1.03 ± 0.35	-	-	-	ns
PSMD12	1.20 ± 0.61	0.66 ± 0.28	1.45 ± 0.65	0.86 ± 0.31	ns	ns	ns	-
HSPA2- HSP70	2.41 ± 1.43	0.20 ± 0.09	3.46 ± 2.98	1.97 ± 2.54	0.01	ns	ns	-
HSP90AA1	1.27 ± 0.60	0.86 ± 0.47	1.32 ± 0.61	1.25 ± 0.69	ns	ns	ns	-
Hsp10	1.14 ± 0.49	1.34 ± 0.36	0.98 ± 0.21	0.89 ± 0.41	ns	ns (0.06)	ns	-
ST13	0.76 ± 0.34	0.76 ± 0.19	1.35 ± 0.30	1.50 ± 0.66	0.005	0.04	ns	-
HSF3	0.48 ± 0.37	1.08 ± 0.55	2.27 ± 1.49	2.11 ± 1.97	0.009	ns	ns (0.06)	-
DNAJA2-HSP40	1.37 ± 1.04	1.16 ± 0.46	1.16 ± 0.60	1.10 ± 0.52	ns	ns (0.06)	ns	-

HSPA5-HSP70	1.70 ± 0.84	1.16 ± 0.70	0.77 ± 0.28	0.93 ± 0.52	ns	ns	ns	-
DNAJB12-HSP40	2.14 ± 1.98	1.52 ± 0.49	1.04 ± 1.05	1.17 ± 0.53	ns	0.008	ns	-
Proliferation								
HNF4	1.88 ± 1.25	1.19 ± 0.73	1.01 ± 0.50	1.12 ± 0.52	ns	ns	ns	-
TUBa1C	0.73 ± 0.36	1.60 ± 1.22	1.06 ± 0.41	1.50 ± 0.74	0.045	0.007	ns	-
POL2RC	1.48 ± 0.90	0.97 ± 0.44	1.01 ± 0.50	1.34 ± 0.87	ns	ns	ns	-

Table 6. Overall energy composition and detailed lipid content of the liver of fed and overfed ducks slaughtered 2 hours after the last meals (2h)

Glycogen and total lipids of the liver were measured (n = 9) from liver of ducks slaughtered 2h after the last meal. Fatty acids below 0.1 % have been removed.

Two-way ANOVA was applied when normality, non-correlation and homoscedasticity of residuals were respected. Otherwise, nonparametric tests were applied and significant differences are represented by superscript letters in the table.
OF: overfeeding; TM: thermal manipulation; nd : non determined; ns: non significant

	Fed (2h)		Overfed (2h)		Statistics	
	Control	TM	Control	TM	2 way ANOVA	Nonparametric test
Glycogen (mg/g of liver)	75.7 ± 33.1	69.9 ± 25.8	30.2 ± 8.7	45.1 ± 12.8	OF effect : *** TM effect: ns Interaction : ns	-
Total lipids (%)	6.6^{c} ± 1.0	6.3^{c} ± 0.6	58.0^{a} ± 3.7	51.3^{b} ± 6.6	-	significant
Saturated FA (%)	46.6 ± 2.7	44.5 ± 2.5	42.7 ± 2.3	40.2 ± 1.8	OF effect : *** TM effect: ** Interaction : ns	-
C14:0	0.6^{b} ± 0.1	0.5^{b} ± 0.1	0.8^{a} ± 0.1	0.9^{a} ± 0.2	-	significant
C15:0	1.5 ± 1.3	1.6 ± 1.4	nd	nd	-	ns
C16:0	28.7 ± 2.7	27.1 ± 2.3	25.7 ± 2.0	25.6 ± 1.3	OF effect : *** TM effect: ns Interaction : ns	-
C18:0	15.7^{ab} ±1.9	15.2^{ab} ± 1.8	16.0^{a} ± 1.0	13.6^{b} ± 2.7	-	significant
C20:0	nd	nd	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	ns
MUFA (%)	26.9 ± 5.6	27.7 ± 5.2	55.6 ± 2.1	57.0 ± 1.2	OF effect : *** TM effect: ns Interaction : ns	-
C16:1	1.9 ± 0.6	2.1 ± 0.7	2.8 ±0.2	3.6 ± 1.8	OF effect : *** TM effect: ns Interaction : ns	-
C18:1	24.6 ± 5.1	25.3 ± 4.6	52.1 ± 2.1	52.9 ± 1.6	OF effect : *** TM effect: ns Interaction : ns	-
C20:1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	OF effect : *** TM effect: ns Interaction : ns	-
PUFA n3 (%)	1.8 ± 0.4	1.9 ± 0.5	nd	nd	-	ns
C16:4 n3	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.4	nd	nd	-	ns

C18:3 n3	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	nd	nd	-	ns
C22:5 n3	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	nd	nd	-	ns
C22:6 n3	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	nd	nd	-	ns
PUFA n6 (%)	23.7[a] ± 4.7	24.8[a] ± 5.4	1.4[c] ± 0.2	1.9[b] ± 0.3	-	significant
PUFA 14	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	nd	nd	-	ns
C18:2 n6	7.7 ± 1.3	8.0 ± 1.7	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.3	OF effect : *** TM effect: ns Interaction : ns	-
C18:3 n6	0.16 ± 0.0	0.1 ± 0.0	nd	nd	-	ns
C20:2 n6	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	ns	-
C20:3 n6	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	OF effect : *** TM effect: ns Interaction : ns	-
C20:4 n6	12.2 ± 2.8	12.6 ± 3.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	OF effect : *** TM effect: ns Interaction : ns	-
C22:4 n6	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.3	nd	nd	-	ns
C22:5 n6	1.4 ± 0.4	1.6 ± 0.4	nd	nd	-	ns

587

588 **Supplemental table 1. Informative table on primers used for the study**

Gene name	Gene Symbol	main function	Primer sequence (F & R)
Acyl-CoA Dehydrogenase Family Member 11	ACAD11	Acyl-coA dehydrogenase enzyme	TGGTTGTACCTCGAGCTGTG CATCCACATGAGAGGGCTTT
Acetyl-CoA Acetyltransferase 1	ACAT1	Acetoacetyl-CoA synthesis	GGTATCCCCGTGGAAGAAGT TTCCACCAGCAACCATTACA
Acetyl-CoA Carboxylase	ACC	Carboxylation of acetyl-CoA	TGCCTCCGAGAACCCTAA AAGACCACTGCCACTCCA
ATP Citrate Lyase	ACLY	Acetyl-CoA and oxaloacetate synthesis	ACCCCACTGTTGGACTATGC GCTTCAAGCGCTTCTGATCT
Acyl-CoA oxidase 1	ACOX1	Fatty Acid beta-oxidation	CATGTTTGAGTGGGAAAGA TTTTCAGGGCAGGAAAATTG
Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 1	ACSL1	Lipid synthesis	GGCTGGCTTCATACAGGAGA CTCTTTTCTTGGCCCATTTG
Albumin	ALB	Regulation of plasma composents	CCATGGTAGACAAGTGCTGC TCCTGGAGCCGTGTCTT
Aldehyde Dehydrogenase 7 Member A1	ALDH7A1	Oxidation of alcohol molecules	GGAAGCTTGGTCTCATTGGA ATGGCCAGGTCTTTCTGAAG
Apolipo protein B	APOB	Transport of lipids	TCTCACCGTGACTTGAGTGC TCCCAGCAGAAGGTGAAGAT
Choline/Ethanolamine Phosphotransferase 1	CEPT1	Choline/Ethanolamine synthesis	CTGCTGTGCAGCTCTTTGAA CGCAGTATCGAAGCAAATCA
Carbohydrate-responsive element-biding protein	ChREBP (MLXIPL)	glucose-induced lipogenesis transcription factor	TCCTCCACACTGCAAAACTG ACCATGCCGTTGAAAGACTC
Activating Transcription Factor 2	CREB2 ATF2	Regulator of gene transcriptions	CAGGTCCTTTTCCTCTGCTG CCTGGGATTCCTGGGATACT
Diacylglycerol O-Acyltransferase 2	DGAT2	Triglycerides synthesis	TGGGGCTTGTTACCGTACTC TGGAGAAGATGGGCTGAATC
Iodothyronine Deiodinase 1	DIO1	Activation of thyroid hormones	AAGAAGCTCACGCAGCAGAT CCCCACTCCTCCCTTGTAGA
DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member A2	DNAJA2-HSP70	Regulate molecular chaperone activity	CTGACTGCAACGGAGAAGGT CTGGAGCCTGATCTGCTTCT

DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B12	DNAJB12-HSP40	Regulate molecular chaperone activity	TTCCCTCCAGTAACGTCCAC ACTTTCAGCTGCTCCGTCAC
Fatty Acid Elongase 6	ELOVL6	Fatty acids elongation	CTACTTTGTGCTCTTCTGCCATTTT TGGCTTCTGTCTCATTTCTACCAC
Enolase 1	ENO1	Glycolysis	CGCTACATGGGGAAAGGTGT AAGGTCAGCAATGTGACGGT
Fatty acid synthase	FAS	Fatty acid synthesis	TGAAGAAGGTCTGGGTGGAG CTCCAATAAGGTGCGGTGAT
Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase	GAPDH	Phosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate	CAGAGGACCAGGTTGTCTCC CACCACACGGTTGCTGTATC
Glucose transporter 2	GLUT2	Transport of glucose	GGAGTTGACCZZCCCGTTTA CCCACCTCGAAGAAGATGAC
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1	GPAT1	Lipid synthesis	ACAACTTCAGCGGTCCTGTT GCGCTGAGGTAGGAACGTAG

589

590 **Supplemental table 2. Informative table on primers used for the study**

Gene name	Gene Symbol	main function	Primer sequence (F & R)
Hexokinase 1	HK1	Glycolysis	GAGGGAGCAGACGTTGTGAA GCCGCATCTCCTCCATGTAA
Hexokinase 2	HK2	Glycolysis	GTCCACTGCATCTCCGACTT CACATCCAGGTCGAACTCCT
Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha	HNF4	Transcription factor	ACCTCAACACCTCCAACAGC ACGCACTGCCTGTTAAACCT
Heat Shock Transcription Factor 3	HSF3	Transcription factor	GAAAACATCAAGCGCAAGGT CTTCTTTCCACAGGGCCTTA
Heat Shock Protein Family E	Hsp10	Co-chaperonin molecule	AGTTCCTTCCCCTGTTTGAT GCTTGTAGCACTTTCCCTTGA
Heat Shock Protein Alpha Family Class A Member 1	HSP90AA1	Regulation of proteins using ATPase activity	AGACCATTTGGCTGTCAAGC CAGCTCCTCACAGTTGTCCA
Heat Shock Protein Family A Member 2	HSPA2-HSP70	Regulation of proteins	AAGCGCACTCTCAGCTCTTC TTGTCTAGCTTGGCATCACG
Heat Shock Protein Family A Member 5	HSPA5-HSP70	Regulation of proteins in the endoplasmic reticulum	GCCCTTCAAGGTTGTTGAAA TGCATGGGTAACCTTCTTCC
Jumonji Domain Containing 1C	JMJD1C	Demetylate DNA	TCTACAGGAACAGCAAGCGG ACTTGTTGCCGTCATCCTGA
Lipase C, Hepatic Type	LIPC	Triglycerides lipase	TCTGCCCATCACAGTTCTTG TGTTTCCCCTGCTTTCACTC
Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member 3	LXRA	Macrophage regulator	CATCTCGACGCTACAATCCA GTGTGCTGCAGTCTCTCCAC
Malic enzym	ME	Oxidative decarboxylation of malate	GCTTGATAGTGAAGGGGCGT AGGATAGGTGGAGGCAGTGT
Nuclear Receptor Corepressor 1	NCOR	Promoting chromatin condensation	CAAGGCACACCAAGAGCAAC ATGGATGGAACGGCCCATTT
Pyruvate Dehydrogenase E1 Subunit Alpha 1	PDHA1	Pyruvat conversion in Acetyl-CoA	CTGCAGAGCTGGAAAAGGTC CACTGCCACATCAATTTCCTT
Perilipin 2	PLIN2	Lipid droplets synthesis	CAAACCTTCCTTTGGTGAGC TTGTCCAGACCCATACATGC
RNA Polymerase II Subunit C	POL2RC	Synthesis of messanger RNA	TCGGAGCAGAGATAACGACC AGTGCATTGTCCGGGTCATA
Peroxisome proliferator activated receptor alpha	PPARA	Beta-oxidation regulator	GGATGCTGGTAGCCTATGGA ACGTGCACAATGCTCTCTTG

Peroxisome proliferator-activated nuclear receptor gamma	PPARg	Regulator of lipid storage	CCCAAGTTTGAGTTCGCTGT GCTGTGACGACTCTGGATGA
Proteasome 26S Subunit, Non ATPase 12	PSMD12	Modifie proteasome	AGGAGGGGAGACTGCAAGAA AAACCATGTCAGAGGCCGTT
Stearoyl-CoA desaturase 1	SCD1	fatty acid biosynthesis (oleate and palmitoleate)	AGTGCTGCTCACATGTTTGG TGAAGTCGATGAAGGCTGTG
Hsp70 Interacting Protein	ST13	Mediate the association of HSP70 and HSP90	TGCAACCAAGAGCTCAGAAA CCTGTCGTCTTGCTTCTTCC
Thyroid Hormone Receptor Beta	THRB	Receptor for triiodothyronine	GCACAAACCAGAGCCAACAG GGTCTTCACATGGCAGCTCA
Cytotoxic Granule Associated RNA Binding Protein	TIA1	Induction of apoptosis	GGGGCAATGGAGCCAAGTAT AAATCCACCCATCCAGGCAG
Tubulin Alpha 1	TUBa1C	Involve in GTP binding activity	ATGCCAAGCGACAAAACCAT AGTGTAATGACCTCGAGCGT

591

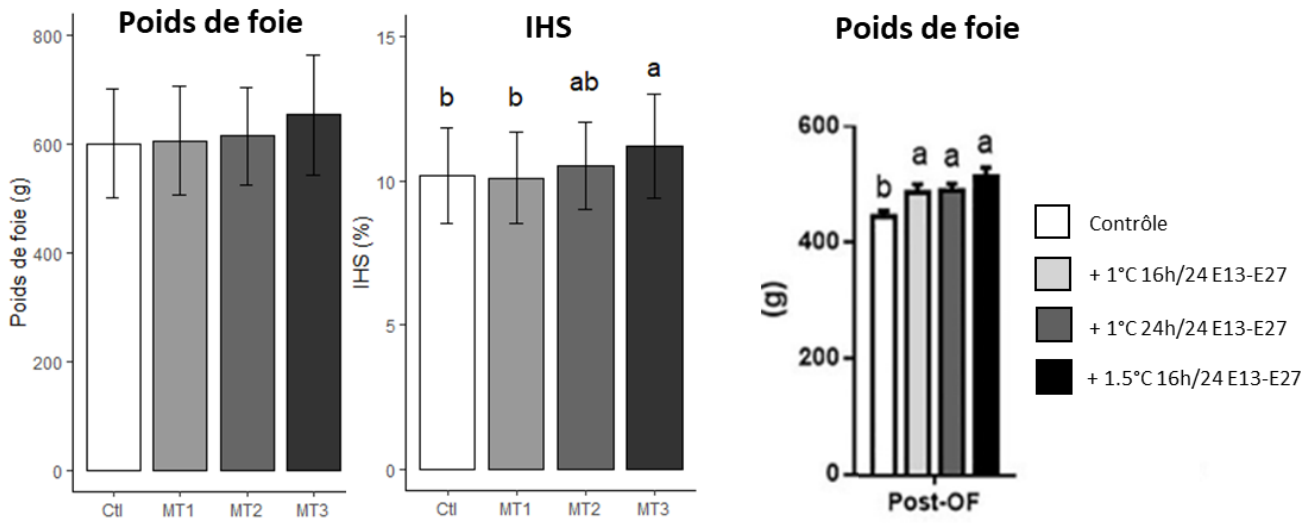


Figure 4.3. Comparaison des poids de foie entre les deux articles de manipulation thermique

Les données de poids de foie et d'indice hépato somatiques des manipulations thermiques testées dans notre étude (MT1 + 1°C 16h/24 E13-E27, MT2 + 1,5°C 16h/24 E11-E21, MT3 + 1,7°C 16h/24 E11-E21) sont représentées ci-dessus. Les résultats des poids de foie sont comparés avec les conditions en commun avec l'article de *Massimino et al. (2019),* c'est-à-dire la condition contrôle et + 1°C 16h/24 E13-E27.
IHS Indice Hépato-Somatique

	Fertilité des œufs (%)	Mortalité précoce (%)	Mortalité en milieu de développement (%)	Mortalité tardive (%)	Eclosabilité (%)
Contrôle	79,9[a]	6,2[a]	10,0[a]	3,2	78,8[a]
+ 1°C 16h/24 E13-E27	85,2[b]	2,8[b]	8,7[a]	3,0	84,2[a]
+ 1.5°C 16h/24 E11-E21	84,6[b]	3,7[ab]	20,2[b]	3,7	67,3[b]
+ 1.7°C 16h/24 E11-E21	84,4[b]	3,4[b]	15,2[c]	3,1	76,3[a]

Tableau 4.1. Les résultats d'incubation du groupe contrôle et des trois groupes programmés

La fertilité des œufs incubés, les trois mortalités embryonnaires et l'éclosabilité sont représentés dans le tableau ci-dessus.
[a,b] Dans une même colonne, des valeurs moyennes sans lettre en commun sont significativement différentes (P value < 0,05)

4. Résultats non publiés et présentés précédemment

Quatre conditions d'incubation ont été testées mais seules deux ont été conservées pour le précédent papier, puisque seule la manipulation thermique +1,7°C 16h24 E11-E21 a engendré une hausse significative du poids de foie après la période de gavage. Effectivement, quand une Anova une voie est appliquée sur les quatre groupes, par exemple pour le poids de foie, un effet condition d'incubation est mis en avant (p-value 0,038) mais le groupe MT3 ne sort pas en post-hoc (p-value 0,089). Si l'on se concentre sur l'indice hépato-somatique (IHS), cette fois-ci, le post-hoc permet de mettre en avant une différence significative entre le groupe MT3 et contrôle (p-value 0,023). Par contre, la thèse précédente a pu montrer pour les trois manipulations thermiques une hausse significative du poids de foie, nous pouvons nous demander pourquoi, même pour la condition reproduite (MT1), peu de différences sont observées.

En utilisant le même type génétique, les mêmes conditions d'élevage et la même courbe de gavage que la thèse précédente, la manipulation thermique +1°C 16h/24 E13-E27 et le groupe contrôle donnent après la période de gavage des foies plus lourds que dans la précédente thèse, avec un gain de plus de 100 g (**Figure 4.3**). L'observation de poids de foie plus élevés pour le groupe contrôle et le groupe repris par rapport à l'ancienne thèse nous confirme que reproduire un essai n'est pas toujours évident et que des variations individuelles existent. **Les canards élevés dans notre essai, présentaient possiblement des potentiels de performance plus élevés que ceux utilisés dans la précédente thèse**. Même si nous avons utilisé le même type génétique, les reproducteurs évoluent et ne sont pas les mêmes. Malheureusement, il n'a pas été possible de récupérer des données de production du fournisseur Grimaud Frères (poids de foie et taux de fonte avec le minimum, la moyenne et le maximum pour la descendance), pour pouvoir valider ou non cette hypothèse.

De plus, au cours de notre essai, nos canards ont dû être élevés en isolement total à cause de l'influenza aviaire (2020). La claustration totale des animaux a engendré une hausse de la densité des animaux par loge mais également une certaine dégradation de la qualité de vie des canards (ex : hausse des taux poussières présentes dans le bâtiment, moins d'activité physique). Des premières études ont pu montrer que la claustration totale des canards pouvait diminuer leur performance (Bernadet, 2018). **Il est donc légitime de se demander si la non-observation d'impact de la manipulation thermique sur le poids du foie gras ne serait pas liée à ces conditions exceptionnelles d'élevage, qui diminuerait leurs performances et donc éloignerait les canards de leurs potentiels de performances. Finalement, est ce que la claustration des animaux ne pourrait pas empêcher la révélation de la programmation thermique chez certains animaux**. Il serait intéressant de réaliser une étude similaire comparant un groupe contrôle et un groupe programmé pour lesquels les modalités d'élevage changeraient entre un accès à l'extérieur ou bien une claustration totale. Cette étude pourrait nous montrer si oui ou non, une claustration peut être source de non révélation d'une programmation embryonnaire.

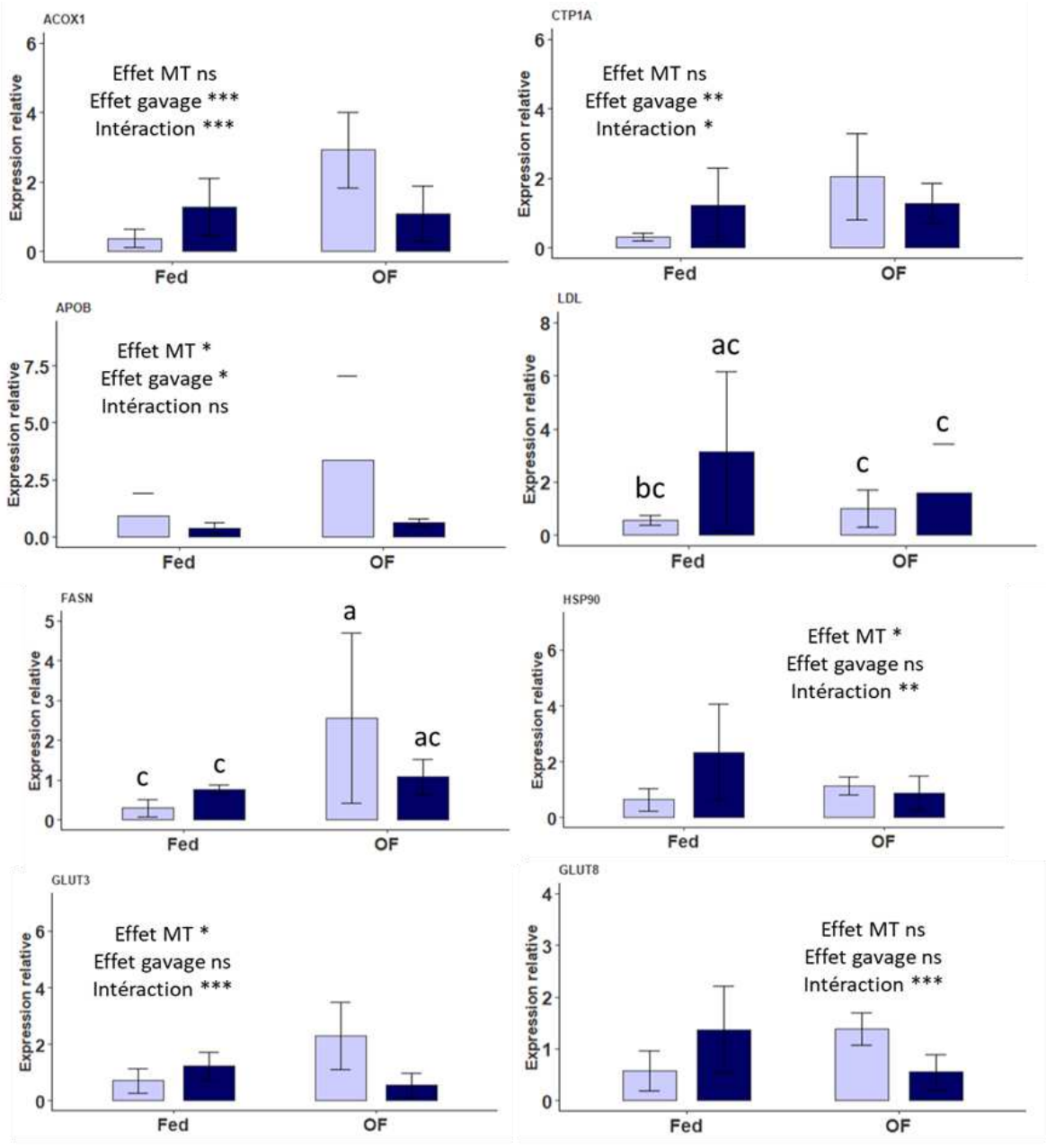


Figure 4.4. Expressions relatives de huit gènes passés dans le muscle pectoral chez les canards gavés (Clara Lebreton)

Les expressions relatives de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides (*ACOX1, CPT1A, APOB, LDL* et *FASN*), dans le métabolisme des glucides (*GLUT3* et *GLUT8*) ou lié aux réponses au stress (*HSP90AA1*) ont pu être étudiées dans le muscle pectoral des canards gavés pour le groupe contrôle et le groupe programmé. Des Anovas deux voies ont été réalisées si toutes les conditions étaient respectées, sinon des tests une voie ont été appliqués pour comparer deux conditions entre elles (*LDL*, *FASN*). Les histogrammes qui ne présentant pas de lettre en commun avec les autres diffèrent significativement (P value < 0,05).

La période d'incubation peut également être questionnée par rapport à son impact sur la performance des animaux après le gavage. Effectivement, avant même les différents changements de température d'incubation des trois groupes concernés, des différences significatives sont relevées entre les quatre groupes pour la fertilité des œufs et la mortalité précoce (**Tableau 4.1**). Le groupe contrôle présentait une fertilité des œufs significativement inférieure et une mortalité précoce significativement supérieure aux trois autres groupes. Les œufs ont été répartis aléatoirement après leur réception dans les quatre incubateurs reproduisant quatre groupes homogènes. Cependant, après 7 jours d'incubation (E7) dans les mêmes conditions, le premier mirage révèle des différences significatives. Nous avons donc analysé plus précisément les relevés de température et d'humidité relative de chacun des incubateurs pour identifier un épisode critique qui serait survenu. Cependant, aucun épisode critique précoce n'a encore pu être mis en évidence sur ces 7 premiers jours au niveau de la température ou de l'humidité relative. Il n'est pas exclu qu'un autre paramètre d'incubation pourrait être à la source de l'épisode critique précoce comme les niveaux de gaz.

Lors de notre comparaison entre les canards gavés et maigres, il ne faut pas oublier que nous réalisons une comparaison entre deux animaux alimentés avec deux aliments différents, les canards rationnés ont reçu l'aliment de croissance et les animaux gavés la poudre de gavage. En plus de leurs différences de compositions (aliment de gavage plus pauvre en protéines brutes et plus riche en lipides et amidon), les animaux ne consomment pas les mêmes quantités (230 g/j/canard contre 400 g/j/canard) ce qui peut biaiser nos résultats et nos interprétations. Un contrôle plus juste serait d'utiliser un nouvel aliment de composition plus proche de la poudre à gavage et très appétant.

Les analyses de cette étude sont centrées sur l'organe principal de la stéatose hépatique : le foie. Or, lorsque des prélèvements de foie ont eu lieu, des prélèvements de muscle pectoral et de gras abdominal sont également effectués et stockés à -80°C. Le groupe MT3 (+1,7°C 16h/24 E11-E21) présentait un poids de foie significativement plus gros que le groupe contrôle dans notre étude, mais aucune différence de poids au niveau des autres organes n'a pu être observée. Dans l'étude de *Massimino et al., (2019)*, une différence significative de poids de gras abdominal a pu être observée, pour les trois groupes programmés, et chez les volailles la manipulation thermique augmente la production de muscle (T Loyau et al., 2013; Piestun et al., 2013, 2011). Suite à ces observations, Clara Lebreton (stagiaire de M1, 2021, **Annexe 6**) a pu s'intéresser au potentiel impact moléculaire de la manipulation thermique sur le muscle pectoral du canard mulard programmé (+ 1,7°C 16h/24 E11-E21). Une dizaine de gènes a pu être étudiée montrant des réponses métaboliques différentes entre les canards contrôles et ceux programmés. Effectivement, la manipulation thermique augmente significativement les expressions relatives de *LDL* et diminue significativement celles de *ACOX1, APOB* et *GLUT3* dans le muscle, chez les animaux programmés et gavés (**Figure 4.4**). Des impacts du gavage ont également pu être observés, en accord avec la bibliographie dans le muscle, comme *FABP4* ou *FASN* qui augmentent significativement avec le gavage (Tavernier et al., 2016). De plus, les gènes impliqués dans le métabolisme du glucose ne semblent pas être très exprimés au sein du tissu musculaire, avec les gènes *HK1*, *HK2*, *G6PDH*, *GLUT1*, *GLUT2* qui ne sortent pas en qPCR. Seuls *GLUT3* et *GLUT8* montrent des effectifs suffisants pour calculer leurs expressions relatives. *A contrario*, il a pu être montré que le métabolisme lipidique semblait actif dans le muscle avec *VLDL*, *LDL*, *APOB*, *FABP4*, *CPT1*, *FASN*, *ACAD11, ACOX*, ou encore *MTTP*. **Ces premiers résultats confirment que le muscle pectoral est également impacté par la manipulation thermique, et ouvrent de nombreuses questions vis-à-vis du métabolisme des glucides.**

CHAPITRE 5 : Impact de la manipulation thermique sur l'expression des gènes du métabolisme hépatique chez l'embryon

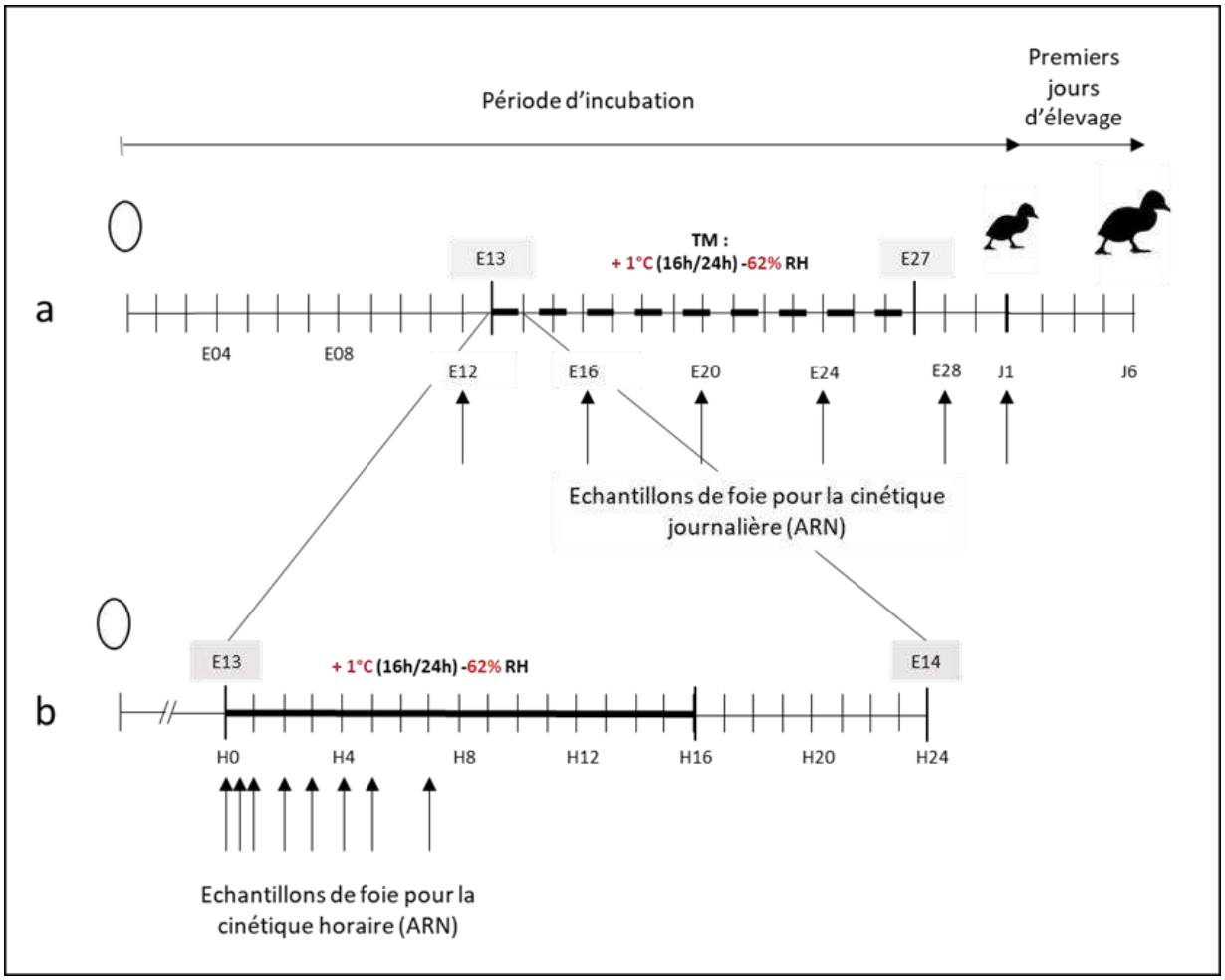


Figure 5.1. Protocole expérimental des deux cinétiques (horaire et journalière)

Deux conditions sont étudiées au cours des deux cinétiques, une condition contrôle (Ctl, 37,6°C et 65 % HR) et une condition MT (+1°C 16h/24, E13-E27, 62 % HR). Au cours de la cinétique journalière (A), 7 prélèvements de foie sont effectués à partir de E12 jusque D6, et la cinétique horaire (B) comprend 8 points de prélèvement de foie avant le changement de température (0) et jusqu'à 7h après le changement de température (7h).

E jour embryonnaire, J jour de vie post-éclosion, H heure

1. Objectifs

La première thèse au laboratoire sur la manipulation thermique embryonnaire chez le canard mulard a montré que des signes de programmation thermique pouvaient être identifiés, à court (poids corporel, température de surface, métabolisme hépatique à la naissance) comme à long terme (poids du foie et du gras abdominal, métabolisme hépatique pendant la période de gavage) (Massimino et al., 2021, 2019).

Dans cette partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés aux impacts moléculaires hépatiques de la manipulation thermique, à court terme, pendant la phase embryonnaire où a lieu le changement de température. Nous nous sommes concentrés sur l'unique condition de programmation ayant mené (à ce moment-là de la thèse) à une amélioration de la production de foie gras sans impact négatif sur l'éclosabilité ou la qualité de produit final, à savoir une augmentation de température de 1°C, 16h/24h du 13ème jour embryonnaire au 27ème jour embryonnaire (Massimino et al., 2019) **Pour cela, nous avons mis en place deux cinétiques de prélèvement complémentaires, une cinétique horaire et une cinétique journalière.** Les deux essais sont représentés sur la **Figure 2.1.**

2. Mise en place des deux cinétiques

La cinétique horaire correspond à 8 prélèvements effectués autour du début de changement de température d'incubation. Au début de l'incubation, 500 œufs (génotype H85, Grimaud Frères Sélection, Roussay France) sont répartis de façon aléatoire dans quatre incubateurs (modèle SOLOGNE de LA NATIONALE, modèle reconditionné). La condition contrôle et la condition MT (+ 1°C à partir de E13) sont réalisées en duplicat, pour alterner l'incubateur de prélèvement. Les œufs sont humidifiés quotidiennement à heure fixe à partir du 8ème jour embryonnaire. Le 13ème jour d'incubation (E13), un peu avant 8h du matin, 15 œufs sont pris aléatoirement dans les incubateurs n°1 (Contrôle) et n°2 (MT). Les foies des embryons sont prélevés, congelés et stockés à -80°C. A 8h, les conditions d'incubations sont changées dans les incubateurs MT (n°2 et n°4), avec une augmentation de 1°C et une HR proche de 63 % (aidé par l'humidification des œufs). Dès que les incubateurs MT atteignent les conditions visées, le chronomètre est déclenché et 15 prélèvements de foie ont lieu aléatoirement (dans les incubateurs n°3 et n°4) à 30 min, 2h, 4h et 7h, et aléatoirement (dans les incubateurs n°1 et n°2) à 1h, 3h et 5h. L'essai prend fin après le dernier prélèvement, 7h après le changement de condition d'incubation.

La cinétique journalière correspond à 7 prélèvements effectués autour de la période de changement de température d'incubation. Un total de 750 œufs est disposé aléatoirement dans chacun des incubateurs (modèle SOLOGNE de LA NATIONALE, modèle reconditionné). Le groupe contrôle est maintenu à 37,6°C avec une HR proche de 60 % sur toute la durée de l'incubation (E0 à E28). *A contrario*, le groupe MT présente une hausse de la température d'incubation de +1°C (38,6°C) avec une HR moyenne de 63,6 % à partir de E13 jusque E27, 16h/24. Une rotation automatique des œufs (90°), toute les 3h, est effectuée et une humidification manuelle des œufs est faite quotidiennement avant les changements de condition d'incubation (16h). La température et l'humidité relative sont contrôlées via deux sondes indépendantes (LoRa® SPY U) dans chacun des incubateurs. Les deux principaux paramètres sont ainsi mesurés toutes les 15 minutes.

Lipides		Carbohydrate		Voies des hormones thyroïdiennes	Stress
Synthèse	ACAT1	oxydation	CREB2 ATF4	ALB	CYP2C
	ACC		ENO1	DIO1	DNAJA2-HSP40
	ACLY		GAPDH	DIO3	DNAJB12-HSP40
	ACSL1		HK1	JMJD1C	HSBP1
	ACSS		HK2	NCOR	HSF1
	CEPT1		PDHA1	SLC16A10	HSF2
	DGAT2	transport	GLUT1	THRB	HSF3
	ELOVL6		GLUT2	USP16	Hsp10
	FASN		GLUT3	**Autophagie**	Hsp60
	GPAT1		InsR		HSP90AA1
	ME	**Acteurs de l'épigénétique**			HSPA2- HSP70
	SCD1			AMBRA1	HSPA5-HSP70
Oxydation	ACAA2			ATG3	PSMD12
	ACAD11	DNMT3A		ATG4B	ST13
	ACOX1	ELP3		ATG7	TIA1
	ALDH3A2	EZH2		BNIP3	**Prolifération cellulaire**
	ALDH7A1	HDAC1		WIPI1- ATG18	
	CPT1	RBBP4		**Inflammation**	
	LIPC	SETDB1			FGFR2
	PLIN2	SIRT1			HGF
transport	APOB	TET1		Il18	HNF4
	LDLR	TET2			POL2RC
	VLDLR	TYMS			TGFb1
Regulateurs	ChREBP				TUBa1C
	LXRA				
	PPARA				

Tableau 5.1. Liste des gènes utilisés pour les analyses statistiques au cours des deux cinétiques embryonnaires

Deux mirages sont réalisés au cours de l'incubation des œufs dans le but d'identifier et d'estimer les mortalités embryonnaires ainsi que la proportion d'œufs non fertiles. Le premier mirage a lieu au 7ème jour embryonnaire (E7), avant les changements de température, et le second au 28ème jour embryonnaire (E28). Les œufs non fertiles ou morts sont retirés de l'incubateur et les œufs restants sont rapprochés dans le but de limiter les perturbations de température. A E28, tous les groupes sont regroupés dans l'éclosoir (modèle BRETAGNE de LA NATIONAL, modèle reconditionné) à 37,3°C et 80 % d'HR. Pendant quatre jours, les naissances sont enregistrées une fois par jour.
Les canetons mâles nés le jour du pic d'éclosion (jour où le plus de canetons sont nés) sont mis en élevage dans but de relever leurs poids corporels, leurs températures internes et de prélever des échantillons de foie en début d'élevage.

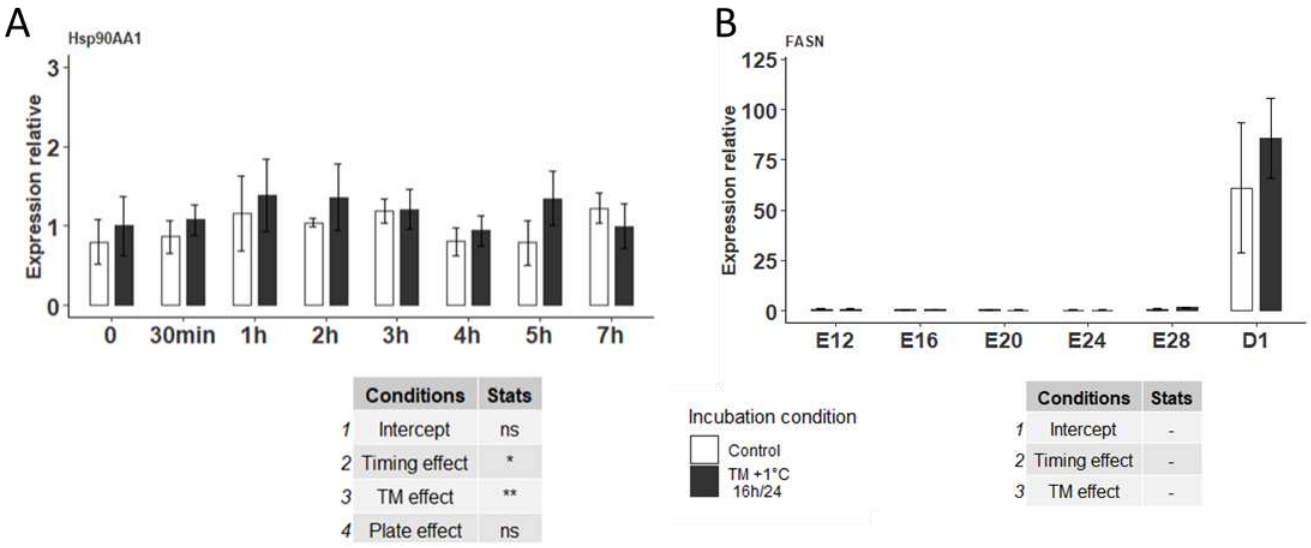
Tous les quatre jours à partir de E12, 15 échantillons de foie ont été prélevés sur les embryons de chacun des incubateurs, soit cinq points de prélèvement (E12, E16, E20, E24, E28). Des prélèvements sont également réalisés le jour de l'éclosion (E30) et six jours après d'élevage (J6). Les échantillons de foie sont directement congelés et stockés à -80°C.

3. Données moléculaires : gènes et méthodes d'analyses

Pour les deux cinétiques, nous nous intéressons aux expressions relatives des gènes hépatiques dits d'intérêt. Des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et le métabolisme glucidique du foie sont regardés en priorité puis complétés (**Tableau 5.1**) par des gènes liés au stress, à la thyroïde, à l'épigénétique, la prolifération cellulaire, l'inflammation…Dans le but d'étudier un maximum de ces gènes pour les différents points des deux cinétiques, l'amplification a été réalisée par le biais d'un Fluidigm. Pour chacune des cinétiques, quatre gènes de référence ont été identifiés, avec *ActB*, Luciférase, *STAB1* et *HPRT* pour la cinétique horaire et *HPRT1*, Luciférase, *STAB1* et *USP9X* pour la cinétique journalière. Les calculs d'expressions relatives, les analyses statistiques et leurs représentations graphiques ont été réalisés via R (**Chp 2**).
La cinétique horaire se compose de sept points : 0, 30min, 1h, 2h, 4h, 5h et 7h suivant la hausse + 1°C de la température d'incubation. En sortie de Fluidigm, 78 gènes sur 95 ont pu être conservés pour l'analyse des résultats. Les autres gènes ne sont pas sortis ou bien leur effectif au sein d'un groupe était inférieur à six. Dans un premier temps, l'ensemble des données a été conservé pour évaluer l'impact des différentes variables décrites dans le modèle linéaire suivant :

$$Yi = Xi + Groupe + Incubateur + Plaque + Timing$$

Nous avons pour chacun des gènes et individu (i), une valeur d'expression relative (Y) se décomposant selon sa valeur individuelle (Xi) à laquelle des corrections sont ajoutées. Par exemple, l'étude se base sur la comparaison de deux groupes, un groupe contrôle et un groupe programmé (Effet Groupe). Cependant d'autres effets sont à prendre en compte comme celui d'avoir réalisé les prélèvements dans deux incubateurs différents (Effet Incubateur), déposé les échantillons sur différentes plaque qPCR pour réaliser le Fluidigm (Effet plaque) et que nous avons sept points distincts de prélèvement à comparer (0, 30min, 1h, 2h, 4h, 5h, 7h), appelé Effet Timing.



	Conditions	Stats
1	Intercept	ns
2	Timing effect	*
3	TM effect	**
4	Plate effect	ns

	Conditions	Stats
1	Intercept	-
2	Timing effect	-
3	TM effect	-

Figure 5.2. Exemples de cinétique horaire pour la HSP90AA1 et journalière pour la FASN

L'expression relative du gène HSP90AA1 (A) est suivie jusqu'à 7h après le changement de température d'incubation (+1°C) pour le groupe contrôle et le groupe MT. Les effets plaques, timing et MT sont pris en compte dans le modèle statistique.

L'expression relative du gène FASN (B) est suivie jusqu'à l 'éclosion après le changement de température d'incubation (+ 1°C de E13 à E27) pour le groupe contrôle et le groupe MT. Les effets timing et MT sont pris en compte dans le modèle statistique. Pour *FASN* l'Anova n'est pas applicable à cause de la non homogénéité des données à cause des résultats de l'éclosion (D1).

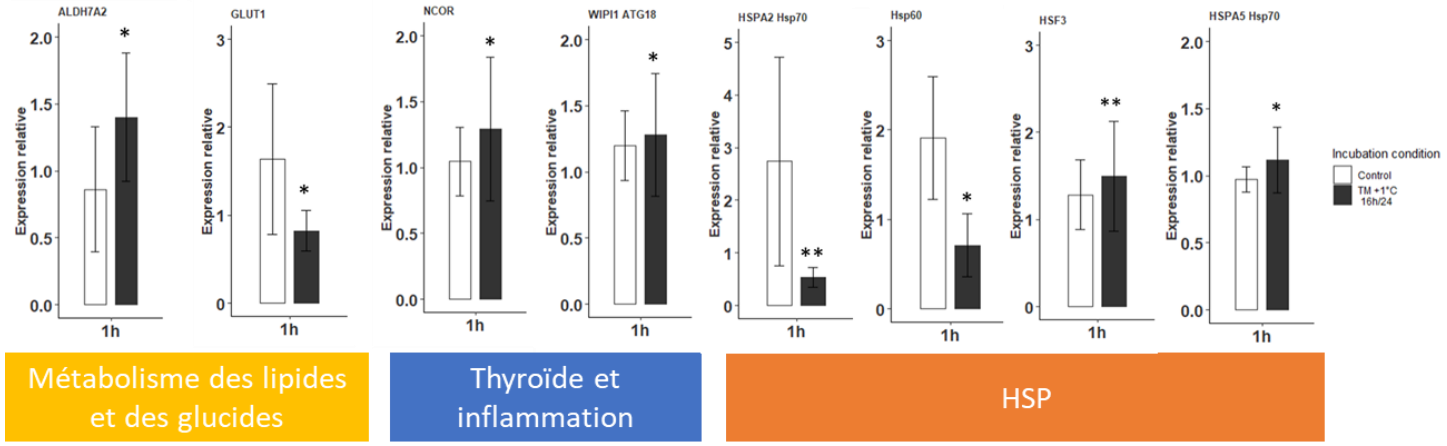


Figure 5.3. Impacts moléculaires 1h après la hausse de température au 13ème jour embryonnaire (E13)

Les gènes significativement impactés par la hausse de température sont représentés ci-dessus. Des tests paramétriques une voie ont été réalisés si toutes les conditions étaient respectées, sinon un test non paramétrique est utilisé. La moyenne ± l'erreur standard a été représentée pour chacun des gènes, avec des effectifs compris entre 6 et 8 échantillons.

* Pvalue < 0,05, ** Pvalue < 0,01, *** Pvalue < 0,001

Parmi les 78 gènes analysés, l'analyse statistique comprenant tous les points de la cinétique ne fait ressortir que le gène *HSP90AA1*, qui est significativement impacté par l'augmentation de température (**Figure 5.2A**). En général, le groupe programmé présente une expression relative de *HSP90AA1* plus importante que celle du groupe contrôle. La cinétique d'expression relative de ce gène montre des variations d'expressions entre le groupe contrôle et le groupe programmé (MT), jusqu'à 7h après la hausse de température, en plus de l'effet timing observable entre tous les points de prélèvement. Nous pouvons voir sur cet exemple, que les nombreuses variations au cours du temps peuvent atténuer les autres effets, et notamment celui qui nous intéresse : l'effet manipulation thermique (MT). **Après avoir analysé l'ensemble des points de prélèvement, nous avons décidé de nous focaliser sur un seul point de la cinétique heure, celui correspondant au prélèvement effectué 1h après la hausse de température pour observer l'impact direct de cette dernière**.

De même pour la cinétique journalière, un modèle linéaire a dans un premier temps été appliqué à toutes les données, soit aux 80 gènes restant après le Fluidigm pour les sept points de prélèvements. Les premières analyses, incluant tous les points de E12 à l'éclosion, nous donnaient des impacts significatifs de la manipulation thermique uniquement pour 3 gènes (*DGAT2*, *GAPDH* et *ELP3*). Cependant ces analyses ont mis en évidence de gros écarts d'expression pour le point éclosion (J1) comparé à tous les autres points, ce qui biaisait les statistiques et écrasait le reste des données (**figure 5.2B**). Après avoir retiré ce point de la cinétique journalière, **nous avons également décidé de ne garder que les points concernant la période d'application du stimulus thermique. Nous nous sommes donc concentrés sur trois points de la cinétique journalière (E16, E20 et E24).**

L'impact post-manipulation thermique, donc la potentielle programmation des animaux à court terme, a été évaluée à l'éclosion de façon séparée (J1).

4. Résultats des impacts directs, cumulés et à l'éclosion de la manipulation thermique

L'impact moléculaire direct de la manipulation thermique, 1h après le début de changement de température

Une heure (1h) après que l'incubateur programmé ait atteint la température visée, des prélèvements de foie ont été faits dans les deux incubateurs (contrôle et MT). Sur les 78 gènes mesurés, 8 gènes montrent un impact direct de la manipulation thermique sur leurs expressions relatives. Trois gènes impliqués dans la synthèse des lipides (*ALDH7A2*), les voies thyroïdiennes (*NCOR*) et l'inflammation (*WIPI1-ATG18*) sont significativement surexprimés par la manipulation thermique (**Figures 5.3**). L'expression relative du transporteur du glucose (*GLUT1*) est quant à elle significativement diminuée par la manipulation thermique par rapport au groupe contrôle. Tous les autres gènes impactés par la manipulation thermique sont identifiés comme étant des *heat shock proteins* (HSPs) soit des gènes qui répondent à des stress thermiques. Deux des HSPs (*HSPA2* et *HSP60*) sont sous-exprimées et les deux autres (*HSF3* et *HSPA5*) sont surexprimées par la manipulation thermique par rapport au groupe contrôle (**Figure 5.3**).

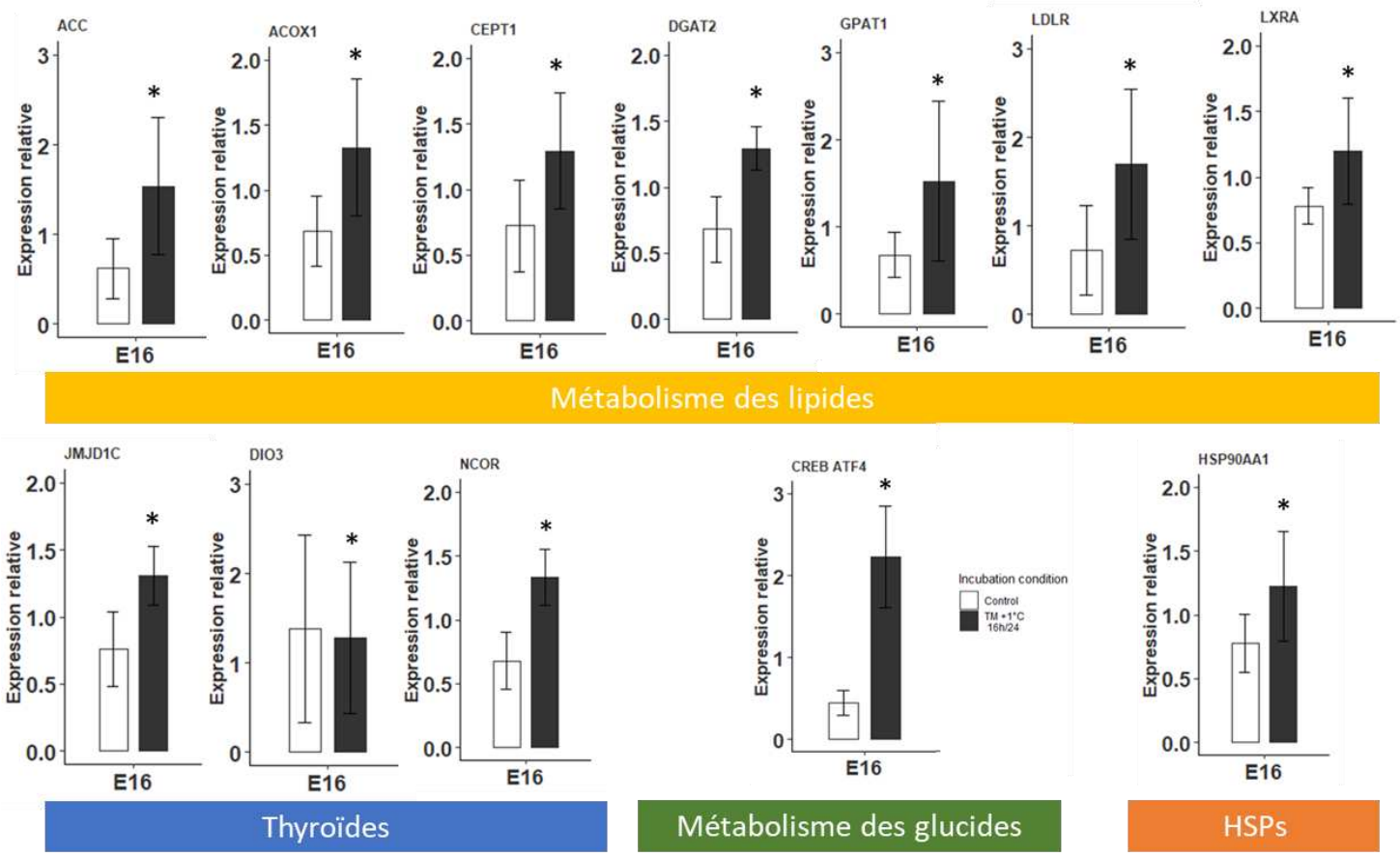


Figure 5.4. Impacts moléculaires de la hausse de température au 16ème jour embryonnaire (E16)

Les expressions relatives des gènes sont représentées pour le groupe contrôle et MT au stade E16.
Des tests de student ont été réalisés à E16 pour comparer les deux groupes si toutes les conditions étaient rassemblées, sinon un test non-paramétrique a été appliqué. La moyenne ± l'erreur standard a été représentée pour chacun des gènes, avec des effectifs compris entre 6 et 8 échantillons.
* Pvalue < 0,05, ** Pvalue < 0,01 et *** Pvalue < 0,001

L'impact moléculaire de la manipulation thermique cumulée sur plusieurs jours E16, E20 et E24

Concernant l'étude de la **cinétique journalière (E16, E20, E24)**, 21 gènes sur les 80 gènes passés en Fluidigm montrent un effet significatif de la hausse de température sur au moins un des trois jours embryonnaires. Pour faciliter l'analyse, les différentes expressions relatives ont été représentées de manière séparée pour chacun des stades embryonnaires.

Au 16ème jour embryonnaire (E16), 12 gènes sont significativement impactés par la manipulation thermique avec des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique, les voies thyroïdiennes et les HSPs (**Figure 5.4**). La majorité de ces gènes est significativement surexprimée dans le groupe MT par rapport au groupe contrôle. D'autres gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, les voies thyroïdiennes et les HSPs sont significativement surexprimés suite à la hausse de température d'incubation (**Figure 5.5**).

Au 20ème jour embryonnaire, les expressions relatives des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et de l'autophagie sont également significativement augmentées. Deux gènes impliqués dans l'épigénétique (*ELP3, TYMS*) montrent un impact significatif de la manipulation thermique, avec une diminution de l'expression relative de *ELP3* dans le groupe programmé (p value < 0.001) et une augmentation de l'expression relative de *TYMS* dans le groupe programmé.

Les mêmes familles de gènes (métabolisme lipidique, HSPs, épigénétique et inflammation) continuent d'être touchées au 24ème jour embryonnaire, avec des variations vis-à-vis des gènes concernés (**Figure 5.6**).

Parmi ces gènes modulés par la manipulation thermique, *ACOX1* et *HSP90AA1* présentent des effets de la manipulation thermique forts et persistants au cours des trois jours embryonnaires étudiés.

Résultats à l'éclosion : étude de l'impact à court terme de la MT embryonnaire

Aucune différence significative n'a été observée entre les deux conditions d'incubation que ce soit pour la mortalité en milieu de développement, la mortalité tardive, l'éclosabilité ou encore la proportion de mâles nés, avec des moyennes respectives de 9,4, 3,1, 81,5 et 55,2 % (**Tableau 5.2**). Cependant, les canetons programmés présentent un poids corporel significativement plus faible (48,8 g contre 50,2 g) et une température interne plus faible (39,9°C contre 40,1°C) par rapport au groupe contrôle.

L'éclosion est la première épreuve dans la vie des canetons avec la sortie de l'œuf et le premier repas. Sur les 80 gènes étudiés, 8 gènes présentent des réponses transcriptionnelles différentes entre le groupe programmé et le groupe contrôle à la naissance (**Figure 5.7**). A l'éclosion, les canetons programmés présentent une sous-expression des HSPs (*HSBP1*, *HSP90AA1* et *HSPA2*) et d'un gène impliqué dans les voies thyroïdienne (*DIO3*) et une surexpression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides (*GPAT1* et *DGAT2*) et d'un gène impliqué dans la réponse à l'inflammation (*IL18*).

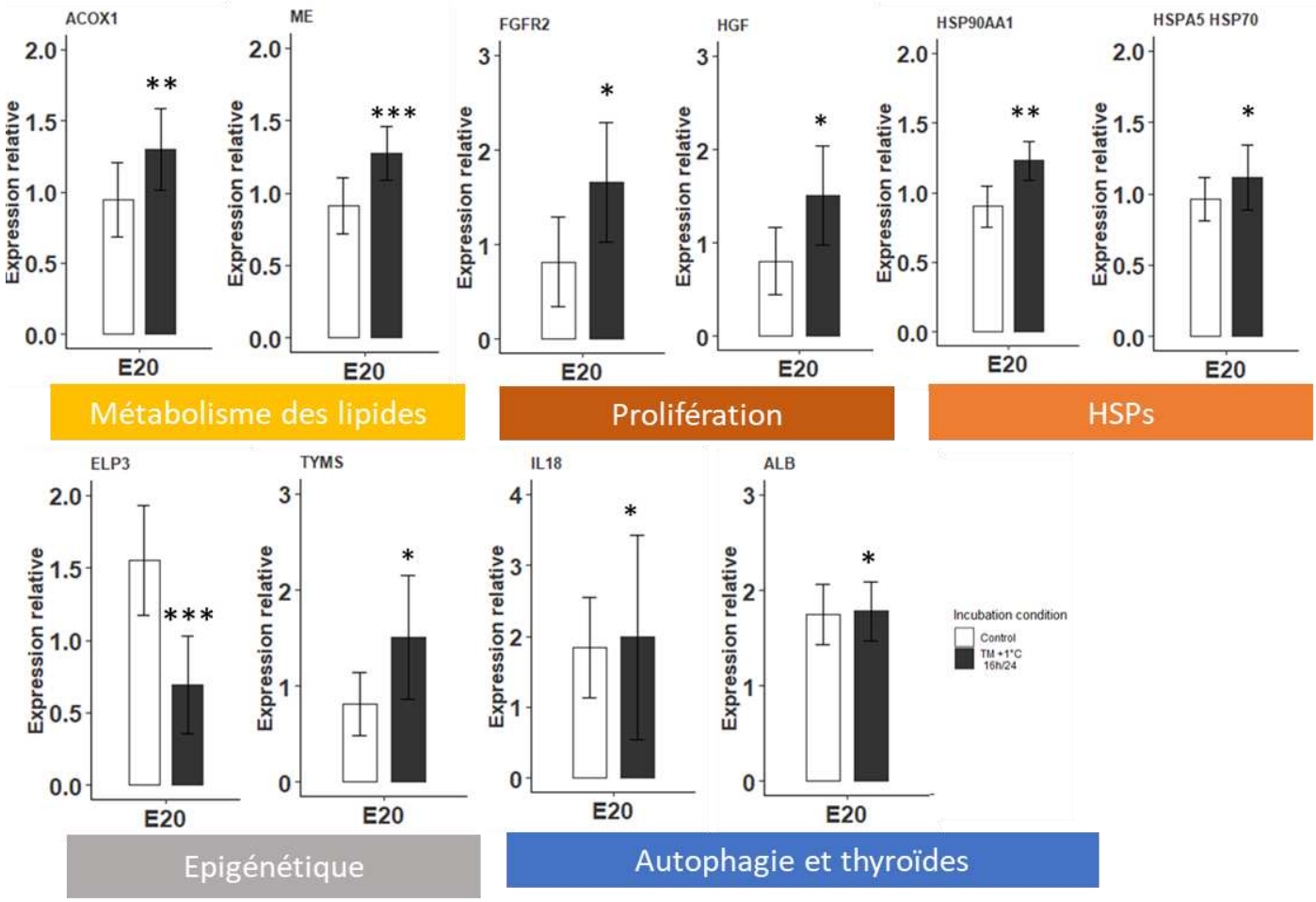


Figure 5.5. Impacts moléculaires de la hausse de température au 20ème jour embryonnaire (E20)

Les expressions relatives des gènes sont représentées pour le groupe contrôle et MT au stade E20.

Des tests de student ont été réalisés à E20 pour comparer les deux groupes si toutes les conditions étaient rassemblées, sinon un test non-paramétrique a été appliqué. La moyenne ± l'erreur standard a été représentée pour chacun des gènes, avec des effectifs compris entre 6 et 8 échantillons.

* Pvalue < 0,05, ** Pvalue < 0,01 et *** Pvalue < 0,001

5. Discussion des résultats

Les impacts directs et cumulatifs de la MT n'impliquent pas uniquement les gènes HSPs

Les gènes HSPs, des marqueurs de la réception et de l'enregistrement du stress thermique

Dans l'heure suivant la hausse de température, nous observons une réponse directe de quatre gènes codant des *heat shock protein* (HSPs). Les HSPs sont des marqueurs de la réponse au stress thermique (Rivera et al., 2005; Xie et al., 2014), mais également d'autres types de stress, et notamment les *HSP70* qui protègent des effets délétères du stress oxydatif (Favatier et al., 1997). Les deux isoformes de *HSP70* (*HSPA2* et *HSPA5*) sont significativement impactées 1h après la MT, avec une surexpression de *HSPA2* (P value 0,007) et une sous expression de *HSPA5* (P value 0,01). De nombreuses études ont suivi la réponse de la *HSP70* au cours de stress thermique chez les volailles, cependant ces études ne spécifient pas spécialement l'isoforme étudiée. Cette information explique peut-être les contradictions qui ont pu être observées, avec parfois des baisses d'expression induites par un stress thermique (Ncho et al., 2022; Rajkumar et al., 2015; Q. Zhang et al., 2020) et parfois une hausse d'expression après ce même stress (Mohammad Borhan Al-Zghoul et al., 2019; Lan et al., 2016). Toutefois, les rares études précisant l'isoforme regardé ont montré qu'un stress thermique augmentait significativement l'expression du gène *HSPA2,* 3h mais aussi quelques jours après la MT (Lan et al., 2016; Massimino et al., 2021), alors que nous observons sa sous-expression 1h après la manipulation thermique dans notre essai. Cette HSPA2 continue d'être sous-exprimée à E20 et E24. **Finalement, *HSP70* semble donc être une des HSPs clefs de la réponse au stress thermique.**

L'expression relative de la *HSP60* est significativement diminuée dans l'heure suivant la hausse de température d'incubation et n'est pas impactée pendant la cinétique journalière. Cette dernière était significativement surexprimée chez les poulets trois jours après la manipulation thermique embryonnaire (17ème jour embryonnaire) (Vinoth et al., 2015), ce que nous n'avons pas observé chez le canard mulard. L'enregistrement du stimulus concerne potentiellement les régions codantes des gènes avec insertion de marques épigénétiques, et les modifications d'activités transcriptionnelles seraient le reflet de ces marques. Les réponses transcriptionnelles des HSPs sont en réalité régulées par des facteurs de transcription spécifiques aux HSPs, appelé *heat shock factor* (HSF) qui permettent d'initier la transcription en réponse au stress thermique (Nakai & Morimoto, 1993; Ogawa et al., 1997). Par exemple, la transcription de *HSP70* est stimulée par le facteur de transcription *HSF1* (Alagar Boopathy et al., 2022). Nous observons un impact de la manipulation thermique sur *HSF1* mais uniquement à E24, cependant *HSF3* est significativement surexprimé 1h après la hausse de température. Ces facteurs de transcription sont surexprimés pouvant expliquer les hausses d'expressions relatives de certaines HSPs. L'expression relative de *HSP90AA1* est significativement augmentée sur deux points de la cinétique journalière (E16 et E20) par rapport au groupe contrôle. Cette HSP est essentiellement impliquée dans l'organisation des molécules chaperonnes lorsque l'organisme doit faire face à un stress thermique (Flees et al., 2017).

Les gènes non HSPs sont également des acteurs de la programmation thermique

La manipulation thermique a également impacté directement (1h) et en continu (E16, E20, E24) **l'expression de quelques gènes impliqués dans les voies thyroïdiennes, les voies de l'inflammation, la prolifération cellulaire, les mécanismes de l'épigénétique, ou encore dans les métabolismes lipidique et glucidique**. Chez les volailles, il a pu être observé que les gènes HSPs et certains gènes impliqués dans différents mécanismes, comme celui des lipides, des hormones thyroïdiennes ou de l'inflammation, peuvent répondre en même temps à un stress thermique et rapidement, dans les heures (Emami et al., 2021; Lan et al., 2016) ou les jours suivant le stress (Massimino et al., 2021)

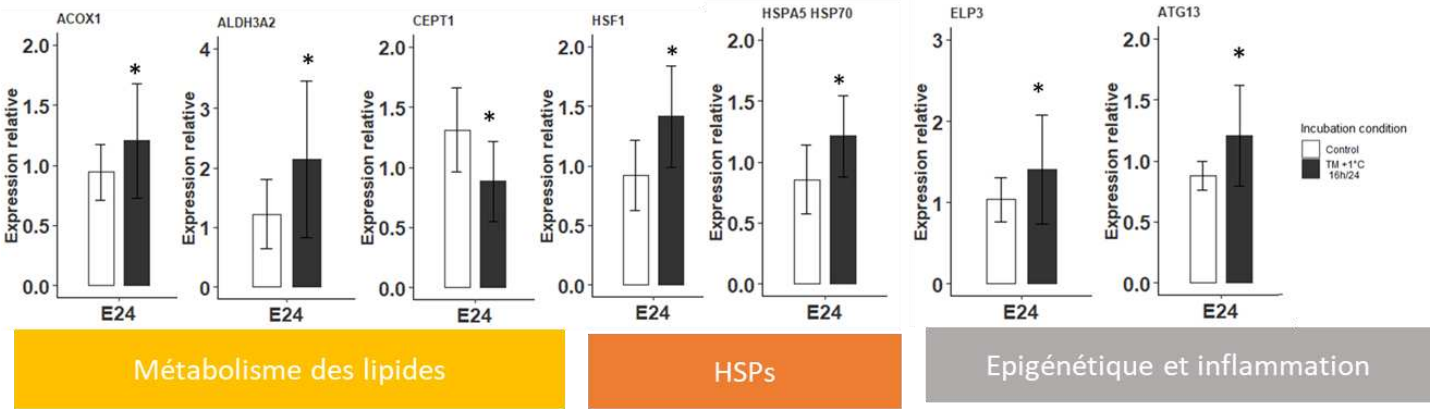


Figure 5.6. Impacts moléculaires de la hausse de température au 24ème jour embryonnaire (E24)

Les expressions relatives des gènes sont représentées pour le groupe contrôle et MT au stade E24.
Des tests de student ont été réalisés à E24 pour comparer les deux groupes si toutes les conditions étaient rassemblées, sinon un test non-paramétrique a été appliqué.
* Pvalue < 0,05, ** Pvalue < 0,01 et *** Pvalue < 0,001

	Mortalité en milieu de développement (%)	Mortalité tardive (%)	Eclosabilité (%)	Proportion de mâle (%)	Poids à l'éclosion (g)	Température interne à l'éclosion (°C)
Contrôle	10,0	3,2	78,8	55,7	$50,2^{a} \pm 4.5$	$40,1^{a} \pm 0.5$
MT	8,7	3,0	84,2	54,7	$48,8^{b} \pm 4.1$	$39,9^{b} \pm 0.4$
Effectifs pour les groupes Contrôle et MT	501 and 554	451 and 506	668 and 669	420 and 435	237 and 255	101 and 98

Tableau 5.2. Mesures zootechniques à l'incubation et à l'éclosion

La mortalité en milieu de développement embryonnaire (E28), la mortalité tardive (E30), l'éclosabilité et la proportion de males nés sont comparés pour les deux conditions d'incubation à l'aide de Chi² tests. Le poids et la température interne à la naissance sont comparés à l'aide d'Anova (suite aux respects des conditions d'application).

Emami et al. (2021) émettent l'hypothèse que l'induction de la *HSP70* pourrait contribuer à la surexpression des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras et l'accumulation des triglycérides, suite à une étude en culture cellulaire de foie qui montre qu'une surexpression de HSP70 favorise la lipogenèse (Jielei Zhang et al., 2018). Cette hypothèse pourrait faire sens à nos résultats, puisque l'impact direct et cumulatif de la manipulation thermique entraine une surexpression de HSP70, de façon concomitante avec une surexpression des gènes de la lipogenèse. D'autre part, il n'est pas étonnant de voir des gènes impliqués dans l'inflammation et voies thyroïdiennes répondre à la manipulation thermique chez les volailles puisque l'inflammation correspond à une réponse à un stress (Adu-Asiamah et al., 2021; Mohammad Borhan Al-Zghoul et al., 2019; Shanmugasundaram et al., 2019) et les hormones thyroïdiennes sont impliquées dans le mécanisme de la thermorégulation (Dayan et al., 2020; Thomas Loyau et al., 2014; Massimino et al., 2021). Finalement, des gènes impliqués dans l'épigénétique sont significativement impactés à E24 (*ELP3* et *TYMS*). Les mécanismes épigénétiques peuvent être responsables de l'enregistrement du stress environnemental subi par les embryons et pourraient expliquer en partie un phénomène de programmation (David et al., 2019; Tarry-Adkins & Ozanne, 2011). L'épigénétique comprends de nombreux mécanismes comme la méthylation de l'ADN ou encore la méthylation des histones, nécessitant l'utilisation des mono carbones (groupe méthyl) (Clare et al., 2019). La synthèse de ces mono carbones implique un grand nombre d'acteur comme le gène *TYMS* (Clare et al., 2019; Coppedè et al., 2019). Le gène *ELP3* fait partie de la famille des histones acétyltransférase (HAT) et catalyse l'addition de fonction acétyl sur les histones, et donc l'activation de la transcription des gènes ciblés (Cai et al., 2022; Winkler et al., 2002). De plus, il a été montré en culture cellulaire qu'une diminution de l'expression du gène *ELP3* entraine la diminution de celle du gène *HSP70* (Q. Han et al., 2007), ce que nous n'observons pas à E20, un stade où la transcription des deux gènes apparaît augmentée. **Les réponses transcriptionnelles des gènes impliqués dans l'épigénétique supportent donc l'idée d'un enregistrement de notre manipulation thermique embryonnaire et pourraient être liées à celles des gènes impliqués dans la réponse au stress thermique.**

Après la manipulation thermique, les conséquences sur l'éclosion

La programmation thermique est confirmée à moyen terme (3 jours après la fin de la MT) à l'éclosion avec des modulations significatives persistantes des expressions relatives de HSPs (*HSBP1*, *HSP90AA1* et *HSPA2*) entre les deux groupes. Ces trois HSPs sont significativement diminuées dans le groupe programmé par rapport au groupe contrôle. Cette baisse d'expression relative de ces HSPs pourrait être liée au fait que les animaux programmés ont bien enregistré le stress thermique embryonnaire ce qui leur permet d'être prêt à répondre à de nouveaux stress comme l'éclosion. Cette hypothèse a déjà pu être mise en avant lorsque les manipulations thermiques ont permis d'améliorer la résistance des volailles de chair au stress thermique pendant leur élevage (T. Loyau et al., 2015; Piestun et al., 2008). Les volailles ayant déjà eu un stress thermique au cours de l'embryogenèse montrent des expressions relatives des HSPs plus faibles que le groupe contrôle et une meilleure tolérance au stress thermique (Ncho et al., 2022; Vinoth et al., 2017, 2015).

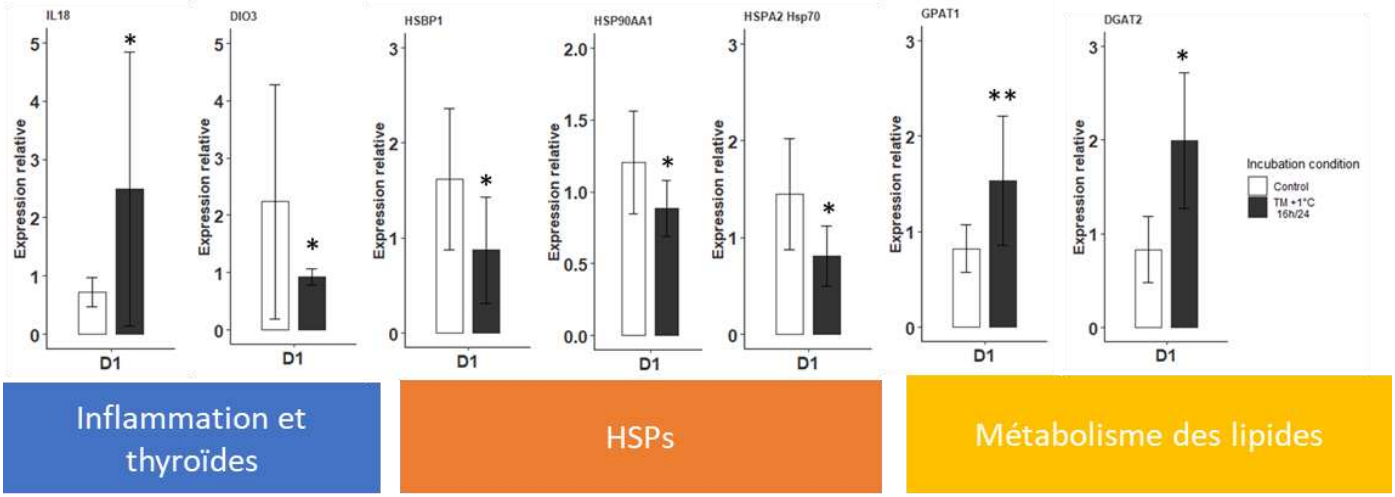


Figure 5.7. Impacts moléculaires de la hausse de température à l'éclosion (D1)

Les expressions relatives des gènes sont représentées pour le groupe contrôle et MT à l'éclosion.

Des tests de student ont été réalisés à l'éclosion pour comparer les deux groupes si toutes les conditions étaient rassemblées, sinon un test non-paramétrique a été appliqué.

* Pvalue < 0,05, ** Pvalue < 0,01 et *** Pvalue < 0,001

6. Conclusion

Les études cinétiques ont donc permis de mettre en évidence des impacts moléculaires directs (E13), cumulatifs (E16, E20 et E24) ainsi qu'une mémorisation de ce stress thermique encore mesurable plusieurs jours après l'arrêt du stimulus (éclosion) confirmant une réelle programmation des animaux. La manipulation thermique impacte bien les gènes impliqués dans la réponse au stress thermique (HSPs) et ce de façon persistante puisque ces gènes présentent des niveaux d'expressions significativement différents par rapport au groupe contrôle pendant l'incubation mais également à l'éclosion. En plus des HSPs, d'autres grands axes métaboliques sont directement impactés par la manipulation thermique : métabolismes lipidique et glucidique, les mécanismes de l'épigénétique, la prolifération cellulaire, les voies thyroïdiennes et de l'inflammation. **Ces deux cinétiques embryonnaires et les résultats à l'éclosion nous laisse supposer que les embryons ont bien reçu le stimulus thermique (*receiving*) mais également que ce stress est potentiellement enregistré (*recording*) et pourrait être à la source des impacts phénotypiques sur des voies métaboliques comme celles des lipides (*remembering*).**

CHAPITRE 6 :

Recherche de nouveaux indicateurs non invasifs de l'engraissement et de la manipulation thermique chez le canard

Deux études préliminaires ont été réalisées, en plus des résultats principaux de la thèse, portant sur la **chémérine** et les **endocannabinoïdes** dans le plasma de canards soumis à deux challenges nutritionnels différents (**Chp 4**). Ces travaux ont été faits au sein de deux centres de recherche (équipe PRC INRAE Nouzilly et équipe IUCPQ à Québec, Canada). Ces études préliminaires avaient pour objectif d'évaluer la relation entre ces molécules plasmatiques et le poids et l'engraissement du foie, dans différentes conditions nutritionnelles et de manipulations thermiques précoces.

1. Réponse de la chémérine suite à une manipulation thermique

1.1. La chémérine : brève description et objectif du travail

La chémérine est une adipokine, c'est-à-dire qu'elle est produite et sécrétée par le tissu adipeux. Elle est libérée dans le sang dans le but de réguler le système glucidique et énergétique (Bernardi et al., 2021; Kershaw & Flier, 2004) ainsi que le système de reproduction (Kiezun et al., 2014; Reverchon et al., 2014) , chez les mammifères et chez les volailles. Il a été montré que la chémérine pouvait également être secrétée par les hépatocytes (Bernardi et al., 2021). Une pro-chémérine est synthétisée par le gène *RARRES* (*retinoic acid receptor responder protein 2*), et a été identifiée en grande quantité dans le tissu adipeux et le foie. Cette pro-chémérine est rendue active par la serine protéase et peut ensuite se fixer sur ses récepteurs pour déclencher le signal. Deux récepteurs sont majoritairement étudiés : la *CCLR2* (*C-C chemokine receptor 2*) et la *CMKLR1* (*chemerin chemokine-like receptor 1*) (Bernardi et al., 2021). Ces deux récepteurs sont présents dans le tissu adipeux, le foie et le muscle, chez les mammifères et les volailles (Mellouk, Ramé, Barbe, et al., 2018).

Chez les mammifères, la chémérine plasmatique a pu être corrélée positivement avec le gras corporel, le glucose et les triglycérides plasmatiques et elle est reliée à une réduction de l'activité du métabolisme lipidique, suggérant que cette adipokine pourrait devenir un marqueur d'engraissement (Bernardi et al., 2021; Bozaoglu et al., 2007). Cependant, chez la dinde (Diot et al., 2015) et chez les femelles reproductrices des poulets de chair (Mellouk, Ramé, Barbe, et al., 2018; Mellouk, Ramé, Marchand, et al., 2018), la chémérine plasmatique a été corrélée négativement à l'engraissement périphérique chez des animaux nourris *ad libitum*. Dans une étude plus récente chez les canards de Barbarie il a pu être montré que le taux de chémérine plasmatique était positivement corrélé à la concentration en triglycérides plasmatiques ($r = +0,80$) et à la teneur en lipides hépatiques ($r = +0,67$), en fin de période de gavage (Mellouk et al., 2019). La relation entre l'engraissement et la chémérine plasmatique chez les oiseaux reste donc variable en fonction de l'espèce et du régime alimentaire, mais suscite l'intérêt de la filière foie gras en tant que potentiel marqueur non invasif d'engraissement hépatique chez les animaux gavés.

L'équipe de recherche sur la Physiologie de la Reproduction et des Comportements (PRC), de l'INRAE de Nouzilly, s'intéresse au rôle de la chémérine chez les volailles, et particulièrement au niveau de l'œuf. Nous avons profité de nos échantillons de plasma de canards mulards pour établir une collaboration avec cette équipe, dans le but de mesurer chez cette espèce le lien entre chémérine plasmatique métabolisme hépatique. Notre étude s'est donc concentrée pour la première fois sur les canards mulards, espèce la plus utilisée dans la filière foie gras, au cours des deux challenges nutritionnels précédemment décrits (**Chp 4**).

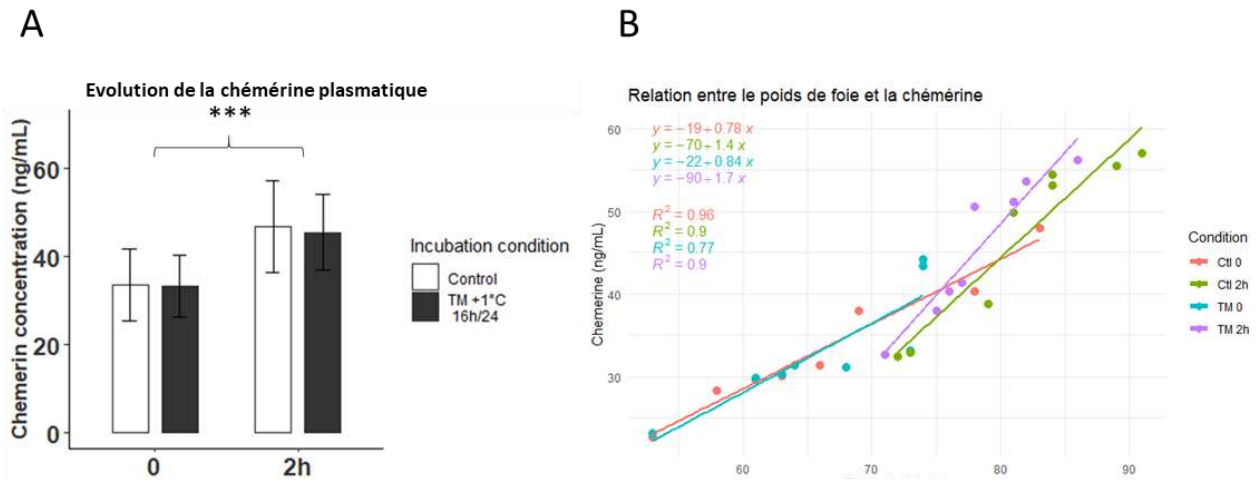


Figure 6.1. Représentation de la relation entre le poids de foie et la chémérine plasmatique lors de la mise à jeun/réalimentation

La chémérine plasmatique (moyenne de 6 à 8 échantillons ± l'erreur standard) est représentée pour les à jeun (0) ou 2h après la réalimentation (2h), et pour les deux groupes, contrôle (Ctl) ou programmé (MT) (A)
Le poids de foie et la chémérine plasmatiques sont corrélés en fonction de leur condition d'incubation et de l'heure de prélèvement (B).
Les droites de régressions (y) et leurs coefficients de corrélation (r^2) sont ajoutés en haut à gauche du graphique.
0 à jeun, 2h 2h après la réalimentation, Ctl contrôle, TM manipulation thermique

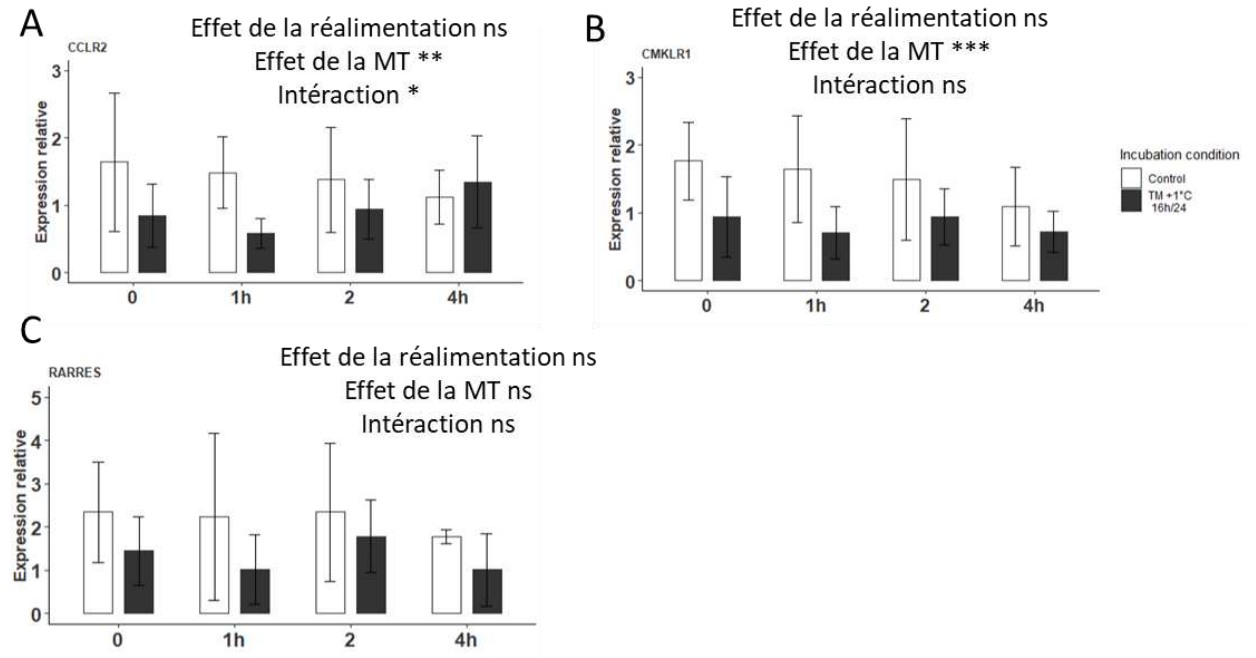


Figure 6.2. Expressions relatives de gènes liés à la chémérine lors de la mise à jeun/réalimentation dans le foie

Des gènes liés à la chémérine sont étudiés (moyenne de 6 à 8 échantillons ± l'erreur standard), comme les récepteurs CCLR2 (A) et CMKLR1 (B) ou lié à sa synthèse RARRES (C), pour chacun des timings et pour les deux conditions d'incubation (Contrôle et MT). Une Anova deux voies a été appliquée pour comparer les deux traitements aux différents timings.
*, **, ***: effet significatif, P < 0.05, P > 0.01, P < 0.001, ns : non significatif
MT manipulation thermique

L'objectif était de confirmer s'il existait ou non un lien entre la chémérine plasmatique et différents marqueurs du métabolisme hépatique : le poids ou l'engraissement du foie, mais également les expressions relatives de trois gènes spécifiques à la chémérine dans le foie (synthèse et récepteurs de la chémérine). De plus, l'impact de la manipulation thermique sur ces précédentes relations a été également étudié. Les échantillons de plasma prélevés lors du challenge mise à jeun/réalimentation et celui du gavage ont été envoyés au laboratoire de Nouzilly pour quantifier la chémérine plasmatique (réalisé par Ophélie Bernardi). Trois gènes d'intérêt ont été également passés en qPCR sur les ADNc dilués de foie qui sont *RARRES*, *CMKLR1* et *CCLR2*. En reliant les différents résultats à chaque individu, différentes corrélations ont pu être réalisées.

1.2. Résultats de l'étude préliminaire sur la chémérine

1.2.1. Le taux plasmatique de la chémérine lors de la mise à jeun/réalimentation

Pour rappel, lors de ce premier challenge alimentaire, les canards sont soumis à 23h de jeûne, puis renourris pendant 1 h. Des prélèvements sont faits à la fin de la période de jeûne (0), puis à la fin de l'heure de réalimentation (1h), puis après 2h (2h) et 4h (4h). Dès deux heures après la réalimentation, les poids de foie sont significativement plus lourds qu'après la période de jeûne, passant en moyenne de 66 à 80 g, cependant aucune différence entre le groupe contrôle et le groupe MT n'est visible (**Chp 4**). La prise de masse du foie ne correspond pas à un engraissement (lipides autour de 6 %) mais a une accumulation du glycogène dans le foie (passant de 1 % à 7,8 % 2h après la réalimentation).

Une quinzaine d'échantillons de plasma de canard mulard a été étudiée après la période de jeûne (0) ainsi que 2h après la réalimentation des animaux (2h). La chémérine plasmatique augmente significativement après la réalimentation, mais aucune différence n'est visible entre les deux conditions d'incubation (contrôle et MT) (**Figure 6.1A**). Des corrélations fortes ont été mesurées pour chacun des groupes entre la chémérine plasmatique et le poids du foie, avec une accentuation des pentes pour les animaux renourris après 2h (**Figure 6.1B**). Deux heures après la prise alimentaire les deux groupes se distinguent avec le groupe MT 2h qui présente une pente plus forte que le groupe contrôle 2h (1,7 contre 1,4) (**Figure 6.1B**). Les coefficients de corrélation entre le poids de foie et la chémérine plasmatiques sont proches de 1 pour trois des conditions (sauf MT 0 avec r^2 = 0,77), soulignant le caractère robuste de cette corrélation.

Les expressions relatives de trois gènes d'intérêt ont ensuite été étudiées : *RARRES* (retinoic acid receptor responder protein 2), *CCLR2* (C-C chemokine receptor 2) et *CMKLR1* (chemerin chemokine-like receptor 1). L'expression de ces trois gènes a été mesurée uniquement dans le foie, sur les quatre points de la cinétique (0, 1h, 2h, et 4h) (**Figure 6.2**). Les trois gènes sont bien exprimés dans le foie mais le challenge mise à jeun/réalimentation ne semble pas les impacter, malgré la présence d'une interaction entre l'effet de la manipulation thermique (MT) et l'effet challenge nutritionnel (mise à jeun/réalimentation) pour *CCLR2*. *A contrario*, la MT diminue significativement l'expression relative des deux récepteurs dans le foie. Aucune corrélation entre l'expression des trois gènes impliqués dans la sécrétion ou la reconnaissance de la chémérine et son taux plasmatique n'a pu être mise en évidence.

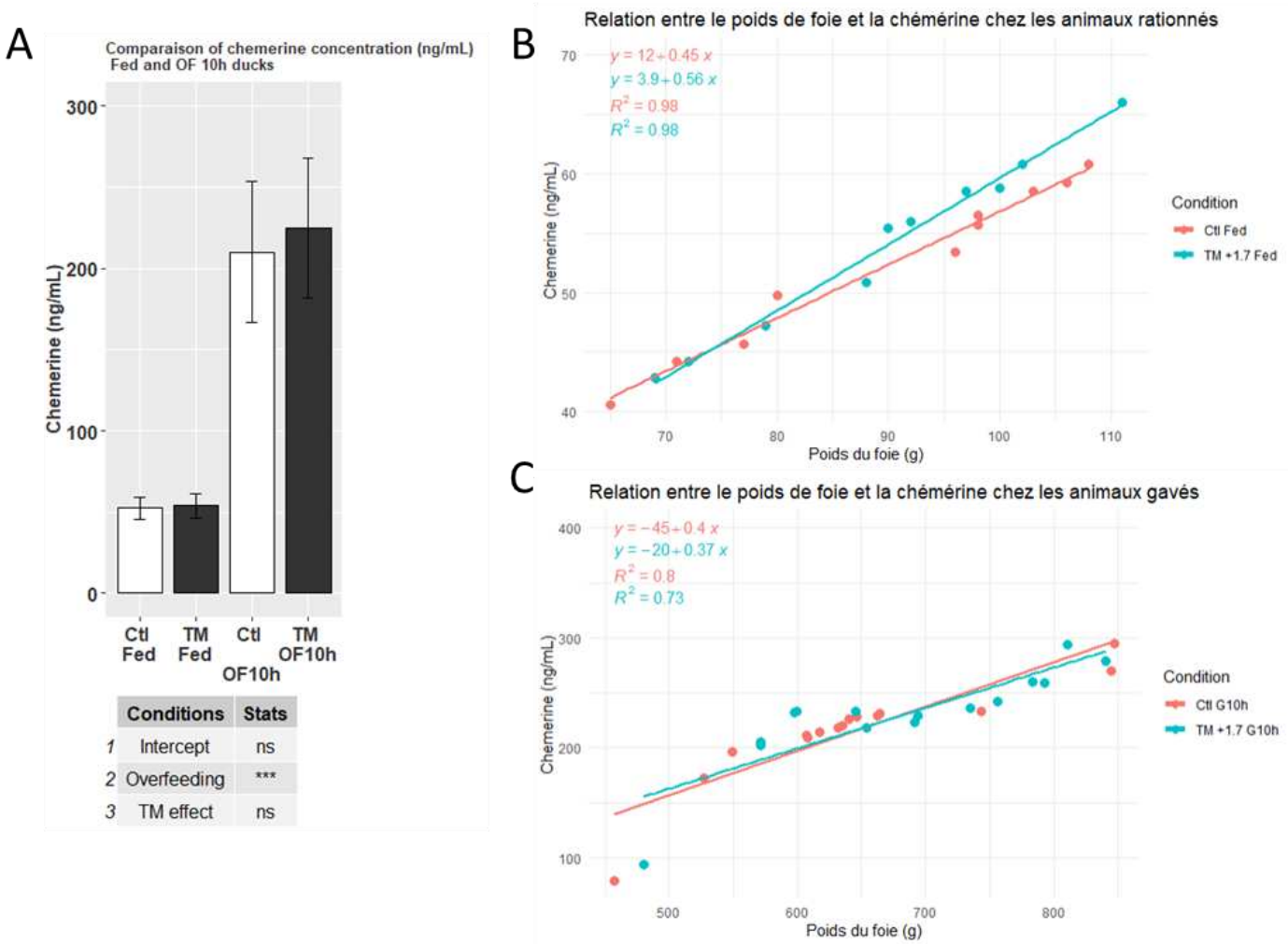


Figure 6.3. Représentation de la relation entre poids de foie et chémérine plasmatique lors du gavage ou non

La chémérine plasmatique est représentée pour les canards gavés (OF10h) et non gavés (Fed), et pour les deux groupes contrôle (Ctl) ou programmé (MT) (moyenne de 6 à 8 échantillons ± l'erreur standard) (A). Le poids de foie et la chémérine plasmatique sont corrélés en fonction de leur condition d'incubation chez les canards rationnés (B) et chez les canards gavés (C). Les droites de régressions (y) et leurs coefficients de corrélation (r^2) sont ajoutés en haut à gauche du graphique.

Fed rationné, OF gavé, Ctl Contrôle, TM manipulation thermique

1.2.2. *La réponse plasmatique de la chémérine lors de la mise en gavage*

Lors de ce second challenge alimentaire, six groupes de canards ont été abattus et analysés dans le cadre de l'étude sur la chémérine. Les deux premiers groupes concernent des animaux ayant été nourris de façon rationnée (1h par jour) et abattus 2h après leur dernier repas, et ayant subi une programmation thermique (MT Fed) ou non (Ctl Fed). Les quatre autres groupes concernent les canards ayant été gavés et abattus 2h (OF 2h) ou 10h après le dernier repas de gavage (OF 10h), après avoir subis une programmation thermique (MT) ou non (Ctl). Le gavage a augmenté le poids de foie, avec une hausse significativement plus importante chez les canards programmés en atteignant les 650 g contre 600 g en moyenne dans le groupe contrôle (**Tableau 4.1**, **Chp4**).

La chémérine plasmatique a été dosée chez les canards alimentés une heure par jour et abattus 2h après le dernier repas (Fed, 10 échantillons) et chez les canards gavés abattus 10h après le dernier repas (OF10h, 15 échantillons), et cela pour les deux conditions d'incubation (Contrôle et MT +1,7°C 16h/24 E11-E21).
Tout d'abord, la chémérine plasmatique augmente de façon significative avec le gavage, mais aucune différence n'est visible entre les deux conditions d'incubation (Contrôle et MT) (**Figure 6.3A**). De plus, la chémérine plasmatique est fortement corrélée au poids de foie que ce soit lors d'une alimentation rationnée avec un poids de foie moyen d'environ 90 g (r^2 = 0,98) ou en fin de gavage avec un poids de foie moyen d'environ 650 g (r^2 = 0,7 à 0,8) (**Figure 6.3B et C**). Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la chémérine plasmatique et le poids de gras abdominal ou le taux de lipides totaux du foie.

Les trois gènes d'intérêt de la chémérine ont pu être étudiés dans le foie pour les canards rationnés et gavés, tous abattus 2h après le dernier repas (**Figure 6.4**). Les expressions relatives des deux récepteurs diminuent significativement avec le gavage, et celle de *RARRES* augmente significativement pour le groupe contrôle et diminue significativement pour le groupe programmé. Aucun impact de la manipulation thermique n'a pu être mis en évidence.

1.2.3. *Bilan de l'étude préliminaire sur la chémérine plasmatique et sa relation avec l'engraissement*

Pour les deux challenges nutritionnels, nous avons pu **corréler positivement la chémérine plasmatique avec le poids de foie des canards, ce qui fait de la chémérine un biomarqueur non-invasif de la prise de masse du foie.** Malheureusement, les tests de corrélations n'ont pas pu montrer de lien direct entre la chémérine plasmatique et le taux de lipides totaux dans le foie des animaux, éliminant l'hypothèse d'un indicateur spécifique de l'engraissement hépatique chez le canard mulard, contrairement à ce qui avait été observé chez le canard de Barbarie (Mellouk et al., 2019).
Il est intéressant de noter que la chémérine plasmatique est fortement corrélée avec le poids de foie, même lorsque celui-ci n'est pas du tout engraissé (animaux nourris de façon rationnée, ou à jeun, ou renourris après un jeûne). **Cette observation suggère que la chémérine plasmatique pourrait refléter des variations du métabolisme hépatique en lien avec le statut nutritionnel et le poids du foie, mais pas avec la quantité de ses lipides totaux**. Il serait intéressant de mesurer des corrélations entre les différents constituants énergétiques du foie selon les différents statuts nutritionnels étudiés (notamment le glycogène, étant la source énergétique la plus rapidement mobilisable et donc la plus variable selon le statut nutritionnel).

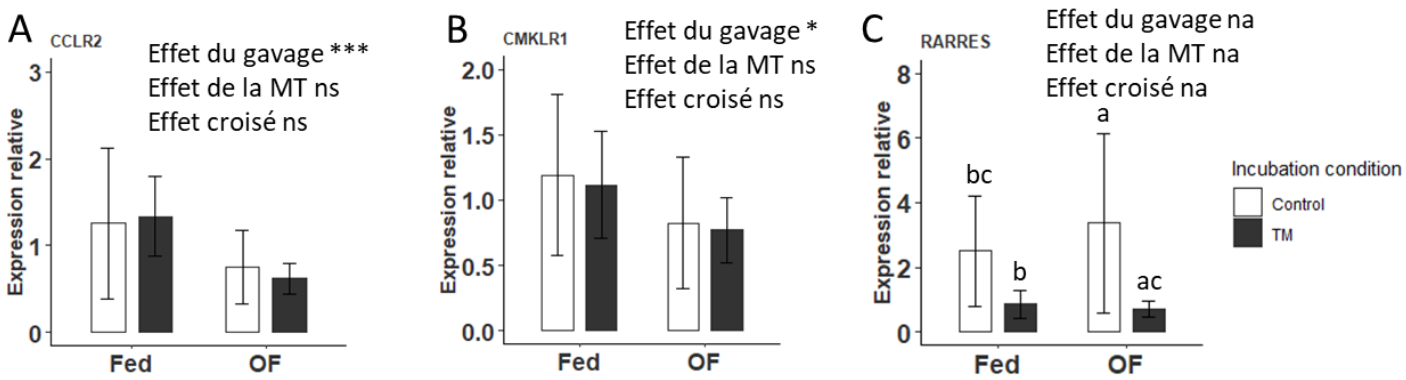


Figure 6.4. Expressions relatives de gènes liés à la chémérine pour les canards gavés ou non, dans le foie

Des gènes liés à la chémérine sont étudiés (moyenne de 6 à 8 échantillons ± l'erreur standard), comme les récepteurs CCLR2 (A) et CMKLR1 (B) ou lié à sa synthèse RARRES (C), pour chacun des timings et pour les deux conditions d'incubation (Contrôle et MT). Une Anova deux voies a été appliquée pour comparer les deux traitements aux différents timings. Sinon des tests une voie ont été utilisés.

* Pvalue < 0,05, ** Pvalue < 0,01, *** Pvalue < 0,001, ns non significatif, na non applicable

TM manipulation thermique, OF gavage, Fed rationné 1h par jour

L'origine de la chémérine plasmatique n'a pas été étudiée dans nos expériences mais nous observons une variation de son taux après les repas, pouvant provenir d'une synthèse effectuée par un autre tissu que le foie. Chez les mammifères, des corrélations entre la chémérine plasmatique et la transcription de la chémérine dans le foie n'ont pas pu être observées, renforçant l'idée que le foie n'est pas le contributeur majeur de la synthèse de la chémérine (Döcke et al., 2013). De plus, chez la souris, le tissu adipeux semble être le centre principal de la synthèse de la chémérine (Bozaoglu et al., 2007; Goralski et al., 2007), avec de forts niveaux d'expression de la chémérine et de son récepteur CMKLR1. Si sa production vient essentiellement du tissu adipeux, un lien entre le poids de foie et l'activation de la synthèse de la chémérine par le tissu adipeux devrait pouvoir être mesurable. Ce lien ou « message » pourrait venir du foie directement, mais également des intestins, ou du cerveau, ou tout autre organe régulant le métabolisme énergétique. **Pour comprendre le lien entre taux plasmatique de la chémérine et le poids de foie, il faudrait donc dans un premier temps comprendre par quel tissu/organe est produite la chémérine circulante.** Pour cela, nous pourrions mesurer l'expression des gènes impliqués dans sa synthèse dans différents tissus, à commencer par le tissu adipeux, et selon différentes conditions nutritionnelles (jeûne, après un repas, ou après la période de gavage).

Nos résultats montrent, après le dernier repas de gavage, une hausse significative de la chémérine plasmatique parallèlement à une baisse de l'expression des récepteurs, alors que lors de la réalimentation, la chémérine plasmatique augmente également mais aucune variation du niveau de transcription de ses récepteurs n'est observée. Peu d'études relient le taux plasmatique de chémérine et l'expression de ses récepteurs membranaires dans le foie, hormis *Mellouk et al., (2019)* qui montre une hausse des deux après le dernier repas de gavage des canards de Barbarie, sans pour autant les corréler. La baisse d'expression des récepteurs membranaires pourrait signifier une baisse de la signalisation médiée par la chémérine sur le métabolisme du foie, comme un rétrocontrôle négatif après une trop forte stimulation. Lors de la réalimentation, la réponse des récepteurs membranaires n'est pas modulée par la chémérine plasmatique, pouvant être lié à sa concentration dans le sang. Effectivement, la chémérine plasmatique est autour de 250 ng/µL chez les canards gavés contre 35 à 50 ng/µL chez les canards réalimentés. Cette différence pourrait expliquer la différence de réponse au niveau des récepteurs membranaires du foie entre les deux challenges nutritionnels.
La manipulation thermique a significativement diminué la transcription des récepteurs membranaires du foie chez les canards réalimentés. Cette baisse de transcription des récepteurs dans le foie pourrait être, comme pour la baisse des expressions relatives des gènes impliqués dans les métabolismes des lipides et du glucose, liée au décalage des réponses hépatiques chez les canards programmés par rapport au canards contrôles. Ce potentiel décalage des différents métabolismes pourrait être vérifié à l'aide d'une cinétique plus longue après la réalimentation, pour voir si le groupe programmé rattrape le contrôle ou si la baisse de transcription est persistante après la réalimentation.

Finalement, nos données montrent que la chémérine plasmatique est fortement liée à la prise de poids du foie, mais pas directement à son engraissement. De nombreuses questions s'ouvrent désormais quant à sa synthèse en réponse face à un stress nutritionnel mais également à un stress thermique. Bien que non corrélée à l'engraissement du foie directement, la chémérine reste intéressante à mesurer lors du gavage, pour suivre l'évolution de la prise de poids de foie.

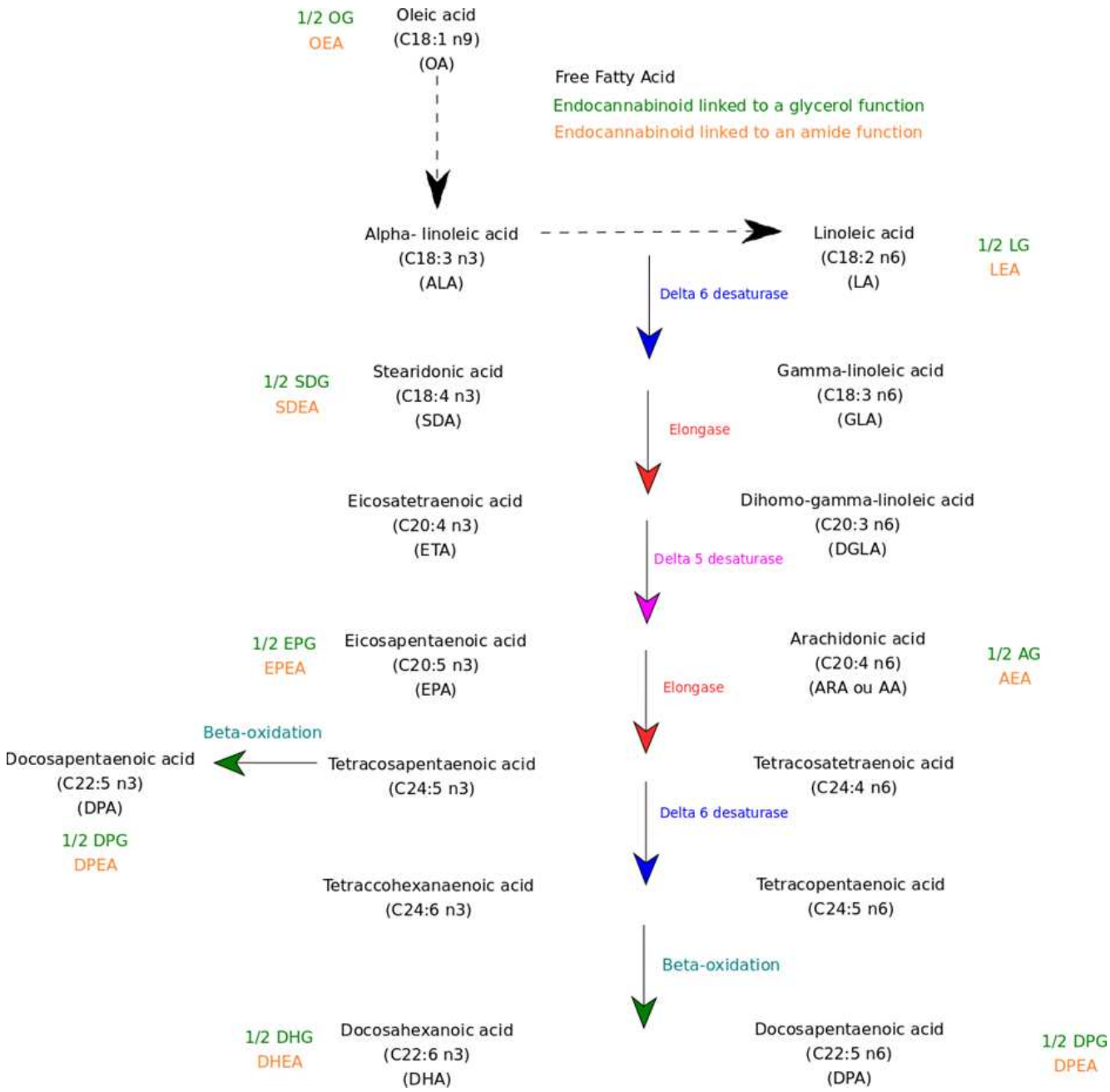


Figure 6.5. Rappel de la synthèse des différents acides gras et des endocannabinoïdes associés

Les voies de synthèse des acides gras libres (en noir) sont représentées en rappel sur le schéma ci-dessous avec les endocannabinoïdes liés, soit avec une fonction glycérol (vert) soit avec une fonction amine (orange).

OG oleic glycerol, OEA oleic ethanolamine, LG linoleic glycerol, LEA linoleic ethanolamine, SDG stearidonic glycerol, SDEA stearidonic ethanolamine, EPG eicosapentaenoic glycerol, EPEA eicosapentaenoic ethanolamine, AG arachidonic glycerol, AEA arachidonic ethanolamine, DPG docosapentaenoic glycerol, DPEA docosapentaenoic ethanolamine, DHG docosahexanoic glycerol, DHEA docosahexanoic ethanolamine

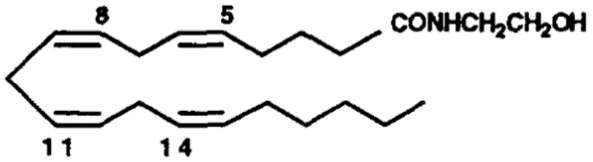
2. La réponse des endocannabinoïdes suite à une manipulation thermique

2.1. Les endocannabinoïdes : brève description et objectif du travail

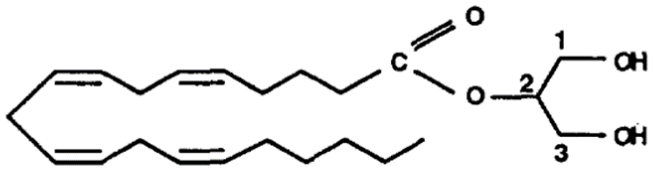
Le système des endocannabinoïdes (ECS) se compose des endocannabinoïdes endogènes (eCBs), des récepteurs endocannabinoïdes et des enzymes nécessaires pour la synthèse et la dégradation des eCBs (Lu & Mackie, 2020). L'ECS est lié au maintien de l'équilibre métabolique, en stimulant les métabolismes glucidiques et lipidiques (Silvestri & Marzo, 2013), et est souvent impliqué dans les cas d'obésité ou de trouble métabolique chez l'humain (Miralpeix et al., 2021; Schulz et al., 2021). Les régimes induisant la stéatose hépatique, riches en gras ou en alcool, augmentent l'expression relative des récepteurs endocannabinoïdes dans le foie (CB1) et les niveaux circulants des eCBs 2-AG et/ou AEA, chez les rongeurs (Jeong et al., 2008; Jourdan et al., 2010; Osei-Hyiaman et al., 2005). **Ces données, chez l'humain et le rongeur, montrent un lien entre les taux plasmatiques d'eCBs et l'engraissement des individus, et notamment de l'engraissement du foie. Dans ce contexte, nous avons souhaité doser ces médiateurs plasmatiques chez le canard mulard lors du gavage, afin de mesurer leur potentiel en tant que biomarqueur non-invasif de l'engraissement du foie.**

La synthèse des endocannabinoïdes (eCBs) est intrinsèquement liée à celle des acides gras libres (**Figure 6.5**) et peut être réalisée par tous les tissus, préférentiellement le cerveau, puis transportés dans le sang. Les eCBs les mieux décrits, chez les mammifères comme chez les oiseaux, sont l'anandamide (AEA) et 2-arachidonoyl glycérol (2-AG) qui sont produits en réponse à la prise alimentaire par tous les tissus (**Figure 6.6**). Leur diffusion, dans les membranes cellulaires, déclenche des réponses métaboliques en se fixant aux récepteurs endocannabinoïdes (Devane et al., 1992; Di Marzo et al., 1999; Stella et al., 1997). De façon intéressante, des injections d'agonistes des récepteurs membranaires, **CB1 (ou CNR1) et CB2 (ou CNR2**), dans le cerveau engendre une hyperphagie des volailles (consommation alimentaire augmentée) (Alizadeh et al., 2015; Emadi et al., 2011; Keyshams et al., 2016; Rahmani et al., 2021; Jin Zhang, 2005).
Des données *in vitro* ont montré que l'activation des récepteurs eCBS induisait un engraissement des cellules du foie (Bazwinsky-Wutschke et al., 2019; Silvestri et al., 2011; Silvestri & Marzo, 2013), et nous ont donc incités à mesurer leur expression dans le foie de nos animaux gavés afin de voir s'il était possible de corréler leur niveau d'expression et l'engraissement du foie.

L'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec (IUCPQ) possède une équipe travaillant sur les personnes souffrant d'obésité ou de troubles métaboliques et les réponses du système des endocannabinoïdes. Les endocannabinoïdes sont sensibles à l'alimentation mais également au stress, deux paramètres qui sont stimulés chez les canards (changement de température d'incubation des œufs, gavage), et impactent les voies métaboliques lipidique et glucidique, voies principales d'intérêt chez les palmipèdes à foie gras. **Cette étude préliminaire avait d'abord pour objectif de vérifier la production des endocannabinoïdes par les canards mulards. Dans un second temps, nous avons étudié les liens entre le système endocannabinoïde et le statut nutritionnel puis la température d'incubation afin d'explorer une potentielle voie d'action de la programmation.** Durant deux mois, j'ai pu me rendre dans ce centre de recherche pour faire les analyses sur mes échantillons de plasma de canard gavés et non gavés. De plus, l'expression hépatique des deux récepteurs des endocannabinoïdes (CB1 et CB2) a pu être étudiée en qPCR.



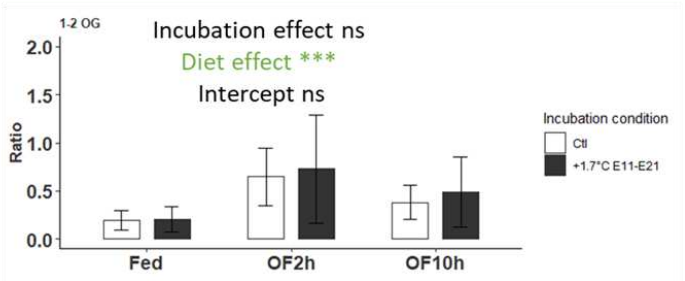
anandamide



2-arachidonyl glycerol (2-Ara-Gl)

Figure 6.6. Structures des endocannabinoïdes AEA et 2-AG (Mechoulam et al., 1995)

Les eCBs dérivés d'acides gras mono insaturés



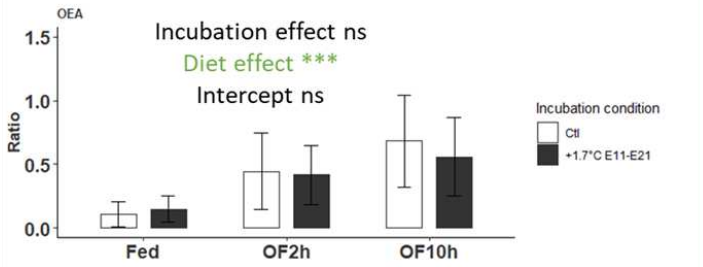


Figure 6.7. Réponses des eCBs liés aux acides gras mono insaturés pour les deux conditions d'incubation et les 3 groupes d'abattage dans le sang

Les ratios des endocannabinoïdes, présents dans le sang, liés à une fonction glycérol (gauche) et une fonction amine (droite) sont représentés pour les deux conditions d'incubation et les trois groupes d'abattage. Le ratio est le rapport entre la quantité mesurée dans l'échantillon par rapport à la quantité présente dans l'échantillon standard.

Des Anovas deux voies sont réalisées afin de comparer les deux conditions d'incubation et les 3 groupes d'abattage, puisque toutes les conditions d'application étaient respectées.

OG oleic glycerol, OEA oleic ethanolamine

Fed rationné 1h, OF2h gavé et abattu 2h après le dernier repas, OF10h gavé et abattu 10h après le dernier repas

2.2. Résultats de l'étude préliminaire sur les endocannabinoïdes

2.2.1. Mesures des eCBs dans le plasma

Les endocannabinoïdes ont été dosés dans le plasma des canards rationnés abattus 2h après le dernier repas (Fed, 10 à 15 échantillons), les canards gavés abattus 2h après le dernier repas (OF2h, 10 à 13 échantillons) et ceux abattus 10h après le dernier repas (OF10h, 15 échantillons), pour les deux conditions d'incubation : Contrôle et MT +1,7°C 16h/24 E11-E21.

Tout d'abord, cette étude préliminaire a permis de mettre en évidence la présence des endocannabinoïdes chez les canards mulards. Effectivement, qu'importe le statut alimentaire ou les conditions d'incubation, les eCBs ont pu être mesurés par LC-MS. L'analyse avait ensuite pour objectif de voir si les endocannabinoïdes pouvaient servir de biomarqueurs non invasifs pour évaluer l'engraissement du foie. Une solution standard est créée pour l'analyse de la LC-MS, et elle contient tous les eCBs à étudier, dans des concentrations bien précises (détails du standard non divulgués). Le pic d'un eCB, en sortie de LC-MS, est rapporté à celui du standard, permettant d'obtenir des ratios de quantités présentes. Le ratio peut par la suite passer en quantification absolue, une fois que la quantification du standard est faite (non faite à ce jour). A partir uniquement des ratios, il n'est pas possible de comparer les quantités des différents éléments entre eux. Par contre, il est possible de comparer les conditions entre-elles pour une même molécule.

Les ratios des deux dérivés endocannabinoïdes de l'acide oléique (1-2 OG et OEA) sont augmentés de façon significative après gavage (**Figure 6.7**). Pour les deux endocannabinoïdes aucun effet MT n'est observé.

Les deux eCBs dérivés de l'acide linoléique (1-2 LG et LEA) sont également augmentés par le gavage (**Figure 6.8**), et aucun impact de la manipulation thermique n'est observé. Le dérivé endocannabinoïde 1-2 AG diminue significativement avec le gavage (tests post-hoc Fed/OF2h et Fed/OF10h). Le second dérivé de l'AA, l'AEA augmente significativement entre les trois stades (Fed/OF10h et OF2h/OF10h, tests post-hoc) et présente aussi un effet lié à la manipulation thermique, avec des ratios plus élevés pour le groupe programmé.

Des corrélations entre les molécules les plus intéressantes (1-2 OG, OEA, 1-2 LG, LEA, 1-2 AG et AEA) et le poids de foie, le taux de fonte et la masse de gras abdominale ont été faites. Parmi les différentes corrélations obtenues, une corrélation entre l'AEA et le poids de foie a été observée (+ 0,67) uniquement pour le groupe programmé, gavé et abattu 10h après le dernier repas (**données non montrées**).

2.2.2. Expression des gènes codant pour les récepteurs aux eCBs

Pour compléter les mesures LC-MS des endocannabinoïdes, l'expression des deux récepteurs des endocannabinoïdes, *CB1* et *CB2*, a été mesurée sur des échantillons de foie de canards rationnés (Fed) et gavés (OF2h). L'expression relative du récepteur *CB1* est significativement diminuée par le gavage tandis qu'aucun impact de la manipulation thermique n'est observé (**Figure 6.9**). Le niveau d'expression du second récepteur est très faible pour les groupes contrôles (Ctl Fed (1), MT Fed (9), Ctl OF (2) et MT OF (8)), ce qui ne permet donc pas de tester statistiquement l'impact du gavage et de la manipulation thermique.

Les eCBs dérivés d'acides gras poly insaturés n6 (Oméga 6)

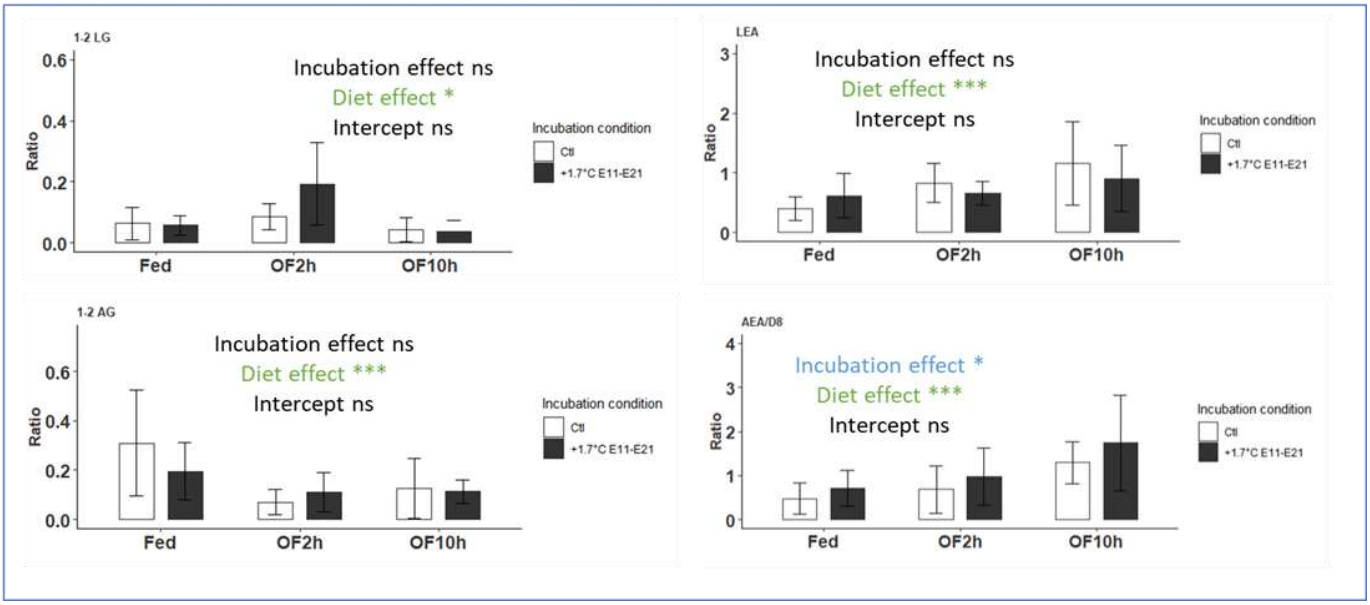


Figure 6. 8. Réponses des eCBs liés aux oméga 6 pour les deux conditions d'incubation et les 3 groupes d'abattage dans le sang

Le ratio des endocannabinoïdes, présents dans le sang, liés à une fonction glycérol (gauche) et une fonction amine (droite). Des Anovas deux voies sont réalisées afin de comparer les deux conditions d'incubation et les 3 groupes d'abattage, si toutes les conditions sont respectées. Sinon des Anovas 1 voie sont réalisées (AA D8, D8 correspond au standard utilisé car deux pics possibles).

LG linoleic glycerol, LEA linoleic ethanolamine, AG arachidonic glycerol, AEA arachidonic ethanolamine,

Fed rationné 1h, OF2h gavé et abattu 2h après le dernier repas, OF10h gavé et abattu 10h après le dernier repas

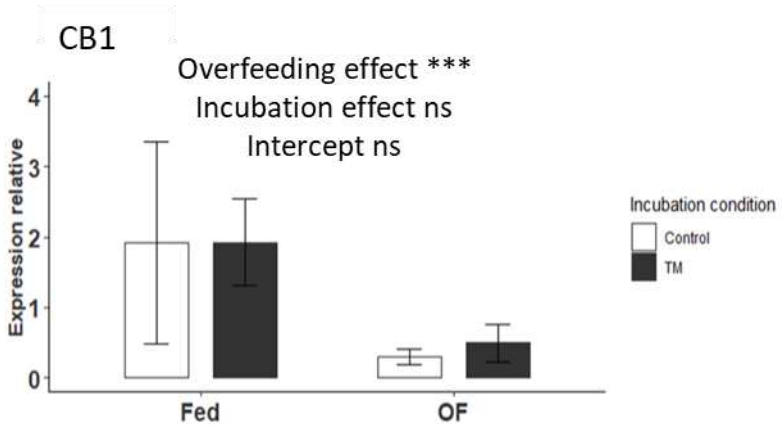


Figure 6.9. Expressions relatives du récepteur CB1 chez le canard gavé ou non dans le foie

Le récepteur CB1 a été étudié pour chacun des timings et pour les deux conditions d'incubation (Contrôle et MT). Une Anova deux voies a été appliquée pour comparer les deux traitements aux différents timing (respect des conditions d'application)

* P value < 0,05, ** P value < 0,01, *** P value < 0,001, ns non significatif, na non applicable

Fed canard rationné, OF canard gavé, TM manipulation thermique

2.2.3. Bilan de l'étude préliminaire sur les eCBs plasmatiques et leur relation avec l'engraissement

Certains eCBs plasmatiques (1-2 OG, OA, 1-2 LG, LEA, 1-2 AG et AEA) sont significativement modulés en fonction du régime alimentaire chez les canards. Toutefois, aucune corrélation n'a pu être établie avec le poids de foie ou l'engraissement du foie, contrairement aux études chez l'Homme (Mallat et al., 2011; Zelber-Sagi et al., 2017). De même, lors du challenge gavage (**Chp 4**), de nombreuses transcriptions de gènes impliqués dans la synthèse des lipides et l'oxydation du glucose sont significativement impactées, mais aucune corrélation entre leur expression et le taux plasmatique des eCB n'a pu être mise en évidence dans notre étude. De façon intéressante, l'**AEA** est significativement augmenté avec le gavage et significativement plus important chez les canards programmés, présentant un poids de foie plus lourd, ce qui pourrait faire de cet eCBs **un potentiel marqueur de la manipulation thermique spécifiquement après gavage.** Toutefois, cette étude préliminaire ne permet pas de conclure positivement quant à l'utilisation de ces paramètres plasmatiques en tant que marqueurs d'engraissement du foie chez les canards mulards. Il serait maintenant intéressant d'essayer de relier ces eCBs à d'autres paramètres comme le taux d'insuline (résistance à l'insuline) ou la consommation (hyperphagie) dans un autre contexte que le gavage**.**

La présence du récepteur membranaire CB1 a pu être confirmé dans le foie de canard, et CB2, comme dans les autres modèles animaux (Emadi et al., 2011; Keyshams et al., 2016; Rahmani et al., 2021; Jin Zhang, 2005), est difficile à amplifier dans le foie.
Chez l'Homme, les pathologies du foie, comme la cirrhose ou l'engraissement non alcoolique, sont associées à des quantités plasmatiques d'endocannabinoïdes et de récepteurs CB1 dans le foie plus fortes que chez les personnes non malades (Mallat et al., 2011). De plus, CB1 est capable de stimuler sa propre synthèse après la prise alimentaire chez les mammifères et les volailles (Emadi et al., 2011; Keyshams et al., 2016; Rahmani et al., 2021; Schulz et al., 2021; Jin Zhang, 2005). Au vu de ces résultats, il aurait été cohérent que le récepteur membranaire CB1 augmente significativement avec le gavage. La baisse observée de ce récepteur dans le foie nous permet de nous questionner sur un potentiel rétrocontrôle de ce récepteur. Effectivement, les différentes études injectent des molécules agonistes au récepteur, chez les animaux, et relèvent les effets dans les premières heures suivant l'injection et non jusqu'à 10h après. **Il est possible que la synthèse du récepteur CB1 soit, comme chez mammifères, augmentée directement avec la prise alimentaire avant de rediminuer**. Il serait alors intéressant de réaliser une cinétique en suivant les endocannabinoïdes plasmatiques et CB1 dans le foie les heures suivant un repas de gavage, ou encore d'utiliser nos échantillons du challenge mise à jeun/réalimentation pour suivre cette réponse suite à une réalimentation.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés uniquement au eCBs présents dans le plasma, lié au matériel biologique dont nous disposions, cependant il serait intéressant de caractériser les endocannabinoïdes présents dans le foie pour approfondir cette recherche préliminaire en cherchant les sites de synthèse des eCBs, chez le canard mulard lors du gavage.

Finalement, comme chez les mammifères, nos résultats concernent essentiellement deux eCBs, AEA et 1-2 AG, qui sont significativement impactés par le gavage. Leur récepteur CB1 est également impacté par le gavage, mais sa réponse mérite de plus amples analyses pour confirmer le potentiel rétrocontrôle. De plus, AEA montre un impact significatif de la manipulation thermique, pouvant faire de lui un potentiel marqueur de la programmation après le gavage.

DISCUSSIONS ET CONCLUSION GENERALE

Discussion et perspectives

Ces travaux de thèse avaient comme objectifs **de confirmer et d'optimiser l'impact de la manipulation thermique embryonnaire sur la production de foie gras chez les canards mulards**. La mise en place des essais s'est appuyée sur des résultats précédents du laboratoire montrant une augmentation significative du poids de foie pour trois groupes de canards mulards programmés (+ 1°C, 24h/24, E13-E27, + 1°C, 16h/24 E13-E27, + 1,5°C 16h/24 E13-E27) (Massimino et al., 2019). Cette même étude montrait que pour deux des groupes (+ 1°C 24h/24 et + 1,5°C 16h/24), des impacts négatifs étaient également observés, comme l'augmentation de la mortalité embryonnaire ou encore l'augmentation du taux de fonte du foie gras.

Lors de cette thèse notre premier objectif était donc d'optimiser la manipulation thermique. Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur l'optimisation pendant l'incubation, afin **de maintenir l'éclosabilité des groupes programmés égale à celle du groupe contrôle (Chp 3)**. Pour cela, nous avons testé différentes fenêtres embryonnaires d'une durée de 10 jours pour appliquer notre stimulus thermique, en nous basant sur l'étude d'ontogenèse réalisée dans la précédente thèse (Massimino et al., 2020). Par la suite, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une **programmation métabolique des foies de canards après deux types de challenges nutritionnels : la réalimentation (suite à un jeûne) et le gavage (Chp 4)**.

Les impacts à plus ou moins long termes des programmations thermiques sont déjà bien décrits en volailles (Andrieux et al., 2022), mais les mécanismes moléculaires à la base de cette programmation restent à déterminer. Dans ce but, pour **mieux comprendre les mécanismes de la programmation thermique chez le canard**, des cinétiques d'expression d'un grand nombre de gènes au cours de la manipulation thermique ont été réalisées (**Chp 5**).

Enfin, dans un dernier temps, nous nous sommes questionnés sur la possibilité de **déterminer des biomarqueurs non-invasifs (chémérine et endocannabinoïdes plasmatiques) de l'engraissement du foie**, et potentiellement de la manipulation thermique (**Chp 6**).

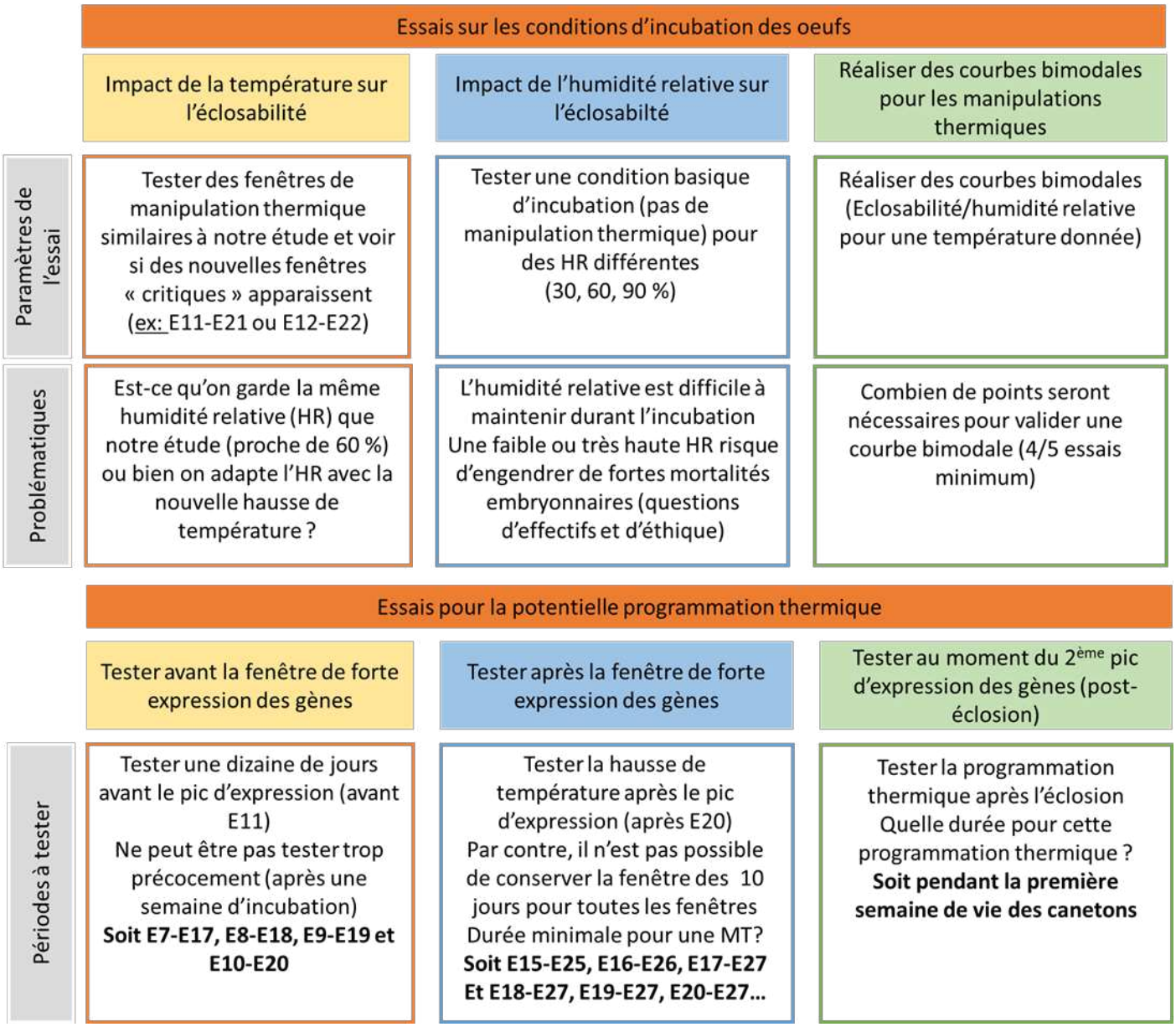


Figure ccl.1. Potentiels nouveaux protocoles d'essai d'incubation pour optimiser les manipulations thermiques et/ou la potentielle programmation thermique

A- Impact d'une hausse de la température d'incubation sur la viabilité des embryons et leurs performances à l'éclosion : analyse critique

L'impact de la MT sur la survie des embryons dépend de la durée mais également de la période d'application de cette dernière

Une hausse de température (+ 1,5°C) appliquée sur la fenêtre embryonnaire de 14 jours (E13-E27) a engendré des pertes de performance à l'éclosion lors de la précédente étude (Massimino et al., 2019). Cependant ces effets négatifs de la manipulation thermique ont pu être évités lorsque la durée était réduite à 10 jours, dans quatre de nos six fenêtres MTs testées. Effectivement, même si la durée est réduite, la période d'application de la manipulation thermique est également importante. Notre étude a pu montrer qu'une même hausse de température d'incubation n'impactait pas de la même manière les embryons selon la période durant laquelle elle était appliquée ((Andrieux et al., 2021) ; **Chp 3**) : les fenêtres précoces de MT (début d'application du stimulus à E9 ou E10) engendrent de très fortes mortalités (de 20 à 24 %), les fenêtres intermédiaires (à partir de E11 et E12) engendrent également de la mortalité mais de façon plus modérée (de 13 à 16 %) par rapport au groupe contrôle (de 6 à 10 %) et surtout n'impactent plus l'éclosabilité finale. Et enfin, lorsque le stimulus est appliqué de façon plus tardive (à partir de E13 ou E14), la mortalité embryonnaire reste proche du groupe contrôle. Nous avons pu confirmer les nombreux travaux chez les volailles montrant l'existence de périodes critiques, et que des manipulations thermiques trop précoces augmentent significativement la mortalité en milieu de développement embryonnaire et baissent l'éclosabilité (Al Sardary & Mohammad, 2016; Carvalho et al., 2020; Yan et al., 2015).

<u>Perspective : jouer sur les paramètres environnementaux (température, humidité, …) pour la MT</u>

Il serait intéressant de confirmer les périodes critiques pour appliquer une manipulation thermique et surtout de voir si des périodes dites non critiques pour une hausse de 1,5°C peuvent devenir critiques pour une hausse de température plus importante. Si ces périodes non critiques deviennent critiques cela signifiera que le paramètre intensité joue un rôle tout aussi important que le paramètre période de la MT, sinon le paramètre période prédominera sur la température (**Figure ccl.1**). Cependant une question reste ouverte, si l'on augmente la température faut-il également augmenter l'humidité relative pour préserver les embryons. Effectivement, depuis le début nous parlons de manipulation thermique mais en réalité il s'agit d'une manipulation combinant de nombreux paramètres (T°C, HR, ventilation, échanges gazeux…).

Ces différents paramètres peuvent être modulés dans le but d'optimiser la manipulation thermique et ses impacts, de façon infinie. Certains des paramètres sont dits principaux et sont liés à de plus forts impacts directs, comme l'humidité relative (Al-Rukibat et al., 2016; M. B. Al-Zghoul et al., 2019; Barott, 1937; T. Loyau et al., 2015).

Nous savons que l'humidité relative est un paramètre critique pour l'incubation des œufs et qu'elle reste difficile à contrôler dans nos incubateurs (**Chp 3**). Cependant, il pourrait être intéressant d'évaluer son rôle critique lors d'un essai dans lequel une même manipulation thermique sera appliquée, même température, période et durée, mais pour des humidités différentes (**Figure ccl.1**). Un point de questionnement pourrait être les niveaux de variation de l'humidité relative (devient rapidement létale) et les effectifs à mettre en place (trop de mortalité implique un fort effectif de départ ou bien un faible effectif à la fin).

Dans le prolongement de cette idée, des courbes bimodales (éclosabilité/HR pour une T°C, (Barott, 1937)) pourraient être obtenues en testant différentes humidités relatives. De plus, ces courbes bimodales pourraient être également combinées avec différentes températures de manipulation thermique. En combinant les deux premières idées d'essai, une étude complète de l'optimisation des manipulations thermiques pourrait être faite et nous permettre de choisir le meilleur couple humidité relative/température pour obtenir la meilleure éclosabilité (**Figure ccl.1**).

Perspective : jouer sur d'autres périodes du développement pour réaliser la MT :

Pour les nouvelles manipulations thermiques utilisées nous avons fait le choix de nous placer autour de la zone du pic d'expression des gènes d'intérêt, identifiée lors de l'étude sur l'ontogenèse hépatique (Massimino et al., 2020). Cependant, aucune information complémentaire ne confirme que cette période correspond à une période de plasticité de l'embryon et donc d'une meilleure mémoire du stimulus environnemental. Il pourrait être intéressant de tester la programmation thermique également sur les zones avant et après ce pic (**Figure ccl.1**).

Avant le pic d'expression (avant E12), la fenêtre de 10 jours peut être conservée et les fenêtres E9-E19, E10-E20 et E11-E21 ont déjà pu être testées jusqu'à l'éclosion (fortes mortalités embryonnaires). En volailles, de nombreuses manipulations thermiques ont été réalisées et il est souvent question d'éviter la première semaine de développement (T. Loyau et al., 2015). Tester des fenêtres à partir du 7ème jour embryonnaire semble un bon compromis.

Après le pic d'expression (après E20), conserver la fenêtre des 10 jours n'est malheureusement pas toujours possible, sauf pour les débuts de fenêtre de E15 à E17. Pour des timings plus tardifs, il faudrait réfléchir à la durée minimale d'une manipulation thermique, en sachant qu'en volaille il est souvent utilisé des fenêtres très courtes (2 à 3 jours) (T. Loyau et al., 2015).

Une dernière période reste possible pour la programmation thermique au cours des premiers jours de vie correspondant à une transition alimentaire. Effectivement, lors du développement, l'embryon utilise ses réserves majoritairement lipidiques alors que son premier repas est riche en glucides. De nombreuses études en volailles, réalisent soit un choc thermique les premiers jours de vie soit la combinaison d'une manipulation thermique embryonnaire avec un choc thermique les premiers jours de vie (Günal, 2012; Yahav & Tzschentke, 2006). L'étude d'ontogenèse montrait un pic d'expression des gènes de la lipogenèse lors de la transition alimentaire des canetons (Massimino et al., 2020), ce qui pourrait être un point de départ intéressant.

Finalement, comme illustré dans cette première partie de discussion, il existe de nombreuses manipulations thermiques qui pourraient être réalisées pour répondre à des questions bien distinctes, ce qui les rend encore plus intéressantes.

B- La MT est une première épreuve pour les embryons qui impacte leur survie, leur sexe ratio et leur poids à la naissance

Nous avons pu voir (**Chp 3**) que les conditions expérimentales de programmation qui maintiennent une éclosabilité égale au groupe contrôle montrent quand même une hausse significative de la mortalité en milieu de développement embryonnaire (de 13 à 16 % contre 6 à 10 % chez les contrôles). Ce rééquilibrage de la mortalité dans les groupes programmés en milieu d'incubation (après E11) pourrait présager qu'une pré-élimination des embryons les plus faibles aurait lieu lors de la manipulation thermique alors que dans le groupe contrôle cette mortalité serait répartie tout au long de l'incubation. L'évaluation de la robustesse d'un embryon semble difficile vu la difficulté de la mise en place des grilles d'évaluation des canetons à la naissance (Barrieu et al., 2015; Tona et al., 2003).

Perspective : sexer les embryons morts pour évaluer la sensibilité des deux sexes :

Une hausse plus précoce de la température d'incubation, quant à elle, engendre de très fortes mortalités en milieu de développement et semble toucher en majorité les embryons femelles (de 65 à 67 % de canetons mâles contre 50 à 54 % chez le contrôle). La plus forte proportion de males à l'éclosion chez les canards mulards est connue (Batellier, Govoroun, et al., 2004; Batellier, Marchal, et al., 2004) et est expliquée par une altération du développement embryonnaire de l'embryon femelle, à cause de son croisement et de son hétérogamétie (Byerly & Jull, 1935; Haldane, 1922). Au niveau de la bibliographie, des manipulations thermiques allant de 35°C à 38°C, chez le canard mulard, ne montrent pas d'impact sur le sexe ratio (Koláčková et al., 2019), alors que chez les volailles, les derniers jours de développement semblent critiques pour la survie des embryons femelles (Elmehdawi et al., 2015; Tzschentke & Halle, 2009). **Dans le but de confirmer au non cette plus forte fragilité des embryons femelles soumis à un changement environnemental, nous pourrions lors d'un nouvel essai sexer les embryons morts au cours de l'incubation et ainsi vérifier la plus forte proportion d'embryon femelle ou non.**

Perspective : la synchronisation des ramassages des canetons éclos :

En plus d'impacter le sexe ratio à l'éclosion, la manipulation thermique engendre des canetons au poids vif significativement plus léger que ceux du groupe contrôle (entre 52 et 53 g contre 54 à 55 g chez les contrôles). Dans de nombreuses études de manipulation thermique, le poids à la naissance des poussins programmés était plus faible que celui des poussins contrôle (Al-Rukibat et al., 2016; Piestun et al., 2008; Zaboli et al., 2016), mais également chez les canetons programmés (Massimino et al., 2019). **Ces différences de poids à l'éclosion peuvent être en partie expliquées par l'accélération du développement chez les embryons programmés par une hausse de température** (Al Sardary & Mohammad, 2016; De Souza Morita et al., 2016; Maatjens et al., 2016a) engendrant une accélération de la consommation du jaune d'œuf (D. M. Lamot et al., 2014). Au cours de notre essai, les naissances ne sont relevées qu'une fois par jour, ce qui laisse des fenêtres de 24h aux canetons, tous groupes confondus, d'éclore. Un caneton né quelques heures avant le ramassage aura un poids vif plus lourd qu'un caneton né la veille, qui aura plus consommé ses réserves. Pour limiter ce biais sur les poids de naissance et obtenir des poids égaux à l'éclosion entre les différents groupes, des études ajustent les heures de ramassage des canetons, en calculant l'accélération du développement embryonnaire par la MT (Carvalho et al., 2020). **Une étude comparative des deux méthodes de ramassage pourrait être réalisée dans le but de savoir si une des méthodes permet d'optimiser les performances des animaux à l'éclosion (poids à l'éclosion) mais aussi sur du long terme (poids final, indice de consommation).**

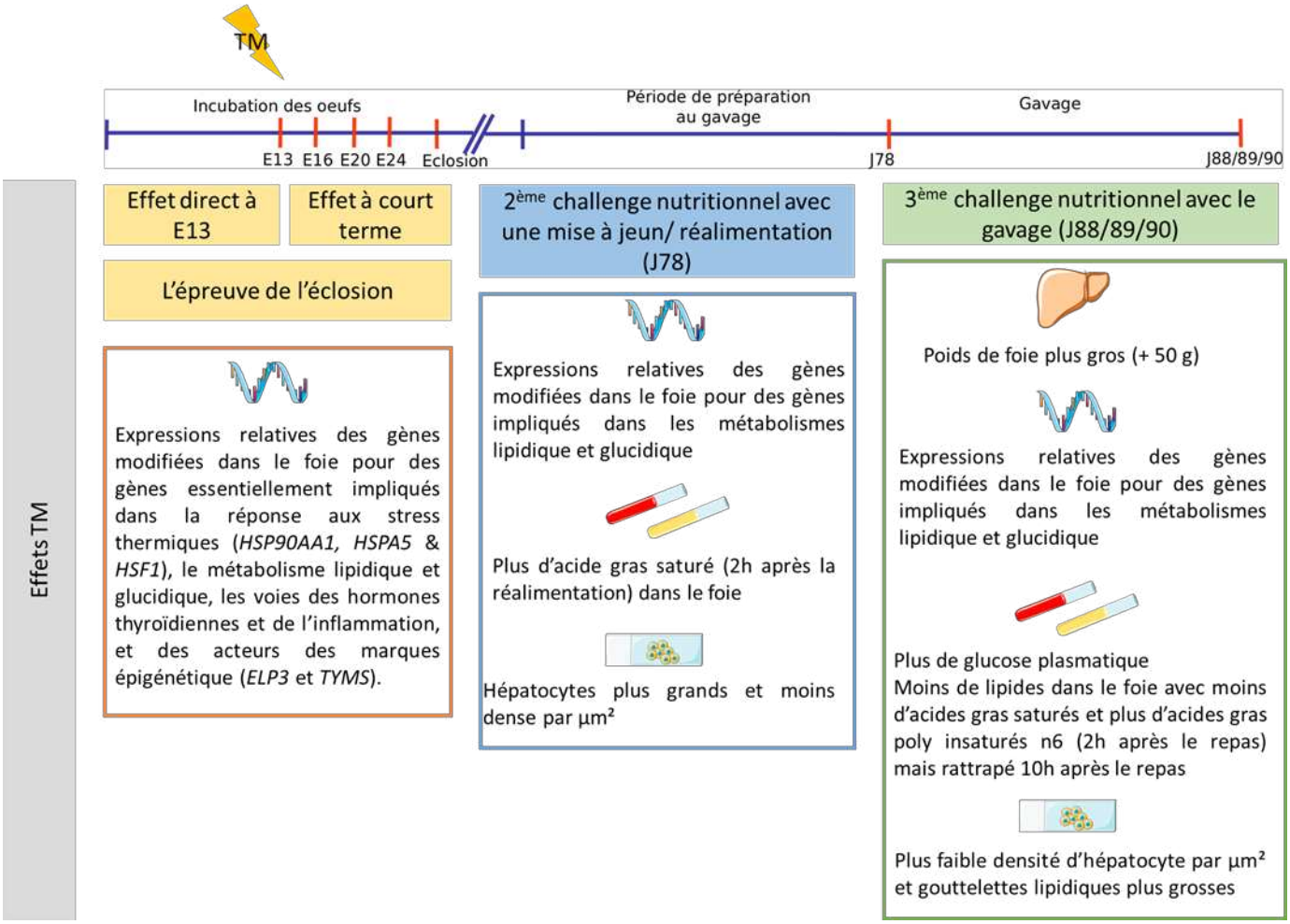


Figure ccl.2. Bilan des différents impacts de la manipulation thermique chez les canards programmés au cours de leur vie

C- Les différents impacts de la manipulation thermique précoce sur le métabolisme hépatique du canard mulard

C-1. Les effets directs de la manipulation thermique chez l'embryon

Tout d'abord, la hausse de température d'incubation est bien « ressentie » directement par les embryons dès la première heure après le changement de température et est attestée par des variations d'expressions relatives de gènes des HSPs (**Figure ccl.2**), et plus particulièrement par la *HSP70*. La *HSP70* est un marqueur de la réponse au stress thermique et elle permet également de protéger les cellules des effets délétères du stress oxydatif (Favatier et al., 1997; Rivera et al., 2005; Xie et al., 2014). La réponse de la *HSP70* face à un stress thermique varie en fonction des études, par exemple sa transcription peut être significativement augmentée après une hausse de température (Mohammad Borhan Al-Zghoul et al., 2019; Lan et al., 2016), comme diminuée chez les poulets (Ncho et al., 2022; Rajkumar et al., 2015; Q. Zhang et al., 2020), et peut concerner ses deux isoformes ce qui n'est pas toujours spécifié dans les études (*HSPA2* et *HSPA5)*. Notre étude confirme que *HSPA2* est significativement augmentée après un stress thermique dans les heures (3h) ou les jours suivants le stress (Lan et al., 2016; Massimino et al., 2021), et met en évidence que la seconde isoforme peut être régulée de manière opposée. Les facteurs de transcription des HSPs sont également modulés par la MT (HSF1 à E24, *HSF3* 1h après la MT), permettant d'initier la transcription des HSPs, comme *HSP70* (Alagar Boopathy et al., 2022; Nakai & Morimoto, 1993; Ogawa et al., 1997). En plus de ces impacts directs, certaines des réponses sont persistantes tout au long de la manipulation thermique comme *HSP90AA1* (E16, E20 et E24), impliquée dans l'organisation des molécules chaperonnes (Flees et al., 2017). **Ces réponses directes des HSPs, nous confirment que ces gènes sont bien des marqueurs de réponse au stress thermique.**

De plus, les réponses transcriptionnelles des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, des hormones thyroïdiennes, de l'inflammation ou encore de l'épigénétique sont également impactées par la MT. Ces impacts se maintiennent tout au long de l'application du stimulus, avec des différences d'expressions relatives de gènes, qui sont visibles à 3, 7 et 11 jours après la première hausse de température ainsi qu'à l'éclosion (**Figure ccl.2**). Ces mêmes métabolismes sont impactés lors d'un stress thermique chez la volaille (Emami et al., 2021; Lan et al., 2016). L'utilisation de la méthode du Fluidigm, nous a permis de nous concentrer sur des gènes cibles, impliqués dans des voies métaboliques d'intérêt. La prochaine étape serait de réaliser de nouvelles cinétiques embryonnaires mais cette fois-ci d'utiliser la technologie du RNAseq (séquençage et quantification de la totalité des ARNs présents) qui permettrait d'avoir une mesure exhaustive de la réponse transcriptionnelle des cellules du foie lors d'un stress thermique, comme réalisé dans l'étude de *Lan et al. (2016)*.

Finalement, cette première étude ciblée sur des gènes candidats nous a permis d'avoir un aperçu des changements métaboliques de l'embryon suite à la hausse des températures, mais des études complémentaires et approfondies (transcriptomiques) seront nécessaires pour mieux caractériser la réponse directe à un stress thermique.

C-2. Effet à long terme de la manipulation thermique embryonnaire : comparaison des deux challenges nutritionnels.

Lors de cette thèse, nous avons testé deux challenges nutritionnels *i.e.* le jeûne/réalimentation et le gavage, pour mettre en évidence l'existence d'une programmation métabolique du foie des canards adultes :

- **Lors d'une réalimentation**, **après une période de mise à jeun**, les animaux âgés de 77 jours présentent une augmentation du poids du foie, passant de 70 à 100 g 4h après la réalimentation, mais cette évolution du poids de foie n'est pas impactée par la MT (**Figure ccl.2**). Cependant, la manipulation thermique impacte significativement la taille des cellules hépatiques et la composition en acides gras du foie. Les canards programmés présentent une forte proportion d'acide gras saturé (C18 :0), un des premiers acides gras synthétisés par la lipogenèse *de novo*, et une plus faible proportion d'acide gras mono et poly-insaturés, produits plus tardifs de la lipogenèse *de novo*. Ces résultats sont complétés par des expressions relatives des gènes impliqués dans les métabolismes lipidique et glucidique significativement plus faibles par rapport au groupe contrôle. Ces résultats suggèrent que la manipulation thermique semble avoir ralenti la réponse du métabolisme lipidique hépatique face à une réalimentation chez les canards programmés.

- Nous avons pu observer une hausse significative du poids de foie 10h après le dernier repas de **gavage** chez les animaux programmés, qui n'était pas encore mesurable 2h après le dernier repas, comparé aux animaux contrôles (**Figure ccl.2**). Cependant, 2h après le dernier repas, l'impact de la manipulation thermique est déjà visible au niveau du plasma, avec plus de glucose circulant, et des réponses transcriptionnelles modifiées liées aux métabolismes lipidique et glucidique.

<u>Hypothèse(s) concernant les mécanismes moléculaires à l'origine du plus fort poids de foie chez les canards programmés.</u>

La surexpression de gènes impliqués dans la synthèse des lipides et l'oxydation des sucres, chez les canards programmés 2h après le dernier repas, va dans le sens de l'engraissement du foie observé 10h après le dernier repas. Dans les précédents résultats du laboratoire (Massimino et al., 2021), peu de gènes semblaient être modulés par la manipulation thermique (6 gènes), pouvant être expliqué par un prélèvement tardif des foies (10h après le dernier repas). Par contre, de nombreuses études travaillant sur les réponses transcriptionnelles suite à un stress thermique montrent une réponse rapide du métabolisme lipidique, chez les volailles (Emami et al., 2021; Lan et al., 2016), comme dans nos résultats liés aux cinétiques embryonnaires. La surexpression des gènes impliqués dans la stéatose hépatiques, 2h après le dernier repas, et le poids de foie qui dépasse celui du groupe contrôle 10h après le dernier repas, suggère comme dans le challenge mise à jeun/réalimentation, un décalage temporel du métabolisme lipidique hépatique chez les canards programmés. Nous savons que l'heure d'abattage des canards après le dernier repas de gavage impacte fortement le poids de foie (Arroyo et al., 2018). Après une première période d'augmentation du poids de foie, le foie finit par se stabiliser avant de baisser et de perdre les lipides nouvellement produits et/ou stockés.

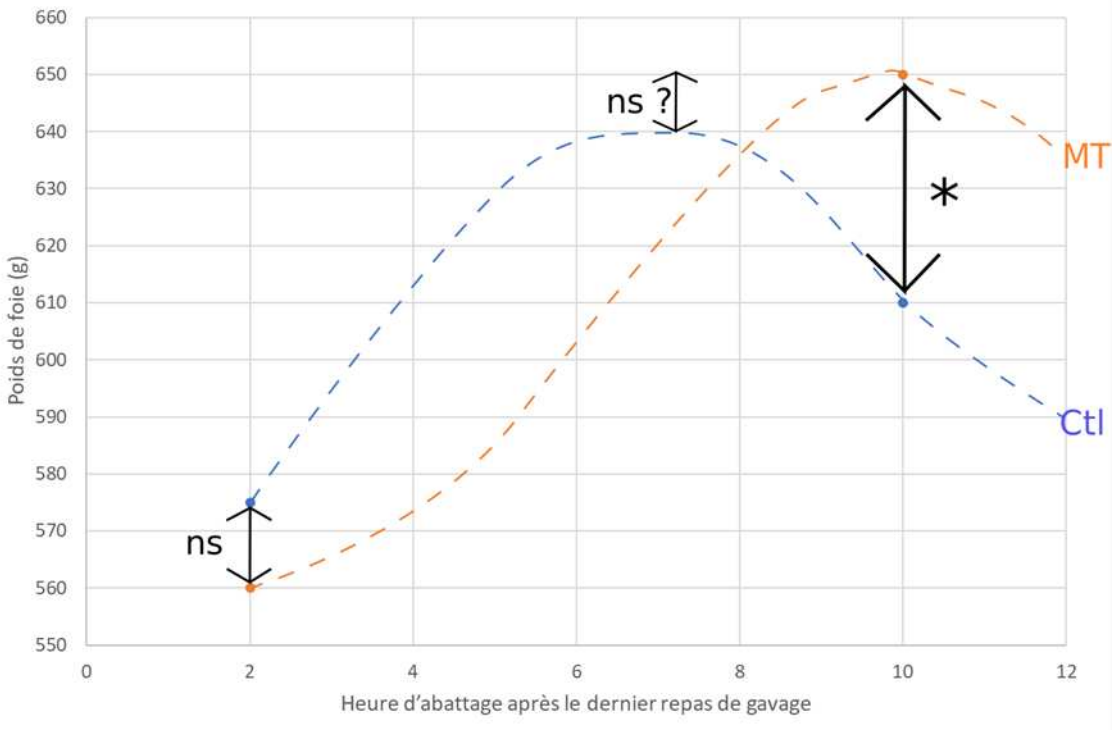


Figure ccl.3. Représentation de l'évolution du poids de foie après le dernier repas et du potentiel décalage entre les deux conditions d'incubation

Le groupe programmé (MT, orange) et le groupe contrôle (Ctl, bleu) présentent des poids de foie égaux 2h après le dernier repas mais des poids significativement différents 10h après le dernier repas.
Les potentielles courbes d'évolution du foie ont été tracée (pointillée) pour illustrer le potentiel décalage entre les deux groupes en lien avec un décalage de la réponse métabolique hépatique.
MT manipulation thermique, Ctl contrôle, ns non significatif, * P value < 0,05

En ayant une réponse tardive de l'engraissement, les foies des canards programmés seraient toujours dans la période de production de lipides au moment de l'abattage, alors que le groupe contrôle se trouverait dans une période de diminution du poids de foie (déstockage des lipides) (**Figure ccl.3**). Ce décalage de réponse chez les canards programmés nous permet donc de supposer que ces canards ne développeraient pas de meilleures capacités à s'engraisser mais plutôt une réponse retardée par rapport au groupe contrôle, entrainant de meilleures performances à l'abattage. Pour étayer ces deux hypothèses, une cinétique de poids et de composition du foie pourrait être réalisée après le dernier repas de gavage pour suivre l'évolution de l'engraissement dans les deux groupes.

Au cours des deux challenges nutritionnels, les réponses métaboliques glucidique et lipidique montrent un fort impact de la MT, se répercutant sur la composition lipidique du foie. Les réponses hépatiques de ces deux métabolismes face à l'un ou l'autre des challenges nutritionnels semblent retardées chez le groupe MT par rapport au groupe contrôle.

C-3. Quels sont les mécanismes potentiels à l'origine de l'effet à long terme de la MT que nous avons observé chez le canard mulard ?

Nous avons pu voir au cours de la thèse qu'une hausse de la température d'incubation engendrait des impacts sur le développement embryonnaire (accélération de l'embryogenèse, mortalité…), les performances à l'éclosion (sexe ratio, poids) mais également des performances à plus long terme comme la réponse à un challenge nutritionnel (mécanismes lipidique et glucidique retardés, hausse du poids de foie gras). Ces changements de phénotypes observés montrent qu'une réelle programmation des canards mulards s'est produite lors de la modification de température d'incubation. La mise en place de la programmation est théorisée à l'aide de la règle des « 4R » de *Vaiserman (2018)* : réception du stimulus (*Receive*), enregistrement du stimulus (*Record*), se souvenir du stimulus (*Remember*) et potentiellement révéler ce stimulus (*Reveal*). L'un des principaux mécanismes de la programmation est celui basé sur l'épigénétique et la persistance de certaines de ces marques tout le long de la vie de l'animal (Tarry-Adkins & Ozanne, 2011).

Tout d'abord, nous avons cherché à caractériser les deux premières étapes (réception et enregistrement) à l'aide d'une cinétique embryonnaire transcriptionnelle. L'heure suivant la hausse de température, 50 % des gènes impactés par cette hausse de température sont des HSPs, marqueurs des stress thermiques (Rivera et al., 2005; Xie et al., 2014), ce qui confirme la réception du stimulus par les embryons. Le stimulus doit par la suite être enregistré et cela peut passer par des changements organisationnels tissulaires et organiques, ou des modifications développementales du système immunitaire, du système hormonal, des télomères ou du microbiote intestinal, ou encore par l'apparition de marques épigénétiques (Lucas, 1991; Vaiserman et al., 2018). En suivant l'effet cumulatif de la MT (E16, E20, E24), les HSPs ne représentaient plus qu'une petite partie des gènes significativement impactés et des métabolismes comme celui des lipides, de l'inflammation, de la prolifération cellulaire, des voies thyroïdiennes ou encore de l'épigénétique prenaient une part plus importante. L'épigénétique comprend de nombreux mécanismes sous-jacents comme la méthylation de l'ADN ou des histones, nécessitant l'activation d'autres métabolismes comme celui des mono-carbones (groupe méthyl) (Clare et al., 2019). La synthèse de ces mono carbones implique un grand nombre d'acteurs comme le gène *TYMS* (Clare et al., 2019; Coppedè et al., 2019). Un autre mécanisme de l'épigénétique est illustré avec le gène *ELP3* qui catalyse l'addition de fonction acétyl sur les histones, et activant la transcription des gènes ciblés (Cai et al., 2022; Winkler et al., 2002). Dans notre étude, l'expression relative de *ELP3* est diminuée alors que celle de *TYMS* est augmentée chez les embryons programmés. Ces modulations d'acteurs impliqués dans la mise en place de marques épigénétiques ont déjà pu être observées chez la volaille lors d'une MT (DNMT), (Yan et al., 2015) (David et al., 2019; Vinoth et al., 2017) et suggèrent que le stimulus thermique pourrait bien être enregistré de cette manière. Les marques épigénétiques devront maintenant être approfondies à l'aide d'études de méthylation ciblée au niveau du promoteur des gènes impactés par la MT, ou en mesurant la méthylation globale de l'ADN génomique associée à des études transcriptomiques (RNAseq).

Les futures études sur les manipulations thermiques chez le canard mulard devront inclure des analyses complémentaires et générales des réponses transcriptionnelles (RNAseq) mais également des marques épigénétiques (méthylation globale ou ciblée de l'ADN), pour suivre leur modulation au cours du temps. L'optimisation de la programmation nécessite encore un approfondissement des connaissances vis-à-vis de ces mécanismes.

D. Des pistes pour le développement de nouveaux biomarqueurs non invasifs en relation avec l'engraissement hépatique voire avec la programmation thermique chez le canard

Nous avons pu montrer que la chémérine et les endocannabinoïdes plasmatiques sont impactés par le gavage, avec une hausse significative et très corrélée avec le poids de foie pour la chémérine et une modulation des endocannabinoïdes plus variable (1-2 AG diminue et AEA augmente) et globalement non corrélée au poids de foie. De façon intéressante, le ratio plasmatique de l'AEA est non seulement augmenté par le gavage, mais également par la manipulation thermique.

La **chémérine plasmatique** est fortement liée à la prise de masse du foie, avec une hausse significative de sa quantité circulante pour les deux challenges nutritionnels. La chémérine plasmatique avait pu être corrélée positivement à l'engraissement chez l'humain et le canard de Barbarie (Bozaoglu et al., 2007; Mellouk et al., 2019), alors que chez la dinde et les reproductrices de poulet de chair une corrélation négative avait été observée (Diot et al., 2015; Mellouk, Ramé, Barbe, et al., 2018). **Nos observations chez le canard mulard suggèrent que la chémérine serait plutôt un marqueur de l'augmentation du poids du foie, sans lien direct avec son engraissement, lors des challenges nutritionnels**. Au cours de notre étude, nous nous sommes concentrés sur la chémérine plasmatique, or l'origine de sa synthèse n'a pas été identifiée. Il est probable que le foie ne soit pas le site majeur de la synthèse de la chémérine (Döcke et al., 2013), mais que ce soit plutôt le tissu adipeux (Bozaoglu et al., 2007; Goralski et al., 2007). Afin de comprendre **le lien entre la chémérine plasmatique et le poids de foie, il serait donc intéressant dans un premier temps de déterminer le tissu producteur de la chémérine plasmatique.** Les récepteurs de la chémérine dans le foie ne répondent pas de la même façon au cours de deux challenges nutritionnels, avec une augmentation après le gavage et pas d'impact lors de la réalimentation. Cette différence de réponse au niveau de la transcription des récepteurs pourrait être liée aux niveaux de chémérine circulante, de 250 ng/µL chez les canards gavés contre 35 à 50 ng/µL chez les canards réalimentés.

Les **endocannabinoïdes** sont significativement modulés par le régime alimentaire (rationné ou gavé), avec pour les deux eCBs principaux, une hausse significative de AEA et une baisse de 1-2 AG chez les canards gavés par rapport aux canards rationnés. Toutefois, aucune corrélation robuste n'a pu être mise en évidence entre le taux plasmatique des eCBs et le poids ou l'engraissement du foie, contrairement aux études précédentes chez les mammifères (Jeong et al., 2008; Jourdan et al., 2010; Osei-Hyiaman et al., 2005). Seul le groupe MT programmé et gavé (10h) a permis de corréler le taux d'AEA avec le poids de foie, suggérant **que les impacts de la manipulation thermique après gavage pourraient être mesurés en suivant les ratios des AEA dans le sang, faisant d'eux des biomarqueurs non invasifs de la programmation dans ce contexte.**

En conclusion, ces deux études préliminaires ont montré qu'il était difficile de trouver des biomarqueurs spécifiques à l'engraissement du foie, même lorsque leur modulation après gavage est forte, et même lorsque leur taux plasmatique est fortement corrélé au poids de foie (chémérine). Toutefois, nous avons mis en évidence quelques impacts de la manipulation thermique sur la chémérine (récepteurs) ou les endocannabinoïdes plasmatiques (AEA), confirmant une réelle programmation métabolique des canards. De nombreuses pistes de recherches restent à explorer pour savoir si ces deux molécules pourraient devenir des biomarqueurs non-invasifs de la programmation du métabolisme hépatique, à différents moments de vie comme la période d'élevage, ou au cours d'autres challenges alimentaires (mise à jeun/réalimentation).

E. Le protocole expérimental « mise à jeun/réalimentation » : potentiel nouveau modèle d'étude pour réduire les recherches avec gavage chez le canard ?

E.1-Comparaison des données obtenues lors de la mise à jeun/réalimentation et du gavage.

Cette étude « mise à jeun/réalimentation » réalisée à l'origine pour pallier un risque d'abattage massif face à l'épidémie de grippe aviaire en 2020, nous a permis de tester un nouveau modèle d'étude expérimentale de la programmation thermique. Comme vu précédemment, différents impacts de la MT sont mesurables au cours de ce challenge nutritionnel et les réponses du canard face à la période de jeûne/réalimentation semblent se rapprocher de celles observées lors du gavage (**Chp 4**).

Comme le gavage, la mise à jeun/réalimentation permet d'augmenter significativement le poids de foie dès 2h après le repas, confirmant les données provenant d'études faites chez les mammifères et les oiseaux (Bazhan et al., 2019; De Beer et al., 2007; Palou et al., 2008; J. S. Wang et al., 2020). Cette prise de masse rapide du foie implique essentiellement le stockage du glycogène (Bazhan et al., 2019; Chen et al., 2021; De Beer et al., 2007; Geisler et al., 2016; A. G. Goodridge, 1968; Palou et al., 2008).

Nous avons montré que la réalimentation après une période de jeûne augmente le taux de glycogène hépatique après 2h, tandis que la proportion de lipides totaux dans le foie reste stable jusque 4h après le repas (autour de 6 %), contrairement aux canards gavés chez qui le taux de lipides hépatiques peut représenter jusqu'à plus de 50 % du poids de foie en fin de gavage (Bonnefont et al., 2019; Chartrin, Bernadet, Guy, Mourot, Hocquette, Rideau, Duclos, et al., 2006; Hermier et al., 2003; Marie-Etancelin et al., 2011). Cependant, une étude chez la volaille a pu montrer que l'augmentation des lipides dans le foie était mesurable 12h après une réalimentation (De Beer et al., 2007) alors que les réponses transcriptionnelles du métabolisme lipidiques peuvent être mesurées bien plus précocement (Bazhan et al., 2019; Chen et al., 2021; Donaldson, 1990; Palou et al., 2008). Ces observations suggèrent que notre protocole pourrait être optimisé pour obtenir une hausse significative de la quantité de lipides hépatiques après une réalimentation. Nos prochaines études tenteront dans cet objectif de prolonger la période de réalimentation.

De façon intéressante, l'expression relative des gènes impliqués dans le métabolisme est globalement diminuée dans les premières heures suivant la réalimentation chez les animaux programmés comparés aux animaux contrôles, mais l'écart semble diminuer au cours du temps (4h après la réalimentation, cette baisse n'est plus visible). **Cette observation, associée à la hausse des acides gras saturés et la baisse des acides gras insaturés 4h après le dernier repas, corrobore l'hypothèse d'un décalage de réponse chez les animaux programmés déjà évoquée lors de l'analyse des résultats de l'expérimentation avec gavage.** De la même manière, le prolongement de la période de réalimentation permettrait de vérifier cette hypothèse.

E2. Utilisation du modèle « mise à jeun/réalimentation » pour étudier la programmation chez le canard ?

Ce modèle pourrait devenir un outil pour optimiser plus rapidement les MTs (impacts mesurables rapidement et similaires à ceux observés lors du gavage) sans avoir à pousser les essais jusqu'à l'étape de gavage (étape contraignante pour le bien-être animal et les autorisations d'essais). Effectivement, la recherche impliquant des animaux à des fins scientifiques se concentre sur le respect de la règle des « 3R (*replace, reduce, refine*) », qui consiste à remplacer le modèle animal par des méthodes alternatives (ex : modélisation, culture cellulaire), à réduire le nombre d'animaux au maximum et à affiner les pratiques pour respecter le bien-être animal. Le gavage est une étape cruciale dans la filière palmipède à foie gras, cependant en expérimentation cette étape présente une forte variabilité (grand nombre d'animaux nécessaire) et correspond à deux semaines d'alimentation forcée (pas optimal pour le bien-être). *A contrario*, le modèle mise à jeun/réalimentation ne montre pas de grande variabilité et n'implique qu'une mise à jeun de moins de 24h des animaux avant leur réalimentation, correspondant à déjà à l'étape de préparation au gavage.

Dans un premier temps, ce nouveau modèle pourrait être optimisé par le moment de sa mise en place, suite à l'influenza aviaire nous avons réalisé l'étude en fin de période de finition, mais il est envisageable de la réaliser en début de vie, en milieu d'élevage, en début de période de finition et autres. De plus, des impacts de la manipulation thermique ont pu être observés, mais nous pouvons nous demander si des impacts d'autres programmation (ex : nutritionnel, transgénérationnel) pourraient être révélés par ce modèle. De plus, nous pouvons jouer sur la durée de jeûne, la durée du repas mais également suivre les réponses pendant plusieurs cycles de mise à jeun/réalimentation afin de se rapprocher encore plus du challenge gavage.

Ce modèle est donc prometteur pour la suite des études sur la programmation car il permettrait d'approfondir les impacts à plus ou moins long-terme avec de nouveaux indicateurs (épigénétique, biomarqueur, nouveaux tissus…), et d'accélérer l'optimisation des conditions d'application des stimulus sans avoir à passer par une étape de gavage. Par ailleurs, si nous parvenions à trouver un protocole de programmation permettant d'optimiser au maximum la réponse métabolique vers un engraissement du foie des canards, il serait envisageable de l'utiliser dans d'autres modèles de production, et notamment sans gavage pour développer de nouvelles méthodes alternatives.

F- Perspectives pour la filière des palmipèdes et utilisation du concept de programmation

La manipulation thermique permet d'augmenter le poids de foie d'environ 50 g par rapport au groupe contrôle, dans notre étude et celle du précédent doctorant. En sachant que la filière de production de foie gras cherche à produire des foies de 500 g, il pourrait être envisageable de réduire la période de gavage d'un à deux repas, en modifiant les conditions d'incubation des œufs. En réduisant le gavage, le bien-être animal et les coûts de production pourraient être améliorés. Cependant, une estimation des coûts énergétiques d'une hausse de température au niveau des éclosoirs devrait être réalisée pour confirmer la rentabilité du changement. D'autre part, une cinétique de mesure du poids de foie pendant la période de gavage entre un groupe contrôle et un groupe programmé semble obligatoire avant toute chose. Effectivement, nous avons pu montrer une plus forte production du foie gras mais l'hypothèse d'un simple décalage temporel du métabolisme reste possible. Nous avons également pu observer que la réponse des canards vis-à-vis de la programmation était essai-dépendante et induisait de ce fait trop de potentielle variation à la fin de la période de gavage**. Même si la période de gavage peut être réduite en utilisant la manipulation thermique précoce, il n'est pas possible que la manipulation thermique, seule, puisse remplacer la pratique du gavage.**

D'autres stimuli embryonnaires pourraient être appliqués comme les injections dans le l'œuf, pour potentiellement avoir une programmation nutritionnelle des embryons et améliorer leurs réponses lors des différentes prises alimentaires, ou encore travailler avec des manipulations thermiques impliquant des baisses de la température d'incubation des œufs (Andrieux et al., 2022). Les recherches dans la filière palmipèdes à foie gras se concentrent sur d'autres pistes comme le type d'aliment, la photopériode ou encore la température lors de l'élevage et gavage des canards (Litt et al., 2021). La combinaison de plusieurs de ces paramètres d'élevage (température, photopériode, disponibilité des aliments) est déjà utilisée pour favoriser l'engraissement spontané des oies qui montre des résultats variables entre les essais et des pertes des qualités organoleptiques du foie gras (Fernandez et al., 2019; Knudsen et al., 2018). La manipulation thermique embryonnaire pourrait être une autre façon de favoriser l'engraissement spontané des oies et canards dans le futur.

Il serait également envisageable de combiner la manipulation thermique embryonnaire, pendant la période d'incubation, avec d'autres outils à des périodes d'élevage différentes, comme la période de finition. Nous avons pu voir que la réponse des canards à une mise à jeun/réalimentation était rapide et surtout impactée par la programmation. Jouer sur la durée de jeûne et/ou durée d'alimentation ou encore le nombre de cycle mise à jeun/réalimentation pourraient induire des réponses plus fortes de l'engraissement du foie lors de la réalimentation, ce qui pourrait être des pistes pour une meilleure préparation des animaux au gavage ou bien un entrainement à des stimuli pour favoriser une forme d'engraissement spontanée.

Finalement, les pistes de recherche afin d'améliorer la filière palmipède à foie gras sont encore nombreuses. Notre intérêt pour la manipulation thermique est cohérent avec les résultats observés en fin de gavage, cependant il serait intéressant de la combiner avec une autre méthode comme les challenges mise à jeun/réalimentation qui pourraient optimiser la réponse au gavage des canards.

Conclusion générale

Mon travail a permis de répondre aux grands objectifs posés en début de thèse sur l'impact d'une manipulation thermique sur le métabolisme hépatique chez le canard. Tout d'abord, nous avons ainsi pu optimiser la manipulation thermique en réduisant la fenêtre de la hausse de température à 10 jours sans impacter l'éclosabilité du groupe programmé tout en maintenant la hausse de production de foie gras et sa qualité finale. Les différents essais réalisés nous ont également permis d'identifier des périodes embryonnaires dites « critiques », pendant lesquelles un changement de condition d'incubation peut engendrer de plus fortes mortalités. Cependant, de nombreuses optimisations sont toujours possibles et pourront être testées dans le futur pour répondre à de nouvelles problématiques.

A l'aide de cinétiques embryonnaires, nous avons essayé de comprendre l'impact direct de la hausse de température sur les embryons et leurs réponses métaboliques hépatiques. Cette étude nous a permis de mettre en évidence des métabolismes qui répondent en priorité au stress thermique, comme les HSPs (*heat shock protein*), mais aussi le métabolisme lipidique, les acteurs de l'épigénétique, des voies des hormones thyroïdiennes ou encore de l'inflammation. Ces études pourraient être complétées par des analyses plus larges qui pourraient révéler de nouveaux acteurs de la programmation.

Les impacts à plus long termes de la manipulation thermique (i.e. programmation) ont pu être étudiés au cours de deux challenges alimentaires. Les deux challenges montrent des réponses similaires de la programmation thermique avec un potentiel décalage dans le temps de l'engraissement du foie, du groupe programmé par rapport au groupe contrôle. De plus, nous avons pu montrer qu'un nouveau modèle d'étude (mise à jeun/réalimentation) pourrait être utile pour optimiser des protocoles de programmation (thermique, nutritionnelle) plus rapidement qu'un protocole allant jusqu'au gavage, et d'obtenir un aperçu des potentielles réponses métaboliques du canard dans le contexte du gavage ou d'engraissement spontané.

Dans un dernier temps, nous avons souhaité compléter l'étude avec deux potentiels marqueurs de l'engraissement du foie. Nous avons pu mettre en évidence que la chémérine plasmatique pourrait être un biomarqueur non-invasif de l'évolution du poids du foie, lors du gavage. Un endocannabinoïde (AEA) a également pu être identifié comme marqueur plasmatique potentiellement lié à la programmation thermique.

La compréhension des mécanismes sous-jacents de la programmation thermique se délie progressivement mais des analyses plus larges (RNAseq, méthylation de l'ADN) permettront dans le futur d'approfondir nos connaissances. De plus, pousser l'étude de l'impact de la manipulation thermique à de nouveaux tissus comme le gras abdominal, le muscle ou encore le cerveau pourrait être prometteur pour continuer à étudier la programmation et approfondir nos connaissances sur de nouveaux biomarqueurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abd El-Hack, M. E., Hurtado, C. B., Toro, D. M., Alagawany, M., Abdelfattah, E. M., & Elnesr, S. S. (2019). Impact of environmental and incubation factors on hatchability of duck eggs. *Biological Rhythm Research*, *00*, 1–10. https://doi.org/10.1080/09291016.2019.1628394

Adu-Asiamah, P., Zhang, Y., Amoah, K., Leng, Q. Y., Zheng, J. H., Yang, H., Zhang, W. L., & Zhang, L. (2021). Evaluation of physiological and molecular responses to acute heat stress in two chicken breeds. *Animal*, *15*(2), 100106. https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100106

Agreste. (2021). *12-Produits agroalimentaires*.

Al-Rukibat, R. K., Al-Zghoul, M. B., Hananeh, W. M., Al-Natour, M. Q., & Abu-Basha, E. A. (2016). Thermal manipulation during late embryogenesis: Effect on body weight and temperature, thyroid hormones, and differential white blood cell counts in broiler chickens. *Poultry Science Association Inc.*, *96*(1), 234–240. https://doi.org/10.3382/ps/pew298

Al-Zghoul, M. B., Sukker, H., & Ababneh, M. M. (2019). Effect of thermal manipulation of broilers embryos on the response toheat-induced oxidative stress. *Poultry Science*, *98*(2), 991–1001. https://doi.org/10.3382/ps/pey379

Al-Zghoul, Mohammad Borhan, Ismail, Z. B., Dalab, A. E. S., Al-Ramadan, A., Althnaian, T. A., Al-ramadan, S. Y., Ali, A. M., Albokhadaim, I. F., Al Busadah, K. A., Eljarah, A., Jawasreh, K. I., & Hannon, K. M. (2015). Hsp90, Hsp60 and HSF-1 genes expression in muscle, heart and brain of thermally manipulated broiler chicken. *Research in Veterinary Science*, *99*, 105–111. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.12.014

Al-Zghoul, Mohammad Borhan, Saleh, K. M., & Ababneh, M. M. K. (2019). Effects of pre-hatch thermal manipulation and post-hatch acute heat stress on the mRNA expression of interleukin-6 and genes involved in its induction pathways in 2 broiler chicken breeds. *Poultry Science*, *98*(4), 1805–1819. https://doi.org/10.3382/ps/pey499

Al Sardary, S., & Mohammad, S. (2016). Effect of Thermal Manipulation during Embryogenesis on Hatching Traits. *International Journal of Agricultural Science*, *1*(3), 190–195.

Alagar Boopathy, L. R., Jacob-Tomas, S., Alecki, C., & Vera, M. (2022). Mechanisms tailoring the expression of heat shock proteins to proteostasis challenges. *Journal of Biological Chemistry*, *298*(5), 101796. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101796

Alizadeh, A., Zendehdel, M., Babapour, V., Charkhkar, S., & Hassanpour, S. (2015). Role of cannabinoidergic system on food intake in neonatal layer-type chicken. *Veterinary Research Communications*, *39*(2), 151–157. https://doi.org/10.1007/s11259-015-9636-3

Andrieux, C., Biasutti, S., Barrieu, J., Morganx, P., Morisson, M., Coustham, V., Panserat, S., & Houssier, M. (2021). Identification of Different Critical Embryonic Periods to Modify Egg Incubation Temperature in Mule Ducks. *Animal Journal*, *In Press*.

Andrieux, C., Petit, A., Collin, A., Houssier, M., Métayer-coustard, S., Panserat, S., & Pitel, F. (2022). Early Phenotype Programming in Birds by Temperature and Nutrition : A Mini-Review. *Frontiers in Animal Science*, *2*(January), 1–8. https://doi.org/10.3389/fanim.2021.755842

Annabelle, T., Karine, R., Marie-Dominique, B., Karine, G., & Stéphane, D. (2017). Pre- and post-prandial expression of genes involved in lipid metabolism at the end of the overfeeding period of mule ducks. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *438*(1–2), 111–121. https://doi.org/10.1007/s11010-017-3118-6

Applegate, T. J., Harper, D., & Lilburn, M. S. (1998). Effect of Hen Production Age on Egg Composition and Embryo Development in Commercial Pekin Ducks. *Poultry Science*, *77*(11), 1608–1612. https://doi.org/10.1093/ps/77.11.1608

Ar, A. (1991). Egg water movements during incubation. In S. G. Tullett (Ed.), *Avian incubation* (pp. 157–173). Butterworth & Co (Publishers) Ltd.

Ar, Amos, & Rahn, H. (1980). Water in the avian egg overall budget of incubation. *Ameri. Zool.*, *20*, 373–384. https://doi.org/10.1093/icb/20.2.373

Arroyo, J., Dubois, J. P., Lavigne, F., Brachet, M., & Fortun-Lamothe, L. (2016). Effects of replacing corn with sorghum on the performance of overfed mule ducks. *Poultry Science*, *95*(6), 1304–1311. https://doi.org/10.3382/ps/pew072

Arroyo, J., Molette, C., Lavigne, F., Knudsen, C., Deneufbourg, C., & Fortun-Lamothe, L. (2018). Influence of the corn form in the diet and length of fasting before slaughter on the performance of overfed mule ducks. *Poultry Science*, *98*(2), 753–760. https://doi.org/10.3382/ps/pey432

Auguet, T., Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Martinez, S., Porras, J. A., Aragonès, G., Sabench, F., Hernandez, M., Aguilar, C., Sirvent, J. J., Del Castillo, D., & Richart, C. (2014). Altered fatty acid metabolism-related gene expression in liver from morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(12), 22173–22187. https://doi.org/10.3390/ijms151222173

Baarendse, P. J. J., Debonne, M., Decuypere, E., Kemp, B., & Van Den Brand, H. (2007). Ontogeny of avian thermoregulation from a neural point of view. *World's Poultry Science Journal*, *63*(2), 267–276. https://doi.org/10.1017/S0043933907001456

Babilié, R., & Auvergne, A. (1984). Performances de gavage et de découpe de différents types génétiques de canards soumis à des normes d'élevages particulières. *Document Technique CRAMP*, 20.

Babilié, R., Auvergne, A., Andrade, V., Hérault, F., Bénard, G., Bouillier-Oudot, M., & Manse, H. (1998). Réversibilité de la stéatose hépatique chez le canard mulard. *2ème Journée de La Recherche Palmipèdes à Foie Gras*, 107–110.

Baéza, E., Marie-Etancelin, C., Davail, S., & Diot, C. (2013). La stéatose hépatique chez les palmipèdes. *Productions Animales*.

Baéza, E., Rideau, N., Chartrin, P., Davail, S., Hoo-Paris, R., Mourot, J., Guy, G., Bernadet, M. D., Juin, H., Meteau, K., & Hermier, D. (2005). Canards de Barbarie, Pékin et leurs hybrides: Aptitude à l'engraissement. *Productions Animales*, *18*(2), 131–141.

Baggott, G. K. (2009). Development of extra-embryonic membranes and fluid compartments. *Avian Biology Research*, *2*(1–2), 21–26. https://doi.org/10.3184/175815509X430381

Barbe, A., Mellouk, N., Ramé, C., Grandhaye, J., Staub, C., Venturi, E., Cirot, M., Petit, A., Anger, K., Chahnamian, M., Ganier, P., Callut, O., Cailleau-Audouin, E., Metayer-Coustard, S., Riva, A., Froment, P., & Dupont, J. (2020). A grape seed extract maternal dietary supplementation in reproductive hens reduces oxidative stress associated to modulation of plasma and tissue adipokines expression and improves viability of offsprings. *PLoS ONE*, *15*(4), 1–24. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231131

Barker, D. J. P. (1995). The fetal and infant origins of disease. *European Journal of Clinical Investigation*, *25*, 457–463. https://doi.org/BARKER, D. J. P. (1995). The fetal and infant origins of disease. European Journal of Clinical Investigation, 25(7), 457–463. doi:10.1111/j.1365-2362.1995.tb01730.x

Barott, H. G. (1937). Effect of temperature, humidity and other factors on the hatch of hens' eggs and on energy metabolism of chick embryos. *Technical Bulletin No 553, United States*

Department of Agriculture, *553*, 1–46. https://www.hatchability.com/Barott.pdf

Barrieu, J., Laverze, J.-B., Martin, X., Morisson, M., Molette, C., Gilbert, H., & Cobo, E. (2015). Mise au point d'une grille de notation permettant d'évaluer la qualité du caneton à la naissance. *Onzièmes Journées de La Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras*, 944–949.

Batellier, F., Govoroun, M., & Brillard, J. P. (2004). Sex-ratio chez les oiseaux sauvages et domestiques. *Productions Animales*, *17*(5), 365–372. https://doi.org/10.20870/productions-animales.2004.17.5.3609

Batellier, F., Marchal, F., Scheller, M. F., Gautron, J., Sellier, N., Taouis, M., Monbrun, C., Vignal, A., & Brillard, J. P. (2004). Sex ratios in mule duck embryos at various stages of incubation. *Theriogenology*, *61*(2–3), 573–580. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00208-5

Baudonnet-Lenfant, C., Auvergne, A., & Babilé, R. (1991). Influence de la durée de jeûne avant l'abattage et du poids à la mise en gavage des canards de Barbarie sur la composition chimique hépatique. *Annales de Zootechnie*, *40*(3), 161–170. https://doi.org/10.1051/animres:19910303

Bazhan, N., Jakovleva, T., Feofanova, N., Denisova, E., Dubinina, A., Sitnikova, N., & Makarova, E. (2019). Sex Differences in Liver, Adipose Tissue, and Muscle Transcriptional Response to Fasting and Refeeding in Mice. *Cells*, *8*(12), 1–18. https://doi.org/10.3390/cells8121529

Bazwinsky-Wutschke, I., Zipprich, A., & Dehghani, F. (2019). Endocannabinoid system in hepatic glucose metabolism, fatty liver disease, and cirrhosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(10). https://doi.org/10.3390/ijms20102516

Bedu, E., Chainier, F., Sibille, B., Meister, R., Dallevet, G., Garin, D., & Duchamp, C. (2002). Increased lipogenesis in isolated hepatocytes from cold-acclimated ducklings. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *283*(5 52-5), 1245–1253. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00681.2001

Bénard, G., Prehn, D., Bengone, T., Jouglar, J. Y., & Durand, S. (1998). Démonstration de la réversibilité de la stéatose hépatique obtenue par gavage de canards mulards. Etude réalisée sur trois cycle de gavage-dégavage. *3ème Journal de La Recherche Palmipèdes à Foie Gras*, 49–52.

Bénard, Geneviève, Bengone, T., Prehn, D., DURAND, S., Labie, C., & Bernard, P. (2006). Contribution à l ' étude de la physiologie du canard en gavage : étude de la stéatose hépatique. *Bulletin de l'académie Des Vétérinaires de France*, *1*, 43–55.

Benjamins, J. A., Murphy, E. J., & Seyfried, T. N. (2012). Lipids. *Basic Neurochemistry*, 81–100. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00005-5

Bernadet, M.-D. (2018). Techniques Elevage Effet d ' un passage en claustration instantanée sur les performances zootechniques et comportementales du canard mulard en élevage Techniques Elevage. *Technique d'élevage*, 1–4.

Bernardi, O., Estienne, A., Reverchon, M., Bigot, Y., Froment, P., & Dupont, J. (2021). Adipokines in metabolic and reproductive functions in birds: An overview of current knowns and unknowns. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *534*, 111370. https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111370

Berradi, H., Taouis, M., Cassy, S., & Rideau, N. (2005). Glucokinase in chicken (Gallus gallus). Partial cDNA cloning, immunodetection and activity determination. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *141*(2), 129–139. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.02.006

Bhanja, S. K., Devi, C. A., Panda, A. K., & Sunder, G. S. (2009). Effect of post hatch feed deprivation on yolk-sac utilization and performance of young broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *22*(8), 1174–1179. https://doi.org/10.5713/ajas.2009.80528

Bird, J. K., Calder, P. C., & Eggersdorfer, M. (2018). The role of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease prevention, and interactions with statins. *Nutrients*, *10*(6). https://doi.org/10.3390/nu10060775

Boleli, I. C., Morita, V. S., Matos, J. B., Thimotheo, M., & Almeida, V. R. (2016). Poultry egg incubation: Integrating and optimizing production efficiency. *Brazilian Journal of Poultry Science*, *18*(Special Issue 2), 1–16. https://doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0292

Bonnefont, C. M. D., Molette, C., Lavigne, F., Manse, H., Bravo, C., Lo, B., Rémignon, H., Arroyo, J., & Bouillier-Oudot, M. (2019). Evolution of liver fattening and foie gras technological yield during the overfeeding period in mule duck. *Poultry Science*, *98*(11), 5724–5733. https://doi.org/10.3382/ps/pez359

Bozaoglu, K., Bolton, K., McMillan, J., Zimmet, P., Jowett, J., Collier, G., Walder, K., & Segal, D. (2007). Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology*, *148*(10), 4687–4694. https://doi.org/10.1210/en.2007-0175

Braun, E. J., & Sweazea, K. L. (2008). Glucose regulation in birds. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *151*(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.05.007

Brun, J. M., Richard, M. M., Marie-Etancelin, C., Rouvier, R., & Larzul, C. (2005). Le canrd mulard: déterminisme génétique d'un hybride intergénérique. *Productions Animales*, *18*(5), 295–308.

Byerly, T. C., & Jull, M. A. (1935). Sex Ratio and Embryonic Mortality in the Domestic Fowl. *Poultry Science*, *14*(4), 217–220. https://doi.org/10.3382/ps.0140217

Cai, Q., Wang, J., Xie, J., Jiang, D., & Keyhani, N. O. (2022). The Elongator Subunit Elp3 Regulates Development, Stress Tolerance, Cell Cycle, and Virulence in the Entomopathogenic Fungus Beauveria bassiana. *Journal of Fungi*, *8*(8), 834. https://doi.org/10.3390/jof8080834

Carvalho, A. V., Couroussé, N., Crochet, S., & Coustham, V. (2019). Identification of reference genes for quantitative gene expression studies in three tissues of japanese quail. *Genes*, *10*(3). https://doi.org/10.3390/genes10030197

Carvalho, A. V., Hennequet-Antier, C., Crochet, S., Bordeau, T., Couroussé, N., Cailleau-Audouin, E., Chartrin, P., Darras, V. M., Zerjal, T., Collin, A., & Coustham, V. (2020). Embryonic thermal manipulation has short and long-term effects on the development and the physiology of the Japanese quail. *PLoS ONE*, *15*(1), 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227700

Chartrin, P., Bernadet, M. D., Guy, G., Mourot, J., Duclos, M. J., & Baéza, E. (2006). The effects of genotype and overfeeding on fat level and composition of adipose and muscle tissues in ducks. *Animal Research*, *55*(3), 231–244. https://doi.org/10.1051/animres:2006011

Chartrin, P., Bernadet, M. D., Guy, G., Mourot, J., Hocquette, J. F., Rideau, N., Duclos, M. J., & Baéza, E. (2006). Does overfeeding enhance genotype effects on liver ability for lipogenesis and lipid secretion in ducks? *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *145*(3), 390–396. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.07.014

Chartrin, P., Bernadet, M., Guy, G., Mourot, J., Hocquette, J., Rideau, N., Jacques, M., & Baéza, E. (2006). Does overfeeding enhance genotype effects on energy metabolism and lipid deposition in breast muscle of ducks ? *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*, *145*, 413–418. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.07.024

Chen, Z., Xing, Y., Fan, X., Liu, T., Zhao, M., Liu, L., Hu, X., Cui, H., Geng, T., & Gong, D. (2021). Fasting and refeeding affect the goose liver transcriptome mainly through the ppar signaling pathway. *Journal of Poultry Science*, *58*(4), 245–257. https://doi.org/10.2141/jpsa.0200095

Cherian, G. (2015). Nutrition and metabolism in poultry: Role of lipids in early diet. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *6*(1). https://doi.org/10.1186/s40104-015-0029-9

Cherian, G., Ai, W., & Goeger, M. P. (2005). Maternal dietary conjugated linoleic acid alters hepatic triacylglycerol and tissue fatty acids in hatched chicks. *Lipids*, *40*(2), 131–136. https://doi.org/10.1007/s11745-005-1367-3

Chevalet, P., Fournel, S., Giraud, N., Gros, F., Laurenti, P., Pradère, F., & Soubaya, T. (2012). Le métabolisme. In *Biologie Tout le cours en fiches* (pp. 187–232).

Christensen, V. L., Donaldson, W. E., & Nestor, K. E. (1993). Embryonic Viability and Metabolism in Turkey Lines Selected for Egg Production or Growth. *Poultry Science*, *72*, 829–838. https://doi.org/10.3382/ps.0720829

Christensen, Vern L. (2009). Development during the first seven days post-hatching. *Avian Biology Research*, *2*(1–2), 27–33. https://doi.org/10.3184/175815509X430417

Clare, C. E., Brassington, A. H., Kwong, W. Y., & Sinclair, K. D. (2019). One-Carbon Metabolism: Linking Nutritional Biochemistry to Epigenetic Programming of Long-Term Development. *Annual Review of Animal Biosciences*, *7*, 263–287. https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115206

Cogburn, L. A., Trakooljul, N., Chen, C., Huang, H., Wu, C. H., Carré, W., Wang, X., & White, H. B. (2018). Transcriptional profiling of liver during the critical embryo-to-hatchling transition period in the chicken (Gallus gallus). *BMC Genomics*, *19*(1), 1–37. https://doi.org/10.1186/s12864-018-5080-4

Collin, A., Picard, M., & Yahav, S. (2005). The effect of duration of thermal manipulation during broiler chick embryogenesis on body weight and body temperature of post-hatched chicks. *Animal Research*, *54*(2), 105–111. https://doi.org/10.1051/animres

Coppedè, F., Stoccoro, A., Tannorella, P., & Migliore, L. (2019). Plasma homocysteine and polymorphisms of genes involved in folate metabolism correlate with DNMT1 gene methylation levels. *Metabolites*, *9*(12), 1–14. https://doi.org/10.3390/metabo9120298

Das, M., & Gursky, O. (1994). *Energetic-structure-function of lipoproteins and their protein components.* https://doi.org/10.1007/978-3-319-17344-3

Davey, M. G., & Tickle, C. (2007). The chicken as a model for embryonic development. *Cytogenetic and Genome Research*, *117*, 231–239. https://doi.org/10.1159/000103184

David, S. A., Vitorino Carvalho, A., Gimonnet, C., Brionne, A., Hennequet-Antier, C., Piégu, B., Crochet, S., Couroussé, N., Bordeau, T., Bigot, Y., Collin, A., & Coustham, V. (2019). Thermal Manipulation During Embryogenesis Impacts H3K4me3 and H3K27me3 Histone Marks in Chicken Hypothalamus. *Frontiers in Genetics*, *10*, 1–11. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01207

Dawson, W. R., & Whittow, G. C. (2000). Regulation of body temperature. In G. C. Whittow (Ed.), *Avian Physiology* (pp. 344–379). Academic Press. https://doi.org/10.1113/expphysiol.1966.sp001873

Dayan, J., Reicher, N., Melkman-zehavi, T., & Uni, Z. (2020). Incubation temperature affects yolk utilization through changes in expression of yolk sac tissue functional genes. *Poultry Science*,

99(11), 6128–6138. https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.07.037

De Beer, M., McMurtry, J. P., Brocht, D. M., & Coon, C. N. (2007). An examination of the role of feeding regimens in regulating metabolism during the broiler breeder grower period. 2. Plasma hormones and metabolites. *Poultry Science*, *86*, 1726–1738. https://doi.org/10.3382/ps.2007-00196

De Oliveira, J. E., Uni, Z., & Ferket, P. R. (2008). Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. *World's Poultry Science Journal*, *64*(4), 488–499. https://doi.org/10.1017/S0043933908000160

De Souza Morita, V., Almeida, V. R., Matos Junior, J. B., Vicentini, T. I., Van Den Brand, H., & Boleli, I. C. (2016). Incubation temperature alters thermal preference and response to heat stress of broiler chickens along the rearing phase. *Poultry Science*, *95*(8), 1795–1804. https://doi.org/10.3382/ps/pew071

De Souza Morita, V., Boleli, I. C., & Oliveira, J. A. De. (2010). Hematological and Incubation Parameters of Chicks from Young Breeders Eggs : Variation with Sex and Incubation Temperature. *International Journal of Poultry Science*, *9*(6), 606–612.

Décret93-999. (1993). Décret n°93-999 du 9 août 1993 relatif aux préparations à base de foie gras. In *Journal officiel de la république française*.

Dentin, R., Girard, J., & Postic, C. (2005). Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): Two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie*, *87*(1 SPEC. ISS.), 81–86. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.11.008

Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., & Mechoulam, R. (1992). Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science*, *258*, 1946–1949. https://doi.org/10.1039/CT9120102209

Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Bisogno, T., & Melck, D. (1999). Metabolism of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: An historical overview and some recent developments. *Lipids*, *34*(6 SUPPL.), 319–325. https://doi.org/10.1007/bf02562332

Dibner, J. J., Knight, C. D., Kitchell, M. L., Atwell, C. A., Downs, A. C., & Ivey, F. J. (1998). Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. *Journal of Applied Poultry Research*, *7*(4), 425–436. https://doi.org/10.1093/japr/7.4.425

Didier, R., Remesy, C., & Demigne, C. (1983). Changes in glucose and lipid metabolism in starved or starved-refed Japanese quail (Coturnix coturnix japonica) in relation to fine structure of liver cells. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, *74*(4), 839–848. https://doi.org/10.1016/0300-9629(83)90356-0

Dietz, M. W. (1995). *Development of metabolism and thermoregulation in galiformes. Effects on body mass, growth rate and functional maturity*.

Ding, F., Pan, Z., Kou, J., Li, L., Xia, L., Hu, S., Liu, H., & Wang, J. (2012). De novo lipogenesis in the liver and adipose tissues of ducks during early growth stages after hatching. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, *163*, 154–160. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2012.05.014

Diot, M., Reverchon, M., Rame, C., Froment, P., Brillard, J. P., Brière, S., Levêque, G., Guillaume, D., & Dupont, J. (2015). Expression of adiponectin, chemerin and visfatin in plasma and different tissues during a laying season in turkeys. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *13*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/s12958-015-0081-5

Döcke, S., Lock, J. F., Birkenfeld, A. L., Hoppe, S., Lieske, S., Rieger, A., Raschzok, N., Sauer, I. M., Florian, S., Osterhoff, M. A., Heller, R., Herrmann, K., Lindenmüller, S., Horn, P., Bauer, M., Weickert, M. O., Neuhaus, O. P., Stockmann, M., Möhlig, M., … Von Loeffelholz, C. (2013). Elevated hepatic chemerin mRNA expression in human non-alcoholic fatty liver disease. *European Journal of Endocrinology*, *169*(5), 547–557. https://doi.org/10.1530/EJE-13-0112

Dolnik, V. R., & Blyumental, T. I. (1967). and Some Other Temperate-Zone Passerine Birds Linked references are available on JSTOR for this article : *The Condor*, *69*(5), 435–468.

Donaldson, W. E. (1990). Lipid Metabolism in Liver of Chicks : Response to Feeding. *Poultry Science*, *69*, 1183–1187. https://doi.org/10.3382/PS.0691183

DuRant, S. E., Hepp, G. R., Moore, I. T., Hopkins, B. C., & Hopkins, W. A. (2010). Slight differences in incubation temperature affect early growth and stress endocrinology of wood duck (Aix sponsa) ducklings. *Journal of Experimental Biology*, *213*, 45–51. https://doi.org/10.1242/jeb.034488

DuRant, Sarah E., Hopkins, W. A., Carter, A. W., Kirkpatrick, L. T., Navara, K. J., & Hawley, D. M. (2016). Incubation temperature causes skewed sex ratios in a precocial bird. *Journal of Experimental Biology*, 1–12. https://doi.org/10.1242/jeb.138263

El-Hanoun, A. M., Rizk, R. E., Shahein, E. H. A., Hassan, N. S., & Brake, J. (2012). Effect of incubation humidity and flock age on hatchability traits and posthatch growth in Pekin ducks. *Poultry Science*, *91*, 2390–2397. https://doi.org/10.3382/ps.2011-02075

Elmehdawi, A., Hall, M., Skewes, P., Wicker, D., Maurice, D. V., Smith, J., & Benton, R. (2015). Low-intensity, short-duration thermal stimulation during the late phase of incubation alters secondary sex ratio in favour of males. *British Poultry Science*, *56*(3), 381–388. https://doi.org/10.1080/00071668.2015.1041099

Emadi, L., Jonaidi, H., & Amir Abad, E. H. (2011). The role of central CB2 cannabinoid receptors on food intake in neonatal chicks. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *197*(12), 1143–1147. https://doi.org/10.1007/s00359-011-0676-z

Emami, N. K., Jung, U., Voy, B., & Dridi, S. (2021). Radical response: Effects of heat stress-induced oxidative stress on lipid metabolism in the avian liver. *Antioxidants*, *10*(1), 1–15. https://doi.org/10.3390/antiox10010035

EuroFoieGras. (2021). *Euro Foie Gras*. https://www.eurofoiegras.com/en/the-production/).

Farhat, A., & Chavez, E. R. (2000). Comparative performance, blood chemistry, and carcass composition of two lines of Pekin ducks reared mixed or separated by sex. *Poultry Science*, *79*(4), 460–465. https://doi.org/10.1093/ps/79.4.460

Favatier, F., Bornman, L., Hightower, L. E., Günther, E., & Polla, B. S. (1997). Variation in hsp gene expression and Hsp polymorphism: Do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance? *Cell Stress and Chaperones*, *2*(3), 141–155. https://doi.org/10.1379/1466-1268(1997)002<0141:VIHGEA>2.3.CO;2

Fernandez, X., Lazzarotto, V., Bernadet, M. D., & Manse, H. (2019). Comparison of the composition and sensory characteristics of goose fatty liver obtained by overfeeding and spontaneous fattening. *Poultry Science*, *98*(11), 6149–6160. https://doi.org/10.3382/ps/pez289

Flees, J., Rajaei-Sharifabadi, H., Greene, E., Beer, L., Hargis, B. M., Ellestad, L., Porter, T., Donoghue, A., Bottje, W. G., & Dridi, S. (2017). Effect of Morinda citrifolia (Noni)-enriched diet on Hepatic Heat Shock protein and lipid metabolism-related genes in heat stressed broiler chickens.

Frontiers in Physiology, *8*(NOV), 1–18. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00919

Folch, J., Lees, M., & Sloane stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, *226*(1), 497–509. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64849-5

Freitas, H. R., Isaac, A. R., Malcher-Lopes, R., Diaz, B. L., Trevenzoli, I. H., & De Melo Reis, R. A. (2017). Polyunsaturated fatty acids and endocannabinoids in health and disease. *Nutritional Neuroscience*, *21*(10), 695–714. https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1347373

French, N. A. (1996). Modeling Incubation Temperature : The Effects of Incubator Design , Embryonic Development , and Egg Size. *Poultry Science*, *76*(1), 124–133. https://doi.org/10.1093/ps/76.1.124

Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K., & Miura, T. (2014). Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathol ophysiological Insights and Potent Clinial Biomarker of Metabolis and Cardiovascular Diseases. *Clinical Medecine Insights: Cardiology*, *8*, 23–33. https://doi.org/10.4137/CMC.S17067.RECEIvED

Furuse, M., Tachibana, T., Ohgushi, A., Ando, R., Yoshimatsu, T., & Denbow, M. D. (2001). Intracerebroventricular injection of ghrelin and growth hormone releasing factor inhibits food intake in neonatal chicks. *Neuroscience Letters*, *301*, 123–126. https://doi.org/10.1016/s0749-0704(18)30581-5

Geisler, C. E., Hepler, C., Higgins, M. R., & Renquist, B. J. (2016). Hepatic adaptations to maintain metabolic homeostasis in response to fasting and refeeding in mice. *Nutrition and Metabolism*, *13*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/s12986-016-0122-x

Gerich, J. E., Lorenzi, M., Bier, D. M., Tsalikian, E., Schneider, V., Karam, J. H., & Forsham, P. H. (1976). Effects of physiologic levels of glucagon and growth hormone on human carbohydrate and lipid metabolism. Studies involving administration of exogenous hormone during suppression of endogenous hormone secretion with somatostatin. *Journal of Clinical Investigation*, *57*(4), 875–884. https://doi.org/10.1172/JCI108364

Gerzilov, V., Petrov, P. B., & Bochukov, A. (2013). Effect of force-feeding on fatty liver and serum biochimical parameters in mule ducks. *AgroLife Scientific Journal*, *2*(1), 6–9.

Gibbons, G. F. (1990). Assembly and Secretion of Hepatic Very-Low-Density Lipoprotein. *Biochemical Journal*, *268*, 1–13. https://doi.org/10.1016/S1569-2582(04)15009-5

Gontier, K., André, J. M., Bernadet, M. D., Ricaud, K., & Davail, S. (2013). Insulin effect on lipogenesis and fat distribution in three genotypes of ducks during overfeeding. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *164*(3), 499–505. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.12.019

Goodridge, A. G. (1968). The effect of starvation and starvation followed by feeding on enzyme activity and the metabolism of [U-14C]glucose in liver from growing chicks. *The Biochemical Journal*, *108*(4), 667–673. https://doi.org/10.1042/bj1080667

Goodridge, Alan G., Back, D. W., Wilson, S. B., & Goldman, M. J. (1986). Regulation of Genes for Enzymes Involved in Fatty Acid Synthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *478*(1), 46–62. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb15520.x

Goodridge, Alan G., Jenik, R. A., McDevitt, M. A., Morris, S. M., & Winberry, L. K. (1984). Malic enzyme and fatty acid synthase in the uropygial gland and liver of embryonic and neonatal ducklings. Tissue-specific regulation of gene expression. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *230*(1), 82–92. https://doi.org/10.1016/0003-9861(84)90088-2

Goralski, K. B., McCarthy, T. C., Hanniman, E. A., Zabel, B. A., Butcher, E. C., Parlee, S. D., Muruganandan, S., & Sinal, C. J. (2007). Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(38), 28175–28188. https://doi.org/10.1074/jbc.M700793200

Günal, M. (2012). The effects of early-age thermal manipulation and daily short-term fasting on performance and body temperatures in broiler exposed to heat stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 1–7. https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01330.x

Guy, G., Pingeli, H., & Baeza, E. (2012). *Production de canards* (Edition Qu).

Haldane, J. B. S. (1922). Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal Genetic*, *XII*(2), 101–109.

Hales, C. N., Barker, D. J. P., Clark, P. M. S., Cox, L. J., Fall, C., Osmond, C., & Winter, P. D. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*, *303*(6809), 1019–1022. https://doi.org/10.1136/bmj.303.6809.1019

Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, *88*(1), 49–92. https://doi.org/10.1057/9781137521477_8

Hammel, H. T. (1968). Regulation of internal body temperature. *Annual Review of Physiology*, *30*, 641–710. https://doi.org/10.1146/annurev.ph.30.030168.003233

Han, G. S., & Carman, G. M. (2013). Phospholipid Synthesis in Yeast. In *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition* (2nd ed., Vol. 3). Published by Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00513-2

Han, G., Yang, H., Bungo, T., Ikeda, H., Wang, Y., & Nguyen, L. T. N. (2018). In ovo L -leucine administration stimulates lipid metabolisms in heat-exposed male , but not female , chicks to a ff ord thermotolerance. *Journal of Thermal Biology*, *71*, 74–82. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.10.020

Han, Q., Hou, X., Su, D., Pan, L., Duan, J., Cui, L., Huang, B., & Lu, J. (2007). HELP3 subunit of the Elongator complex regulates the transcription of HSP70 gene in human cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *39*(6), 453–461. https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00293.x

He, J., Tian, Y., Li, J. J., Shen, J. D., Tao, Z. R., Fu, Y., Niu, D., & Lu, L. Z. (2012). Expression pattern of adipocyte fatty acid-binding protein gene in different tissues and its regulation of genes related to adipocyte differentiation in duck. *Poultry Science*, *91*(9), 2270–2274. https://doi.org/10.3382/ps.2012-02149

Hermier, D., Guy, G., Guillaumin, S., Davail, S., André, J. M., & Hoo-Paris, R. (2003). Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *135*(4), 663–675. https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00146-5

Hermier, D., Salichon, M. R., Guy, G., Peresson, R., Mourot, J., & Lagarrigue, S. (1999). La stéatose hépatique des palmipèdes gavés : Bases métaboliques et sensibilité génétique. *Productions Animales*, *12*(4), 265–271.

Hochberg, Z., Feil, R., Constancia, M., Fraga, M., Junien, C., Carel, J. C., Boileau, P., Le Bouc, Y., Deal, C. L., Lillycrop, K., Scharfmann, R., Sheppard, A., Skinner, M., Szyf, M., Waterland, R. A., Waxman, D. J., Whitelaw, E., Ong, K., & Albertsson-Wikland, K. (2011). Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. *Endocrine Reviews*, *32*(2), 159–224. https://doi.org/10.1210/er.2009-0039

Hodgetts, B. (1991). Current hatchabilities in species of domestic importance and the scope for improvement. In *Avian incubation* (pp. 139–144). Butterworth & Co Ltd.

Iizuka, K., Wu, W., Horikawa, Y., Saito, M., & Takeda, J. (2013). Feedback looping between ChREBP and PPARα in the regulation of lipid metabolism in brown adipose tissues. *Endocrine Journal*, *60*(10), 1145–1153. https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ13-0079

INAO. (2015). *Cahier des charges de l ' indication géographique protégée (IGP) « Canard à foie gras du Sud-Ouest (Chalosse, Gascogne, Gers, Landes, Périgord, Quercy) »*. https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/document_administratif-9e8e4b22-95d7-4290-aa76-c5638c04b37f/telechargement

ITAVI. (2020). *La filière palmipèdes gras*. https://www.itavi.asso.fr/filieres-palmipedes-gras

Jenkins, S. A., & Porter, T. E. (2004). Ontogeny of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in the chicken embryo: A review. *Domestic Animal Endocrinology*, *26*(4), 267–275. https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2004.01.001

Jeong, W. il, Osei-Hyiaman, D., Park, O., Liu, J., Bátkai, S., Mukhopadhyay, P., Horiguchi, N., Harvey-White, J., Marsicano, G., Lutz, B., Gao, B., & Kunos, G. (2008). Paracrine Activation of Hepatic CB1 Receptors by Stellate Cell-Derived Endocannabinoids Mediates Alcoholic Fatty Liver. *Cell Metabolism*, *7*(3), 227–235. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.12.007

Jiang, Z., Cherian, G., Robinson, F. E., & Sim, J. S. (1990). Effect of feeding cholesterol to laying hens and chicks on cholesterol metabolism in pre- and posthatch chicks. *Poultry Science*, *69*(10), 1694–1701. https://doi.org/10.3382/ps.0691694

Jourdan, T., Djaouti, L., Demizieux, L., Gresti, J., Vergès, B., & Degrace, P. (2010). CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes*, *59*(4), 926–934. https://doi.org/10.2337/db09-1482

Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *89*(6), 2548–2556. https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395

Keyshams, N., Zendehdel, M., Babapour, V., & Baghbanzadeh, A. (2016). Cannabinoid–glutamate interactions in the regulation of food intake in neonatal layer- type chicks: role of glutamate NMDA and AMPA receptors. *Veterinary Research Communications*, *40*(2), 63–71. https://doi.org/10.1007/s11259-016-9655-8

Kiezun, M., Smolinska, N., Maleszka, A., Dobrzyn, K., Szeszko, K., & Kaminski, T. (2014). Adiponectin expression in the porcine pituitary during the estrous cycle and its effect on lh and fsh secretion. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *307*(11), E1038–E1046. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00299.2014

King, D. E., Asem, E. K., & Adeola, O. (2000). Ontogenetic development of intestinal digestive functions in white pekin ducks. *Journal of Nutrition*, *130*(1), 57–62. https://doi.org/10.1093/jn/130.1.57

Knudsen, C., Bonnefont, C., Fortun-Lamothe, L., Ricaud, K., & Fernandez, X. (2018). L'engraissement spontané du foie ches les palmipèdes : état des lieux et perspectives de recherche. *INRA Productions Animales*, *31*(2), 117–130. https://doi.org/10.20870/productions-animales.2018.31.2.2318

Koláčková, M., Kreisinger, J., Albrecht, T., & Hořák, D. (2019). Effect of incubation temperature on sex-dependent embryo mortality and morphological traits in Mallard. *Journal of Thermal Biology*, *83*(April), 95–102. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.05.007

Kono, T., Nishida, M., Nishiki, Y., Seki, Y., Sato, K., & Akiba, Y. (2005). Characterisation of glucose transporter (GLUT) gene expression in broiler chickens. *British Poultry Science*, *46*(4), 510–515. https://doi.org/10.1080/00071660500181289

Koonen, D. P. Y., Jacobs, R. L., Febbraio, M., Young, M. E., Soltys, C. L. M., Ong, H., Vance, D. E., & Dyck, J. R. B. (2007). Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes*, *56*(12), 2863–2871. https://doi.org/10.2337/db07-0907

Lamot, D. (2017). *First week Nutrition for Broiler Chickens*. Wageningen University.

Lamot, D. M., Van De Linde, I. B., Molenaar, R., Van Der Pol, C. W., Wijtten, P. J. A., Kemp, B., & Van Den Brand, H. (2014). Effects of moment of hatch and feed access on chicken development. *Poultry Science*, *93*(10), 2604–2614. https://doi.org/10.3382/ps.2014-04123

Lan, X., Hsieh, J. C. F., Schmidt, C. J., Zhu, Q., & Lamont, S. J. (2016). Liver transcriptome response to hyperthermic stress in three distinct chicken lines. *BMC Genomics*, *17*(1), 4–14. https://doi.org/10.1186/s12864-016-3291-0

Landauer, W. (1961). *The Hatchability of Chicken Eggs as Influenced by Environment and Heredity*. University of Connecticut. https://doi.org/10.3382/ps.0230495

Larzul, C., Imbert, B., Bernadet, M. D., Guy, G., & Rémignon, H. (2006). Meat quality in an intergeneric factorial crossbreeding between muscovy (Cairina moschata) and Pekin (Anas platyrhynchos) ducks. *Animal Research*, *55*(3), 219–229. https://doi.org/10.1051/animres:2006010

Li, S., Bai, S., Qin, X., Zhang, J., Irwin, D. M., Zhang, S., & Wang, Z. (2019). Comparison of whole embryonic development in the duck (Anas platyrhynchos) and goose (Anser cygnoides) with the chicken (Gallus gallus). *Poultry Science*, *98*(8), 3278–3291. https://doi.org/10.3382/ps/pez133

Lilja, C., & Olsson, U. (1987). Changes in embryonic development associated with long-term slection for high growth rate in Japanese quail. *Growth*, *51*, 301–308.

Litt, J., Leterrier, C., & Fortun-Lamothe, L. (2021). Conditions d'élevage des palmipèdes à foie gras : des demandes sociétales à une démarche de progrès. *INRAE Productions Animales*, *33*(3), 203–222. https://doi.org/10.20870/productions-animales.2020.33.3.4500

Liu, H., Liu, J., Yan, X., Li, Q., Zhao, Y., Wang, Y., Zhang, R., Wang, G., Wang, H., Li, X., Yang, C., Li, L., Han, C., & Wang, J. (2015). Impact of thermal stress during incubation on gene expression in embryonic muscle of Peking ducks (Anasplatyrhynchos domestica). *Journal of Thermal Biology*, *53*, 80–89. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.08.013

Liu, R. Z., Li, X., & Godbout, R. (2008). A novel fatty acid-binding protein (FABP) gene resulting from tandem gene duplication in mammals: transcription in rat retina and testis. *Genomics*, *92*(6), 436–445. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.08.003

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods*, *25*(4), 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Loyau, T., Bedrani, L., Berri, C., Métayer-Coustard, S., Praud, C., Coustham, V., Mignon-Grasteau, S., Duclos, M. J., Tesseraud, S., Rideau, N., Hennequet-Antier, C., Everaert, N., Yahav, S., & Collin, A. (2015). Cyclic variations in incubation conditions induce adaptive responses to later heat exposure in chickens: A review. *Animal*, *9*(1), 76–85. https://doi.org/10.1017/S1751731114001931

Loyau, T, Berri, C., Bedrani, L., Praud, C., & Duelos, M. J. (2013). Thermal manipulation of the embryo modifies the physiology and body compositiob of broiler chickens reared in floor pens without affecting breast meat processing quality. *American Society of Animal Science*, *91*, 3674–3685. https://doi.org/10.2527/jas2013-6445

Loyau, Thomas, Métayer-Coustard, S., Berri, C., Crochet, S., Cailleau-Audouin, E., Sannier, M., Chartrin, P., Praud, C., Hennequet-Antier, C., Rideau, N., Couroussé, N., Mignon-Grasteau, S., Everaert, N., Duclos, M. J., Yahav, S., Tesseraud, S., & Collin, A. (2014). Thermal manipulation during embryogenesis has long-term effects on muscle and liver metabolism in fast-growing chickens. *PLoS ONE*, *9*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105339

Lu, H. C., & Mackie, K. (2020). Review of the Endocannabinoid System. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, *6*(6), 607–615. https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016

Lucas, A. (1991). Programming by early nutrition in man. The childhood environment and adult disease. In *The childhood environment and adult disease* (pp. 38–55).

Lucas, A. (1998). Symposium : The Effects of Childhood Diet on Adult Health and Disease - Programming by Early Nutrition: An Experimental Approach. *Journal of Nutrition*, *128*(2), 401–406. https://doi.org/10.1093/jn/128.2.401S

Lund, M., Olsen, R. K. J., & Gregersen, N. (2015). A short introduction to acyl-CoA dehydrogenases; deficiencies and novel treatment strategies. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, *3*(12), 1375–1386. https://doi.org/10.1517/21678707.2015.1092869

Maatjens, C. M., Van Roovert-Reijrink, I. A. M., Engel, B., Van Der Pol, C. W., Kemp, B., & Van Den Brand, H. (2016a). Temperature during the last week of incubation. I. Effects on hatching pattern and broiler chicken embryonic organ development. *Poultry Science*, *95*(4), 956–965. https://doi.org/10.3382/ps/pew390

Maatjens, C. M., Van Roovert-Reijrink, I. A. M., Engel, B., Van Der Pol, C. W., Kemp, B., & Van Den Brand, H. (2016b). Temperature during the last week of incubation. III. Effects on chicken embryo physiology. *Poultry Science*, *96*(5), 1451–1458. https://doi.org/10.3382/ps/pew390

Mallat, A., Teixeira-Clerc, F., Deveaux, V., Manin, S., & Lotersztajn, S. (2011). The endocannabinoid system as a key mediator during liver diseases: New insights and therapeutic openings. *British Journal of Pharmacology*, *163*(7), 1432–1440. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01397.x

Marie-Etancelin, C., Basso, B., Davail, S., Gontier, K., Fernandez, X., Vitezica, Z. G., Bastianelli, D., Baeza, E., Bernadet, M. D., Guy, G., Brun, J. M., & Legarra, A. (2011). Genetic parameters of product quality and hepatic metabolism in fattened mule ducks. *Journal of Animal Science*, *89*(3), 669–679. https://doi.org/10.2527/jas.2010-3091

Marie-Etancelin, C., Retailleau, B., Alinier, A., & Vitezica, Z. G. (2015). Sex impact on the quality of fatty liver and its genetic determinism in mule ducks. *Journal of Animal Science*, *93*(9), 4252–4257. https://doi.org/10.2527/jas.2015-9121

Massimino, W., Andrieux, C., Biasutti, S., Davail, S., Bernadet, M., Pioche, T., Ricaud, K., Gontier, K., Morisson, M., Collin, A., Panserat, S., & Houssier, M. (2021). Impacts of Embryonic Thermal Programming on the Expression of Genes Involved in Foie gras Production in Mule Ducks. *Frontiers in Physiology*, *12*(December), 1–12. https://doi.org/10.3389/fphys.2021.779689

Massimino, W., Davail, S., Bernadet, M., Pioche, T., Ricaud, K., Gontier, K., Manse, H., Morisson, M., Collin, A., Panserat, S., & Houssier, M. (2019). Impact of thermal manipulation during

embryogenesis on hepatic metabolism in mule ducks. *Fontiers in Physiology*, *10*, 1–12. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01495

Massimino, W., Davail, S., Secula, A., Andrieux, C., Bernadet, M., Pioche, T., Ricaud, K., Gontier, K., Morisson, M., Collin, A., Panserat, S., & Houssier, M. (2020). Ontogeny of hepatic metabolism in mule ducks highlights different gene expression profiles between carbohydrate and lipid metabolic pathways. *BMC Genomics*, 1–13. https://doi.org/10.1186/s12864-020-07093-w

Mathers, J. C., & McKay, J. A. (2009). Epigenetics - Potential contribution to fetal programming. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 646, pp. 119–123). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9173-5_13

Mellouk, N., Ramé, C., Barbe, A., Grandhaye, J., Froment, P., & Dupont, J. (2018). Chicken is a useful model to investigate the role of adipokines in metabolic and reproductive diseases. *International Journal of Endocrinology*, *2018*. https://doi.org/10.1155/2018/4579734

Mellouk, N., Ramé, C., Barbe, A., Venturi, E., Touzé, J.-L., Staub, C., Bernadet, M. D., Chartrin, P., Bordeau, T., Froment, P., Baeza, E., & Dupont, J. (2019). La chémérinemie et l'échographie: des indicatuers de la stéatose hépatique chez le canard? *Journée de La Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras*, 426–431.

Mellouk, N., Ramé, C., Marchand, M., Staub, C., Touzé, J. L., Venturi, É., Mercerand, F., Travel, A., Chartrin, P., Lecompte, F., Ma, L., Froment, P., & Dupont, J. (2018). Effect of different levels of feed restriction and fish oil fatty acid supplementation on fat deposition by using different techniques, plasma levels and mRNA expression of several adipokines in broiler breeder hens. *PLoS ONE*, *13*(1), 1–29. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191121

Miralpeix, C., Reguera, A. C., Fosch, A., Zagmutt, S., Casals, N., Cota, D., & Rodríguez-Rodríguez, R. (2021). Hypothalamic endocannabinoids in obesity: an old story with new challenges. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(23), 7469–7490. https://doi.org/10.1007/s00018-021-04002-6

Mozduri, Z., Marty-gasset, N., Lo, B., & Masoudi, A. A. (2021). Identification of Plasmatic Biomarkers of Foie Gras Qualities in Duck by Metabolomics. *Frontiers in Physiology*, *February*. https://doi.org/10.3389/fphys.2021.628264

Mueller, C. A., Burggren, W. W., & Tazawa, H. (2015). The Physiology of the Avian Embryo. In *Sturkie's Avian Physiology* (Sixth Edit, pp. 739–766). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407160-5.00032-4

Nakai, A., & Morimoto, R. I. (1993). Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(4), 1983–1997. https://doi.org/10.1128/mcb.13.4.1983-1997.1993

Narinç, D., Erdo, S., Tahtabiçen, E., & Aksoy, T. (2016). Effects of thermal manipulations during embryogenesis of broiler chickens on developmental stability , hatchability and chick quality. *Animal*, *10*(8), 1328–1335. https://doi.org/10.1017/S1751731116000276

Ncho, C. M., Goel, A., Gupta, V., Jeong, C., & Choi, Y. H. (2022). Embryonic manipulations modulate differential expressions of heat shock protein , fatty acid metabolism , and antioxidant-related genes in the liver of heat-stressed broilers. *PLoS ONE*, *17*(7), 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269748

Ogawa, A., Solovei, I., Hutchison, N., Saitoh, Y., Ikeda, J. E., Macgregor, H., & Mizuno, S. (1997). Molecular characterization and cytological mapping of a non-repetitive DNA sequence region from the W chromosome of chicken and its use as a universal probe for sexing Carinatae birds. *Chromosome Research*, *5*(2), 93–101. https://doi.org/10.1023/A:1018461906913

Olofsson, S. O., & Boren, J. (2005). Apolipoprotein B: A clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine*, *258*(5), 395–410. https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2005.01556.x

OnbaŞilar, E. E., Erdem, E., Poyraz, O., & Yalcin, S. (2011). Effects of hen production cycle and egg weight on egg quality and composition, hatchability, duckling quality, and first-week body weight in Pekin ducks. *Poultry Science*, *90*(11), 2642–2647. https://doi.org/10.3382/ps.2011-01359

Ono, H., Hou, P. C. L., & Tazawa, H. (1994). Responses of developing chicken embryos to acute changes in ambient temperature: Noninvasive study of heart rate. *Israel Journal of Zoology*, *40*(3–4), 467–479. https://doi.org/10.1080/00212210.1994.10688766

Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Bátkai, S., Harvey-White, J., Mackie, K., Offertáler, L., Wang, L., & Kunos, G. (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(5), 1298–1305. https://doi.org/10.1172/JCI200523057

Owen, J. (1991). Principles and problems of incubation design. In S. G. Tullett (Ed.), *Avian incubation* (pp. 205–224). Butterworth & Co (Publishers) Ltd.

Özlü, S., Shiranjang, R., Elibol, O., & Brake, J. (2018). Effect of hatching time on yolk sac percentage and broiler live performance. *Revista Brasileira de Ciencia Avicola*, *20*(2), 231–236. https://doi.org/10.1590/1806-9061-2017-0579

Palou, M., Priego, T., Sánchez, J., Villegas, E., Rodríguez, A. M., Palou, A., & Picó, C. (2008). Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *456*(5), 825–836. https://doi.org/10.1007/s00424-008-0461-1

Piestun, Y., Druyan, S., Brake, J., & Yahav, S. (2013). Thermal treatments prior to and during the beginning of incubation affect phenotypic characteristics of broiler chickens posthatching. *Poultry Science*, *92*(4), 882–889. https://doi.org/10.3382/ps.2012-02568

Piestun, Y., Halevy, O., Shinder, D., Ruzal, M., Druyan, S., & Yahav, S. (2011). Thermal manipulations during broiler embryogenesis improves post-hatch performance under hot conditions. *Journal of Thermal Biology*, *36*(7), 469–474. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2011.08.003

Piestun, Y., Shinder, D., Ruzal, M., Halevy, O., Brake, J., & Yahav, S. (2008). Thermal manipulations during broiler embryogenesis: Effect on the acquisition of thermotolerance. *Poultry Science*, *87*(8), 1516–1525. https://doi.org/10.3382/ps.2008-00030

Piestun, Y., Zimmerman, I., & Yahav, S. (2015). Thermal manipulations of Turkey embryos: The effect on thermoregulation and development during embryogenesis. *Poultry Science*, *94*(2), 273–280. https://doi.org/10.3382/ps/peu047

Pioche, T., Skiba, F., Bernadet, M. D., Seiliez, I., Massimino, W., Houssier, M., Tavernier, A., Ricaud, K., Davail, S., Skiba-Cassy, S., & Gontier, K. (2020). Kinetic study of the expression of genes related to hepatic steatosis, glucose and lipid metabolism and cellular stress during overfeeding in mule ducks. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *21*(1), 1–9. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00198.2019

Poulsen, L. la C., Siersbæk, M., & Mandrup, S. (2012). PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *23*(6), 631–639. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.003

Printz, R. L., Koch, S., Potter, L. R., O'Doherty, R. M., Tiesinga, J. J., Moritz, S., & Granner, D. K. (1993).

Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(7), 5209–5219.

Pulikanti, R., Peebles, E. D., Keirs, R. W., Bennett, L. W., Keralapurath, M. M., & Gerard, P. D. (2010). Pipping muscle and liver metabolic profile changes and relationships in broiler embryos on days 15 and 19 of incubation. *Poultry Science*, *89*(5), 860–865. https://doi.org/10.3382/ps.2009-00531

Rahmani, B., Ghashghayi, E., Zendehdel, M., Khodadadi, M., & Hamidi, B. (2021). The Crosstalk Between Brain Mediators Regulating Food Intake Behavior in Birds: A Review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *27*(4), 2349–2370. https://doi.org/10.1007/s10989-021-10257-1

Rajkumar, U., Vinoth, A., Shanmugam, M., Rajaravindra, K. S., & Rama Rao, S. V. (2015). Effect of Embryonic Thermal Exposure on Heat Shock Proteins (HSPs) Gene Expression and Serum T3 Concentration in Two Broiler Populations. *Animal Biotechnology*, *26*(4), 260–267. https://doi.org/10.1080/10495398.2015.1022183

Ramirez, D. A., Arboleda, C. R., Escote, L. J., & Ticohermonso, E. (1976). The cytogenetics of intergeneric hybrids of Anas bochas and Cairina moschata. *Phillipine Agriculturalist*, *60*(6).

Reverchon, M., Ramé, C., Bertoldo, M., & Dupont, J. (2014). Adipokines and the female reproductive tract. *International Journal of Endocrinology*, 1–10. https://doi.org/10.1155/2014/232454

Rivera, R. E., Christensen, V. L., Edens, F. W., & Wineland, M. J. (2005). Influence of selenium on heat shock protein 70 expression in heat stressed turkey embryos (Meleagris gallopavo). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*, *142*, 427–432. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.09.006

Romanoff, A. L. (1949). Critical Periods and Causes of Death in Avian Embryonic Development. *The Auk*, *66*(3), 264–270. https://doi.org/10.2307/4080357

Sanches, S. C. L., Ramalho, L. N. Z., Augusto, M. J., Da Silva, D. M., & Ramalho, F. S. (2015). Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models. *BioMed Research International*, 13. https://doi.org/10.1155/2015/574832

Sauveur, B. (1988). Développement embryonnaire et incubation. In *Reproduction des volailles et production d'oeufs* (pp. 229–265). Inra.

Schulz, P., Hryhorowicz, S., Rychter, A. M., Zawada, A., Słomski, R., Dobrowolska, A., & Krela-Kaźmierczak, I. (2021). What role does the endocannabinoid system play in the pathogenesis of obesity? *Nutrients*, *13*(2), 1–24. https://doi.org/10.3390/nu13020373

Scott Turner, J. (1991). The thermal energetics of an incubated chicken egg. In *Avian Incubation* (Vol. 15, Issues 3–4, pp. 211–216). Butterworth & Co (Publishers) Ltd. https://doi.org/10.1016/0306-4565(90)90004-2

Serr, J., Suh, Y., & Lee, K. (2009). Regulation of adipose triglyceride lipase by fasting and refeeding in avian species. *Poultry Science*, *88*(12), 2585–2591. https://doi.org/10.3382/ps.2009-00265

Shanmugasundaram, R., Wick, M., & Lilburn, M. S. (2019). Effect of embryonic thermal manipulation on heat shock protein 70 (HSP70) expression and subsequent immune response to post-hatch lipopolysaccharide challenge in Pekin ducklings. *Poultry Science*, *98*(2), 722–733. https://doi.org/10.3382/ps/pey460

Silvestri, C., Ligresti, A., & Di Marzo, V. (2011). Peripheral effects of the endocannabinoid system in energy homeostasis : Adipose tissue , liver and skeletal muscle. *Review Endocrinoly Disorders*,

12, 153–162. https://doi.org/10.1007/s11154-011-9167-3

Silvestri, C., & Marzo, V. Di. (2013). Review The Endocannabinoid System in Energy Homeostasis and the Etiopathology of Metabolic Disorders. *Cell Metabolism*, *17*(4), 475–490. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.001

Speake, B. K., Noble, R. C., & Murray, A. M. B. (1998). The utilization of yolk lipids by the chick embryo. *World's Poultry Science Journal*, *54*(4), 319–334. https://doi.org/10.1079/wps19980022

Stella, N., Schweitzer, P., & Plomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, *388*(6644), 773–778. https://doi.org/10.1038/42015

Tarry-Adkins, J. L., & Ozanne, S. E. (2011). Mechanisms of early life programming: Current knowledge and future directions. *American Journal of Clinical Nutrition*, *94*(6), 1765–1771. https://doi.org/10.3945/ajcn.110.000620

Tavernier, A. (2016). *La stéatose hépatique chez les palmipèdes: gènes clés, différences entre types génétiques et cinétique postprandiale*. Université de Pau et des Pays de l'Adour.

Tavernier, A., Davail, S., Houssier, M., Bernadet, M. D., Ricaud, K., & Gontier, K. (2019). Inter genotype differences in expression of genes involved in glucose metabolism in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks. *Spring Nature B.V.*, *47*(2), 1527–1533. https://doi.org/10.1007/s11010-016-2850-7

Tavernier, A., Davail, S., Ricaud, K., Bernadet, M.-D., & Gontier, K. (2016). Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *424*(1–2), 147–161. https://doi.org/10.1007/s11010-016-2850-7

Tavernier, A., Ricaud, K., Bernadet, M.-D., Davail, S., & Gontier, K. (2017). Kinetics of expression of genes involved in glucose metabolism after the last meal in overfed mule ducks. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *430*(1–2), 127–137. https://doi.org/10.1007/s11010-017-2960-x

Tavernier, A., Ricaud, K., Bernadet, M.-D., Gontier, K., & Davail, S. (2017). Pre- and post-prandial expression of genes involved in lipid metabolism at the end of the overfeeding period of mule ducks. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *438*(1–2), 111–121. https://doi.org/10.1007/s11010-017-3118-6

The_National_Archives. (2012). *Five Freedoms*. Farm Animal Welfare Council. https://webarchive.nationalarchives.gov.uk/ukgwa/20121010012427/http://www.fawc.org.uk/freedoms.htm

Théron, L., Astruc, T., Bouillier-Oudot, M., Molette, C., Vénien, A., Peyrin, F., Vitezica, Z. G., & Fernandez, X. (2011). The fusion of lipid droplets is involved in fat loss during cooking of duck "foie gras." *Meat Science*, *89*(4), 377–383. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.018

Tona, K., Bamelis, F., De Ketelaere, B., Bruggeman, V., Moraes, V. M. B., Buyse, J., Onagbesan, O., & Decuypere, E. (2003). Effects of egg storage time on spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth. *Poultry Science*, *82*(5), 736–741. https://doi.org/10.1093/ps/82.5.736

Tzschentke, B., & Halle, I. (2009). Influence of temperature stimulation during the last 4 days of incubation on secondary sex ratio and later performance in male and female broiler chicks. *British Poultry Science*, *50*(5), 634–640. https://doi.org/10.1080/00071660903186570

Tzschentke, B., & Plagemann, A. (2006). Imprinting and critical periods in early development. *World's Poultry Science Journal*, *62*(4), 626–637. https://doi.org/10.1079/wps2006117

UE. (1998). Welfare Aspects of the Production of Foie Gras in Ducks and Geese Report of the

Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare Adopted 16 December 1998 Contents of the Report. In *Pathology* (Issue December).

Vaiserman, A., Koliada, A., & Lushchak, O. (2018). Developmental programming of aging trajectory. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 47, pp. 105–122). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.07.007

Van der Wagt, I., de Jong, I. C., Mitchell, M. A., Molenaar, R., & van den Brand, H. (2020). A review on yolk sac utilization in poultry. *Poultry Science*, *99*(4), 2162–2175. https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.041

Vinoth, A., Thirunalasundari, T., Shanmugam, M., Uthrakumar, A., Suji, S., & Rajkumar, U. (2017). Evaluation of DNA methylation and mRNA expression of heat shock proteins in thermal manipulated chicken. *Cell Stress and Chaperones*, *23*(2), 235–252. https://doi.org/10.1007/s12192-017-0837-2

Vinoth, A., Thirunalasundari, T., Tharian, J. A., Shanmugam, M., & Rajkumar, U. (2015). Effect of thermal manipulation during embryogenesis on liver heat shock protein expression in chronic heat stressed colored broiler chickens. *Journal of Thermal Biology*, *53*, 162–171. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.10.010

Visser, G. H. (1991). *Development of metabolism and temperature regulation in precocial birds. Patterns in shorebirds (Charadriiformes) and the domestic fowl (Gallus domesticus)*.

Wang, J. S., Hu, H. J., Xu, Y. B., Wang, D. C., Jiang, L., Li, K. X., Wang, Y. Y., & Zhan, X. A. (2020). Effects of posthatch feed deprivation on residual yolk absorption, macronutrients synthesis, and organ development in broiler chicks. *Poultry Science*, *99*(11), 5587–5597. https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.032

Wang, Y., Mu, Y., Li, H., Ding, N., Wang, Q., Wang, Y., Wang, S., & Wang, N. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor-γ gene: A key regulator of adipocyte differentiation in chickens. *Poultry Science*, *87*(2), 226–232. https://doi.org/10.3382/ps.2007-00329

Wells, J. C. K. (2017). Worldwide variability in growth and its association with health: Incorporating body composition, developmental plasticity, and intergenerational effects. *American Journal of Human Biology*, *29*(2), 1–16. https://doi.org/10.1002/ajhb.22954

Wilson, H. R. (1991). Physiological requirements of developing embryo: temperature and turning. In S. G. Tullett (Ed.), *Avian incubation* (pp. 145–156). Butterworth & Co (Publishers) Ltd.

Winkler, G. S., Kristjuhan, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Svejstrup, J. Q. (2002). Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(6), 3517–3522. https://doi.org/10.1073/pnas.022042899

Xie, J., Tang, L., Lu, L., Zhang, L., Xi, L., Liu, H. C., Odle, J., & Luo, X. (2014). Differential expression of heat shock transcription factors and heat shock proteins after acute and chronic heat stress in laying chickens (Gallus gallus). *PLoS ONE*, *9*(7), 16–18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102204

Yadgary, L., Cahaner, A., Kedar, O., & Uni, Z. (2010). Yolk sac nutrient composition and fat uptake in late-term embryos in eggs from young and old broiler breeder hens. *Poultry Science*, *89*(11), 2441–2452. https://doi.org/10.3382/ps.2010-00681

Yahav, S., Collin, A., Shinder, D., & Picard, M. (2004). Thermal manipulations during broiler chick embryogenesis: Effects of timing and temperature. *Poultry Science*, *83*, 1959–1963. https://doi.org/10.1093/ps/83.12.1959

Yahav, S., & McMurtry, J. P. (2001). Thermotolerance acquisition in broiler chickens by temperature conditioning early in life - The effect of timing and ambient temperature. *Poultry Science*, *80*, 1662–1666. https://doi.org/10.1093/ps/80.12.1662

Yahav, S., & Tzschentke, B. (2006). Perinatal thermal manipulations in poultry , does it cause long-lasting thermoregulatory memory ? *12th European Poultry Conference*, 1–6.

Yan, X. P., Liu, H. H., Liu, J. Y., Zhang, R. P., Wang, G. S., Li, Q. Q., Wang, D. M. C., Li, L., & Wang, J. W. (2015). Evidence in duck for supporting alteration of incubation temperature may have influence on methylation of genomic DNA. *Poultry Science*, *94*, 2537–2545. https://doi.org/10.3382/ps/pev201

Zaboli, G. R., Rahimi, S., Shariatmadari, F., Torshizi, M. A. K., Baghbanzadeh, A., & Mehri, M. (2016). Thermal manipulation during pre and post-hatch on thermotolerance of male broiler chickens exposed to chronic heat stress. *Poultry Science*, *96*, 478–485. https://doi.org/10.3382/ps/pew344

Zelber-Sagi, S., Azar, S., Nemirovski, A., Webb, M., Halpern, Z., Shibolet, O., & Tam, J. (2017). Serum levels of endocannabinoids are independently associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Obesity*, *25*(1), 94–101. https://doi.org/10.1002/oby.21687

Zhang, Jielei, Fan, N., & Peng, Y. (2018). Heat shock protein 70 promotes lipogenesis in HepG2 cells. *Lipids in Health and Disease*, *17*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s12944-018-0722-8

Zhang, Jin. (2005). *Central Cannabinoid Regulation of Food Intake in Chickens*.

Zhang, Q., Luo, Y. K., Zhang, B. H., Chan, Y. Z., Huang, L. L., Wang, Y., Liang, J. M., & Zhang, X. Q. (2020). RNA-Seq Study of Hepatic Response of Yellow-Feather Chickens to Acute Heat Stress. *Annals of Animal Science*, *20*(1), 55–69. https://doi.org/10.2478/aoas-2019-0060

Zuidhof, M. J., Schneider, B. L., Carney, V. L., Korver, D. R., & Robinson, F. E. (2014). Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 20051. *Poultry Science*, *93*(12), 2970–2982. https://doi.org/10.3382/ps.2014-04291

ANNEXES

Liste des annexes

Annexe 1 : Mini-review: **Charlotte Andrieux**, Angélique Petit, Anne Collin, Marianne Houssier, Sonia Métayer-Coustard, Stéphane Panserat, Frédérique Pitel, Vincent Coustham, *Early Phenotype Programming in Birds by Temperature and Nutrition: A Mini Review* (Frontiers in Physiology, 2022)

Annexe 2 : **Charlotte Andrieux**, William Massimino, Sandra Biassuti, Stéphane Davail, Marie-Dominique Bernadet, Tracy Pioche, Karine Ricaud, Karine Gontier, Mireille Morisson, Anne Collin, Stéphane Panserat, Marianne Houssier, *Impacts of Embryonic Thermal Programing on the Genes Involved in Mule Ducks* (Frontiers in physiology, 2021)

Annexe 3 : Fiches des aliments distribués aux canards comprenant l'aliment de démarrage (PAG 1301), l'aliment de croissance (PAG1320) et l'aliment de gavage (PALMA146)

Annexe 4 : Abstract du web-congrès IFRG (14-15 Octobre 2021)

Annexe 5 : Article et poster présentés pour ma participation aux journées de la recherche avicole (JRA) (9-10 Mars 2022, Tours France)

Annexe 6 : Poster de la Stagiaire Clara Lebreton (stage de M1, 11 Avril au 3 Juin 2022) sur les modulations des gènes du métabolisme lipidique et glucidique dans le muscle pectoral du canards mulards gavés ou rationnés, et programmés ou contrôles.

Annexe 7 : Abstract du congrès IFRG (12-13 Octobre 2022, Leiden Pays-Bas)

Annexe 1 : Mini-review: **Charlotte Andrieux**, Angélique Petit, Anne Collin, Marianne Houssier, Sonia Métayer-Coustard, Stéphane Panserat, Frédérique Pitel, Vincent Coustham, *Early Phenotype Programming in Birds by Temperature and Nutrition: A Mini Review* (Frontiers in Physiology, 2022)

Résumé

Le début du développement embryonnaire est une période critique pendant laquelle l'environnement peut influencer significativement la santé, le bien-être, la robustesse et les performances des animaux d'élevage. Chez les vertébrés ovipares, comme les oiseaux, le développement embryonnaire prend entièrement place dans l'œuf. Ce développement dans l'œuf permet d'étudier directement les effets des changements environnementaux sur le développement embryonnaire. De façon intéressante, des impacts bénéfiques ont pu être identifiés dans de nombreuses études conduisant à l'innovation des procédures pour améliorer le phénotype des animaux sur le long terme. Dans cette revue, nous discutons des effets des stratégies touchant à la température ou à l'alimentation en début de développement et qui montrent des résultats prometteurs, ainsi que des potentiels effets transgénérationnels. Le timing, la durée et l'intensité de ces procédures sont essentiels pour garantir qu'ils apporteront des effets bénéfiques, sans affecter la survie des animaux ou la qualité finale du produit. Par exemple, des cycles d'augmentation de la température d'incubation des œufs ont pu être montrer une amélioration de la thermo tolérance et augmenter la production musculaire chez les poulets ou bien la production de foie gras chez les canards mulards. L'alimentation *in ovo* a également montré des résultats prometteurs permettant d'améliorer la maturation du tractus digestif, le développement et la croissance des poussins, mais aussi d'obtenir des poussins de meilleure qualité. De plus, des changements dans la disponibilité nutritionnelle des donneurs de méthyle peut influencer le phénotype de la descendance, par exemple. Les mécanismes moléculaires, derrière la programmation précoce des phénotypes, sont toujours étudiés et sont probablement d'origine épigénétique, comme montré dans de récentes études.

frontiers in Animal Science

PERSPECTIVE
published: 04 January 2022
doi: 10.3389/fanim.2021.755842

Early Phenotype Programming in Birds by Temperature and Nutrition: A Mini-Review

Charlotte Andrieux[1†], *Angélique Petit*[2†], *Anne Collin*[2], *Marianne Houssier*[1], *Sonia Métayer-Coustard*[2], *Stéphane Panserat*[1], *Frédérique Pitel*[3] and *Vincent Coustham*[1,2*]

[1] INRAE, Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, NUMEA, Saint-Pée-sur-Nivelle, France, [2] INRAE, Université de Tours, BOA, Nouzilly, France, [3] INRAE, Université de Toulouse, ENVT, GenPhySE, Castanet-Tolosan, France

Early development is a critical period during which environmental influences can have a significant impact on the health, welfare, robustness and performance of livestock. In oviparous vertebrates, such as birds, embryonic development takes place entirely in the egg. This allows the effects of environmental cues to be studied directly on the developing embryo. Interestingly, beneficial effects have been identified in several studies, leading to innovative procedures to improve the phenotype of the animals in the long term. In this review, we discuss the effects of early temperature and dietary programming strategies that both show promising results, as well as their potential transgenerational effects. The timing, duration and intensity of these procedures are critical to ensure that they produce beneficial effects without affecting animal survival or final product quality. For example, cyclic increases in egg incubation temperature have been shown to improve temperature tolerance and promote muscular growth in chickens or fatty liver production in mule ducks. *In ovo* feeding has also been successfully used to enhance digestive tract maturation, optimize chick development and growth, and thus obtain higher quality chicks. In addition, changes in the nutritional availability of methyl donors, for example, was shown to influence offspring phenotype. The molecular mechanisms behind early phenotype programming are still under investigation and are probably epigenetic in nature as shown by recent work in chickens.

Keywords: programming, bird, temperature, nutrition, *in ovo*, embryo

OPEN ACCESS

Edited by:
Pascale Chavatte-Palmer, INRA UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, France

Reviewed by:
Dana L. M. Campbell, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), Australia
Christi Swaggerty, United States Department of Agriculture (USDA), United States

***Correspondence:**
Vincent Coustham
vincent.coustham@inrae.fr

[†]These authors have contributed equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to Animal Physiology and Management, a section of the journal Frontiers in Animal Science

Received: *09 August 2021*
Accepted: *14 December 2021*
Published: *04 January 2022*

Citation:
Andrieux C, Petit A, Collin A, Houssier M, Métayer-Coustard S, Panserat S, Pitel F and Coustham V (2022) Early Phenotype Programming in Birds by Temperature and Nutrition: A Mini-Review. Front. Anim. Sci. 2:755842. doi: 10.3389/fanim.2021.755842

INTRODUCTION

Early development is a critical period during which the environment influences the health, welfare, robustness and performance of livestock (Ho et al., 2011; Reed and Clark, 2011). Long-term effects of the early environment, i.e., during embryogenesis or the first days of life, have been demonstrated in cattle (Reynolds and Vonnahme, 2017), sheep (Reynolds et al., 2010), pigs (Feeney et al., 2014), fish (Panserat et al., 2019), and birds (Feeney et al., 2014; Loyau et al., 2015) among others. The oviparous vertebrate model differs from the others due to an embryonic development outside of the dam. Therefore, the embryo can be easily manipulated, opening up new opportunities for phenotypic programming to improve poultry production.

Embryonic incubation conditions have been studied since the mid-20th century to find optimal incubation parameters for poultry production. The concept of programming has emerged more

recently with the demonstration of beneficial effects of different stimuli such as temperature (Loyau et al., 2015), nutrition (Uni et al., 2005; Cherian, 2011) or changes in maternal diet (Hynd et al., 2016; Baéza et al., 2017). The purpose of this review is to provide a concise description of the advancement of this concept in four poultry species (broiler chickens, quails, ducks and turkeys) with a particular interest on two main embryonic programming strategies, nutrition and temperature.

NUTRITIONAL PROGRAMMING STRATEGIES

The Maternal Nutrition as a Lever to Program the Progeny's Phenotype

Several maternal nutritional strategies have been developed to modulate egg nutrient content to obtain higher quality chicks in terms of robustness, growth and body composition. The links between hen nutrition and management, egg composition and subsequent animal behavior, performance, and disease susceptibility are well-established (Aigueperse et al., 2013). The breeder hen's diet can modulate the levels of other essential nutrients, which in turn can impact the fitness of hatched chicks and their phenotype later in life (for reviews, see Rühl, 2007; Morisson et al., 2017).

Fatty acids are essential for embryonic development, bird growth, the development of the central nervous system and the immune system (Noble et al., 1984; Ding and Lilburn, 1996; Wang et al., 2004; Cherian, 2015; Koppenol et al., 2015; Thanabalan and Kiarie, 2021). The balance of fatty acids (FA) can be modulated via the hen's diet. Ducklings from ducks fed with a FA ω3-enriched diet have a higher live weight at hatch (D0), D28 and D56 and a lower feed conversion ratio for the growing period (Baéza et al., 2017). Reduced hyperactivity and stress responsiveness in ducklings were also observed. Supplementation with FA ω3 LC also reduced the frequency and severity of pecking in ducklings.

In low protein feeding programs, not only are egg-laying rate and egg weight altered, but also the amount of leptin in the yolk sac and the expression of a number of genes in the yolk sac, hypothalamus, or muscle of the offspring (Rao et al., 2009). The chicks have lower hatch weight but faster post-hatch growth. More recently, it has been shown that feeding broiler breeders reduced protein diets has a negative impact on reproductive performance but improved offspring performance (Lesuisse et al., 2017), even in subsequent generations (Lesuisse et al., 2017, 2018). Studies testing different levels of digestible lysine (Ciacciariello and Tyler, 2013) or arginine (Fernandes et al., 2014) in hen diets have shown positive effects on offspring such as performance improvement, carcass yield, abdominal fat content, and bone quality for arginine supplementation.

Mineral and vitamin supplementations have often been studied to solve defects of mineralization of the skeleton and legs problems. Vitamins can be enriched in the egg through the hen's diet. Vitamin A is produced by the hen from the carotenoids in the feed. They have antioxidant properties, which are essential for the embryo. Indeed, in the last stage of incubation, fatty acid oxidation increases, as does the production of free radicals and oxidative stress. These processes mainly cause damage to the embryos (Surai et al., 2016). Vitamin D3 regulates the flow of calcium through the chorioallantoic membrane. A vitamin D-deficient diet leads to decreased Ca^{++} transport across the chorioallantoic membrane and decreased Ca^{++} accumulation in the embryo, as well as increased late embryonic mortality (malposition, beak unable to break through the shell). Minerals such as iodine, selenium, magnesium, zinc, copper, iron or manganese can also be enriched in eggs (Jiakui and Xiaolong, 2004; Chinrasri et al., 2013; Favero et al., 2013; Saunders-Blades and Korver, 2015; Torres and Korver, 2018; Xie et al., 2019).

Overall, maternal feeding approaches optimize the hen's diet through supplementation or restriction of a wide variety of nutrients. However, it is often difficult to assess whether the effects of maternal diet on offspring are direct or not.

In ovo Nutrition Programming Strategies

In ovo feeding is a more direct way to influence offspring phenotype. Several studies have reported the use of *in ovo* nutrient supplementation to reduce the hatch window and improve health, post-hatch immune status, hatchability, hatched chick weight, growth performance, and meat quality (Uni and Ferket, 2004; Wei et al., 2011; Kadam et al., 2013; Roto et al., 2016; Gao et al., 2017; Peebles, 2018; Taha-Abdelaziz et al., 2018; Jha et al., 2019; Kalantar et al., 2019; Ayansola et al., 2021). New *in ovo* strategies also aim to address new challenges such as finding alternatives to antibiotic use through probiotic injections (Oladokun and Adewole, 2020). Therefore, *in ovo* stimulation of chicken microflora offers a better approach in establishing intestinal microflora (Alagawany et al., 2021).

At hatching, chicks switch from a yolk FA-based diet to a complete diet. Injection of carbohydrates and amino acids (AA) during embryonic development allows chicks to adapt to their post-hatch diet. Carbohydrates are widely studied because their concentration within the egg is less than one percent of total nutrients (Campos et al., 2011). To limit the utilization of FA and proteolysis of muscle proteins for energy purposes, injections of carbohydrates alone or combined with other nutrients of interest have been performed *in ovo* to increase glycogen storage and modulate energy status of chicks (Retes et al., 2017). Results depended on the type of sugar injected, injection site, embryo developmental stage, and genetics. Smirnov et al. (2006) showed an effect of carbohydrate injection on intestinal epithelium development with a 27% increase in villus area at hatching.

Amino acid administration improves hatching weight (Ohta et al., 2001) which persists up to 56 days of age in some studies (Al-Murrani, 1982). *In ovo* injection of AA such as arginine, considered an essential amino acid in birds, has been used to improve post-hatch growth performance via regulation of protein synthesis through the mTOR pathway (Yu et al., 2018). Arginine also stimulated myogenin gene expression in cultured chicken tissues (Li et al., 2016b). Moreover, *in ovo* injection of sulfur AA (methionine plus cysteine) resulted in improved embryonic development, IGF-I and TLR4 gene expression, antioxidant status and jejunum histomorphometry of newly

hatched broiler chicks exposed to heat stress during incubation (Elnesr et al., 2019; Elwan et al., 2019).

In ovo injection of AA, FA, vitamins, and trace elements on early post-hatch growth may also impact the development of lymphoid organs (thymus, bursa, and spleen) and immune parameters in broilers (Bakyaraj et al., 2012). *In ovo* vitamin and mineral administration significantly augmented the hatchability percentage and body weight of chicks post hatching (Alagawany et al., 2020; Hassan et al., 2021). The efficacy of vitamins C, E, D3, and folic acid on embryonic health and development has been reported in the literature (Peebles, 2018). The use of the yolk by the embryo for energy purposes results in oxidative processes, leading to the degradation of polyunsaturated fatty acids in cell membranes. Vitamins, such as vitamin E or C, protect the embryo by limiting the negative effects of free radicals (Surai et al., 2016; Araújo et al., 2018; Peebles, 2018). Results may depend on doses, ages, and injection sites.

Determining the mechanisms by which egg nutrients regulate cellular metabolism, signaling, gene expression and function is critical to improving nutrient utilization, poultry production efficiency and animal robustness. In birds, most studies only report phenotypic results of *in ovo* injections. Only a few recent studies are beginning to decipher the mechanisms involved in these phenotypic changes. Epigenetic changes may be involved, especially when methyl group donors, such as methionine, are injected (Anderson et al., 2012; Donohoe and Bultman, 2012; Veron et al., 2018). Thus, manipulation of sulfur AA content can induce changes in cellular function that may have implications for the development, long-term growth, and health of the animal. The early utilization of nutrients like AA can influence disease resistance and embryo survival (Saeed et al., 2019). Folate supplementation improved growth performance, immune function, and folate metabolism of broilers through epigenetic regulation of immune genes by altering chromatin conformation and epigenetic marks such as histone methylation (Li et al., 2016a). Injection of betaine (a component of the methionine cycle), also considered an effective antioxidant agent and methyl donor, affects hepatic cholesterol metabolism through epigenetic gene regulation in newly hatched chicks (Hu et al., 2015).

TEMPERATURE PROGRAMMING STRATEGIES

Temperature Increases During Egg Incubation

Thermal manipulation (TM) during embryogenesis has been studied for over three decades. TM involves altering egg incubation temperature to improve post-hatch physiological responses of birds (Iqbal et al., 1990). In particular, fine-tuning egg incubation temperature has been used to develop strategies to help chickens better withstand heat later in life (Loyau et al., 2015). TM has since been studied in several other avian species, including turkeys for thermoregulation and muscle growth (Maltby et al., 2004; Piestun et al., 2015), ducks for the lipid metabolism and liver (Wang et al., 2014; Massimino et al., 2019), and quail for growth, physiological and metabolic parameters (Vitorino Carvalho et al., 2020).

Cyclic increases in incubation temperature, mimicking naturally fluctuating conditions, have been found to improve thermal tolerance while minimizing hatching defects (Piestun et al., 2008; Loyau et al., 2015). Because of the interference between the thermoregulatory system and other body functions, TM has also been shown to alter a broader range of phenotypes. For instance, TM has been shown to affect growth in broiler chickens and quails (Loyau et al., 2013; Vitorino Carvalho et al., 2020), muscle development in broiler chickens (Collin et al., 2007; Piestun et al., 2009), skin vascularization in broiler chickens (Morita et al., 2016) and immunity in Pekin ducks (Shanmugasundaram et al., 2018). In Pekin ducks, TM positively impacted muscle fiber diameter and regulatory pathways of muscle development (Liu et al., 2015; Li et al., 2017). Interestingly, TM increased liver weight (Liu et al., 2015) and lipogenesis gene activity in Pekin ducks (Wang et al., 2014). Three different TM conditions were shown to result in increased fatty liver weight, lipid amount, and droplets size after the overfeeding period in mule ducks (Massimino et al., 2019).

Several factors must be considered when implementing a thermal incubation strategy, the most important being the timing and the cyclicality of the treatment and the level of temperature increase (Loyau et al., 2015). For example, early days of embryogenesis and continuous temperature increases should be avoided, as they are associated with hatching defects (Massimino et al., 2019; Vitorino Carvalho et al., 2020). Breeding age and genetics contribute to the effectiveness of TM (Yalçin et al., 2005). Increasing the relative humidity in the incubator is another important parameter to prevent dehydration during temperature elevation (Loyau et al., 2015). Therefore, incubation parameters must be finely tuned to tip the balance toward positive rather than negative effects. This may explain why this seemingly straightforward procedure is not yet widely used in hatcheries.

One way to refine practices is to understand the mechanisms underlying the effects of TM. With advances in next-generation sequencing, genome-wide gene expression and epigenetic data have shed the light on some central and peripheral molecular effects of TM. In 35-day-old chickens and quails, TM has been shown to have a limited effect on gene expression in muscle and hypothalamus under normal rearing conditions (Loyau et al., 2016; Vitorino Carvalho et al., 2021). However, when animals were subjected to heat exposure at the same age, a much stronger gene expression response was found in the TM group compared to the control group. This may be explained by the involvement of epigenetic marks that are imprinted during the embryonic heat exposure and may trigger a differential response when the animals are again exposed to heat. This hypothesis is supported by the identification of several hundred differential peaks of histone marks altered by TM in the hypothalamus of 35-day-old chickens (David et al., 2019). In ducks, TM has been shown to affect the gene expression level of methylation enzymes (Yan et al., 2015), suggesting that incubation temperature may influence DNA methylation in ducks during early development. In addition, several studies have shown the involvement of heat shock proteins (HSP) and factors (HSF) that protect cells from

deleterious effects of stress such as misfolding and apoptosis (Costa et al., 2020). Interestingly, a recent study showed that TM altered the basal expression of HSP108, HSP90, HSF-1 and HSF-2 during late embryogenesis and the first week of life, but also the mRNA expression dynamics of these HSPs and HSFs during heat stress (Al-Zghoul and El-Bahr, 2019). HSPs were also identified as differentially expressed in genome-wide studies (Loyau et al., 2016; Vitorino Carvalho et al., 2021) but did not appear to be altered at the epigenetic level (David et al., 2019), suggesting that other mechanisms may be involved in TM lifelong memory.

Temperature Decreases During the Egg Incubation

Exposure of eggs to low incubation temperatures has several impacts on chick physiology, but also on long-term health and welfare traits. The young broiler chick is particularly sensitive to cold after hatching (Collin et al., 2003), and later in life, fast-growing broilers placed in a cold environment may develop an accumulation of fluid in the peritoneal cavity called ascites (Decuypere et al., 2000). While continuous incubation of eggs at low temperatures below 36°C results in degraded hatchability and increased pre-hatch incubation time (Kühn et al., 1982; Black and Burggren, 2004a,b), fine decreases in incubation temperatures have been proposed to stimulate subsequent cold tolerance in birds (Nichelmann and Tzschentke, 2002; Shinder et al., 2009; Akşit et al., 2013). Exposure to cold at the end of incubation did not alter hatchability but resulted in an increase in internal temperature at 3 days of age compared to control broilers chicks. This improved performance with a 5–10% increase in body weight at 14 and 35 days of age in standard temperature rearing (Shinder et al., 2011) and a 4% increase in female weight at 40 days of age, whereas no such change was observed in males (Nyuiadzi et al., 2020). The authors demonstrated beneficial effects of embryonic thermal programming on broiler health, with 19 and 26% reductions in mortality and incidence of ascites, respectively, compared to control chickens under ascites-inducing conditions. Less intense but cyclic cold embryonic thermal programming decreased mortality and ascites incidence during growth of chicks from old breeders (Shinder et al., 2011). Such treatment induced an increase in body weight but a degradation in feed efficiency and a better cold tolerance of broilers when subsequently subjected to cold (Akşit et al., 2013). Loyau et al. (2014) reported that at hatching, the same embryonic cold exposure conditions resulted in a 9-fold increase in catalase activity in the liver of treated chicks compared to controls. This suggests that cyclic embryonic cold exposure stimulated antioxidant defenses in chicks, presumably in response to a transient increase in cold-induced tissue oxidation risk during incubation (Mujahid and Furuse, 2009).

These medium- to long-term effects of short cold exposures during incubation have been shown to trigger heat production through modifications in thermoregulatory mechanisms via a change in neuronal receptors sensitivity in the hypothalamus (Nichelmann and Tzschentke, 2002), and an increase in plasma triiodothyronine T3 concentration (Kamanli et al., 2015). Finally, the impacts of cold exposure during incubation on subsequent chick behavior were reported by Bertin et al. (2018). The authors analyzed the effect of acute decreases in temperature during days 12–19 of incubation on the expression of fear-related behaviors in broilers. At hatching, this treatment affected neurodevelopmental plasticity in the brain with higher expression of corticotropin-releasing factor in nuclei of the amygdala, altering the chicks' social behavior, novelty perception, and increasing their fear behavior. However, cold exposures during incubation under these conditions impaired the health and welfare of chickens reared in postnatal cold (Nyuiadzi et al., 2020).

TRANSGENERATIONAL PROGRAMMING

A growing number of studies have suggested that environmental exposures may be transmitted beyond exposed generations via "transgenerational epigenetic inheritance" (Jablonka and Raz, 2009). Non-genetic transgenerational inheritance has recently been shown to occur in birds (Brun et al., 2015; Leroux et al., 2017). For instance, Brun et al. (2015) showed that the Muscovy duck diet is capable of affecting traits related to growth and lipid metabolism in the grand-offspring, via the sire. In quail, *in ovo* injection of genistein, a phytoestrogen, impacted reproductive and behavioral traits after 3 generations without further injection (Leroux et al., 2017). In a 3-generation study in broilers, a reduced balanced protein diet induced transgenerational effects, including feather condition, polydipsia and frustration-related behavior (Buyse et al., 2020).

While these examples illustrate the existence of non-genetic inheritance of embryonic exposure in birds, the magnitude of these effects remains to be assessed in most cases. Although "epigenetic heritability" has been estimated at very low values for several egg quality traits in meat-type quails (Paiva et al., 2018b), an epigenetic heritability of 0.10 for the weight at 7 days of age has been reported (Paiva et al., 2018a). Concurrently, very little is known about the molecular mechanisms involved, especially in poultry (Guerrero-Bosagna et al., 2018). These may include alterations in sperm miRNAs and lncRNAs (Wu et al., 2019), or putative RNA modifications, DNA methylation, and retained histones (Matsushima et al., 2019).

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

To face future challenges, including fluctuations due to climate change and changing farming systems, breeders are under pressure to increase performance and productivity, but also to ensure resilience and reduce resource use and environmental impact. In this context, epigenetic programming is an underestimated lever, as maternal or embryonic nutritional and thermal programming offers promising prospects to improve poultry performance and welfare. Programming the environment of animals (e.g., optimizing the way they are housed and fed) can indeed promote non-genetic factors that may be passed on the subsequent generations. This aspect is particularly important in the poultry industry where,

generally, production farms are located all over the world, including in warm climate regions, while breeding farms are concentrated in a few temperate locations. Identifying environmental changes in ancestors that affect offspring traits through the transmission of epigenetic marks would therefore allow breeders to produce commercial animals better adapted to local production environments. In order to implement such fine-tuned practices in the field, additional research is needed in this challenging area to account for the potential variability of breeders and the response of their offspring.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

Ethical review and approval was not required for the animal study because this review cites approved studies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the writing of the review.

FUNDING

CA was funded by the Comité Départemental des Landes (CD40), France. AP was funded by the University of Tours, France. Some results on which this review is based on were part of studies funded by INRAE (Department Animal Physiology and Livestock Systems, Eval_Adapt project) and carried out within the UMT framework Integrative Biology Research and Development (BIRD) associating ITAVI and INRAE, by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR), Programs ANR-09-JCJC-0015-01 THERMOCHICK, ANR-09-GENM-004 EPIBIRD and ANR-15-CE02-0009-01 QuailHeatE, and by the Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras (CIFOG).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mireille Morisson (UMR GenPhySE, Toulouse, France) for initial discussions on the review.

REFERENCES

Aigueperse, N., Calandreau, L., and Bertin, A. (2013). Maternal diet influences offspring feeding behavior and fearfulness in the precocial chicken. *PLoS ONE* 8:e77583. doi: 10.1371/journal.pone.0077583

Akşit, M., Yalçin, S., Siegel, P. B., Yenisey, Ç., Özdemir, D., and Özkan, S. (2013). Broilers respond to cooler ambient temperatures after temperature acclimation during incubation and early postnatal age. *J. Appl. Poult. Res.* 22, 298–307. doi: 10.3382/japr.2012-00675

Alagawany, M., Elnesr, S. S., Farag, M. R., Abd El-Hack, M. E., Barkat, R. A., Gabr, A. A., et al. (2021). Potential role of important nutraceuticals in poultry performance and health - A comprehensive review. *Res. Vet. Sci.* 137, 9–29. doi: 10.1016/j.rvsc.2021.04.009

Alagawany, M., Elnesr, S. S., Farag, M. R., Tiwari, R., Yatoo, M. I., Karthik, K., et al. (2020). Nutritional significance of amino acids, vitamins and minerals as nutraceuticals in poultry production and health–a comprehensive review. *Vet. Q.* 41, 1–29. doi: 10.1080/01652176.2020.1857887

Al-Murrani, W. K. (1982). Effect of injecting amino acids into the egg on embryonic and subsequent growth in the domestic fowl. *Br. Poult. Sci.* 23, 171–174. doi: 10.1080/00071688208447943

Al-Zghoul, M. B., and El-Bahr, S. M. (2019). Basal and dynamics mRNA expression of muscular HSP108, HSP90, HSF-1 and HSF-2 in thermally manipulated broilers during embryogenesis. *BMC Vet. Res.* 15:83. doi: 10.1186/s12917-019-1827-7

Anderson, O. S., Sant, K. E., and Dolinoy, D. C. (2012). Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J. Nutr. Biochem.* 23, 853–859. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.03.003

Araújo, I. C. S., Caf,é, M. B., Noleto, R. A., Martins, J. M. S., Ulhoa, C. J., Guareshi, G. C., et al. (2018). Effect of vitamin E in ovo feeding to broiler embryos on hatchability, chick quality, oxidative state, and performance. *Poult. Sci.* 98, 3652–3661. doi: 10.3382/ps/pey439

Ayansola, H., Liao, C., Dong, Y., Yu, X., Zhang, B., and Wang, B. (2021). Prospect of early vascular tone and satellite cell modulations on white striping muscle myopathy. *Poult. Sci.* 100:100945. doi: 10.1016/j.psj.2020.12.042

Baéza, E., Chartrin, P., Bordeau, T., Lessire, M., Thoby, J. M., Gigaud, V., et al. (2017). Omega-3 polyunsaturated fatty acids provided during embryonic development improve the growth performance and welfare of Muscovy ducks (Cairina moschata). *Poult. Sci.* 96, 3176–3187. doi: 10.3382/ps/pex147

Bakyaraj, S., Bhanja, S. K., Majumdar, S., and Dash, B. (2012). Modulation of post-hatch growth and immunity through in ovo supplemented nutrients in broiler chickens. *J. Sci. Food Agric.* 92, 313–320. doi: 10.1002/jsfa.4577

Bertin, A., Calandreau, L., Meurisse, M., Georgelin, M., Palme, R., Lumineau, S., et al. (2018). Incubation temperature affects the expression of young precocial birds' fear-related behaviours and neuroendocrine correlates. *Sci. Rep.* 8, 1–10. doi: 10.1038/s41598-018-20319-y

Black, J. L., and Burggren, W. W. (2004a). Acclimation to hypothermic incubation in developing chicken embryos (Gallus domesticus) I. Developmental effects and chronic and acute metabolic adjustments. *J. Exp. Biol.* 207, 1543–1552. doi: 10.1242/jeb.00909

Black, J. L., and Burggren, W. W. (2004b). Acclimation to hypothermic incubation in developing chicken embryos (Gallus domesticus) II. Hematology and blood O2 transport. *J. Exp. Biol.* 207, 1553–1561. doi: 10.1242/jeb.00910

Brun, J. M., Bernadet, M. D., Cornuez, A., Leroux, S., Bodin, L., Basso, B., et al. (2015). Influence of grand-mother diet on offspring performances through the male line in Muscovy duck. *BMC Genet.* 16, 1–11. doi: 10.1186/s12863-015-0303-z

Buyse, J., Collin, A., Coustham, V., De Haas, E., and Pitel, F. (2020). The use of epigenetics in poultry breeding. *Adv. Poult. Genet. Genomics*. doi: 10.19103/AS.2020.0065.28

Campos, A. M., de, A., Rostagno, H. S., Gomes, P. C., da Silva, E. A., Albino, L. F. T., et al. (2011). Efeito da inoculação de soluções nutritivas *in ovo* sobre a eclodibilidade e o desempenho de frangos de corte. *Rev. Bras. Zootec.* 40, 1712–1717. doi: 10.1590/S1516-35982011000800013

Cherian, G. (2011). Essential fatty acids and early life programming in meat-type birds. *Worlds. Poult. Sci. J.* 67, 599–614. doi: 10.1017/S0043933911000705

Cherian, G. (2015). Nutrition and metabolism in poultry: Role of lipids in early diet. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6:28. doi: 10.1186/s40104-015-0029-9

Chinrasri, O., Chantiratikul, P., Maneetong, S., Chookhampaeng, S., and Chantiratikul, A. (2013). Productivity and selenium concentrations in egg and tissue of laying quails fed selenium from hydroponically produced selenium-enriched kale sprout (Brassica oleracea var. alboglabra L.). *Biol. Trace Elem. Res.* 155, 381–386. doi: 10.1007/s12011-013-9824-3

Ciacciariello, M., and Tyler, N. C. (2013). The effects of maternal dietary lysine intake on offspring performance to 21 days of age. *J. Appl. Poult. Res.* 22, 238–244. doi: 10.3382/japr.2012-00625

Collin, A., Berri, C., Tesseraud, S., Requena Rodón, F. E., Skiba-Cassy, S., Crochet, S., et al. (2007). Effects of thermal manipulation during early and late embryogenesis on thermotolerance and breast muscle characteristics in broiler chickens. *Poult. Sci.* 86, 795–800. doi: 10.1093/ps/86.5.795

Collin, A., Buyse, J., Van As, P., Darras, V. M., Malheiros, R. D., Moraes, V. M. B., et al. (2003). Cold-induced enhancement of avian uncoupling protein expression, heat production, and triiodothyronine concentrations in broiler chicks. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130, 70–77. doi: 10.1016/S0016-6480(02)00571-3

Costa, B. T. A., Lopes, T. S. B., Mesquita, M. A., Lara, L. J. C., and Araújo, I. C. S. (2020). Thermal manipulations of birds during embryogenesis. *Worlds. Poult. Sci. J.* 76, 843–851. doi: 10.1080/00439339.2020.1823302

David, S. A., Vitorino Carvalho, A., Gimonnet, C., Brionne, A., Hennequet-Antier, C., Piégu, B., et al. (2019). Thermal manipulation during embryogenesis impacts H3K4me3 and H3K27me3 histone marks in chicken hypothalamus. *Front. Genet.* 10, 1–11. doi: 10.3389/fgene.2019.01207

Decuypere, E., Buyse, J., and Buys, N. (2000). Ascites in broiler chickens: exogenous and endogenous structural and functional causal factors. *Worlds. Poult. Sci. J.* 56, 374–377. doi: 10.1079/WPS20000025

Ding, S. T., and Lilburn, M. S. (1996). Characterization of changes in yolk sac and liver lipids during embryonic and early posthatch development of turkey poults. *Poult. Sci.* 75, 478–483. doi: 10.3382/ps.0750478

Donohoe, D. R., and Bultman, S. J. (2012). Metaboloepigenetics: Interrelationships between energy metabolism and epigenetic control of gene expression. *J. Cell. Physiol.* 227, 3169–3177. doi: 10.1002/jcp.24054

Elnesr, S. S., Elwan, H. A. M., Xu, Q. Q., Xie, C., Dong, X. Y., and Zou, X. T. (2019). Effects of in ovo injection of sulfur-containing amino acids on heat shock protein 70, corticosterone hormone, antioxidant indices, and lipid profile of newly hatched broiler chicks exposed to heat stress during incubation. *Poult. Sci.* 98, 2290–2298. doi: 10.3382/ps/pey609

Elwan, H. A. M., Elnesr, S. S., Xu, Q., Xie, C., Dong, X., and Zou, X. (2019). Effects of in ovo methionine-cysteine injection on embryonic development, antioxidant status, IGF-I and TLR4 gene expression, and jejunum histomorphometry in newly hatched broiler chicks exposed to heat stress during incubation. *Animals* 9, 1–13. doi: 10.3390/ani9010025

Favero, A., Vieira, S. L., Angel, C. R., Bess, F., Cemin, H. S., and Ward, T. L. (2013). Reproductive performance of Cobb 500 breeder hens fed diets supplemented with zinc, manganese, and copper from inorganic and amino acid-complexed sources. *J. Appl. Poult. Res.* 22, 80–91. doi: 10.3382/japr.2012-00607

Feeney, A., Nilsson, E., and Skinner, M. K. (2014). Epigenetics and transgenerational inheritance in domesticated farm animals. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5, 1–7. doi: 10.1186/2049-1891-5-48

Fernandes, J. I. M., Murakami, A. E., de Souza, L. M. G., Ospina-Rojas, I. C., and Rossi, R. M. (2014). Effect of arginine supplementation of broiler breeder hens on progeny performance. *Can. J. Anim. Sci.* 94, 313–321. doi: 10.4141/cjas2013-067

Gao, T., Zhao, M., Zhang, L., Li, J., Yu, L., Lv, P., et al. (2017). Effect of in ovo feeding of l-arginine on the hatchability, growth performance, gastrointestinal hormones, and jejunal digestive and absorptive capacity of posthatch broilers. *J. Anim. Sci.* 95, 3079–3092. doi: 10.2527/jas.2016.0465

Guerrero-Bosagna, C., Morisson, M., Liaubet, L., Rodenburg, T. B., de Haas, E. N., Koštál, L., et al. (2018). Transgenerational epigenetic inheritance in birds. *Environ. Epigenetics* 4, 0–8. doi: 10.1093/eep/dvy008

Hassan, H. A., Arafat, A. R., Farroh, K. Y., Bahnas, M. S., El-wardany, I., and Elnesr, S. S. (2021). Effect of in ovo copper injection on body weight, immune response, blood biochemistry and carcass traits of broiler chicks at 35 days of age. *Anim. Biotechnol.* 1–8. doi: 10.1080/10495398.2021.1874964

Ho, D. H., Reed, W. L., and Burggren, W. W. (2011). Egg yolk environment differentially influences physiological and morphological development of broiler and layer chicken embryos. *J. Exp. Biol.* 214, 619–628. doi: 10.1242/jeb.046714

Hu, Y., Sun, Q., Li, X., Wang, M., Cai, D., Li, X., et al. (2015). In ovo injection of betaine affects hepatic cholesterol metabolism through epigenetic gene regulation in newly hatched chicks. *PLoS ONE* 10:e0122643. doi: 10.1371/journal.pone.0122643

Hynd, P. I., Weaver, S., Edwards, N. M., Heberle, N. D., and Bowling, M. (2016). Developmental programming : a new frontier for the poultry industry? *Anim. Prod. Sci.* 56, 1233–1238. doi: 10.1071/AN15373

Iqbal, A., Decuypere, E., Abd El Azim, A., and Kühn, E. R. (1990). Pre- and post-hatch high temperature exposure affects the thyroid hormones and corticosterone response to acute heat stress in growing chicken (Gallus domesticus). *J. Therm. Biol.* 15, 149–153. doi: 10.1016/0306-4565(90)90032-D

Jablonka, E., and Raz, G. (2009). Epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Q. Rev. Biol.* 84, 131–176. doi: 10.1086/598822

Jha, R., Singh, A. K., Yadav, S., Berrocoso, J. F. D., and Mishra, B. (2019). Early nutrition programming (in ovo and post-hatch feeding) as a strategy to modulate gut health of poultry. *Front. Vet. Sci.* 6:82. doi: 10.3389/fvets.2019.00082

Jiakui, L., and Xiaolong, W. (2004). Effect of dietary organic versus inorganic selenium in laying hens on the productivity, selenium distribution in egg and selenium content in blood, liver and kidney. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 65–68. doi: 10.1016/j.jtemb.2004.04.002

Kadam, M. M., Barekatain, M. R., K., Bhanja, S., and Iji, P. A. (2013). Prospects of in ovo feeding and nutrient supplementation for poultry: the science and commercial applications-a review. *J. Sci. Food Agric.* 93, 3654–3661. doi: 10.1002/jsfa.6301

Kalantar, M., Hosseini, S. M., Hosseini, M. R., Kalantar, M. H., Farmanullah, and Yang, L. G. (2019). Effects of *in ovo* injection of coenzyme Q10 on hatchability, subsequent performance, and immunity of broiler chickens. *Biomed Res. Int.* 2019:7167525. doi: 10.1155/2019/7167525

Kamanli, S., Durmu,ş, I., Yalçin, S., Yildirim, U., and Meral, Ö. (2015). Effect of prenatal temperature conditioning of laying hen embryos: hatching, live performance and response to heat and cold stress during laying period. *J. Therm. Biol.* 51, 96–104. doi: 10.1016/j.jtherbio.2015.04.001

Koppenol, A., Buyse, J., Everaert, N., Willems, E., Wang, Y., Franssens, L., et al. (2015). Transition of maternal dietary n-3 fatty acids from the yolk to the liver of broiler breeder progeny via the residual yolk sac. *Poult. Sci.* 94, 43–52. doi: 10.3382/ps/peu006

Kühn, E. R., Decuypere, E., Colen, L. M., and Michels, H. (1982). Posthatch growth and development of a circadian rhythm for thyroid hormones in chicks incubated at different temperatures. *Poult. Sci.* 61, 540–549. doi: 10.3382/ps.0610540

Leroux, S., Gourichon, D., Leterrier, C., Labrune, Y., Coustham, V., Rivière, S., et al. (2017). Embryonic environment and transgenerational effects in quail. *Genet. Sel. Evol.* 49, 1–8. doi: 10.1186/s12711-017-0292-7

Lesuisse, J., Li, C., Schallier, S., Leblois, J., Everaert, N., and Buyse, J. (2017). Feeding broiler breeders a reduced balanced protein diet during the rearing and laying period impairs reproductive performance but enhances broiler offspring performance. *Poult. Sci.* 96, 3949–3959. doi: 10.3382/ps/pex211

Lesuisse, J., Schallier, S., Li, C., Bautil, A., Li, B., Leblois, J., et al. (2018). Multigenerational effects of a reduced balanced protein diet during the rearing and laying period of broiler breeders. 2. Zootechnical performance of the F1 broiler offspring. *Poult. Sci.* 97, 1666–1676. doi: 10.3382/ps/pey014

Li, S., Zhi, L., Liu, Y., Shen, J., Liu, L., Yao, J., et al. (2016a). Effect of in ovo feeding of folic acid on the folate metabolism, immune function and epigenetic modification of immune effector molecules of broiler. *Br. J. Nutr.* 115, 411–421. doi: 10.1017/S0007114515004511

Li, X., Qiu, J., Liu, H., Wang, Y., Hu, J., Gan, X., et al. (2017). Long-term thermal manipulation in the late incubation period can inhibit breast muscle development by activating endoplasmic reticulum stress in duck (Anasplatyrhynchos domestica). *J. Therm. Biol.* 70, 37–45. doi: 10.1016/j.jtherbio.2017.10.008

Li, Y., Wang, Y., Willems, E., Willemsen, H., Franssens, L., Buyse, J., et al. (2016b). *In ovo* L-arginine supplementation stimulates myoblast differentiation but negatively affects muscle development of broiler chicken after hatching. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 100, 167–177. doi: 10.1111/jpn.12299

Liu, H., Liu, J., Yan, X., Li, Q., Zhao, Y., Wang, Y., et al. (2015). Impact of thermal stress during incubation on gene expression in embryonic muscle of Peking ducks (Anasplatyrhynchos domestica). *J. Therm. Biol.* 53, 80–89. doi: 10.1016/j.jtherbio.2015.08.013

Loyau, T., Bedrani, L., Berri, C., Métayer-Coustard, S., Praud, C., Coustham, V., et al. (2015). Cyclic variations in incubation conditions induce adaptive responses to later heat exposure in chickens: a review. *Animal* 9, 76–85. doi: 10.1017/S1751731114001931

Loyau, T., Berri, C., Bedrani, L., Métayer-Coustard, S., Praud, C., Duclos, M. J., et al. (2013). Thermal manipulation of the embryo modifies the physiology and body composition of broiler chickens reared in floor pens without affecting breast meat processing quality. *J. Anim. Sci.* 91, 3674–3685. doi: 10.2527/jas.2013-6445

Loyau, T., Collin, A., Yenisey, Ç., Crochet, S., Siegel, P. B., Akşit, M., et al. (2014). Exposure of embryos to cyclically cold incubation temperatures durably affects energy metabolism and antioxidant pathways in broiler chickens. *Poult. Sci.* 93, 2078–2086. doi: 10.3382/ps.2014-03881

Loyau, T., Hennequet-Antier, C., Coustham, V., Berri, C., Leduc, M., Crochet, S., et al. (2016). Thermal manipulation of the chicken embryo triggers differential gene expression in response to a later heat challenge. *BMC Genomics* 17:329. doi: 10.1186/s12864-016-2661-y

Maltby, V., Somaiya, A., French, N. A., and Stickland, N. C. (2004). In ovo temperature manipulation influences post-hatch muscle growth in the turkey. *Br. Poult. Sci.* 45, 491–498. doi: 10.1080/00071660412331286190

Massimino, W., Davail, S., Bernadet, M., Pioche, T., Ricaud, K., Gontier, K., et al. (2019). Impact of thermal manipulation during embryogenesis on hepatic metabolism in mule ducks. *Front. Physiol.* 10, 1–12. doi: 10.3389/fphys.2019.01495

Matsushima, W., Brink, K., Schroeder, J., Miska, E. A., and Gapp, K. (2019). Mature sperm small-RNA profile in the sparrow: implications for transgenerational effects of age on fitness. *Environ. Epigenetics* 5, 1–11. doi: 10.1093/eep/dvz007

Morisson, M., Coustham, V., Frésard, L., Collin, A., Zerjal, T., Métayer-coustard, S., et al. (2017). *Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics*. Cham: Springer. Available online at: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-319-31143-2_40-1#citeas

Morita, V., S., Almeida, V. R., Matos, J. B., Vicentini, T. I., van den Brand, H., et al. (2016). Incubation temperature during fetal development influences morphophysiological characteristics and preferred ambient temperature of chicken hatchlings. *PLoS ONE* 11:e0154928. doi: 10.1371/journal.pone.0154928

Mujahid, A., and Furuse, M. (2009). Oxidative damage in different tissues of neonatal chicks exposed to low environmental temperature. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 152, 604–608. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.01.011

Nichelmann, M., and Tzschentke, B. (2002). Ontogeny of thermoregulation in precocial birds. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 131, 751–763. doi: 10.1016/S1095-6433(02)00013-2

Noble, R. C., Connor, K., and Smith, W. K. (1984). The synthesis and accumulation of cholesteryl esters by the developing embryo of the domestic fowl. *Poult. Sci.* 63, 558–564. doi: 10.3382/ps.0630558

Nyuiadzi, D., Berri, C., Dusart, L., Travel, A., Méda, B., Bouvarel, I., et al. (2020). Short cold exposures during incubation and postnatal cold temperature affect performance, breast meat quality, and welfare parameters in broiler chickens. *Poult. Sci.* 99, 857–868. doi: 10.1016/j.psj.2019.10.024

Ohta, Y., Kidd, M. T., and Ishibashi, T. (2001). Embryo growth and amino acid concentration profiles of broiler breeder eggs, embryos, and chicks after *in ovo* administration of amino acids. *Poult. Sci.* 80, 1430–1436. doi: 10.1093/ps/80.10.1430

Oladokun, S., and Adewole, D. I. (2020). In ovo delivery of bioactive substances: an alternative to the use of antibiotic growth promoters in poultry production—a review. *J. Appl. Poult. Res.* 29, 744–763. doi: 10.1016/j.japr.2020.06.002

Paiva, J. T., de Resende, M. D. V., Resende, R. T., de Oliveira, H. R., Silva, H. T., Caetano, G. C., et al. (2018a). Transgenerational epigenetic variance for body weight in meat quails. *J. Anim. Breed. Genet.* 135, 178–185. doi: 10.1111/jbg.12329

Paiva, J. T., De Resende, M. D. V., Resende, R. T., Oliveira, H. R., Silva, H. T., Caetano, G. C., et al. (2018b). A note on transgenerational epigenetics affecting egg quality traits in meat-type quail. *Br. Poult. Sci.* 59, 624–628. doi: 10.1080/00071668.2018.1514582

Panserat, S., Marandel, L., Seiliez, I., and Skiba-Cassy, S. (2019). New insights on intermediary metabolism for a better understanding of nutrition in teleosts. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 7, 195–220. doi: 10.1146/annurev-animal-020518-115250

Peebles, E. D. (2018). *In ovo* applications in poultry: a review. *Poult. Sci.* 97, 2322–2338. doi: 10.3382/ps/pey081

Piestun, Y., Harel, M., Barak, M., Yahav, S., and Halevy, O. (2009). Thermal manipulations in late-term chick embryos have immediate and longer term effects on myoblast proliferation and skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* 106, 233–240. doi: 10.1152/japplphysiol.91090.2008

Piestun, Y., Shinder, D., Ruzal, M., Halevy, O., Brake, J., and Yahav, S. (2008). Thermal manipulations during broiler embryogenesis: Effect on the acquisition of thermotolerance. *Poult. Sci.* 87, 1516–1525. doi: 10.3382/ps.2008-00030

Piestun, Y., Zimmerman, I., and Yahav, S. (2015). Thermal manipulations of turkey embryos: the effect on thermoregulation and development during embryogenesis. *Poult. Sci.* 94, 273–280. doi: 10.3382/ps/peu047

Rao, K., Xie, J., Yang, X., Chen, L., Grossmann, R., and Zhao, R. (2009). Maternal low-protein diet programmes offspring growth in association with alterations in yolk leptin deposition and gene expression in yolk-sac membrane, hypothalamus and muscle of developing Langshan chicken embryos. *Br. J. Nutr.* 102, 848–857. doi: 10.1017/S0007114509276434

Reed, W. L., and Clark, M. E. (2011). Beyond maternal effects in birds: responses of the embryo to the environment. *Integr. Comp. Biol.* 51, 73–80. doi: 10.1093/icb/icr032

Retes, P. L., Clemente, A. H. S., Neves, D. G., Espósito, M., Makiyama, L., Alvarenga, R. R., et al. (2017). *In ovo* feeding of carbohydrates for broilers—a systematic review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 102, 361–369. doi: 10.1111/jpn.12807

Reynolds, L. P., Borowicz, P. P., Caton, J. S., Vonnahme, K. A., Luther, J. S., Hammer, C. J., et al. (2010). Developmental programming: the concept, large animal models, and the key role of uteroplacental vascular development. *J. Anim. Sci.* 88, E61–72. doi: 10.2527/jas.2009-2359

Reynolds, L. P., and Vonnahme, K. A. (2017). Livestock as models for developmental programming. *Anim. Front.* 7, 12–17. doi: 10.2527/af.2017-0123

Roto, S. M., Kwon, Y. M., and Ricke, S. C. (2016). Applications of *in ovo* technique for the optimal development of the gastrointestinal tract and the potential influence on the establishment of its microbiome in poultry. *Front. Vet. Sci.* 3:63. doi: 10.3389/fvets.2016.00063

Rühl, R. (2007). Effects of dietary retinoids and carotenoids on immune development: symposium on "nutritional influences on developmental immunology." *Proc. Nutr. Soc.* 66, 458–469. doi: 10.1017/S002966510600509X

Saeed, M., Babazadeh, D., Naveed, M., Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Arain, M. A., et al. (2019). *In ovo* delivery of various biological supplements, vaccines and drugs in poultry: current knowledge. *J. Sci. Food Agric.* 99, 3727–3739. doi: 10.1002/jsfa.9593

Saunders-Blades, J. L., and Korver, D. R. (2015). Effect of hen age and maternal vitamin D source on performance, hatchability, bone mineral density, and progeny *in vitro* early innate immune function. *Poult. Sci.* 94, 1233–1246. doi: 10.3382/ps/pev002

Shanmugasundaram, R., Wick, M., and Lilburn, M. S. (2018). Effect of embryonic thermal manipulation on heat shock protein 70 expression and immune system development in Pekin duck embryos. *Poult. Sci.* 97, 4200–4210. doi: 10.3382/ps/pey298

Shinder, D., Rusal, M., Giloh, M., and Yahav, S. (2009). Effect of repetitive acute cold exposures during the last phase of broiler embryogenesis on cold resistance through the life span. *Poult. Sci.* 88, 636–646. doi: 10.3382/ps.2008-00213

Shinder, D., Ruzal, M., Giloh, M., Druyan, S., Piestun, Y., and Yahav, S. (2011). Improvement of cold resistance and performance of broilers by acute cold exposure during late embryogenesis. *Poult. Sci.* 90, 633–641. doi: 10.3382/ps.2010-01089

Smirnov, A., Tako, E., Ferket, P. R., and Uni, Z. (2006). Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by *in ovo* feeding of carbohydrates. *Poult. Sci.* 85, 669–673. doi: 10.1093/ps/85.4.669

Surai, P. F., Fisinin, V. I., and Karadas, F. (2016). Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Anim. Nutr.* 2, 1–11. doi: 10.1016/j.aninu.2016.01.001

Taha-Abdelaziz, K., Hodgins, D. C., Lammers, A., Alkie, T. N., and Sharif, S. (2018). Effects of early feeding and dietary interventions on development of lymphoid organs and immune competence in neonatal chickens: a review. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 201, 1–11. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.05.001

Thanabalan, A., and Kiarie, E. G. (2021). Influence of feeding omega-3 polyunsaturated fatty acids to broiler breeders on indices of immunocompetence, gastrointestinal, and skeletal development in broiler chickens. *Front. Vet. Sci.* 8:653152. doi: 10.3389/fvets.2021.653152

Torres, C. A., and Korver, D. R. (2018). Influences of trace mineral nutrition and maternal flock age on broiler embryo bone development. *Poult. Sci.* 97, 2996–3003. doi: 10.3382/ps/pey136

Uni, Z., Ferket, P. R., Tako, E., and Kedar, O. (2005). In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poult. Sci.* 84, 764–770. doi: 10.1093/ps/84.5.764

Uni, Z., and Ferket, R. P. (2004). Methods for early nutrition and their potential. *Worlds. Poult. Sci. J.* 60, 101–111. doi: 10.1079/WPS20038

Veron, V., Marandel, L., Liu, J., Vélez, E. J., Lepais, O., Panserat, S., et al. (2018). DNA methylation of the promoter region of bnip3 and bnip3l genes induced by metabolic programming 06 Biological Sciences 0604 Genetics. *BMC Genomics* 19, 1–14. doi: 10.1186/s12864-018-5048-4

Vitorino Carvalho, A., Hennequet-antier, C., Brionne, A., Crochet, S., Jimenez, J., Courouss,é, N., et al. (2021). Embryonic thermal manipulation impacts the postnatal transcriptome response of heat-challenged Japanese quails. *BMC Genomics* 22, 1–13. doi: 10.1186/s12864-021-07832-7

Vitorino Carvalho, A., Hennequet-Antier, C., Crochet, S., Bordeau, T., Courouss,é, N., Cailleau-Audouin, E., et al. (2020). Embryonic thermal manipulation has short and long-term effects on the development and the physiology of the Japanese quail. *PLoS ONE* 15:e0227700. doi: 10.1371/journal.pone.0227700

Wang, G., Liu, J., Xiang, S., Yan, X., Li, Q., Cui, C., et al. (2014). Influence of *in ovo* thermal manipulation on lipid metabolism in embryonic duck liver. *J. Therm. Biol.* 43, 40–45. doi: 10.1016/j.jtherbio.2014.05.001

Wang, Y. W., Sunwoo, H., Cherian, G., and Sim, J. S. (2004). Maternal dietary ratio of linoleic acid to α-linolenic acid affects the passive immunity of hatching chicks. *Poult. Sci.* 83, 2039–2043. doi: 10.1093/ps/83.12.2039

Wei, X. J., Ni, Y. D., Lu, L. Z., Grossmann, R., and Zhao, R. Q. (2011). The effect of equol injection in ovo on posthatch growth, meat quality and antioxidation in broilers. *Animal* 5, 320–327. doi: 10.1017/S1751731110001771

Wu, S., Guo, W., Li, X., Liu, Y., Li, Y., Lei, X., et al. (2019). Paternal chronic folate supplementation induced the transgenerational inheritance of acquired developmental and metabolic changes in chickens. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 286:20191653. doi: 10.1098/rspb.2019.1653

Xie, C., Elwan, H. A. M., Elnesr, S. S., Dong, X. Y., and Zou, X. T. (2019). Effect of iron glycine chelate supplementation on egg quality and egg iron enrichment in laying hens. *Poult. Sci.* 98, 7101–7109. doi: 10.3382/ps/pez421

Yalçin, S., Özkan, S., Çabuk, M., Buyse, J., Decuypere, E., and Siegel, P. B. (2005). Pre- and postnatal conditioning induced thermotolerance on body weight, physiological responses and relative asymmetry of broilers originating from young and old breeder flocks. *Poult. Sci.* 84, 967–976. doi: 10.1093/ps/84.6.967

Yan, X. P., Liu, H. H., Liu, J. Y., Zhang, R. P., Wang, G. S., Li, Q. Q., et al. (2015). Evidence in duck for supporting alteration of incubation temperature may have influence on methylation of genomic DNA. *Poult. Sci.* 94, 2537–2545. doi: 10.3382/ps/pev201

Yu, L. L., Gao, T., Zhao, M. M., Lv, P. A., Zhang, L., Li, J. L., et al. (2018). Effects of *in ovo* feeding of l-arginine on breast muscle growth and protein deposition in post-hatch broilers. *Animal* 12, 2256–2263. doi: 10.1017/S1751731118000241

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Andrieux, Petit, Collin, Houssier, Métayer-Coustard, Panserat, Pitel and Coustham. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 2 : **Charlotte Andrieux**, William Massimino, Sandra Biassuti, Stéphane Davail, Marie-Dominique Bernadet, Tracy Pioche, Karine Ricaud, Karine Gontier, Mireille Morisson, Anne Collin, Stéphane Panserat, Marianne Houssier, *Impacts of Embryonic Thermal Programming on the Genes Involved in Mule Ducks* (Frontiers in physiology, 2021)

Résumé

La programmation thermique précoce a montré des améliorations de la production de foie gras chez les canards mulards gavés. Cependant, les mécanismes à l'origine de cette programmation n'ont pas été encore bien caractérisés. Dans cette étude, nous avons examiné l'effet de la manipulation thermique embryonnaire (+ 1°C, 16h/24 du 13ème jour embryonnaire au 27ème) sur les expressions relatives des gènes hépatiques impliqués dans les métabolisme lipidique et glucidique, du stress, de la prolifération cellulaire et des voies des hormones thyroïdiennes, à la fin de la manipulation thermique et après la période de gavage (OF) chez le canard mulard. L'analyse des expressions des gènes sont analysés par des qPCR en quantification en temps réel, classiques ou à haut débits. Dans un premier temps, nous avons confirmé que le gavage impacte fortement les expressions relatives des gènes impliqués dans les métabolismes lipidique et glucidique. Ensuite, nous avons également observé un impact du gavage sur les expressions relatives des gènes hépatiques impliqués dans les voies des hormones thyroïdiennes, du stress et de la prolifération cellulaire. Seul un petit nombre de gènes ont montré une modulation de leurs expressions liées à la programmation thermique en fin de la période de gavage (OF), et un de ces gènes a été également modulé à la fin de la manipulation thermique. Pour la première fois, nous avons explorés les mécanismes moléculaires de la programmation thermique embryonnaire, de la fin de la manipulation thermique à la programmation du phénotype des adultes, avec une optimisation du métabolisme du foie.

frontiers in Physiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 03 December 2021
doi: 10.3389/fphys.2021.779689

Impacts of Embryonic Thermal Programming on the Expression of Genes Involved in *Foie gras* Production in Mule Ducks

*William Massimino[1†], Charlotte Andrieux[1†], Sandra Biasutti[2], Stéphane Davail[1], Marie-Dominique Bernadet[3], Tracy Pioche[1], Karine Ricaud[1], Karine Gontier[1], Mireille Morisson[4], Anne Collin[5], Stéphane Panserat[1] and Marianne Houssier[1]**

[1] Univ Pau & Pays Adour, INRAE, E2S UPPA, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Saint-Pée-sur-Nivelle, France, [2] Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, IUT Génie Biologique, Mont-de-Marsan, France, [3] UEPFG INRAE Bordeaux-Aquitaine, Domaine d'Artiguères 1076, Benquet, France, [4] GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Castanet-Tolosan, France, [5] BOA, INRAE, Université de Tours, Nouzilly, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Jie Wen,
Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), China

Reviewed by:
Monika Proszkowiec-Weglarz, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture (USDA), United States
Mahmoud Madkour, National Research Centre, Egypt

***Correspondence:**
Marianne Houssier
marianne.houssier@univ-pau.fr

[†] These authors have contributed equally to this work and share first authorship

Specialty section:
This article was submitted to Avian Physiology, a section of the journal Frontiers in Physiology

Received: 19 September 2021
Accepted: 04 November 2021
Published: 03 December 2021

Citation:
Massimino W, Andrieux C, Biasutti S, Davail S, Bernadet M-D, Pioche T, Ricaud K, Gontier K, Morisson M, Collin A, Panserat S and Houssier M (2021) Impacts of Embryonic Thermal Programming on the Expression of Genes Involved in Foie gras Production in Mule Ducks. Front. Physiol. 12:779689. doi: 10.3389/fphys.2021.779689

Embryonic thermal programming has been shown to improve *foie gras* production in overfed mule ducks. However, the mechanisms at the origin of this programming have not yet been characterized. In this study, we investigated the effect of embryonic thermal manipulation (+1°C, 16 h/24 h from embryonic (E) day 13 to E27) on the hepatic expression of genes involved in lipid and carbohydrate metabolisms, stress, cell proliferation and thyroid hormone pathways at the end of thermal manipulation and before and after overfeeding (OF) in mule ducks. Gene expression analyses were performed by classic or high throughput real-time qPCR. First, we confirmed well-known results with strong impact of OF on the expression of genes involved in lipid and carbohydrates metabolisms. Then we observed an impact of OF on the hepatic expression of genes involved in the thyroid pathway, stress and cell proliferation. Only a small number of genes showed modulation of expression related to thermal programming at the time of OF, and only one was also impacted at the end of the thermal manipulation. For the first time, we explored the molecular mechanisms of embryonic thermal programming from the end of heat treatment to the programmed adult phenotype with optimized liver metabolism.

Keywords: embryonic thermal programming, liver, metabolism, gene expression, duck

INTRODUCTION

The concept of early life programming appeared in humans less than 30 years ago with the observation of an association between the size of a child at birth and the risk of developing chronic pathologies in adulthood (Barker et al., 1993). More recently, programming has emerged in farm animals as an effective technique for improving their performances as adults. The principle consists in exposing the organism, during an early period of its life, characterized by a great plasticity, to an environmental stimulus which can thus be "recorded" and which can direct an adapted response to another stimulus, occurring later in its life (Lucas, 1998). In mammals, several types of primary

stimulus have been associated to an alternative phenotype in adulthood such as developmental malnutrition, stress or hypoxia (Tarry-Adkins and Ozanne, 2011).

In birds, since embryogenesis occurs outside the mother's body, many types of environmental factors can be easily applied to "program" the animals. Incubation temperature being one of the easiest parameters to control, embryonic thermal programming is therefore one of the most studied in poultry and has already demonstrated its efficiency in terms of improving adult thermoregulation in multiple species such as chickens (Piestun et al., 2008), ducks (DuRant et al., 2013) or quails (Vitorino Carvalho et al., 2020). Interestingly, changing the incubation temperature can also improve other performances, such as meat production in chicken (Piestun et al., 2013), or even *foie gras* production in mule duck (Massimino et al., 2019). In this last study, our team demonstrated that three different conditions of embryonic thermal programming led to an increase in lipid content in the liver of adult mule ducks after overfeeding (OF) (Massimino et al., 2019). A parallel study, focusing on the ontogeny of mule duck liver (Massimino et al., 2020), demonstrated that these thermal manipulations occurred during a period characterized by high expression of carbohydrate and lipid metabolism genes, suggesting a greater sensitivity of these metabolic pathways to thermal stress applied during this period. Nevertheless, despite the many encouraging results, the molecular mechanisms of programming process remain largely unknown. Modification of hormonal responses, gene expression regulations or epigenetic marks have been studied in the context of increased thermoregulation (Vaiserman et al., 2018; Madkour et al., 2021), but the field concerning hepatic metabolism has been scarcely explored (Loyau et al., 2014).

Overfeeding is a method used to stimulate *de novo* lipogenesis in migratory birds that store their energy in the liver (Leveille et al., 1975). For about 12 days, the ducks are fed corn (grain or meal) twice a day and the excess carbohydrates are converted into lipids by the hepatocytes, resulting in a huge increase in liver weight (Baeza et al., 2013). The metabolic pathways involved in this hepatic steatosis have been more precisely described in the last decades (Herault et al., 2010). First, glucose is taken up by the liver (Annabelle et al., 2017), before being degraded into pyruvate and then into acetyl CoA which is subsequently used for lipid synthesis (Annabelle et al., 2018). These lipids can be transported to peripheral tissues or recaptured by the liver for long-term storage (Tavernier et al., 2017).

The embryonic thermal programming applied to mule ducks that resulted in the increase in liver fattening (Massimino et al., 2019) may have affected each of these metabolic pathways, but also a variety of other pathways such as cell proliferation or thyroid hormone pathway strongly involved in liver metabolism (Sinha et al., 2014). In this study, we examined for the first time the short and long term molecular impacts of a 1°C increase in incubation temperature applied discontinuously (16 h/24 h) between E13 and E27 on mule duck eggs, resulting in the best optimized response to overfeeding (Massimino et al., 2019). We focused our work on the expression of genes involved in liver metabolism, thyroid pathway, cellular stress and cell proliferation at the end of the thermal treatment to study the short term impact, and before and after overfeeding for a longer term study.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Approval Statement

All experimental procedures complied with French national guidelines for the care of animals for research purposes. The protocols were approved by the Animal care and Use Committee of the Greater Southwest Region (no. 73) and authorized by the department under the file reference APAFIS14196-201805250850236-v3. Ducks were killed in line with the European Council regulation (European Union, 2009) at the Experimental Station for Waterfowl breeding (INRA, Artiguères, France).

Eggs Incubation and Thermal Treatment

The overall experimental design is shown in **Figure 1**.

A total of 1,000 eggs of mule ducks (genotype H85, provided by Grimaud Frères Selection Company, Roussay, France) were kept at room temperature during 3 days prior to incubation and randomly divided into two incubators (500 eggs each). Control group was maintained at 37.6°C and 47% average relative humidity (RH) during the whole incubation period. Thermal manipulation (TM) was performed during the last 14 days of incubation period, i.e., embryonic day 13 to 27 (E13-E27) at 38.6°C 16 h/day (+1°C 16 h/24 h), RH being adjusted to an average of 63% in order to avoid egg dehydration. This thermal treatment condition was chosen among the three previously studied, for its optimal results, without any negative effect on hatchability or final yield (Massimino et al., 2019).

All eggs were turned through 90° every 3 h. In each incubator, temperature and hygrometry were continuously measured by a sensor equipped with remote probes (KIMO). Unfertile eggs were excluded by candling at E10, with a sliding of remaining eggs to prevent local temperature disturbance caused by the appearance of holes. On embryonic day 27 (E27), 20 embryos per group were collected and then temporarily placed in a small incubator near the dissection table, previously programmed to the incubation temperature, to avoid a long temperature variation before their slaughter by decapitation. Livers were harvested and frozen in liquid nitrogen for RNA extraction. The remaining eggs were placed in the same hatcher at 37.3°C and 80% of RH. Newly hatched ducks were recorded every day from E28 to E31.

Rearing and Force-Feeding Conditions, Sample Collection

Male ducklings were divided into two groups of 70 per treatment and were raised under the same conditions of light and temperature, and fed *ad libitum* from hatching to 4 weeks of age with a starting diet (2,800 Kcal, crude protein 17.5%). From 4 to 8 weeks of age, ducklings were fed *ad libitum* with a growing diet (2,800 Kcal, crude protein 15.5%), and hourly rationed between 8 and 12 weeks of age. At 12 weeks of age (D83) 15 animals per group were slaughtered for liver sampling before overfeeding

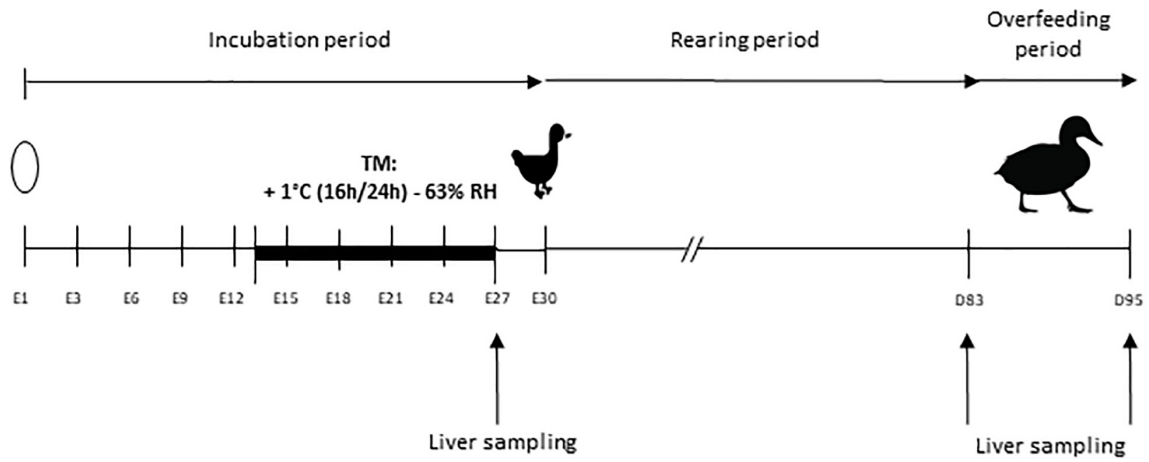


FIGURE 1 | Experimental design. Incubation period extends from embryonic day 1 (E1) to day 30 (E30), day of peak hatching of the ducklings. The thermal manipulation (TM) was performed between E13 and E27, with a temperature increase of 1°C (16 h/24 h) and relative humidity (RH) adjusted to 63%. Overfeeding began at 83 days of age (D83) and ended at 95 days (D95). Liver samplings for RNA extraction are indicated by an arrow at the end of the TM (E27) and before (D83) and after (D95) overfeeding.

period, classically practiced at this age in ducks (Saez et al., 2010; Hérault et al., 2018; Lo et al., 2020). All remaining ducks were overfed with corn meal twice a day (53% corn and 47% water, Palma Maisadour), for 11 days (21 meals) and slaughtered at the end of the OF period (D95). Liver samples from 20 animals per group were collected for gene expression analysis, 10 h after the last meal. In each case, ducks were slaughtered by exsanguination after electronarcosis. After dissection, pieces of liver were sampled in the middle of the large lobe for the study of gene expression and were frozen in liquid nitrogen for RNA analysis.

RNA Extraction and Reverse Transcription

Total RNA was isolated from frozen tissue according to the Ribozol method (VWR Life Science). Total RNA concentration was measured by spectrophotometry (optical density at 260 nm) using a Biotek EPOCH 2 microplate reader (Take 3 plate), and all the samples were normalized at 500 ng/μl. The integrity of total RNA was analyzed by electrophoresis, and the absence of DNA contamination was prevented by DNase treatment. Exogenous RNA of Luciferase (Promega) was added to each sample (100 pg per sample) to ensure the stability of a reference gene to enable data normalization, as described previously (Desvignes et al., 2011). For the RT-PCR, an amount of 3 μg RNA was reverse transcribed to cDNA with Iscript Reverse Transcription Supermix for RTqPCR (Bio-Rad, United States) with duplicate samples. Reverse transcription reaction was done in CFX384 (Bio-Rad, United States) according to this program: 25°C/5 min, 46°C/20 min, 95°C/1 min.

qPCR EvaGreen Using BioMark

The mRNA levels of 45 genes encoding proteins involved in lipid and carbohydrate metabolism, cell stress and proliferation, and the thyroid hormone pathway were quantified in liver from ducks before and after OF (at 83 and 95 days of age). Given the large number of genes and samples, we chose for this part to do a high-throughput expression study. All primer sequences used are listed on the **Supplementary Tables 1–3** and were validated on a concentration range of cDNA pool. Before performing Fluidigm step, a specific target amplification (STA) has been done with 5 ng/μL of cDNA. This step consists in PCR using PreAmp Master Mix and specific primer in order to normalize all samples and to ensure that there are enough copies of cDNA in each well. The manufacturer recommends this step because the method used nanovolumes. After the STA, all target and samples were distributed in a 96 × 96 chip for Fluidigm Gene Expression Array. The primers were provided by Applied Biosystems and were used at a concentration of 100 μM. The reaction was made using 20× EvaGreen dye following the program: holding stage 95°C for 10 min, 35 cycles of amplification: 95°C for 15 s, 60°C for 1 min. All the data were analyzed with the Fluidigm real-time PCR Analysis Software (Fluidigm Corporation v4.1.3). Melting curves were systematically monitored at the end of the last amplification cycle to confirm the specificity of the amplification reaction. Each qPCR run included negative controls (wells without reverse transcriptase, mRNA or cDNA). This part of the work was performed at the platform of quantitative transcriptomic GeT-TQ (GenoToul, Toulouse, France).

Gene Expression Analysis After EvaGreen qPCR

The selectHKgenes function with "Vandesompele" method of the SLqPCR package was used with RStudio (Version 1.2.1335) to choose the 6 most stable housekeeping genes (Pfaffl et al., 2004). The six housekeeping genes for the relative quantification of mRNA levels of target genes were USP9X, beta-actin, EIF3, STAB1, HPRT1 and Luciferase (added during the reverse transcription step), and are listed in the **Supplementary Table 3**. The slope of a standard curve using serial dilutions of cDNA

measured the efficiency (E) of PCR. In all cases, PCR efficiency values ranged between 1.85 and 2. The analyzes were done with RStudio and results were expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ with :

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{RQ_{target}}{\text{geomean}\,(RQ_{references})}$$

$$RQ = \frac{2^{\Delta Ct_{target}}}{(2^{\Delta Ct_{USP9X}} \times (2^{\Delta Ct_{Actine\beta}} \times 2^{\Delta Ct_{EIF3}} \times 2^{\Delta Ct_{STAB1}} \times 2^{\Delta Ct_{HPRT1}} \times 2^{\Delta Ct_{luciferase}})^{\frac{1}{6}}}$$

$$\Delta Ct_{target} = Ct_{control} - Ct_{sample}$$

$$\Delta Ct_{ref} = Ct_{control} - Ct_{samples}$$

$$Ct_{control} = \text{average Ct of all samples.}$$

Real Time qPCR Using Syber Green

Gene expression levels of embryonic liver samples (E27) were determined by real-time RT-PCR). Primer sequences are listed in the **Supplementary Tables 2, 3**.

The mRNA expression levels of target genes were detected using quantitative PCR with the PerfeCTa SYBR Green FastMix (Quantabio) in the CFX384 qPCR Detection System (Bio-Rad, United States). The reaction volume was 15 μL per sample and included 7.5 μL of SYBR Green FastMix, 2 μL (6 μg/mL) of cDNA and 2.75 μL of each primer (290 nM).

Melting curves were systematically monitored at the end of the last amplification cycle to confirm the specificity of the amplification reaction. Each qPCR run included duplicates of samples and negative controls (wells without reverse transcriptase, mRNA or cDNA).

Gene Expression Analysis After Syber Green qPCR

Relative quantifications of target gene mRNA levels were normalized with exogenous luciferase RNA (Promega), constituting the reference gene (ref). PCR efficiency was measured by the slope of a standard curve using serial dilutions of cDNA. In all cases, PCR efficiency values ranged between 1.85 and 2. Relative quantifications were expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) with:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{RQ_{target}}{RQ_{ref}}$$

$$RQ_{target} = 2^{\Delta Ct_{(target)}}$$

$$RQ_{ref} = 2^{\Delta Ct(ref)}$$

$$\Delta Ct_{target} = Ct_{control} - Ct_{sample}$$

$$\Delta ref_{target} = Ct_{control} - Ct_{sample}$$

$$Ct_{control} = \text{average Ct of all samples.}$$

Statistical Analyses

Statistical analyses were done using the GraphPad Prism v6 software. For embryonic samples (E27), when data set presented a Normal distribution (assessed by Shapiro–Wilk test), student's *t* tests were performed to compare control and TM groups. If the values did not follow a Normal distribution, the statistical analysis was performed with a non-parametric Mann Whitney test.

For pre-OF and post-OF samples, a two-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Sidak's multiple comparison test. The data are presented as the average ± standard error of mean (SEM). In every case, differences between the groups were considered statistically significant if the value of $P < 0.05$.

RESULTS

Expression of Heat Stress Pathway Genes at the End of the Thermal Manipulation

We first checked the expression of genes known to be influenced by heat stress to confirm that the thermal manipulation was indeed perceived by the liver of duck embryos. Relative expressions of three different heat shock proteins (HSP) and one heat shock factors (HSF) were analyzed in **Figure 2** at the end of the TM (E27). We measured a strong increase in gene expressions of HSP70 and HSP90 in the TM group compared to the control group. In contrast, the expressions of DNAJB12 (HSP40) and HSF3 were significantly reduced in the TM group compared to the control group. These results confirm the molecular perception of the thermal stimulus by duck embryos.

Impact of Early Thermal Manipulation and Overfeeding on Gene Expression of Metabolic Pathways

The **Table 1** lists the relative expression values of genes involved in lipid and carbohydrate metabolisms. All these genes were significantly modulated by OF, with an overall increase in carbohydrate transport and oxidation, and lipid synthesis. The two main regulators ChREBP and PPARG were also increased at the end of the OF period compared to before this feeding challenge. On the contrary, lipid oxidation was strongly down-regulated after the last meal of the OF period compared to the pre-OF period. As shown in the right panel of the table, only two genes were significantly altered by the TM during this period: GPAT1 and APOB. The increase in GPAT1 expression was significantly higher in the TM group compared with the control group after the OF period (significant interaction between both factors), whereas APOB expression was decreased by both OF and TM, without significant interaction between both nutritional and incubation factors.

Impact of Early Thermal Manipulation and Overfeeding on Gene Expression of Thyroid, Cellular Stress and Proliferation Pathways

The **Table 2** shows the relative expression of genes involved in various cellular pathways before and after OF in the liver. Most

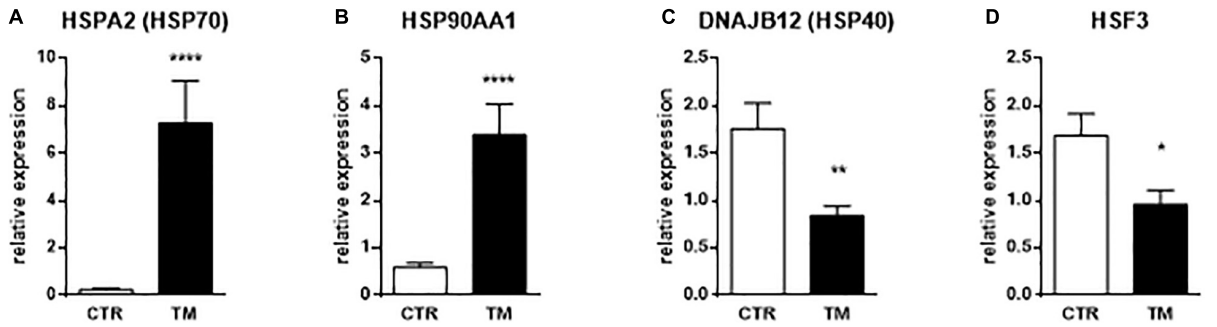


FIGURE 2 | Hepatic relative expression of genes directly influenced by heat treatment at E27. Column representation of the relative expression of HSPA2 **(A)**, HSP90AA1 **(B)**, DNAJB12 **(C)**, and HSF3 **(D)** at the end of the thermal manipulation in the liver of control (CTR) or thermal manipulated (TM) duck embryos. Data are presented as mean +/– SEM (n = 18–19). *P < 0.05, **P < 0.01, ****P < 0.0001.

TABLE 1 | Hepatic relative expression of genes involved in the lipid and carbohydrate pathways depending on incubation conditions before and after overfeeding.

			Control		TM		Effects			
Metabolic pathway		Gene	pre-OF	post-OF	pre-OF	post-OF	OF	TM	Interaction	n
Carbohydrates	Transport	GLUT1	0.44 ± 0.06	0.75 ± 0.06	0.33 ± 0.05	0.68 ± 0.09	**	ns	ns	5-19
		GLUT2	0.56 ± 0.06	0.95 ± 0.08	0.55 ± 0.04	0.83 ± 0.03	****	ns	ns	14-19
		GLUT3	0.26 ± 0.05	0.48 ± 0.05	0.27 ± 0.06	0.41 ± 0.03	***	ns	ns	12-19
	Oxidation	PDHA1	0.59 ± 0.06	0.78 ± 0.05	0.48 ± 0.04	0.78 ± 0.05	****	ns	ns	14-19
		ENO1	0.62 ± 0.04	0.87 ± 0.07	0.59 ± 0.04	0.88 ± 0.06	****	ns	ns	14-19
		HK1	0.54 ± 0.10	0.96 ± 0.08	0.47 ± 0.07	0.95 ± 0.07	****	ns	ns	14-19
Lipids	Synthesis	FASN	0.39 ± 0.06	2.07 ± 0.15	0.45 ± 0.09	1.93 ± 0.07	****	ns	ns	14-19
		DGAT2	0.11 ± 0.01	0.50 ± 0.06	0.19 ± 0.03	0.56 ± 0.10	****	ns	ns	14-18
		ACC	0.51 ± 0.04	1.02 ± 0.05	0.47 ± 0.06	0.92 ± 0.05	****	ns	ns	14-19
		SCD1	0.26 ± 0.06	1.63 ± 0.08	0.20 ± 0.05	1.73 ± 0.08	****	ns	ns	12-19
		ACLY	0.37 ± 0.05	1.28 ± 0.11	0.37 ± 0.06	1.47 ± 0.11	****	ns	ns	14-19
		PLIN2	0.31 ± 0.04	0.62 ± 0.05	0.28 ± 0.05	0.59 ± 0.04	****	ns	ns	14-19
		ELOV6	1.11 ± 0.08	2.18 ± 0.10	1.06 ± 0.10	2.20 ± 0.08	****	ns	ns	14-19
		GPAT1	0.50 (b) ± 0.07	0.84 (b) ± 0.08	0.48 (b) ± 0.08	1.41 (a) ± 0.16	****	*	*	14-19
	Oxidation	ACOX1	1.60 ± 0.14	0.71 ± 0.07	1.43 ± 0.11	0.66 ± 0.06	****	ns	ns	13-19
		ACAD11	1.38 ± 0.18	0.53 ± 0.06	1.01 ± 0.16	0.51 ± 0.06	****	ns	ns	14-19
		ACSL1	1.85 ± 0.19	0.80 ± 0.07	1.68 ± 0.15	0.83 ± 0.07	****	ns	ns	14-19
		LIPC	1.80 ± 0.31	0.98 ± 0.11	1.85 ± 0.31	0.76 ± 0.08	****	ns	ns	14-19
		CPT1	2.32 ± 0.26	0.80 ± 0.08	2.15 ± 0.17	0.87 ± 0.09	****	ns	ns	14-19
	Transport	APOB	1.16 ± 0.10	0.83 ± 0.07	0.88 ± 0.08	0.79 ± 0.06	**	*	ns	14-19
		FABP4	0.13 ± 0.02	1.02 ± 0.16	0.11 ± 0.02	1.24 ± 0.20	****	ns	ns	14-19
		VLDLR	1.02 ± 0.20	1.43 ± 0.13	0.83 ± 0.17	1.19 ± 0.15	*	ns	ns	14-19
		LDLR	1.48 ± 0.20	1.07 ± 0.10	1.54 ± 0.13	0.86 ± 0.06	****	ns	ns	13-19
Regulators		ChREBP	0.42 ± 0.04	1.33 ± 0.09	0.46 ± 0.07	1.23 ± 0.10	****	ns	ns	14-19
		PPARG	0.53 ± 0.06	0.99 ± 0.09	0.42 ± 0.04	0.90 ± 0.05	****	ns	ns	13-19

*Data are presented as mean +/– SEM. TM, thermal manipulation; pre-OF, before overfeeding period; post-OF, after overfeeding period. ns, non significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. Different letters in parentheses indicate significant differences measured between each group when there is an interaction between the OF and TM factors. n, number of samples.*

of these genes were significantly modified by OF. All profile types were represented in the thyroid pathway, with OF-induced increases in SPOT14 and THRB expression, decreases in NCOR and DIO3, and no OF effect for DIO1. Similarly, the cellular stress pathway was variously affected by OF, with an increase in HSP70, HSP90, HSF3 and ST13, and a decrease in UBQLN1, HSF2 and HSBP1 whereas PSMD12 were not altered at all by the nutritional challenge. The impact of OF on the cell proliferation pathway in the liver was more homogeneous with an increase in all relative expression values, except for HGF and MAPK1, which were not affected at all.

None of the genes involved in cell proliferation were influenced by the TM unlike the stress pathway that involved two genes whose expression was significantly decreased by

TABLE 2 | Hepatic relative expression of genes involved in the thyroid, stress and cell proliferation pathways depending on incubation conditions before and after overfeeding.

		Control		TM		Effects			
Pathway	**Gene**	**pre-OF**	**post-OF**	**pre-OF**	**post-OF**	**OF**	**TM**	**Interaction**	**n**
Thyroid Hormone Signaling	SPOT14	0.09 ± 0.02	0.83 ± 0.05	0.08 ± 0.01	0.90 ± 0.05	↑ ****	ns	ns	13-19
	THRB	0.35 ± 0.06	0.78 ± 0.05	0.24 ± 0.03	0.77 ± 0.04	↑ ****	ns	ns	14-19
	NCOR	1.56 ± 0.13	1.25 ± 0.07	1.70 ± 0.10	1.28 ± 0.08	↓ ***	ns	ns	14-19
	DIO3	1.37 ± 0.15	0.53 ± 0.07	1.92 ± 0.30	0.77 ± 0.11	↓ ****	* ↑	ns	12-19
	DIO1	1.11 ± 0.09	1.10 ± 0.06	0.94 ± 0.08	1.09 ± 0.06	ns	ns	ns	14-19
Cellular Stress	UBQLN1	4.28 ± 0.44	2.91 ± 0.16	3.41 ± 0.19	2.78 ± 0.11	↓ ****	* ↓	ns	14-19
	PSMD12	1.28 ± 0.12	1.18 ± 0.05	0.92 ± 0.10	1.14 ± 0.05	ns	* ↓	ns	14-19
	HSP70	0.40 ± 0.04	0.92 ± 0.21	0.54 ± 0.07	1.66 ± 0.44	↑ **	ns	ns	13-19
	HSP90AA1	0.78 ± 0.08	0.98 ± 0.13	0.75 ± 0.09	1.04 ± 0.13	↑ *	ns	ns	14-19
	DNAJB12	0.38 (ab) ± 0.10	0.36 (a) ± 0.07	0.11 (b) ± 0.02	0.37 (a) ± 0.04	ns	ns	*	8-19
	HSF3	0.73 ± 0.10	0.91 ± 0.07	0.65 ± 0.07	0.84 ± 0.04	↑ *	ns	ns	14-19
	HSF2	1.40 ± 0.21	1.11 ± 0.05	1.53 ± 0.25	0.99 ± 0.04	↓ **	ns	ns	14-19
	HSBP1	2.52 (a) ± 0.28	1.33 (c) ± 0.05	1.90 (b) ± 0.13	1.33 (c) ± 0.04	↓ ****	* ↓	*	14-19
	ST13	0.78 ± 0.08	1.70 ± 0.11	0.63 ± 0.04	1.63 ± 0.09	↑ ****	ns	ns	12-19
Cell Proliferation	HNF4	0.66 ± 0.11	1.15 ± 0.10	0.50 ± 0.10	1.16 ± 0.07	↑ ****	ns	ns	10-19
	MAPK1	0.35 ± 0.06	0.35 ± 0.05	0.26 ± 0.04	0.32 ± 0.05	ns	ns	ns	14-19
	MED21	0.54 ± 0.08	0.66 ± 0.05	0.52 ± 0.06	0.71 ± 0.03	↑ **	ns	ns	13-19
	TUBa1C	0.36 ± 0.05	0.88 ± 0.06	0.37 ± 0.06	0.96 ± 0.06	↑ ****	ns	ns	14-19
	HGF	2.05 ± 0.47	1.72 ± 0.18	1.84 ± 0.35	1.40 ± 0.17	ns	ns	ns	11-18
	POLR2C	0.59 ± 0.06	0.79 ± 0.04	0.65 ± 0.06	0.86 ± 0.04	↑ ****	ns	ns	14-19

*Data are presented as mean +/− SEM. TM, thermal manipulation; pre-OF, before overfeeding period; post-OF, after overfeeding period. ns, non significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. Different letters in parentheses indicate significant differences measured between each group when there is an interaction between the OF and TM factors. n, number of samples.*

embryonic thermal treatment (UBQLN1 and PSMD12), and two for which a significant interaction between feeding and incubation conditions was found: it concerned DNAJB12 for which an increase was observed post-OF only in the TM group, and HSBP1, for which the decrease post-OF was most pronounced in the control group. Concerning the hormonal pathway, only the expression of DIO3 showed a significant increase in the TM group compared to the control group during this period.

The Genes Influenced by Thermal Manipulation During Overfeeding Are Not Affected at the End of the Thermal Stimulus, Except One

As indicated above, only 6 genes (out of a total of 45) were significantly modulated by embryonic thermal treatment during the OF period. To see if this programming was already measurable at the end of the heat treatment, we measured the expression of these 6 genes in the liver of embryos at E27. The results presented in **Figure 3** show that only DIO3 expression was already increased by TM at this stage, with the other five being not affected by the thermal treatment.

DISCUSSION

This study follows the demonstration that embryonic thermal programming can induce an optimization of liver fattening in mule ducks (Massimino et al., 2019). In this previous work, we used three different thermal stimuli during the incubation period to program the liver metabolism of adult ducks to respond more strongly to OF. Although all three programming resulted in larger and fatter livers than the control group, only one had no negative impact on hatchability or finished product quality. This condition consisted of a 1°C increase in incubation temperature, 16 h/24 h, from embryonic day 13 to embryonic day 27. We therefore chose to analyze the expression of genes in the liver of the animals from this condition in order to study the molecular mechanisms at the origin of this metabolic programming.

Expected Molecular Perception of Heat Treatment at E27 Using Genes Known to Be Sensitive to Temperature

We began by studying the expression of genes belonging to the heat shock protein (HSP) family, themselves members of the chaperone protein superfamily (Morimoto, 1993; Vos et al., 2008). These proteins (including HSPA and DNAJ members) play a crucial role in stress conditions but also in normal physiological conditions requiring protein quality control for cellular homeostasis. Their binding to substrates at risk, i.e., in a degraded folding state, allows them to be directed toward a folding or degradation pathway. Although initially identified as heat stress-induced proteins, not all are regulated in the same way, and some not even by temperature (Vos et al., 2008).

In the first step of our experiment, we focused on three members of HSPs that are obviously altered by temperature:

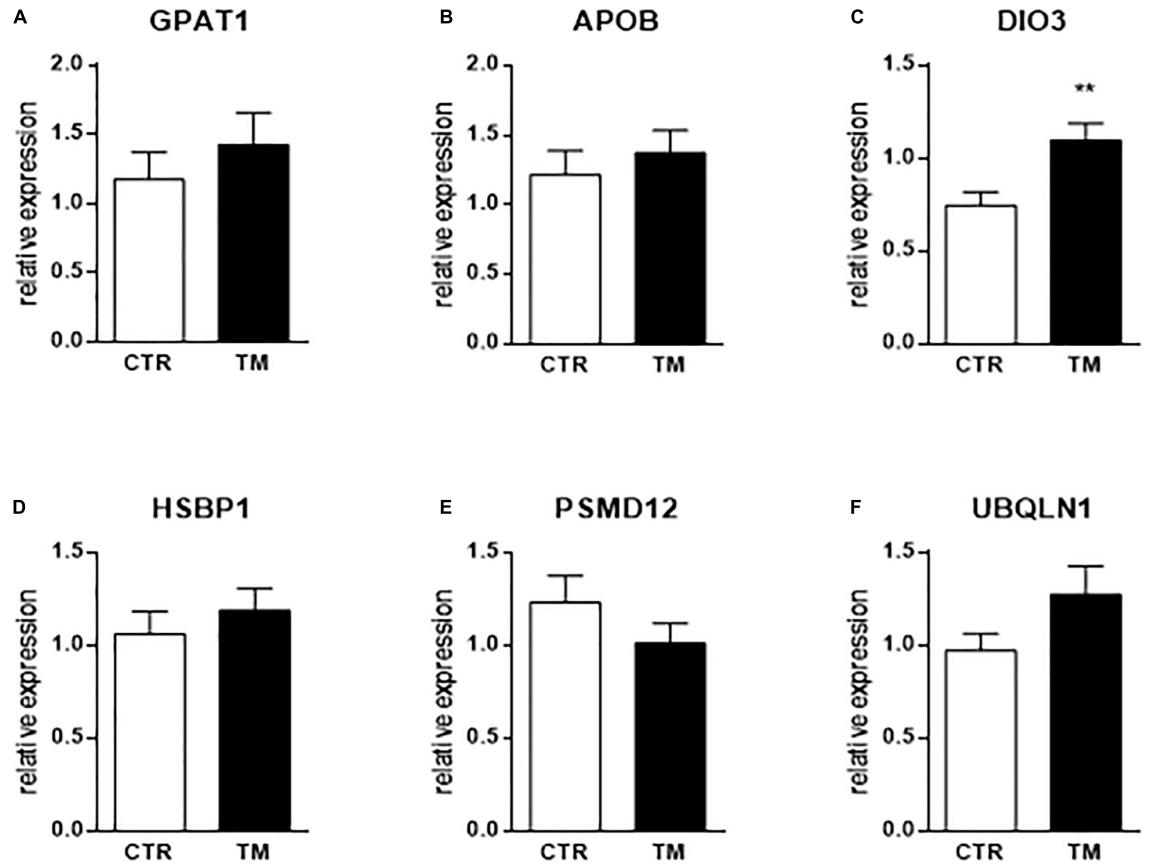


FIGURE 3 | Hepatic relative expression at the end of the heat treatment (E27) of genes influenced by TM before or after overfeeding. Column representation of the relative expression of GPAT1 **(A)**, APOB **(B)**, DIO3 **(C)**, HSBP1 **(D)**, PSMD12 **(E)** and UBQLN1 **(F)** at the end of the thermal manipulation in the liver of control (CTR) or thermal manipulated (TM) duck embryos. Data are presented as mean +/– SEM (n = 16–19). $^{**}P < 0.01$. The absence of a star means that there is no statistical difference between the groups.

HSP70 (HSPA2), HSP90AA1 and HSP40 (DNAJB12). We measured a significant increase in the expression of the first two at the end of the heat treatment (E27) in the TM group compared to the control group, confirming what has already been well described in different tissues of heat-stressed chicken (Wang and Edens, 1998; Al-Zhgoul et al., 2013; Al-Zghoul et al., 2015; Cedraz et al., 2017; Albokhadaim et al., 2019; Madkour et al., 2021). More surprisingly, we also measured a significant decrease in HSP40 (DNAJB12) at E27 in the TM group compared to control. Mostly up-regulated after heat stress (Dong et al., 2006; Neal et al., 2006; Chen et al., 2018), down-regulation of that chaperone has, however, already been measured immediately after a transport stress in the spleen of hens (Li et al., 2021). These data suggest that the type of stress, the targeted tissue, or the time of stress exposure may have a different impact on the expression of different HSP family members.

Heat shock factors (HSFs) on the other hand are transcription factors induced after heat stress that bind to heat shock promoters to modulate the expression of target proteins (Westwood et al., 1991; Morimoto, 1993). HSF3 has been shown to regulate the production of HSP70 and HSP90 proteins under heat stress conditions (Tanabe, 1998). The decrease in its expression measured at the end of the heat treatment, in parallel with the strong increase of HSP70 and HSP90, could reflect the existence of a negative feedback after some time of heat exposure (14 days here), as already suggested in other types of stress responses and involving the glucocorticoid receptor (Wadekar et al., 2001, 2004; Kang et al., 2017).

However, all these changes in HSP and HSF gene expression confirm that the thermal stimulus used for embryonic programming was well perceived and measured at the molecular level in the liver of duck embryos.

Molecular Impact of Overfeeding on Carbohydrate and Lipid Metabolisms but Also on the Thyroid Pathway, Stress and Cell Proliferation in the Liver

As explained above, this thermal embryonic programming has already been shown to increase *foie gras* production in ducks submitted to overfeeding between 83 and 95 days of age (Massimino et al., 2019). To understand the mechanisms behind this increase in fattening, we first explored the expression level of genes involved in lipid and carbohydrate metabolisms in

duck livers before and after OF. As previously described, OF induced a strong increase in the expression of genes involved in carbohydrate transport to the liver (GLUT family), then in carbohydrate oxidation for pyruvate (HK1 and ENO1) and acetyl-CoA (PDHA1) production (Herault et al., 2010; Annabelle et al., 2017). These substrates can then be used by the pathway of lipid synthesis, strongly induced by OF in parallel with a decrease in their oxidation, as also observed previously (Tavernier et al., 2017; Annabelle et al., 2018). ChREBP and PPARG, key regulators of these pathways, are also strongly increased by OF. For lipid transport-related genes, the relative expressions of APOB and LDLR are decreased by OF, whereas those of FABP4 and VLDLR are increased. We propose two ways to explain these opposite regulations: first, depending on the direction of lipid transport through the liver cells (in or out), their expression can be either increased or decreased by the OF; second, the timing of RNA collection after the last OF meal can have a significant impact on the expression level, as demonstrated by a kinetic study of these same genes (which sometimes show opposite regulation at 2 h and at 5 h after the last meal) (Annabelle et al., 2018).

We then turned our attention to the thyroid hormone signaling pathway since it has been shown that, both in mammals (Danforth et al., 1979; Katzeff, 1990) and ducks (Massimino et al., 2019), OF induces an increase in plasma triiodothyronine (T3). The blood concentration in T3 is mainly dependent on the peripheral conversion of T4 in T3 by deiodinases. Especially, T4 can be converted into T3 by deiodinases 1 and 2, but into the inactive hormone rT3 by DIO1 and DIO3 (Darras et al., 2006). This active form T3 of thyroid hormone (TH) is able to bind a nuclear receptor (thyroid hormone receptor beta, THRB, being the predominant form in the liver) to modify the gene expression of a wide spectrum of genes involved in lipid metabolism (Sinha et al., 2018; Ritter et al., 2020). TH can induce the expression of fatty acid transporters, resulting in increased uptake of fatty acids in the liver, enzymes of lipolysis and beta-oxidation, but also *de novo* lipogenesis (Sinha et al., 2018). However, the circulating level of THs (T3 and T4) does not directly reflect their impact on tissue function, since they must first be captured by membrane receptors, then can be altered by deiodinases (DIO) and finally coregulators in the nucleus can regulate their activity (Mendoza and Hollenberg, 2017). Therefore, we were interested in measuring at the transcriptional level the hepatic regulation of their activity. Our expression data seem to confirm a global activation of T3 in the liver of overfed ducks, since we measured an increase in THRB and SPOT14 (involved in T3-induced lipid synthesis) expressions, in parallel with a decrease in NCOR (corepressor) and DIO3 (deiodinase responsible for TH inactivation) (Kinlaw et al., 1995; Mendoza and Hollenberg, 2017; Sinha et al., 2018; Ritter et al., 2020). This increase in T3 activity during overfeeding has been proposed as a protective mechanism to limit weight gain by increasing lipid catabolism in favor of energy expenditure through thermogenesis (Oppenheimer et al., 1991; Almeida et al., 1996; Silvestri et al., 2005). These regulations therefore suggest a protective mechanism for liver cells to limit OF-induced lipid overload, which may alter cell physiology over time.

To further assess the physiological status of liver cells during OF, we were then interested in the genes related to stress. We first notice that half of the chaperones involved in protein folding (HSP70, HSP90AA1, HSF3, ST13) are increased by OF, suggesting that protein quality control processes are globally activated. Decreased expression level of HSBP1 (in the control group, and to a lower extent, in the TM group) as an inhibitor of HSF (Cotto and Morimoto, 1999) could be interpreted as cellular protections. The decrease in HSF2 expression could, in another way, indicate that the transcriptional modulation of these factors does not always reflect their DNA-binding activity, as previously demonstrated (Sarge et al., 1991; Ding et al., 1996), although a negative feedback cannot be excluded in this global activation of protein protection. In another category, PSMD12 is a proteasome subunit that plays a role in global protein homeostasis by clearing misfolded or damaged protein (Du et al., 2020). Here, OF did not affect its expression, although it is downregulated in the liver of obese individuals with an increased fat content, as well as many genes involved in protein catabolism (Pihlajamäki et al., 2009). On the contrary, UBQLN1, also involved in protein degradation *via* proteasome or autophagy (Rothenberg et al., 2010; Kurlawala et al., 2017), is strongly decreased by OF, confirming at least a partial decrease in protein catabolism under these conditions.

Finally, since the role of hyperplasia in the fattening of duck livers after force-feeding has been recently put forward (Hérault et al., 2019), we measured the expression of genes involved in cell proliferation. Our results confirm a general increase in the expression of proliferation-related genes, with the exception of MAPK1, whose activation may be more reflected by the phosphorylation status (Nishida and Gotoh, 1993) and the hepatocyte growth factor (HGF) not affected at all. These observations suggest that hyperplasia may indeed play a role in duck liver fattening during OF, which should be further investigated by histological studies.

Impact of Embryonic Thermal Manipulation During the Overfeeding Period – Evidence of Real Programming

Since ducks in the TM group had larger and fatter livers than controls at the end of OF (Massimino et al., 2019), we were first interested in the impact of TM on the expression of genes involved in the two main pathways directly implicated in liver fattening. Consistently with the study of Loyau et al. (2014) that had highlighted very low effect of TM in the hepatic expression of metabolic genes in the liver, none of the genes related to carbohydrate metabolism were significantly modulated by TM, and only 2 genes related to lipid metabolism were affected, and this at a relatively low level ($P < 0.05$), and only in case of overfeeding for GPAT1 (due to a significant interaction of the incubation and the nutritional factors for this gene expression). Located in the outer membrane of mitochondria, GPAT1 is involved in the first step of triacylglycerol esterification (Coleman, 2019) and has been shown to play critical role in hepatic steatosis (Yu et al., 2018). The second, APOB, is a structural protein of Very-Low-Density Lipoproteins (VLDL), and low-density lipoprotein (LDL) produced by the liver for lipid export to peripheral tissues (Gruffat et al., 1996; Bagherniya et al., 2021). Indeed, a greater increase in a crucial lipogenic enzyme

or a decrease in a key factor involved in lipid export may both play a role in the increased liver fattening of our programmed animals. However, this relatively weak response led us to measure the impact of TM on the expression of other factors, possibly involved in liver metabolism.

Regarding the thyroid hormone signaling pathway, DIO3, considered to be the major TH-inactivating enzyme (Bianco et al., 2002), was significantly increased by TM before and after OF. This result contrasts with the study of Loyau et al. (2014) in the chicken liver who had found no change in this gene expression in slightly different conditions of TM. The expression of the activating enzyme DIO1 was not affected in both studies. The programming effect of TM on the regulation of the hepatic T4 to T3 or rT3 conversion might therefore be slightly different in the two species. Although no impact of thermal programming could be measured on plasma T3 and T4 levels in our overfed ducks (Massimino et al., 2019), increased expression of this deiodinase in the TM group suggests that embryonic thermal programming may induce a slight TH inactivation in the liver. These data support the hypothesis that embryonic thermal manipulation could have increased the lipid content in the liver by decreasing energy expenditure *via* thermogenesis (Almeida et al., 1996). Even though we did not measure a difference in surface temperature after the OF period in our programmed ducks, it is not impossible that internal temperature and thus thermogenesis was affected, reducing energy expenditure and thus promoting liver fattening.

Interestingly, the greatest impact of TM measured during the OF period was on the cellular stress pathway, with half of the significantly impacted genes belonging to this group. All of these genes were down-regulated in the TM group compared to the control group. Decreased expression of HSBP1, which is a negative regulator of the HSP family (Satyal et al., 1998), before OF, could be interpreted as a "protein quality control readiness," preparing the liver to cope with OF and thus promoting improved cellular physiology during this challenge. TM also significantly decreases the expression of PSMD12 and UBQLN1, both involved in protein catabolism (Kurlawala et al., 2017; Du et al., 2020). As this metabolic pathway is decreased in the liver of obese patients with increased fat content (Pihlajamäki et al., 2009), this could represent a kind of predisposition to liver fattening.

Lastly, since it has been shown that embryonic thermal manipulation in chickens can stimulate cell proliferation in an immediate but also delayed manner (Piestun et al., 2009), we wondered whether TM could modulate liver cell proliferation during the OF period and thus contribute to liver fattening. Eventually, none of the genes we measured were affected by TM during this period. However, it might be interesting to measure the impact of TM on liver cell proliferation directly at the end of the thermal stimulus to see if baseline fattening potential is increased from birth by increasing cell numbers.

Finally, only six genes (out of 45) were significantly regulated by the embryonic TM during the OF period. However, these specifically targeted genes represent evidence of long-term programming at the molecular level in duck liver and may all support the hypothesis of optimized metabolism for *foie gras* production. Nevertheless, we do not rule out the possibility of having missed TM-induced transcriptional modulations during OF, especially because RNA samples were taken 10 h after the last feeding. It has been well demonstrated that the expression of metabolic genes during OF (Tavernier et al., 2017) but also according to the time of collection of liver samples after the last meal follow their own kinetics (Annabelle et al., 2017, 2018). Since most of the metabolic genes have a peak of expression about 2 h after the last meal, it would be interesting to study the impact of TM at this precise moment. In addition, the timing of the embryonic thermal stimulus may be optimized based on a recent study showing hepatic gene expression profiles during embryogenesis (Massimino et al., 2020), and may allow measurement of larger expression differences during the OF period. It is also important to note that all of these modulations are measured only at the mRNA level, and do not necessarily predict the activity of associated proteins, which is especially relevant for deiodinases for instance (Darras et al., 2006). It will be interesting during the next studies to confirm and deepen these results at the level of proteins and their activity.

Genes Thermally Programmed to Respond Optimally to the Overfeeding Are Not Affected at the End of the Embryonic Stimulus, Except One

In the last part, we measured the direct impact of TM (at E27) on the six genes that were significantly impacted by long-term programming. We showed that the expression of only one of these genes was directly influenced by the TM at the end of the stimulus, suggesting that programming is registered through other pathways than direct modulation of expression. However, we observe that DIO3 is always up-regulated by TM both at the end of the thermal stimulus and before and after the OF period, suggesting a powerful and continuous mechanism to modulate this pathway which thus seems to have a key role in hepatic metabolism in ducks. Precisely how the expression of these genes is modulated by temperature, and how the information is recorded to program the response of hepatocytes to a dietary challenge much later in the life of the animal, however, are questions that remain to be explored.

CONCLUSION

This study is the first to explore the molecular mechanisms involved in the long-term programming of liver metabolism in ducks by an embryonic thermal stimulus. We have identified a handful of genes that represent prime targets of this programming and may direct hepatic metabolism toward increased lipid storage during overfeeding. However, understanding the precise mechanisms behind programmed phenotypes will therefore require many more studies to be apprehended.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Animal Care and Use Committee of the Greater Southwest Region (n° 73).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MH, SP, AC, MM, and WM conceived and designed the study. WM and CA conducted all the experiments and analyses with the help of SB, MH, TP, KR, KG, SD, and M-DB. M-DB supervised the whole breeding, overfeeding, and slaughtering phases. All authors reviewed the manuscript and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by grants from the "Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras" (CIFOG-Agreement 2018-01) and from "Comité Départemental des Landes" (CD40).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the technicians of the Experimental Station for Waterfowl Breeding (INRAE, Artigueres, France) for the daily care given to the animals and the monitoring of the good conditions for the experiments.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2021.779689/full#supplementary-material

REFERENCES

Albokhadaim, I. F., Althnaian, T. A., and El-Bahr, S. M. (2019). Gene expression of heat shock proteins/factors (HSP60, HSP70, HSP90, HSF-1, HSF-3) and antioxidant enzyme activities in heat stressed broilers treated with vitamin C. *Pol. J. Vet. Sci.* 22, 565–572. doi: 10.24425/pjvs.2019.129965

Almeida, N. G., Levitsky, D. A., and Strupp, B. (1996). Enhanced thermogenesis during recovery from diet-induced weight gain in the rat. *Am. J. Physiol.* 271(5 Pt 2), R1380–R1387. doi: 10.1152/ajpregu.1996.271.5.R1380

Al-Zghoul, M.-B., Ismail, Z. B., Dalab, A. E. S., Al-Ramadan, A., Althnaian, T. A., Al-ramadan, S. Y., et al. (2015). Hsp90, Hsp60 and HSF-1 genes expression in muscle, heart and brain of thermally manipulated broiler chicken. *Res. Vet. Sci.* 99, 105–111. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.12.014

Al-Zhgoul, M.-B., Dalab, A. E. S., Ababneh, M. M., Jawasreh, K. I., Busadah, K. A. A., and Ismail, Z. B. (2013). Thermal manipulation during chicken embryogenesis results in enhanced Hsp70 gene expression and the acquisition of thermotolerance. *Res. Vet. Sci.* 95, 502–507. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.05.012

Annabelle, T., Karine, R., Marie-Dominique, B., Karine, G., and Stéphane, D. (2018). Pre- and post-prandial expression of genes involved in lipid metabolism at the end of the overfeeding period of mule ducks. *Mol. Cell. Biochem.* 438, 111–121. doi: 10.1007/s11010-017-3118-6

Annabelle, T., Karine, R., Marie-Dominique, B., Stéphane, D., and Karine, G. (2017). Kinetics of expression of genes involved in glucose metabolism after the last meal in overfed mule ducks. *Mol. Cell. Biochem.* 430, 127–137. doi: 10.1007/s11010-017-2960-x

Baeza, E., Marie-Etancelin, C., Davail, S., and Diot, C. (2013). La stéatose hépatique chez les palmipèdes. *INRA Prod. Anim.* 26, 403–414.

Bagherniya, M., Johnston, T. P., and Sahebkar, A. (2021). Regulation of apolipoprotein B by natural products and nutraceuticals: a comprehensive review. *Curr. Med. Chem.* 28, 1363–1406. doi: 10.2174/0929867327666200427092114

Barker, D. J. P., Medical Research Council (Great Britain), and Environmental Epidemiology Unit (1993). *Fetal and Infant Origins of Adult Disease: Papers Written by the Medical Research Council Environmental Epidemiology Unit, University of Southampton*. London: British Medical Journal.

Bianco, A. C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M. J., and Larsen, P. R. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* 23, 38–89. doi: 10.1210/edrv.23.1.0455

Cedraz, H., Gromboni, J. G. G., Garcia, A. A. P., Farias Filho, R. V., Souza, T. M., de Oliveira, E. R., et al. (2017). Heat stress induces expression of HSP genes in genetically divergent chickens. *PLoS One* 12:e0186083. doi: 10.1371/journal.pone.0186083

Chen, T., Lin, T., Li, H., Lu, T., Li, J., Huang, W., et al. (2018). Heat shock protein 40 (HSP40) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): molecular cloning, tissue distribution and ontogeny, response to temperature, acidity/alkalinity and salinity stresses, and potential role in ovarian development. *Front. Physiol.* 9:1784. doi: 10.3389/fphys.2018.01784

Coleman, R. A. (2019). It takes a village: channeling fatty acid metabolism and triacylglycerol formation *via* protein interactomes. *J. Lipid Res.* 60, 490–497. doi: 10.1194/jlr.S091843

Cotto, J. J., and Morimoto, R. I. (1999). Stress-induced activation of the heat-shock response: cell and molecular biology of heat-shock factors. *Biochem. Soc. Symp.* 64, 105–118.

Danforth, E., Horton, E. S., O'Connell, M., Sims, E. A., Burger, A. G., Ingbar, S. H., et al. (1979). Dietary-induced alterations in thyroid hormone metabolism during overnutrition. *J. Clin. Invest.* 64, 1336–1347. doi: 10.1172/JCI109590

Darras, V. M., Verhoelst, C. H. J., Reyns, G. E., Kühn, E. R., and der Geyten, S. V. (2006). Thyroid hormone deiodination in birds. *Thyroid* 16, 25–35. doi: 10.1089/thy.2006.16.25

Desvignes, T., Fauvel, C., and Bobe, J. (2011). The NME gene family in zebrafish oogenesis and early development. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 384, 439–449. doi: 10.1007/s00210-011-0619-9

Ding, X., Smallridge, R., Galloway, R., and Kiang, J. (1996). Rapid assay of HSF1 and HSF2 gene expression by RT-PCR. *Mol. Cell. Biochem.* 158, 189–192. doi: 10.1007/BF00225845

Dong, C., Zhang, Y., Zhang, Q., and Gui, J. (2006). Differential expression of three *Paralichthys olivaceus* Hsp40 genes in responses to virus infection and heat shock☆. *Fish Shellfish Immunol.* 21, 146–158. doi: 10.1016/j.fsi.2005.11.002

Du, X., Shen, X., Dai, L., Bi, F., Zhang, H., and Lu, C. (2020). PSMD12 promotes breast cancer growth *via* inhibiting the expression of pro-apoptotic genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 526, 368–374. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.095

DuRant, S. E., Hopkins, W. A., Carter, A. W., Stachowiak, C. M., and Hepp, G. R. (2013). Incubation conditions are more important in determining early thermoregulatory ability than posthatch resource conditions in a precocial bird. *Physiol. Biochem. Zool.* 86, 410–420. doi: 10.1086/671128

European Union (2009). *Council Regulation (EC) No 1099/2009 of 24 September 2009 on the Protection of Animals At the Time of Killing Text with EEA Relevance 30*. Brussels: European Union.

Gruffat, D., Durand, D., Graulet, B., and Bauchart, D. (1996). Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. *Reprod. Nutr. Dev.* 36, 375–389. doi: 10.1051/rnd:19960404

Hérault, F., Duby, C., Baéza, E., and Diot, C. (2018). Adipogenic genes expression in relation to hepatic steatosis in the liver of two duck species. *Animal* 12, 2571–2577. doi: 10.1017/S1751731118000897

Hérault, F., Houée-Bigot, M., Baéza, E., Bouchez, O., Esquerré, D., Klopp, C., et al. (2019). RNA-seq analysis of hepatic gene expression of common Pekin, Muscovy, mule and hinny ducks fed ad libitum or overfed. *BMC Genomics* 20:13. doi: 10.1186/s12864-018-5415-1

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

Kang, S. W., Madkour, M., and Kuenzel, W. J. (2017). Tissue-specific expression of DNA methyltransferases involved in early-life nutritional stress of chicken, *Gallus gallus*. *Front. Genet.* 8:204. doi: 10.3389/fgene.2017.00204

Katzeff, H. L. (1990). Increasing age impairs the thyroid hormone response to overfeeding. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 194, 198–203.

Kinlaw, W. B., Church, J. L., Harmon, J., and Mariash, C. N. (1995). Direct evidence for a role of the "spot 14" protein in the regulation of lipid synthesis. *J. Biol. Chem.* 270, 16615–16618. doi: 10.1074/jbc.270.28.16615

Kurlawala, Z., Shah, P. P., Shah, C., and Beverly, L. J. (2017). The STI and UBA domains of UBQLN1 are critical determinants of substrate interaction and proteostasis: U BQLN1 M EDIATED P ROTEOSTASIS. *J. Cell. Biochem.* 118, 2261–2270. doi: 10.1002/jcb.25880

Leveille, G. A., Romsos, D. R., Yeh, Y., and O'Hea, E. K. (1975). Lipid biosynthesis in the chick. A consideration of site of synthesis, influence of diet and possible regulatory mechanisms. *Poult. Sci.* 54, 1075–1093. doi: 10.3382/ps.0541075

Li, C., Zhang, R., Wei, H., Wang, Y., Chen, Y., Zhang, H., et al. (2021). Enriched environment housing improved the laying hen's resistance to transport stress *via* modulating the heat shock protective response and inflammation. *Poult. Sci.* 100:100939. doi: 10.1016/j.psj.2020.12.036

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta CT$ method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

Lo, B., Marty-Gasset, N., Manse, H., Bannelier, C., Bravo, C., Domitile, R., et al. (2020). Cellular markers of mule duck livers after force-feeding. *Poult. Sci.* 99, 3567–3573. doi: 10.1016/j.psj.2020.03.048

Loyau, T., Métayer-Coustard, S., Berri, C., Crochet, S., Cailleau-Audouin, E., Sannier, M., et al. (2014). Thermal manipulation during embryogenesis has long-term effects on muscle and liver metabolism in fast-growing chickens. *PLoS One* 9:e105339. doi: 10.1371/journal.pone.0105339

Lucas, A. (1998). Programming by early nutrition: an experimental approach. *J. Nutr.* 128, 401S–406S.

Madkour, M., Aboelenin, M. M., Aboelazab, O., Elolimy, A. A., El-Azeem, N. A., El-Kholy, M. S., et al. (2021). Hepatic expression responses of DNA methyltransferases, heat shock proteins, antioxidant enzymes, and NADPH 4 to early life thermal conditioning in broiler chickens. *Ital. J. Anim. Sci.* 20, 433–446. doi: 10.1080/1828051X.2021.1890645

Massimino, W., Davail, S., Bernadet, M.-D., Pioche, T., Tavernier, A., Ricaud, K., et al. (2019). Positive impact of thermal manipulation during embryogenesis on foie gras production in mule ducks. *Front. Physiol.* 10:1495. doi: 10.3389/fphys.2019.01495

Massimino, W., Davail, S., Secula, A., Andrieux, C., Bernadet, M. D., Pioche, T., et al. (2020). Ontogeny of hepatic metabolism in mule ducks highlights different gene expression profiles between carbohydrate and lipid metabolic pathways. *BMC Genomics* 21:742. doi: 10.1186/s12864-020-07093-w

Mendoza, A., and Hollenberg, A. N. (2017). New insights into thyroid hormone action. *Pharmacol. Ther.* 173, 135–145. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.012

Morimoto, R. (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259, 1409–1410. doi: 10.1126/science.8451637

Neal, S. J., Karunanithi, S., Best, A., So, A. K.-C., Tanguay, R. M., Atwood, H. L., et al. (2006). Thermoprotection of synaptic transmission in a *Drosophila* heat shock factor mutant is accompanied by increased expression of Hsp83 and DnaJ-1. *Physiol. Genomics* 25, 493–501. doi: 10.1152/physiolgenomics.00195.2005

Nishida, E., and Gotoh, Y. (1993). The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.* 18, 128–131. doi: 10.1016/0968-0004(93)90019-j

Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L., Lane, J. T., and Thompson, M. P. (1991). Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J. Clin. Invest.* 87, 125–132. doi: 10.1172/JCI114961

Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., and Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: best keeper–excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509–515.

Piestun, Y., Druyan, S., Brake, J., and Yahav, S. (2013). Thermal manipulations during broiler incubation alter performance of broilers to 70 days of age. *Poult. Sci.* 92, 1155–1163. doi: 10.3382/ps.2012-02609

Piestun, Y., Harel, M., Barak, M., Yahav, S., and Halevy, O. (2009). Thermal manipulations in late-term chick embryos have immediate and longer term effects on myoblast proliferation and skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* 106, 233–240. doi: 10.1152/japplphysiol.91090.2008

Piestun, Y., Shinder, D., Ruzal, M., Halevy, O., Brake, J., and Yahav, S. (2008). Thermal manipulations during broiler embryogenesis: effect on the acquisition of thermotolerance. *Poult. Sci.* 87, 1516–1525. doi: 10.3382/ps.2008-00030

Pihlajamäki, J., Boes, T., Kim, E.-Y., Dearie, F., Kim, B. W., Schroeder, J., et al. (2009). Thyroid hormone-related regulation of gene expression in human fatty liver. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 3521–3529. doi: 10.1210/jc.2009-0212

Ritter, M. J., Amano, I., and Hollenberg, A. N. (2020). Thyroid hormone signaling and the liver. *Hepatology* 72, 742–752. doi: 10.1002/hep.31296

Rothenberg, C., Srinivasan, D., Mah, L., Kaushik, S., Peterhoff, C. M., Ugolino, J., et al. (2010). Ubiquilin functions in autophagy and is degraded by chaperone-mediated autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3219–3232. doi: 10.1093/hmg/ddq231

Saez, G., Baéza, E., Bernadet, M. D., and Davail, S. (2010). Is there a relationship between the kinetics of lipoprotein lipase activity after a meal and the susceptibility to hepatic steatosis development in ducks? *Poult. Sci.* 89, 2453–2460. doi: 10.3382/ps.2010-00683

Sarge, K. D., Zimarino, V., Holm, K., Wu, C., and Morimoto, R. I. (1991). Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. *Genes Dev.* 5, 1902–1911. doi: 10.1101/gad.5.10.1902

Satyal, S. H., Chen, D., Fox, S. G., Kramer, J. M., and Morimoto, R. I. (1998). Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes Dev.* 12, 1962–1974.

Silvestri, E., Schiavo, L., Lombardi, A., and Goglia, F. (2005). Thyroid hormones as molecular determinants of thermogenesis. *Acta Physiol. Scand.* 184, 265–283. doi: 10.1111/j.1365-201X.2005.01463.x

Sinha, R. A., Singh, B. K., and Yen, P. M. (2014). Thyroid hormone regulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 538–545. doi: 10.1016/j.tem.2014.07.001

Sinha, R. A., Singh, B. K., and Yen, P. M. (2018). Direct effects of thyroid hormones on hepatic lipid metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 259–269. doi: 10.1038/nrendo.2018.10

Tanabe, M. (1998). Disruption of the HSF3 gene results in the severe reduction of heat shock gene expression and loss of thermotolerance. *EMBO J.* 17, 1750–1758. doi: 10.1093/emboj/17.6.1750

Tarry-Adkins, J. L., and Ozanne, S. E. (2011). Mechanisms of early life programming: current knowledge and future directions. *Am. J. Clin. Nutr.* 94, 1765S–1771S. doi: 10.3945/ajcn.110.000620

Tavernier, A., Davail, S., Ricaud, K., Bernadet, M.-D., and Gontier, K. (2017). Genes involved in the establishment of hepatic steatosis in Muscovy, Pekin and mule ducks. *Mol. Cell. Biochem.* 424, 147–161. doi: 10.1007/s11010-016-2850-7

Vaiserman, A., Koliada, A., and Lushchak, O. (2018). Developmental programming of aging trajectory. *Ageing Res. Rev.* 47, 105–122. doi: 10.1016/j.arr.2018.07.007

Vitorino Carvalho, A., Hennequet-Antier, C., Crochet, S., Bordeau, T., Couroussé, N., Cailleau-Audouin, E., et al. (2020). Embryonic thermal manipulation has short and long-term effects on the development and the physiology of the Japanese quail. *PLoS One* 15:e0227700. doi: 10.1371/journal.pone.0227700

Vos, M. J., Hageman, J., Carra, S., and Kampinga, H. H. (2008). Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA,

and DNAJ chaperone families. *Biochemistry* 47, 7001–7011. doi: 10.1021/bi800639z

Wadekar, S. A., Li, D., and Sánchez, E. R. (2004). Agonist-activated glucocorticoid receptor inhibits binding of heat shock factor 1 to the heat shock protein 70 promoter *in Vivo*. *Mol. Endocrinol.* 18, 500–508. doi: 10.1210/me.2003-0215

Wadekar, S. A., Li, D., Periyasamy, S., and Sánchez, E. R. (2001). Inhibition of heat shock transcription factor by GR. *Mol. Endocrinol.* 15, 1396–1410. doi: 10.1210/mend.15.8.0674

Wang, S., and Edens, F. W. (1998). Heat conditioning induces heat shock proteins in broiler chickens and turkey poults. *Poult. Sci.* 77, 1636–1645. doi: 10.1093/ps/77.11.1636

Westwood, J. T., Clos, J., and Wu, C. (1991). Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat-shock factor. *Nature* 353, 822–827. doi: 10.1038/353822a0

Yu, J., Loh, K., Song, Z., Yang, H., Zhang, Y., and Lin, S. (2018). Update on glycerol-3-phosphate acyltransferases: the roles in the development of insulin resistance. *Nutr. Diabetes* 8:34. doi: 10.1038/s41387-018-0045-x

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Massimino, Andrieux, Biasutti, Davail, Bernadet, Pioche, Ricaud, Gontier, Morisson, Collin, Panserat and Houssier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 3 :

Libra OP / 27.47

Copyright RADAR Automation, tous droits réservés.

Nutricia

Route de Saint Sever - HAUT MAUCO - BP 27 - 40001 MONT de MARSAN C,dex - Tel (33) 05.58.05.84.56 - Fax : (33) 05.58.0

02-06-2021 14:39

Formule arrondie

144021 PAG1320 CROISSANCE-PALMA20-CANARD CROIS LABEL INIT

Code usine :	10186133	**Usine :**	SOAL HAUT-MAUCO
Libellé formule	HM-PAG1320 CROI	**Ville :**	Haut-Mauco
Optimisation du :	07/04/2021 10:37	**En production du :**	03/05/2021 12:09
Version N° :	168	**au :**	
03MAI21			

Code MP	Matière Première	Taux %
100114	Blé Grain Vrac	39.878
200114	Mais Grain Sud-Ouest Classe A Vrac	25.250
13800521	TOURTEAUX DE TOURNESOL 35 VRAC	16.800
10142000	Son de blé Vrac	9.450
200101	Maïs support Classe A	3.000
10234080	DRECHES DE MAIS VRAC	2.500
29000000	Carbonate de calcium Farine Vrac	1.950
29110110	Lysine Base Liquide 50 % SANOF	0.426
29004000	Sel Raffiné VRAC	0.345
32552206	PREFAB 55 SC5 0.2% BIGBAG 1250kg	0.200
29111202	M.H.A. Liquide	0.130
29221000	Choline Chlorure 75 % liquide vrac	0.040
29021126	QUANTUM BLUE 5G 500	0.016
29021303	RONOZYME WX 1000 DILUT (ex CT) SAC2	0.015

Code Nut	Nutriment	taux
2200	EM Vol /kg	2741.684
2205	EMv Enz Nut	2800.006
2232	EV /kg	2642.652
2233	EVenz /kg	2677.820
10002	Humidité %	12.227
10012	Protéine brute	14.996
10020	Matière grasse	2.225
10031	Cellulose brute	5.804
10040	Cendres brutes	5.074
20000	Amidon %	45.094
30050	Lysine %	0.691
30051	Méthionine %	0.402
30053	Méth+Cystine %	0.696
30054	Arginine %	0.928
30055	Thréonine %	0.517
30056	Tryptophane %	0.182
30083	AAindi/MAT	0.195
32205	Prot.Dig.Vol. %	12.651
32250	Lys.Dig.Vol. %	0.620
32251	Mét.Dig.Vol. %	0.381
32253	M+C.Dig.Vol. %	0.630
32255	Thr.Dig.Vol. %	0.456
32256	Trp.Dig.Vol. %	0.163
32261	Mét/Lys Dig Vol	0.615
32263	M+C/Lys Dig Vol	1.016
32265	Thr/Lys Dig Vol	0.735
32266	Try/Lys Dig Vol	0.262
40031	Ac.Linoléique %	1.339
50000	Calcium %	1.003
50010	Phos.Total %	0.479
50020	Sodium %	0.150
50040	Potassium %	0.654
50091	Chlore %	0.307
51304	CA/PdispvoG	3.343
52212	P.Disp Vo Gra %	0.300
52290	Electrolyt. mEq	146.046
72201	3P ppm	5.384
90053	T.Premix	0.271
90101	T.Far.Animales	0.000
90103	T.Far.Poisson	0.000
90301	T.Blé	39.878
90302	T.Blé+Triticale	39.878
90305	T.Blé+Issue Blé	49.328
90321	T.Mais+Iss Mais	30.750
90380	T.Céréale Label	68.128
90381	T.Cér+Iss Label	80.078
90389	R. I/C+I	0.149

Copyright RADAR Automation, tous droits réservés.

Nutricia

Route de Saint Sever - HAUT MAUCO - BP 27 - 40001 MONT de MARSAN C,dex - Tel (33) 05.58.05.84.56 - Fax : (33) 05.58.0

02-06-2021 14:39

Formule arrondie

144021 PAG1320 CROISSANCE-PALMA20-CANARD CROIS LABEL INIT

Code Nut	Nutriment	taux
90392	T.Cér+Iss+légum	80.078
90410	T.Luzer+coprod	0.000
90901	T.Drêche	2.500
90980	T.Issues Label	11.950
91500	T.Eq.T.Colza	0.000
91502	T.Tx soja	0.000
91598	T.Tx tournesol	16.800
92600	T.MP Granul +	39.878
92652	T.OGM	0.000
100021	B.H.T	0.000

Libra OP / 27.47

Copyright RADAR Automation, tous droits réservés.

Nutricia

Route de Saint Sever - HAUT MAUCO - BP 27 - 40001 MONT de MARSAN C,dex - Tel (33) 05.58.05.84.56 - Fax : (33) 05.58.0

02-06-2021 14:39

Formule arrondie

141814 PALMA11-PAG1301-MONKA5

Code usine :	10178456	**Usine :**	SOAL HAUT-MAUCO
Libellé formule	HM-PALMA11	**Ville :**	Haut-Mauco
Optimisation du :	07/04/2021 10:22	**En production du :**	03/05/2021 12:09
Version N° :	283	**au :**	
03MAI21			

Code MP	Matière Première	Taux %
100136	BLE TENDRE HP	39.889
200114	Mais Grain Sud-Ouest Classe A Vrac	20.350
13800521	TOURTEAUX DE TOURNESOL 35 VRAC	13.500
10234080	DRECHES DE MAIS VRAC	9.000
13100000	TOURTEAUX DE COLZA DESHUILE VRAC	7.000
200101	Maïs support Classe A	3.000
29000000	Carbonate de calcium Farine Vrac	2.375
10142000	Son de blé Vrac	1.650
14079000	Betterave Mélasse	1.500
29110110	Lysine Base Liquide 50 % SANOF	0.639
29001000	Phosphate Bicalcique Vrac	0.375
29004000	Sel Raffiné VRAC	0.255
32552208	PREFAB DEM 55 0.2% S 25KG	0.200
29111202	M.H.A. Liquide	0.177
29221000	Choline Chlorure 75 % liquide vrac	0.060
29021303	RONOZYME WX 1000 DILUT (ex CT) SAC2	0.015
29021126	QUANTUM BLUE 5G 500	0.015

Code Nut	Nutriment	taux
2200	EM Vol /kg	2745.301
2205	EMv Enz Nut	2800.101
2232	EV /kg	2673.365
2233	EVenz /kg	2708.904
10002	Humidité %	12.177
10012	Protéine brute	17.458
10020	Matière grasse	2.778
10031	Cellulose brute	5.788
10040	Cendres brutes	5.935
20000	Amidon %	40.607
30050	Lysine %	0.899
30051	Méthionine %	0.488
30053	Méth+Cystine %	0.834
30054	Arginine %	0.993
30055	Thréonine %	0.612
30056	Tryptophane %	0.196
30083	AAindi/MAT	0.188
32205	Prot.Dig.Vol. %	14.323
32250	Lys.Dig.Vol. %	0.800
32251	Mét.Dig.Vol. %	0.462
32253	M+C.Dig.Vol. %	0.750
32255	Thr.Dig.Vol. %	0.524
32256	Trp.Dig.Vol. %	0.173
32261	Mét/Lys Dig Vol	0.578
32263	M+C/Lys Dig Vol	0.937
32265	Thr/Lys Dig Vol	0.655
32266	Try/Lys Dig Vol	0.216
40031	Ac.Linoléique %	1.592
50000	Calcium %	1.297
50010	Phos.Total %	0.556
50020	Sodium %	0.140
50040	Potassium %	0.730
50091	Chlore %	0.271
51304	CA/PdispvoG	3.415
52212	P.Disp Vo Gra %	0.380
52290	Electrolyt. mEq	171.554
90053	T.Premix	0.290
90101	T.Far.Animales	0.000
90103	T.Far.Poisson	0.000
90301	T.Blé	39.889
90302	T.Blé+Triticale	39.889
90305	T.Blé+Issue Blé	41.539
90320	T.Maïs	23.350
90321	T.Mais+Iss Mais	32.350
90380	T.Céréale Label	63.239
90381	T.Cér+Iss Label	73.889
90389	R. I/C+I	0.144

Copyright RADAR Automation, tous droits réservés.

Nutricia

Route de Saint Sever - HAUT MAUCO - BP 27 - 40001 MONT de MARSAN C,dex - Tel (33) 05.58.05.84.56 - Fax : (33) 05.58.0

02-06-2021 14:39

Formule arrondie

141814 PALMA11-PAG1301-MONKA5

Code Nut	Nutriment	taux
90392	T.Cér+Iss+légum	73.889
90410	T.Luzer+coprod	0.000
90901	T.Drêche	9.000
90980	T.Issues Label	10.650
91500	T.Eq.T.Colza	7.000
91502	T.Tx soja	0.000
91598	T.Tx tournesol	13.500
92600	T.MP Granul +	39.889
92652	T.OGM	0.000
100021	B.H.T	0.000

Libra OP / 27.47

Copyright RADAR Automation, tous droits réservés.

Nutricia

Route de Saint Sever - HAUT MAUCO - BP 27 - 40001 MONT de MARSAN C,dex - Tel (33) 05.58.05.84.56 - Fax : (33) 05.58.0

02-06-2021 14:39

Formule arrondie

141875 PALMA146-PALMA148-GAVAL

Code usine :	10178484	**Usine :**	SOAL HAUT-MAUCO
Libellé formule	HM-PALMA146	**Ville :**	Haut-Mauco
Optimisation du :	25/01/2021 16:47	**En production du :**	27/01/2021 09:57
Version N° :	205	**au :**	

AMIDON 0.5%

Code MP	Matière Première	Taux %
200253	Maïs GAN 2020 Vrac	97.500
60311055	PRODIGAV ACID SPL BB1250KG	2.000
10250051	Farine de Maïs type FIII SAC25KG	0.500

Code Nut	Nutriment	taux
2200	EM Vol /kg	3321.178
2205	EMv Enz Nut	3403.168
2232	EV /kg	3160.826
2233	EVenz /kg	3224.805
10002	Humidité %	13.839
10012	Protéine brute	7.224
10020	Matière grasse	3.437
10031	Cellulose brute	1.979
10040	Cendres brutes	2.041
20000	Amidon %	64.521
30050	Lysine %	0.235
30051	Méthionine %	0.153
30053	Méth+Cystine %	0.323
30054	Arginine %	0.340
30055	Thréonine %	0.271
30056	Tryptophane %	0.058
30062	Valine %	0.351
30083	AAindi/MAT	0.252
32205	Prot.Dig.Vol. %	6.031
32250	Lys.Dig.Vol. %	0.191
32251	Mét.Dig.Vol. %	0.139
32253	M+C.Dig.Vol. %	0.282
32255	Thr.Dig.Vol. %	0.230
32256	Trp.Dig.Vol. %	0.052
32261	Mét/Lys Dig Vol	0.729
32263	M+C/Lys Dig Vol	1.479
32265	Thr/Lys Dig Vol	1.208
32266	Try/Lys Dig Vol	0.271
40031	Ac.Linoléique %	2.042
50000	Calcium %	0.078
50010	Phos.Total %	0.227
50020	Sodium %	0.124
50040	Potassium %	0.330
50091	Chlore %	0.129
51304	CA/PdispvoG	1.297
52212	P.Disp Vo Gra %	0.060
52290	Electrolyt. mEq	102.014
90053	T.Premix	0.061
90101	T.Far.Animales	0.000
90103	T.Far.Poisson	0.000
90301	T.Blé	0.000
90302	T.Blé+Triticale	0.000
90305	T.Blé+Issue Blé	0.242
90320	T.Maïs	97.500
90321	T.Mais+Iss Mais	98.260
90381	T.Cér+Iss Label	98.518
90389	R. I/C+I	0.010

Copyright RADAR Automation, tous droits réservés.

Nutricia

Route de Saint Sever - HAUT MAUCO - BP 27 - 40001 MONT de MARSAN C,dex - Tel (33) 05.58.05.84.56 - Fax : (33) 05.58.0

02-06-2021 14:39

Formule arrondie

141875 PALMA146-PALMA148-GAVAL

Code Nut	Nutriment	taux
90392	T.Cér+Iss+légum	98.518
90410	T.Luzer+coprod	0.000
90901	T.Drêche	0.000
90980	T.Issues Label	1.002
91500	T.Eq.T.Colza	0.000
91502	T.Tx soja	0.000
91598	T.Tx tournesol	0.000
92600	T.MP Granul +	0.000
92652	T.OGM	0.000

Annexe 4 : Web-congrès IFRG 2021, Abstract soumis

Identification of Different Critical Embryonic Periods to Modify Egg Incubation Temperature in Mule Ducks

C. Andrieux[1], S. Biasutti[2], J. Barrieu[3], P. Morganx[3], M. Morisson[4], V. Coustham[1], S. Panserat[1], M. Houssier[1]

[1]Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, INRAE, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Saint Pée sur Nivelle, 64310, France
[2]Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, IUT Génie Biologique, 40000 Mont de Marsan, France
[3]INRAE Bordeaux-Aquitaine, UEPFG (Unité Expérimentale Palmipèdes à Foie Gras), Domaine d'Artiguères 1076, route de Haut Mauco, 40280 Benquet, France.
[4]GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31326 Castanet Tolosan, France

***Corresponding Author**:* charlotte.andrieux@univ-pau.fr

Egg incubation represents nearly 20 % of the total fatty liver production process and is therefore a critical phase for final yield. Based on the hatching rate, the best incubation parameters have already been well described for poultry, but the literature on ducks is lacking. In this study, we tested different incubation conditions by varying two important factors, temperature, and relative humidity, in mule ducks. These variations were applied at different periods during embryogenesis in order to measure the impact of environmental disturbances on different zootechnical performances. The temperature was increased by 1.5°C (16h/24), and the relative humidity was set up to 65 % during ten days. Six ten-day developmental windows were tested, from embryonic day 9 (E9) to embryonic day 14 (E14). Our results are in line with previous reports showing that increasing incubation temperature, even when relative humidity is adjusted, can have a negative impact on duck embryonic mortality. However, the hatchability can be maintained at the level of the control groups when these modifications are applied on the latest windows (from the 11th embryonic day). Sex ratio, hatching body weight, and internal temperature are also sensitive to these incubation changes, and their modification could have a major impact on later zootechnical performance. These results should contribute to the development of embryonic temperature programming approaches, especially for the fatty liver production industry.

Keywords: Mule duck, incubation temperature, embryonic periods, performances

Annexe 5 :

LE CHALLENGE NUTRITIONNEL JEÛNE/ RÉALIMENTATION : UN NOUVEAU MODÈLE D' ÉTUDE DU MÉTABOLISME HÉPATIQUE CHEZ LE CANARD MULARD



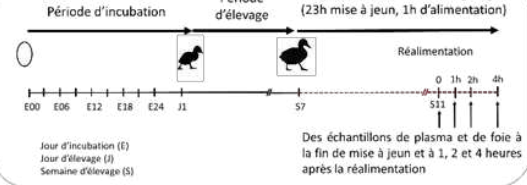
Andrieux Charlotte[1], Biasutti Sandra[2], Michaël Marchand[1], Morisson Mireille[3], Coustham Vincent[1], Panserat Stéphane[1], Houssier Marianne[1]

JRA 2022
9 & 10 Mars

Contexte

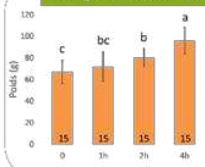
Il est possible lors de la réalimentation des animaux, après une période de mise à jeun, de mesurer les réponses nutritionnelles de différents organes (Palou *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2021). Ces voies métaboliques sont stimulées au niveau du foie chez les volailles (Goldman *et al.*, 1985; Goodridge *et al.*, 1989). Lors du gavage chez les palmipèdes, de nombreuses voies métaboliques sont également stimulées dans le foie (Tavernier *et al.*, 2017; Pioche *et al.*, 2020). Si nous parvenons à montrer que des voies métaboliques hépatiques sont stimulées de façon similaire lors d'une réalimentation et au cours d'un gavage, il sera alors possible de concevoir un protocole simple afin d'étudier des mécanismes d'optimisation de la réponse métabolique hépatique face à un challenge alimentaire, sans avoir à gaver les animaux.

Protocole



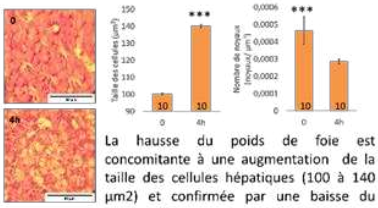
Des échantillons de plasma et de foie à la fin de mise à jeun et à 1, 2 et 4 heures après la réalimentation

La réalimentation engendre une augmentation du poids de foie,



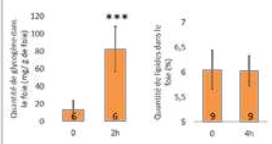
La réalimentation engendre rapidement une augmentation significative du poids de foie visible dès 2h (67 à 80 g).

Un élargissement des hépatocytes,



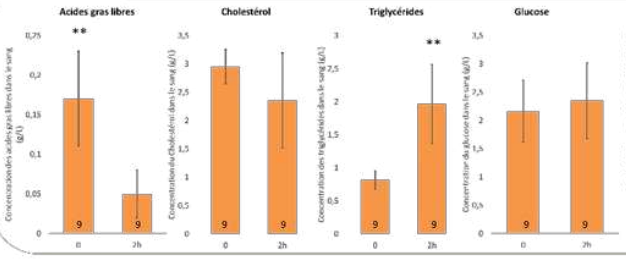
La hausse du poids de foie est concomitante à une augmentation de la taille des cellules hépatiques (100 à 140 µm2) et confirmée par une baisse du nombre de noyaux par unité de surface.

Une augmentation du glycogène et une stabilisation des lipides dans le foie,



Entre 0 et 2h, le glycogène augmente significativement dans les cellules hépatiques, passant de 13 à 82 mg de glycogène/ g de foie (soit de 1,3 % à 8,2 %).
Le taux de lipides dans le foie reste cependant stable après la réalimentation, autour de 6 % (soit de 6,06 et 6,03).

Ainsi qu'une diminution des AGL et une augmentation de TG dans le sang.



Entre 0 et 2h, les acide gras libres (AGL) diminuent significativement, passant de 0,17 à 0,09 g/L. Parallèlement, les triglycérides (TG) augmentent significativement passant de 0,81 à 2,09 g/L.
Les concentrations plasmatiques du glucose et du cholestérol restent stables entre 2,18 et 2,59 g/L et entre 2,95 et 2,35 g/L, quelque soit l'état nutritionnel.

Conclusion

Cette première étude nous a permis de mettre en évidence des réponses rapides du métabolisme hépatique lors du challenge jeûne/ réalimentation chez le canard mulard. Les premières réponses mesurées mettent en évidence une activation du métabolisme glucidique hépatique (hausse de la quantité de glycogène) et une modification des paramètres lipidiques plasmatiques (variations des TG et AGL) . Ces modifications sont aussi observées lorsque les canards sont gavés (Bonnefont *et al.*, 2019). Cette constatation suggère donc que le modèle jeûne/ réalimentation, bien qu'encore largement améliorable, pourrait nous permettre d'accélérer les études d'optimisation de production de foie gras.

Bonnefont, C. M. D., Molette, C., Lavigne, F., Manse, H., Bravo, C., Lo, B., Rémignon, H., Arroyo, J. & Bouillier-Oudot, M. (2019). *Poult. Sci.* **98**, 5724–5733.
Chen, Z., Xing, Y., Fan, X., Tongjun, L., Zhao, M., Liu, L., Hu, X., Cui, H., Geng, T. & Gong, D. (2021). *J. Poult. Sci.*
Goldman, M. J., Back, D. W. & Goodridge, A. G. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 4404–4408.
Goodridge, A. G., Carpenter, W. R., Fisch, J. E., Goldman, M. J., Kameda, K. & Stapleton, S. R. (1989). *Reprod. Nutr. Dev.* **29**, 359–375.
Palou, M., Priego, T., Sánchez, J., Villegas, E., Rodríguez, A. M., Palou, A. & Picó, C. (2008). *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **456**, 825–836.
Pioche, T., Skiba, F., Bernadet, M. D., Seiliez, I., Massimino, W., Houssier, M., Tavernier, A., Ricaud, K., Davail, S., Skiba-Cassy, S. & Gontier, K. (2020). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **21**, 1–9.
Tavernier, A., Ricaud, K., Bernadet, M.-D., Davail, S. & Gontier, K. (2017). *Mol. Cell. Biochem.* **430**, 127–137.
Tavernier, A., Ricaud, K., Bernadet, M.-D., Gontier, K. & Davail, S. (2017). *Mol. Cell. Biochem.* **438**, 111–121.



[1]*Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, INRAE, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Saint Pée sur Nivelle, 64310, France*
[2]*Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, IUT Génie Biologique, 40000 Mont de Marsan, France*
[3]*GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31326 Castanet Tolosan, France*
Charlotte.andrieux@univ-pau.fr

LE CHALLENGE NUTRITIONNEL JEÛNE/ REALIMENTATION : UN NOUVEAU MODELE D'ETUDE DU METABOLISME HEPATIQUE CHEZ LE CANARD MULARD

Andrieux Charlotte[1], Biasutti Sandra[2], Michaël Marchand[1], Morisson Mireille[3], Coustham Vincent[1], Panserat Stéphane[1], Houssier Marianne[1]

[1]Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, INRAE, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Saint Pée sur Nivelle, 64310, France

[2]Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, IUT Génie Biologique, 40000 Mont de Marsan, France

[3]GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31326 Castanet Tolosan, France

charlotte.andrieux@univ-pau.fr

RÉSUMÉ

La réalimentation après une période de mise à jeun stimule de nombreuses voies métaboliques dans le foie de divers animaux. L'utilisation de cette approche chez le canard mulard pourrait être particulièrement intéressante dans l'étude des mécanismes d'optimisation de la production de foie gras. Le challenge alimentaire que représente le gavage pourrait ainsi être remplacé par un protocole de « jeûne/ réalimentation » permettant de mesurer des différences métaboliques au niveau hépatique, lors des phases expérimentales visant à optimiser la réponse métabolique des animaux.

Cette étude porte sur la réponse métabolique hépatique de canards mulard ayant été soumis à une série de jeûne/réalimentation (23h de jeûne/1h de réalimentation quotidienne), pendant 4 semaines. Lors du dernier cycle, 15 canards ont été abattus à la fin de la période de jeûne (0), puis entre 10 et 15 canards après 1, 2 et 4h après la prise alimentaire (1h, 2h, 4h). Des mesures zootechniques, des dosages plasmatiques, et des coupes histologiques de foie ont été réalisées. Nous avons mis en évidence une hausse significative du poids de foie et du contenu en glycogène entre 0 et 2h, ainsi que des variations du cholestérol, des acides gras libres et des triglycérides plasmatiques après réalimentation. En conclusion, il a pu être montré que ce protocole permet de visualiser des réponses rapides du métabolisme énergétique au niveau hépatique chez le canard mulard, confirmant l'intérêt de cette approche comme modèle d'étude dans le contexte de travaux cherchant l'amélioration de la production de foie gras.

ABSTRACT

The fasting refeeding challenge: a new model for the study of hepatic metabolism in mule duck

Refeeding after a fasting period stimulates several liver metabolic pathways in animals. The use of this tool in the mule duck might be interesting to study optimization mechanisms of *foie gras* production. The nutritional challenge represented by the overfeeding could be replaced by a fasting /refeeding protocol. This protocol allows to measure hepatic metabolism differences during trials targeting animal metabolic response optimization.

This study focuses on hepatic metabolism response of mule ducks subjected to a series of fasting/ refeeding cycles (23h of fasting/1h of refeeding), for 4 weeks. At the last cycle, 15 ducks have been slaughtered after the end of the fasting (0), and between 10 and 15 ducks after 1h, 2h and 4h following the refeeding (1h, 2h and 4h). Zootechnical measurements, plasmatic analyzes and liver histological sections have been done. We highlighted a significant increase in liver weight, and glycogen content between 0 and 2h in addition to plasmatic variations of cholesterol, non-esterified fatty acids and triglycerides after refeeding. To conclude, this protocol allows to visualize quick hepatic metabolism responses in the mule duck, confirming the interest of this approach as a study model to improve *foie gras* production.

INTRODUCTION

La réalimentation des animaux, après une période de mise à jeun, permet de mesurer les réponses métaboliques nutritionnelles de différents organes (Palou *et al.*, 2008; Fujita *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2021). Ces deux états nutritionnels engendrent des réponses métaboliques antagonistes. La restriction alimentaire force le métabolisme à puiser dans les réserves énergétiques en hydrolysant le glycogène en glucose, et les triglycérides (TG) en acides gras libres (AGL). *A contrario*, l'alimentation fournit de l'énergie en grande partie sous la forme de glucose qui en cas de surplus peut être stocké dans les adipocytes sous forme de TG et dans le foie sous forme de glycogène chez les mammifères (Palou *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2021). Chez le rat, le foie est le premier organe à répondre au jeûne qui entraine une baisse significative de son poids en quelques heures, parallèlement à une baisse de la lipogenèse et une hausse du catabolisme des lipides et des glucides (Palou *et al.*, 2008). Ces voies de signalisation sont inversées quelques heures après la réalimentation, et le poids de foie revient à son niveau de base.

Ces voies métaboliques sont également stimulées par une réalimentation chez les volailles (Goldman *et al.*, 1985; Krestel-Rickert *et al.*, 1986; Goodridge *et al.*, 1989) et également durant le gavage chez les palmipèdes (Tavernier, Ricaud, Bernadet, Davail *et al.*, 2017; Pioche *et al.*, 2020). Ces animaux migrateurs ont pour particularité de stocker le surplus d'énergie apporté par leur alimentation, essentiellement dans le foie lors de la préparation aux longs voyages. Ils sont donc depuis plus de deux millénaires élevés pour leur capacité à produire du foie gras, dont la méthode de production nécessite aujourd'hui un gavage de deux repas par jour, durant environ 11 jours (Baéza *et al.*, 2013).

Très peu d'études ont mesuré l'ensemble des modifications métaboliques au niveau du foie (en termes de composition, structure et variation d'expression génétique) des palmipèdes, lors d'une réalimentation suivant une période de jeûne. Au contraire, ces modifications métaboliques et structurelles sont particulièrement bien décrites depuis de nombreuses années dans le contexte du gavage (Hermier *et al.*, 2003; Davail *et al.*, 2003; Benard *et al.*, 2006; Théron *et al.*, 2011; Tavernier *et al.*, 2016; Tavernier, Ricaud, Bernadet, Gontier *et al.*, 2017; Tavernier, Ricaud, Bernadet, Davail *et al.*, 2017). Par ailleurs, nous tentons d'optimiser la modulation précoce des voies métaboliques par des manipulations thermiques précoces afin d'améliorer les performances de production de foie gras mais ceci nécessite de gaver les animaux afin de mesurer la réponse physiologique réelle (Massimino *et al.*, 2019, 2021).

Si nous parvenions à montrer que des voies métaboliques hépatiques similaires sont stimulées lors d'une réalimentation suivant une période jeûne, alors il serait possible de concevoir un protocole simple afin d'étudier des mécanismes d'optimisation de la réponse métabolique hépatique face à un challenge alimentaire, sans gaver les animaux. Ceci nous permettrait d'accélérer la compréhension des mécanismes à l'œuvre lors des phases expérimentales. En effet, le challenge alimentaire de jeûne/réalimentation pourrait se réduire à un seul cycle se déroulant donc sur une période courte, et sur un nombre d'animaux réduit (la réponse moléculaire étant moins variable que l'engraissement du foie par gavage). De plus, ce modèle permettrait de respecter pleinement l'objectif de réduction mais également de raffinement (deux des 3R) du bien-être animal nécessaire pour satisfaire la demande sociétale croissante d'éthique en expérimentation animale, par la suppression du gavage lors des phases expérimentales.

Dans cette étude, nous avons donc mesuré les impacts sur la structure, la composition et les voies métaboliques du foie lors d'un challenge jeûne/réalimentation chez le canard mulard.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Conduite d'élevage

Un total de 150 canetons mâles (génotype H85 de la compagnie Grimaud Frères Sélection, Roussay en France) a été élevé en bâtiment chauffé avec un aliment de démarrage *ad libitum* jusqu'à 4 semaines, puis un aliment de croissance *ad libitum* jusqu'à 7 semaines et une alimentation rationnée une heure par jour jusqu'à la fin de l'essai (11 semaines). De la semaine 7 à la semaine 11, les animaux ont été soumis à une série de 26 mises à jeun/ réalimentation. Les consommations quotidiennes ont été déterminées collectivement jusqu'à la fin de l'essai.

A l'âge de 76 jours (11ème semaine), 55 animaux ont été abattus en différents points du cycle de jeûne/réalimentation. Lors de la 27ème mise à jeun, 15 animaux ont été abattus à la fin des 23h de jeûne (0), puis 15 animaux 1h (1h), 2h (2h) et 10 animaux 4h après la fin de la réalimentation (4h), afin d'effectuer des mesures zootechniques et de prélever des échantillons de foie et de plasma.

1.2. Mesures et prélèvements

Les poids de foie ont été pesés à la fin de la dernière période de jeun (0), 1 (1h), 2 (2h) et 4 heures après la dernière réalimentation (4h) pour 10 à 15 canards. Des échantillons de foie ont été collectés à la fin de la période de jeûne puis 4h après la réalimentation pour des analyses histologiques ainsi que du plasma à la fin

de la période de jeûne et 2 heures après la réalimentation et conservés à -20°C.

1.3. Histologie du foie

Les échantillons de foie ont été fixés au formaldéhyde (4 %) pendant 24h, puis déshydratés par des bains successifs d'éthanol de concentration croissante, puis de xylène avant d'être inclus en paraffine. Les coupes de foie sont d'une épaisseur variant de 7 à 10µm et sont réalisées sur des lames KNITELL (rodées 90°C, marge dépolie, x50x76x26mm).
La coloration des coupes a été réalisée en combinant deux méthodes de coloration : PAS (Periodic Acid Schiff) puis HE (Hématoxyline Eosin).
Les mesures de taille cellulaire et de nombre de noyaux par µm² ont été effectuées sur 5 foies provenant d'individus différents pour chacun des groupes. Pour chaque foie, deux lames ont été utilisées pour réaliser entre 4 et 6 comptages (sur chacune des lames) sur des zones différentes. Les statistiques ont été réalisées sur la moyenne des comptages de chacune des lames pour chaque individu, soit 10 mesures pour chaque groupe.

1.4. Dosages plasmatiques

Les plasmas ont été préparés par centrifugation à 2 000 g pendant 10 min à 4°C des sangs collectés à 0 et 2h. Le glucose, les triglycérides, le cholestérol et les acides gras libres ont été quantifiés par la méthode colorimétrique via les kits enzymatiques adéquats (Glucose GOD-POD, SOBIODA ; Triglycerides GPO POD, SOBIODA ; Cholesterol LD M, SOBIODA, NEFA HR2, Wako Richmond, United States).

1.4. Composition énergétique du foie

Les lipides totaux ont été extraits à partir de 1,0 g de tissu de foie, prélevés à 0 et 4h pour les deux traitements, par homogénéisation dans le chloroforme/ méthanol 2 :1 (v/v) et mesurés par gravimétrie en suivant la méthode de Folch (Folch *et al.*, 1957).
Le glycogène présent dans le foie a été mesuré à 0 et 2h. Le glucose libre est mesuré à partir de 100 mg de tissu broyé, puis le glycogène est hydrolysé par du KOH, chauffé à 100°C durant 2h30. Les molécules de glucose libre et de glucose total ont été dosées en utilisant la même méthode que celle du dosage du glucose dans le sang. Le glycogène présent dans le foie correspond à la différence entre le glucose total et le glucose libre, chacun en mg de glucose par g de foie.

1.5. Analyses statistiques

Les données de concentrations plasmatiques, de taille et de nombre de cellules sont comparées à l'aide du test de Student si la normalité et l'homoscédasticité des données sont respectées, sinon un test de Wilcoxon est réalisé. Pour les données de poids de foie, une ANOVA une voie est réalisée. Toutes les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel Rstudio (3.6.2).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. La réalimentation modifie la structure et la composition énergétique du foie

Nous avons mesuré, 4h après la réalimentation, une hausse du poids de foie, passant de 67 g à 96 g (**figure 1**). Cette augmentation est progressive et est visible dès 2h après la réalimentation, ce qui montre la rapidité de la réponse hépatique du canard mulard dans un contexte de challenge alimentaire. Cette hausse de poids est concomitante à une augmentation de la taille des cellules hépatiques, passant de 100 à 140 μm^2 entre 0 et 4h et confirmée par une baisse du nombre de noyaux par unité de surface passant de $4{,}6x10^{-4}$ à $2{,}96x10^{-4}$ entre 0 et 4h (**Figure 2**).

D'après différentes études chez les mammifères ou les volailles, la hausse de poids de foie observée après une période de réalimentation pourrait être attribuée à deux facteurs principaux : une remise en réserve du glycogène mais également à une synthèse de lipides (Goodridge, 1968; Leveille *et al.*, 1975; Donaldson, 1990; De Beer *et al.*, 2007; Palou *et al.*, 2008; Bazhan *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2021).
Pour comprendre à quoi était due la hausse du poids de foie chez nos canards mulards, nous avons donc mesuré le contenu en glycogène et en lipides totaux, 2h et 4h respectivement après la réalimentation. La **Figure 3** nous montre qu'entre 0 et 2h, le glycogène augmente significativement dans les cellules hépatiques, passant de 13 à 82 mg de glycogène/ g de foie (soit de 1,3 % à 8,2 %), tandis que la part des lipides totaux ne varie pas et reste autour de 6,0 % quel que soit le statut alimentaire.

Dans notre étude, la différence de poids de foie après la réalimentation semble donc essentiellement liée à la quantité de glycogène de nouveau stocké dans le foie. Toutefois, une étude réalisée en 2007 chez le poulet a montré que la hausse de la quantité de lipides hépatiques devenait significative près de 12h après la réalimentation (De Beer *et al.*, 2007). D'autres études, plus nombreuses, ont montré que la stimulation de l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse après une réalimentation pouvait avoir lieu bien plus tôt (Donaldson, 1990; Palou *et al.*, 2008; Bazhan *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2021). Ces données suggèrent donc l'existence d'un décalage entre l'activation des

voies métaboliques et la concrétisation par une hausse de la quantité de lipides hépatiques mesurable après une réalimentation. D'autre part, dans notre étude la quantité d'aliments ingérées lors du repas était restreinte, notamment par le temps d'accès à la mangeoire, limité à 1h, limitant d'autant la réponse lipidique hépatique.
Dans l'objectif de mesurer un engraissement du foie dans ce modèle, il serait donc intéressant de tester des conditions de réalimentation plus longues et des prélèvements plus éloignés du jeûne.
Nous projetons également de mesurer l'activation des gènes hépatiques impliqués dans les voies métaboliques de stockage, de catabolisme et de transport au cours du temps après une réalimentation, afin d'avoir une idée précise de la cinétique de réponse à ce challenge alimentaire dans le foie des canards.

2.2. Des biomarqueurs plasmatiques correspondant à la réponse hépatique lipidique

Lors du gavage, la prise alimentaire prolongée entraine une hausse de la production des TG hépatiques, exportés vers les tissus périphériques et entrainant donc une hausse de leur taux plasmatique visible dès le 4ème repas, atteignant les 5 g/L à la fin de la stimulation, parallèlement à une baisse des AGL (Tavernier *et al.*, 2016; Tavernier, Ricaud, Bernadet, Gontier *et al.*, 2017).
Par ailleurs, il a été montré que la réalimentation après une période de jeûne permet aussi la production de TG par le foie pour une redistribution et un stockage vers les tissus périphériques, que ce soit chez les mammifères ou les poulets (Leveille *et al.*, 1975; Palou *et al.*, 2008). Cette activité hépatique permet donc la production et l'exportation des TG, entrainant alors une hausse de leur taux plasmatique, parallèlement à une baisse des AGL.
Nous nous sommes donc intéressés à ces paramètres plasmatiques au cours de notre expérience de jeune/réalimentation chez le canard mulard. Les résultats présentés dans les **Figures 4A et 4B** nous montrent que les AGL diminuent significativement, passant de 0,17 à 0,09 g/L entre 0 et 2h, tandis que les TG augmentent significativement 2h après la réalimentation en atteignant les 2,09 g/L contre 0,81 g/L à la fin de la mise à jeun. Ces résultats confirment donc la modification du métabolisme lipidique hépatique chez le canard suite à une réalimentation, dans des proportions différentes mais une orientation similaire à ce qui est mesuré lors du gavage.
Les taux de glucose (GLU) et de cholestérol (Chol) quant à eux restent stables, autour de 2,3 g/L et 2,65 g/L respectivement, quel que soit le statut alimentaire.

La concentration plasmatique basale du glucose chez les volailles est environ deux fois supérieure à celle des mammifères liée à une meilleure gestion de l'hyperglycémie (Leveille *et al.*, 1975), malgré une réponse à l'insuline exogène normale (Gontier 2013). Au cours de la période de gavage chez les canards mulards, la concentration plasmatique de glucose reste stable entre 2,18 et 2,59 g/L (Berradi *et al.*, 2004). Même s'il a été montré que le glucose plasmatique présente un faible pic de concentration 1 heure après le dernier repas, passant de 2,3 g/L à 2,9 g/L cette différence n'est plus significative dès la deuxième heure suivant ce repas (Tavernier, Ricaud, Bernadet, Davail *et al.*, 2017). Ces données suggèrent que la glycémie élevée du canard, gavé ou non, n'est pas très sensible à l'ingestion d'un repas ou que son adaptation est très rapide et donc rarement mesurée. Nos résultats concernant les taux plasmatiques de glucose à la fin de la période de jeûne et 2h après la réalimentation confirment donc la faible modulation de ce paramètre lors d'un challenge alimentaire (**Figure 4C**).

Enfin, le cholestérol plasmatique semble stable lorsque les animaux sont réalimentés (**Figure 4D**). Au contraire, lors d'un challenge comme le gavage, une hausse significative du cholestérol plasmatique est observée (Hermier *et al.*, 2003; Marie-Etancelin *et al.*, 2011; Massimino *et al.*, 2019). Toutefois, cette hausse a été montrée comme fortement corrélée au poids, et donc à l'engraissement du foie au cours du gavage (Pioche *et al.*, 2020). Il n'est donc pas surprenant de ne pas mesurer de variation de cholestérol plasmatique dans notre étude, n'ayant pas mesuré de variation du taux de lipides hépatiques. Il parait donc indispensable de trouver un modèle de jeûne/réalimentation permettant de mesurer une hausse de la quantité de lipides dans le foie, afin de pouvoir utiliser ce challenge comme un modèle expérimental d'étude des mécanismes métaboliques en œuvre lors du gavage.

CONCLUSION

Cette première étude nous a permis de mettre en évidence des réponses rapides du métabolisme hépatique lors du challenge nutritionnel de jeûne/réalimentation chez le canard mulard. Les premières réponses mesurées mettent en évidence une activation du métabolisme glucidique hépatique, par une hausse de la quantité de glycogène mais également lipidique, par les modulations plasmatiques des TG et AGL.

Lors de la production de foie gras, le gavage induit également une hausse du métabolisme glucidique (synthèse de glycogène) puis lipidique (hausse de la synthèse des lipides) (Lo *et al.*, 2017; Bonnefont *et al.*, 2019). Ces modulations métaboliques sont mesurables également au niveau plasmatique, avec une hausse des TG parallèlement à une baisse des AGL.

Il semble donc que de nombreuses voies métaboliques hépatiques communes soient activées lorsque les canards sont gavés pour la production de foie gras, et lors d'un challenge de jeûne/réalimentation. Cette constatation nous amène donc à suggérer que le modèle jeûne/réalimentation, bien que largement améliorable, pourrait nous permettre d'accélérer les études d'optimisation de production du foie gras. En effet, les expérimentations ayant pour objectif de moduler la réponse métabolique des canards dans l'objectif d'optimiser l'engraissement du foie, nécessitent aujourd'hui de gaver les animaux afin de mesurer la réponse physiologique réelle. Toutefois, si nous parvenions à trouver un protocole de jeûne/ réalimentation qui reproduit le plus fidèlement possible l'activation de ces voies métaboliques (au niveau moléculaire, mais également physiologique avec une hausse du glycogène et des lipides hépatiques), nous pourrions alors tester de nombreuses hypothèses de façons plus rapide et plus éthiquement valorisables.

En conclusion, nous suggérons que le protocole « jeûne/réalimentation » pourrait être utilisé comme modèle expérimental pour étudier les mécanismes mis en jeu lors de la production de foie gras et leur possible optimisation par des mécanismes de programmation métabolique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Baéza, E., Marie-Etancelin, C., Davail, S. & Diot, C. (2013). *Prod. Anim.*

Bazhan, N., Jakovleva, T., Feofanova, N., Denisova, E., Dubinina, A., Sitnikova, N. & Makarova, E. (2019). *Cells*. **8**, 1–18.

De Beer, M., McMurtry, J. P., Brocht, D. M. & Coon, C. N. (2007). *Poult. Sci.* **86**, 1726–1738.

Benard, P. G., Bengone, T., Prehn, D., DURAND, S., Labie, C. & Bernard, P. (2006). *Bull. l'académie Des Vétérinaires Fr.* 43–55.

Berradi, H., Guy, G. & Rideau, N. (2004). *Poult. Sci.* **83**, 161–168.

Bonnefont, C. M. D., Molette, C., Lavigne, F., Manse, H., Bravo, C., Lo, B., Rémignon, H., Arroyo, J. & Bouillier-Oudot, M. (2019). *Poult. Sci.* **98**, 5724–5733.

Chen, Z., Xing, Y., Fan, X., Tongjun, L., Zhao, M., Liu, L., Hu, X., Cui, H., Geng, T. & Gong, D. (2021). *J. Poult. Sci.*

Davail, S., Rideau, N., Guy, G., André, J. M., Hermier, D. & Hoo-Paris, R. (2003). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **134**, 707–715.

Donaldson, W. E. (1990). *Poult. Sci.* **69**, 1183–1187.

Folch, J., Lees, M. & Sloane stanley, G. H. (1957). *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509.

Fujita, S., Yamaguchi, M., Hiramoto, D., Saneyasu, T., Honda, K. & Kamisoyama, H. (2018). *J. Poult. Sci.* **55**, 269–273.

Goldman, M. J., Back, D. W. & Goodridge, A. G. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 4404–4408.

Goodridge, A. G. (1968). *Biochem. J.* **108**, 667–673.

Goodridge, A. G., Carpenter, W. R., Fisch, J. E., Goldman, M. J., Kameda, K. & Stapleton, S. R. (1989). *Reprod. Nutr. Dev.* **29**, 359–375.

Hermier, D., Guy, G., Guillaumin, S., Davail, S., André, J. M. & Hoo-Paris, R. (2003). *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* **135**, 663–675.

Krestel-Rickert, D. H., Baile, C. A. & Buonomo, F. C. (1986). *Physiol. Behav.* **37**, 361–363.

Leveille, G. A., Romsos, D. R., Yeh, Y.-Y. & O'Hea, E. K. (1975). *Poult. Sci.* **54**, 1075–1093.

Lo, B., Marty-gasset, N., Canlet, C., Tremblay-franco, M., Molette, C., Viala, D., Chambon, C. & Bonnefont, C. M. D. (2017). *Douzièmes Journées La Rech. Avic. Palmipèdes à Foie Gras*. 3–7.

Marie-Etancelin, C., Basso, B., Davail, S., Gontier, K., Fernandez, X., Vitezica, Z. G., Bastianelli, D., Baeza, E., Bernadet, M. D., Guy, G., Brun, J. M. & Legarra, A. (2011). *J. Anim. Sci.* **89**, 669–679.

Massimino, W., Andrieux, C., Biasutti, S., Davail, S., Bernadet, M., Pioche, T., Ricaud, K., Gontier, K., Morisson, M., Collin, A., Panserat, S. & Houssier, M. (2021). *Front. Physiol.* **12**, 1–12.

Massimino, W., Davail, S., Bernadet, M., Pioche, T., Ricaud, K., Gontier, K., Manse, H., Morisson, M., Collin, A., Panserat, S. & Houssier, M. (2019). *Fontiers Physiol.* **10**, 1–12.

Palou, M., Priego, T., Sánchez, J., Villegas, E., Rodríguez, A. M., Palou, A. & Picó, C. (2008). *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **456**, 825–836.

Pioche, T., Skiba, F., Bernadet, M. D., Seiliez, I., Massimino, W., Houssier, M., Tavernier, A., Ricaud, K., Davail, S., Skiba-Cassy, S. & Gontier, K. (2020). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **21**, 1–9.

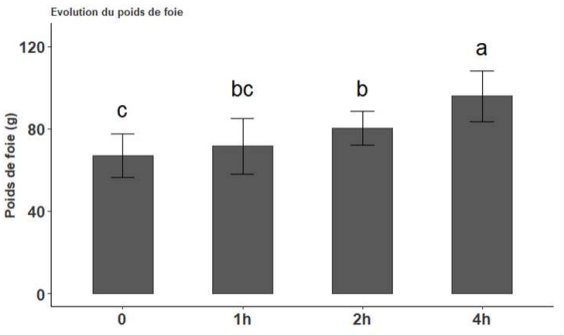
Tavernier, A., Davail, S., Ricaud, K., Bernadet, M.-D. & Gontier, K. (2016). *Mol. Cell. Biochem.* **424**, 147–161.

Tavernier, A., Ricaud, K., Bernadet, M.-D., Davail, S. & Gontier, K. (2017). *Mol. Cell. Biochem.* **430**, 127–137.

Tavernier, A., Ricaud, K., Bernadet, M.-D., Gontier, K. & Davail, S. (2017). *Mol. Cell. Biochem.* **438**, 111–121.

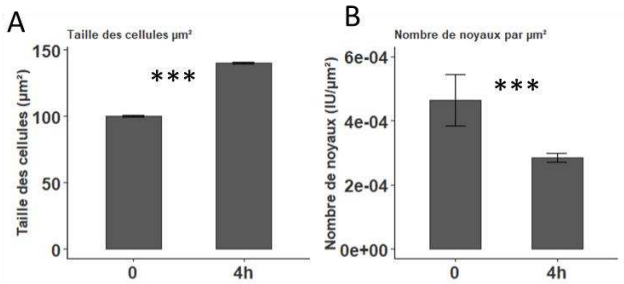
Théron, L., Astruc, T., Bouillier-Oudot, M., Molette, C., Vénien, A., Peyrin, F., Vitezica, Z. G. & Fernandez, X. (2011). *Meat Sci.* **89**, 377–383.

Figure 1 : Evolution du poids de foie en fonction de la mise à jeun et de la réalimentation



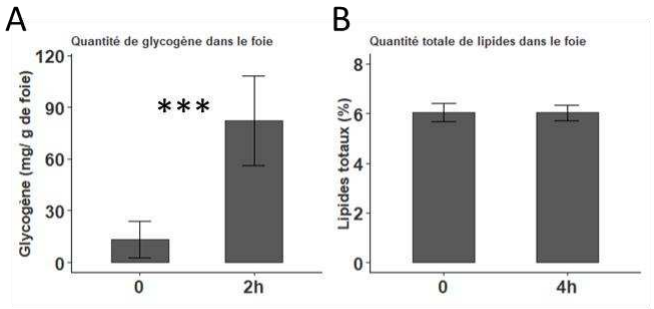
Les poids de foie sont représentés pour chacun des points de prélèvement. Une ANOVA une voie a été réalisée pour comparer les poids de foie entre les quatre prélèvements (n = 15). Les histogrammes avec des lettres différentes sont significativement différents. Entre 0 et 2h, la p value est de 0,01, entre 2 et 4h la p value est de 0,008 et entre 0 et 4h, 1 et 4h les p values sont inférieures à 0,001.

Figure 2 : Evolution du nombre de noyaux (A) et la taille des cellules (B) entre la mise à jeûne et 4 heures après la réalimentation dans le foie



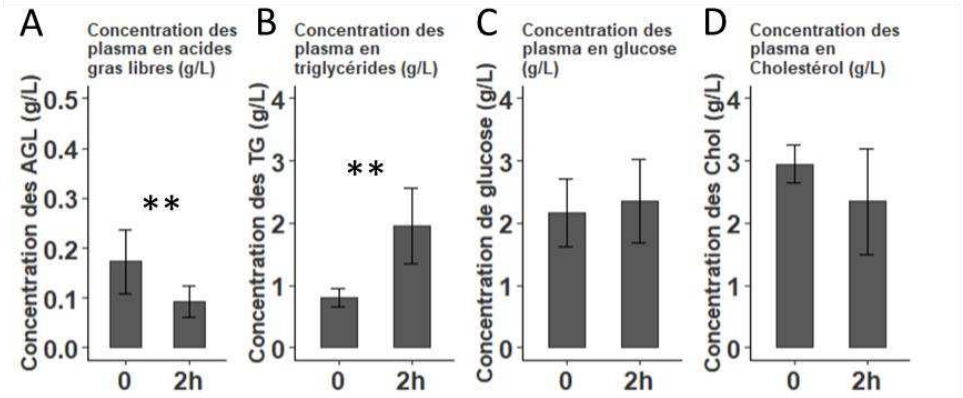
Des tests de student ont été réalisés afin de comparer les deux points de prélèvement (0 et 4h) pour la taille des cellules (n = 10) ainsi que le nombre de noyau (n = 10).

Figure 3 : Caractérisation de la composition énergétique du foie en glycogène à la fin de la période de jeûne et 2 heures après la réalimentation (A) et en lipides totaux 0 et 4 heures après la réalimentation (B)



Des tests de student ont été réalisés pour comparer les deux points de prélèvement, 0 et 2h pour le glycogène (n = 6) et 0 et 4h pour les lipides totaux (n =9).

Figure 4 : Dosages plasmatiques à la fin de la période de jeûne et 2 heures après la réalimentation pour les acides gras libres (A), les triglycérides (B), le glucose (C) et le cholestérol (D)



Des tests de student ont été réalisés pour comparer les deux points de prélèvement (0 et 2h) pour les acides gras libres, les triglycérides, le glucose et le cholestérol (n = 9).

Annexe 6 :

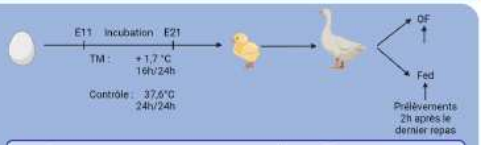
Impact d'une programmation thermique et du gavage sur le muscle pectoral du Canard Mulard

Clara Le Breton, 14 juin 2022

Introduction :

Le canard Mulard est élevé dans la filière française de foie gras et de magret, première productrice mondiale. Cette pratique implique d'avoir recourt au gavage des animaux. Il a été montré qu'une manipulation thermique embryonnaire améliore, au moment du gavage, le métabolisme du foie (Massimino et al. 2021).
Je me suis donc intéressée au cours de ce stage à l'impact d'une manipulation thermique sur le muscle du canard Mulard gavé ou non-gavé.

Design de l'étude :

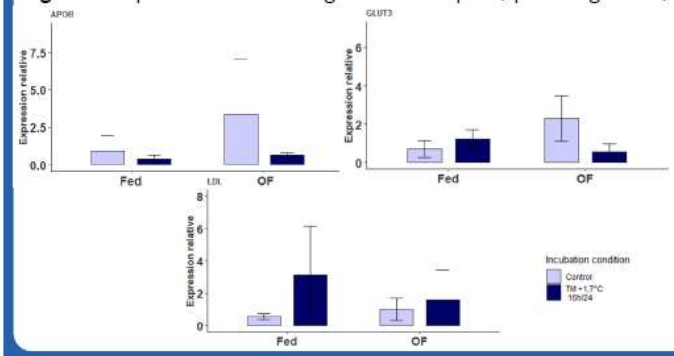


- E : jour embryonnaire
- TM : manipulation thermique
- OF : overfed (gavé)
- Fed : nourris normalement (contrôles)



Résultats:

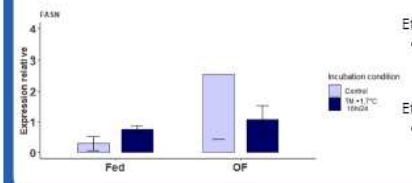
Figure 1 : Expression relative des gènes de transport (lipides et glucides) dans le *Pectoralis Major* (magret) du canard Mulard



Effet TM :
- Augmentation de l'export des triglycérides vers le foie chez les individus contrôles (LDL) (p-value = 0,0014)
- Diminution du captage du glucose après gavage (GLUT3) (p-value = 0,0159)
- Réduction de l'export des triglycérides de la lipogenèse (ApoB) (p-value = 0,00404)

Effet gavage :
- Pas d'effets gavage significatifs

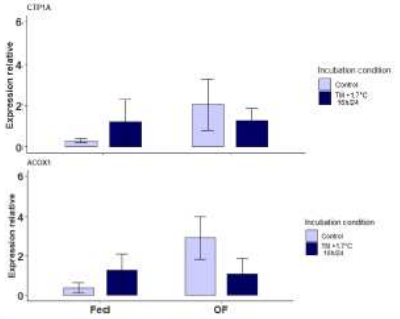
Figure 2 : Expression relative d'un gène de la lipogenèse dans le *Pectoralis Major* du canard Mulard



Effet gavage :
- Augmentation de la lipogenèse (FASN) (p-value = 0,0005759)

Effet TM :
- Diminution de la lipogenèse après gavage (FASN) (p-value = 0,001224)

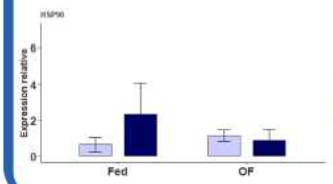
Figure 3 : Expression relative des gènes de l'oxydation des lipides dans le *Pectoralis Major* du canard Mulard



Effet gavage :
- Augmentation de la béta-oxydation des acides gras (CTP1A et ACOX1) (p-value = 0,00708, p-value = 0,000261)

Effet TM :
- pas d'effet sur l'oxydation des lipides

Figure 4 : Expression relative d'un gène de stress dans le *Pectoralis Major* du canard Mulard

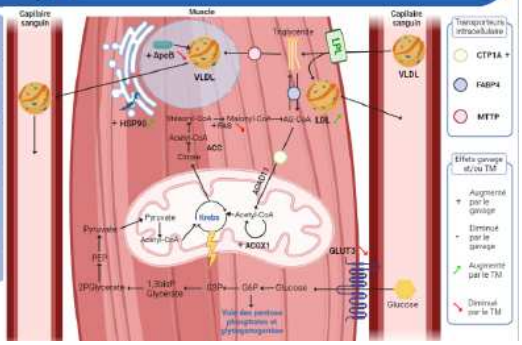


Effet gavage :
- diminution de la réponse au stress chez les individus TM gavés (HSP90) (p-value = 0,016)

Effet TM :
- Augmentation de la réponse au stress chez les individus Fed (HSP90) (p-value = 0,007253)

Conclusion et perspectives :

Le gavage induit une augmentation de la lipogenèse (Chartrin et al., 2006), l'oxydation et l'export des acides-gras dans le muscle. Cet accroissement peut être une forme de réponse face à une arrivée plus importante de lipides et de glucides de la circulation. La manipulation thermique a un effet négatif sur l'entrée du glucose, la lipogenèse (Loyau et al., 2014) et l'export et un effet positif sur le retour des lipides au foie (Tavernier et al., 2017) et le stress (Massimino et al., 2021). L'augmentation du retour vers le foie des lipides s'additionnant à la diminution de la récupération du glucose pourrait induire une baisse de disponibilité des lipides pour faire fonctionner la lipogenèse et l'export des acides gras.
Pour mieux comprendre les rouages du métabolisme lipidique musculaire en situation de gavage ou de manipulation thermique pourraient être fait un dosage des lipides dans le muscle, des activités enzymatiques ou une caractérisation des protéines.



Saez G. (2009), Thèse de Doctorat en Biologie : Université de pau et des Pays de l'Adour (France), 146p.
Chartrin et al. (2006). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, Volume 145, Issue 4, 2006, Pages 413-418
Tavernier et al. Mol Cell Biochem (2017) 424:147–161 DOI 10.1007/s11010-016-2850-7
Massimino et al. Front Physiol, Frontiers., 2021, 12,
Loyau et al. (2014) Thermal Manipulation during . PLoS ONE 9(9): e105339.

Annexe 7 : Congrès IFRG 2022, Abstract soumis

Impacts of Early Thermal Manipulation on Gene Expressions at Hatch in Mule Duck

Charlotte Andrieux[1], Sandra Biasutti[2], Josette Barrieu[3], Philippe Morganx[3], Michaël Marchand[1], Mireille Morisson[4], Vincent Coustham[1], Stéphane Panserat[1], Marianne Houssier[1]

[1]Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, INRAE, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Saint Pée sur Nivelle, 64310, France
[2]Univ Pau & Pays Adour, E2S UPPA, IUT Génie Biologique, 40000 Mont de Marsan, France
[3]INRAE Bordeaux-Aquitaine, UEPFG (Unité Expérimentale Palmipèdes à Foie Gras), Domaine d'Artiguères 1076, route de Haut Mauco, 40280 Benquet, France.
[4]GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31326 Castanet Tolosan, France

***Corresponding Author**:* charlotte.andrieux@univ-pau.fr

Temperature changes during the embryogenesis are well known to modify either thermotolerance of broilers or hepatic metabolism in mule ducks. This study will focus on the impact of the temperature increase (+1°C, 16h/24, from embryonic day 13th to 27th) in mule ducks. We firstly analysed the direct impact of temperature changes during the embryogenesis. One hour after the increase of temperature, relative expressions of genes involved in lipid synthesis, thyroid and inflammation pathways were up-regulated. Heat shock proteins (HSPs) were also significantly stimulated by the thermal manipulation, with up and down regulations depending of the studied HSP gene. These genes were also significantly modified after days of temperature increase, confirming a direct regulation of gene expressions by the thermal manipulation. Indeed, lipid, inflammation, cell proliferation, thyroid and heat shock protein genes were up-regulated at the embryonic days 16th, 20th and 24th. Only one gene involved in epigenetic mechanisms was down-regulated at the embryonic day 20th. In order to test if the thermal manipulation could have a permanent effect later in life, we also analysed gene expressions at hatch, this period corresponding to a critical period for the animals. In relation to the early thermal manipulation, animals presented lower weights at hatch but also lower gene expressions for genes linked to heat shock proteins and thyroid pathway. Moreover, genes involved in lipid metabolism and inflammation were up-regulated. Our results strongly suggest a long-term effect of the early thermal manipulation in ducks. Further studies are now in progress to understand the mechanisms of the observed programming in hatching ducks.

Keywords: Mule duck, thermal manipulation, gene expression, heat shock protein, metabolic programming

RÉSUMÉ

Le développement embryonnaire constitue une période critique de la mise en place et du fonctionnement de l'organisme. Chez les animaux, un stress survenu au cours du développement embryonnaire peut provoquer des changements physiologiques mesurables à plus ou moins long terme, faisant émerger le concept de programmation. Chez le canard mulard, il a pu être récemment montré qu'une modification de la température d'incubation des œufs (MT) engendrait une hausse du poids de foie après la période de gavage avec pour certaines conditions des effets néfastes, comme une augmentation du taux de fonte ou encore une baisse de l'éclosabilité.

Suite à l'observation d'effets non désirés chez les canards programmés après la période de gavage, nous nous sommes concentrés sur une même hausse de température d'incubation, sur six **nouvelles fenêtres de MT (Article 1)**, dont quatre **ont permis de maintenir les performances du groupe contrôle en sortie d'éclosoir.** Cette même étude a également pu mettre en avant qu'**il existait des périodes critiques (E9-E19 et E10-E20)** pendant lesquelles un stress environnemental engendrait de fortes mortalités. Finalement, pour l'essai concernant l'optimisation de la méthode, la fenêtre E11-E21 a été conservée pour tester deux hausses de température d'incubation pour l'étude suivante.

Après avoir observé des impacts de la MT en sortie d'éclosoir, nous nous sommes intéressés aux potentiels impacts de la MT à plus long terme, à partir de deux challenges nutritionnels et des nouvelles MT créées. Le **challenge mise à jeun/réalimentation** nous a permis de montrer qu'**il est possible de mesurer une programmation métabolique du foie, sans avoir à gaver les animaux (Article 2).** Effectivement, nous avons mesurés des réponses transcriptionnelles des métabolismes lipidique et glucidique spécifiquement modulées chez les animaux programmés. Suite à ce premier challenge, **le gavage** a été réalisé montrant, une nouvelle fois, une **hausse du poids de foie chez les canards programmés** (+ 1,7°C 16h/24 E11-E21) par rapport au groupe contrôle (**Article 3**).

Deux cinétiques embryonnaires (horaire et journalière) ont permis de **suivre les modulations directes des gènes impliqués dans le mécanisme de la programmation**, avec une modulation d'environ 10 % des gènes mesurés dans l'heure suivant le stimulus thermique (8 gènes sur 78). Cette proportion a augmenté les jours suivants, toujours pendant la MT (12 gènes sur 80), et une mémorisation du stress est observée trois jours après l'arrêt de la MT (7 gènes sur 80). Deux études préliminaires ont **corrélé la chémérine et un endocannabinoïde avec une hausse du poids du foie**. De plus, l'endocannabinoïde **AEA semble être suffisamment discriminant pour différencier le groupe programmé** présentant un engraissement plus important que le groupe contrôle après gavage.

Nos travaux ont permis de confirmer que la MT avait un impact sur le court et long terme, en modifiant les réponses métaboliques et la composition et structure du foie après le gavage. Parallèlement, nous avons aussi montré que la plupart de ces modifications pouvaient être prévisualisées grâce au challenge nutritionnel mise à jeun/réalimentation. Ce modèle pourrait donc permettre d'étudier de façon plus précoce (et sans gavage) la programmation des animaux. Finalement, deux biomarqueurs de la prise de poids du foie ont pu être mis en évidence chez le canard mulard, et l'un d'eux présente du potentiel pour être un marqueur de la programmation.